

博士論文番号：0381030

イネにおけるフラジェリン認識情報の
細胞内伝達機構に関する研究

藤原 沙都姫

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科 細胞間情報学講座

(高山 誠司 教授)

平成 19 年 1 月 29 日提出

所属 (主指導教員)	細胞間情報学講座（高山 誠司 教授）		
氏名	藤原 沙都姫	提出	平成 18 年 12 月 25 日
題目	イネにおけるフラジェリン認識情報の 細胞内伝達機構に関する研究		

自然界には、植物に病気を引き起こす能力を持つ病原菌が多数存在しているが、実際に一つの植物種に感染できる病原菌は数種に限定される。これは、植物が病原菌特有の様々な分子をシグナル分子として認識することによって自己の持つ免疫システムを誘導し、大半の病原菌からの感染を未然に防いでいるからである。

単子葉植物を宿主とする植物病原細菌 *Acidovorax avenae* の菌株間における宿主特異性は非常に厳密であり、一つの菌株が感染できる植物種はほぼ一種に限定されている。当研究室では、イネと *A. avenae* のイネ親和性、非親和性の菌株を用いて、本菌の宿主特異性決定機構について研究を行ってきた。これまでの研究で、*A. avenae* のイネ非親和性菌株をイネに接種した場合、核 DNA のラダー化や細胞膜収縮といった動物のアポトーシス様の形態変化を伴う過敏感細胞死や、活性酸素の発生、*EL2*、*PAL*、*Cht-1*、*PBZ1*、*LOX* 等の抵抗性遺伝子の発現が誘導されることが示された。一方、イネ親和性菌株をイネに接種した場合にはこのような免疫反応は誘導されないことも明らかとなり、本菌の親和性、非親和性決定にイネによる菌の認識と免疫反応誘導が関与することが示唆された。さらに、このような免疫反応は本菌の鞭毛を構成するタンパク質であるフラジェリンによって引き起こされることも明らかになり、イネは *A. avenae* のフラジェリンを認識して免疫反応を誘導していることが示された。しかしながら、イネがフラジェリンを認識した後の免疫反応誘導に至る情報伝達機構は未だ明らかになっていない。そこで筆者は、イネによるフラジェリン認識後の免疫反応誘導機構を明らかにすることを目的として研究を行った。

まず、フラジェリン認識情報の下流で制御されているイネの遺伝子群を明らかにするために、非親和性菌株接種 1 時間後および未接種のイネ培養細胞より得た mRNA より構築した cDNA ライブラリーから作製したイネ cDNA マイクロアレイを用い、イネ親和性菌株、非親和性菌株および非親和性菌のフラジェリン欠損株をそれぞれ接種したイネ培養細胞の発現プロファイリングを行った。その結果、非親和性菌株特異的に発現誘導される遺伝子群のうち、非親和性菌のフラジェリン欠損株の接種で発現誘導が消失した約 46 遺伝子をフラジェリン認識情報の下流で制御される遺伝子として同定した。これらフラジェリン認識下流遺伝子のうちいくつかの遺伝子の発現パターンを real time RT-PCR により調べたところ、確認したすべての遺伝子が非親和性菌株より精製したフラジェリン処理によって特異的に発現誘導されることが明らかとなり、先のマイクロアレイの結果と一致した。さらに、22K イネオリゴアレイを用いてより網羅的な解析を行ったところ、これら 46 遺伝子を含む約 150 遺伝子をフラジェリン認識の下流に制御される遺伝子として同定することが出来た。

これらフラジェリン認識下流遺伝子の多くは、 Ca^{2+} 結合モチーフである EF-hand を有するタンパク質をコードする遺伝子であったこと、また細胞外 Ca^{2+} キレート剤である EGTA によって *EL2*、*CCD1*、*OsCPK13*、*myb factor*、*ZF1* などの多くのフラジェリン認識下流遺伝子の発現が抑制されることが real-time RT-PCR で確認されたことより、非親和性菌株およびそのフラジェリンの認識シグナル伝達には Ca^{2+} シグナルが関与している可能性が示唆された。そこで、フラジェリン認識によって誘導される免疫反応と細胞内 Ca^{2+} 濃度変化との関連について調べた。非親和性菌株またはそのフラジェリン処理によって誘導される活性酸素発生は、細胞外 Ca^{2+} キレート剤 EGTA や Ca^{2+} チャネル遮断剤 nifedipine 等により阻害された。さらに、staurosporine や K252a といったタンパク質リン酸化阻害剤によっても活性酸素発生が顕著に阻害されることが明らかになった。また、同様に非親和性菌株接種によって誘導される過敏感細胞死も、 Ca^{2+} 阻害剤やタンパク質リン酸化阻害剤によって抑制されることが示された。そこで、免疫反応誘導時のイネ細胞内の Ca^{2+} 動態を調べるために、Yellow Cameleon 3.6 を発現させたイネ培養細胞を用いて経時的に Ca^{2+} 動態の解析を行ったところ、非親和性菌株およびそのフラジェリンを処理したイネ培養細胞では、早期に $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ の顕著な上昇が認められたが、親和性菌株およびそのフラジェリンではこのような濃度変化は認められなかった。この $[\text{Ca}^{2+}]$ 上昇は EGTA 等により阻害されることから、非親和性フラジェリン分子を認識したイネ培養細胞では、細胞外からの Ca^{2+} の流入によって細胞内の Ca^{2+} 濃度上昇が起こっていることが示された。以上の結果から、フラジェリン認識後の免疫反応誘導過程には、 Ca^{2+} シグナリングおよびタンパク質リン酸化プロセスが密接に関与していることが推定される。マイクロアレイ解析によって得られたフラジェリン認識下流遺伝子の中には、いくつかのカルシウム依存性プロテインキナーゼ（CPK）をコードする遺伝子が含まれていた。そこで、次にイネに存在する CPK とフラジェリンシグナルによって誘導される免疫反応との関係に着目して以下の実験を行った。イネに存在する 29 個の CPK すべての発現パターンを *A. avenae* の非親和性菌株と親和性菌株を接種したイネ培養細胞で調べたところ、*OsCPK7*, *8*, *10*, *12*, *13*, *19* が非親和性菌株特異的に発現誘導されることが明らかになった。そこで、これら *OsCPK* がフラジェリンによって誘導される免疫反応に関与するかどうかを調べるため、フラジェリン認識下流遺伝子である *OsWRKY70* のプロモーターにルシフェラーゼ遺伝子を連結したベクターとそれぞれの *OsCPK* 遺伝子をイネプロトプラストで共発現させたところ、*OsCPK8* と *OsCPK13* の過剰発現の場合にのみ *OsWRKY70* の発現が誘導されることが示された。そこで、次に *OsCPK13* をウィルス発現系を用いて *Nicotiana benthamiana* に一過的に過剰発現させたところ、野生株と比較して強い生育阻害が認められた。さらに、この *OsCPK13* を発現した葉に非親和性の *A. avenae* と親和性の *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* を接種したところ、非親和性株だけでなく親和性株の接種によっても強い過敏感細胞死が観察された。

以上の結果から、イネは非親和性菌株のフラジェリンを認識して、ごく早期に細胞内への Ca^{2+} 流入を引き起こし、この細胞内 $[\text{Ca}^{2+}]$ 上昇を受けて *OsCPK13* などのキナーゼが活性化し、これにより活性酸素発生や過敏感細胞死、下流遺伝子の転写が誘導されることが示された。本研究により、高等植物であるイネの免疫反応誘導に関与するフラジェリン下流制御遺伝子群を同定することが出来た。さらに、このフラジェリン認識情報の細胞内伝達には Ca^{2+} シグナルとタンパク質リン酸化が重要であることを示すことが出来た。

目 次

序論	4
第一章 フラジェリン認識情報の下流で制御される イネ遺伝子群の解析	
1-1 序	15
1-2 材料と方法	15
1-3 結果	21
1-4 考察	39
第二章 イネにおけるフラジェリン認識情報の Ca^{2+} シグナルを介した伝達機構	
2-1 序	45
2-2 材料と方法	45
2-3 結果	54
2-4 考察	87
総合考察	97
謝辞	99
参考文献	100
論文目録	117

序 論

イギリスの思想家 Thomas Robert Malthus は 1798 年に主著『人口論：An Essay on the Principle of Population』の中で、「人口は幾何級数的に増加するが、食料生産は算術級数的にしか増加するに過ぎず、この過剰人口による貧困の増大は避けられない」との見解を發表した。この当時の世界人口は約 10 億人であったが、それから約 200 年後の現在、米国勢調査局国連統計の推計によると、地球上の人口は 2006 年末現在、65 億 6440 万人を上回った。また、国連の中位推計によると 2050 年には世界の人口は 90 億人を上回るとも予測されている (UN, World Population Prospects: The 2004 Revision)。中でも発展途上地域での人口増加率は著しく、先進地域の約 1.5 倍以上にも及ぶ。このような爆発的な人口の増加と生活水準の上昇に伴い、世界中で食糧需要や、飼料用穀物の消費量が増加している。一方で、地球温暖化に伴う砂漠化、塩土化の進行、窒素・硫黄酸化物をはじめとする汚染物質による大気・土壌・水圏の汚染の拡大等の地球環境問題は食糧生産においても多大な影響を及ぼすと思われ、今後爆発的な食糧増産は見込めず、近い将来 Malthus の予想したように危機的な食糧不足が訪れることが考えられる。

植物は環境から多くのストレスを受けており、実際に農場で収穫された作物の収量は、最高の条件を整えて栽培したときに予想される最高収量の約 2~3 割程度でしかないとされている (山田, 1999)。このような減収の要因は、細菌、糸状菌、線虫等の感染、昆虫による食害や雑草による栄養分の収奪、干害、塩害、冷害、異常高温、酸性雨、風水害などによる生育阻害など様々である。我が国の農林水産省の統計によると、このような減収要因による 2006 年産水稻の被害面積は 3,966,000 ha、被害量は 1,072,000 トン以上にものぼり、このうち気象被害によるものが約 74%、病虫害によるものが約 24%であったと報告されている。このような現状を考えると、植物病原体による病害の防除を積極的に行うことが将来予測される食糧不足を回避するための一つ的手段となるだろう。しかし、植物の病害防除には有効な農薬が無い場合が多く、環境汚染や人体への影響などの問題から農薬自体の使用が制限される場合もあり、化学物質を使った病害防除が有効な解決法になっていないのが現状である。そこで、植物が持っている植物独自の病害抵抗性機構を人為的に強化するか、遺伝的に病害抵抗性を有する品種を育成することなどが食糧資源の損失を最低限に抑える上で重要となってくる。植物に病害抵抗性を付与するためにはまず、植物が本来有している植物病原菌からの感染を防ぐメカニズムである防御システムに関する詳細な知見を得ることが必要となる。

植物に病気を引き起こす原因としては、伝染性の生物的病原 (病原体) と、非伝染性の環境的病原 (気象的要因、土壌・肥料的要因、化学的要因) とがある。現在、世

界で知られている生物的植物病原体は、糸状菌、細菌、ウイルス、ウイロイド、ファイトプラズマ、リケッチア様微生物、線虫、原虫等であり、これまで糸状菌類が 10,000 種以上、細菌が約 100 種、ウイルスが約 900 種、線虫が約 3,000 種同定されている。これらの植物病原菌によって引き起こされる植物の病気の種類は多種多様であり、その数は我が国だけでも約 6,000 種にのぼる。ところが、一つの植物種に限ってみると、その植物に病気を引き起こすことができる病原菌は一般的に限られている。例えば、地球上に存在する約 10,000 種の植物病原糸状菌のうち、世界的な主要作物であるイネを加害することのできる病原菌は約 50 種で、このうちイネに大きな被害を与えるものは 10 種類にも満たない (Agrios, 1997)。このように、植物は本来、大多数の病原菌に対しては抵抗性を示し、わずかに数種の病原菌種によって被害を受ける。これは、植物は脊椎動物のような抗体反応・食作用などの特殊化された細胞を伴う免疫系を持たないが、植物独自の病原体の認識機構と生体防御システムを有し、植物を取り巻く多くの病原体から身を守っているからである。

植物の病原菌に対する抵抗性は、大きく静的（受動的）抵抗性と動的（能動的）抵抗性に分けられる。静的抵抗性とは、植物が病原菌の感染を受ける前から具備している潜在的な物理的・化学的性質による抵抗性を意味する。例えば、物理的抵抗性には細胞壁の存在、ワックスやクチクラ層による防御等が含まれ、化学的抵抗性には細胞表層や細胞内におけるポリフェノール、配糖体、サポニン等の抗菌性成分の蓄積等が挙げられる。一方、動的抵抗性とは、植物細胞・組織が微生物等の外敵の攻撃に対して積極的に誘導する一連の防御反応を意味する。高等植物の動的抵抗性は病原菌を認識した後に誘導され、それぞれ活性酸素の生成とそれに伴う過敏感反応の開始、ファイトアレキシンの蓄積、防御応答性関連遺伝子群の発現誘導、PR (pathogenesis-related) タンパク質の合成などの防御反応が含まれる。近年、植物が病原体を認識し、誘導する生体防御システム（動的抵抗性）は、哺乳類の免疫システムの中で自然免疫と共通性が高いことが明らかになり、植物においてもこのような動的抵抗性を植物免疫 (plant innate immunity) と称されるようになった。

高等植物の有する免疫反応の中で、極めて早い段階に認められる応答は、活性酸素種の一過的な発生である。この活性酸素の発生は急激な酸素消費を伴うことから一般に、オキシダティブバーストと呼ばれている。植物のオキシダティブバーストで発生する活性酸素種としてはスーパーオキシド (O_2^-)、過酸化水素 (H_2O_2)、ヒドロキシラジカル ($\cdot OH$) および一重項酸素 (1O_2) 等の極めて反応性の強い分子種である。活性酸素種の増加は、直接的な殺菌作用 (Peng and Kuc, 1992; Iwano *et al.*, 2002)、細胞壁でのヒドロキシプロリンに富む糖タンパク質の酸化的架橋反応の促進 (Bradley *et al.*, 1992)、PR タンパク質を誘導するサリチル酸生合成経路の活性化 (Léon *et al.*, 1995) などにより、病原菌の侵入阻害に関与することが示されている (吉岡ら, 2004)。オ

キシダティブバーストは植物の免疫反応以外でも認められ、アブシジン酸制御の気孔の開鎖 (Pei *et al.*, 2000)、傷害応答 (Orozco-Cárdenas *et al.*, 2001)、根のオーキシンによる走重力成長 (Joo *et al.*, 2001) や毛根形成 (Rental *et al.*, 2004) などの生理現象の誘導に関わっていることも知られている。このようなオキシダティブバーストは、主に細胞膜に存在する NADPH (reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) オキシダーゼの活性化より起こると考えられている (Doke, 1983; Murphy *et al.*, 1996; Desikan *et al.*, 1996)。病原菌認識によって誘導されるオキシダティブバーストを NADPH オキシダーゼの阻害剤である DPI で阻害すると、PR タンパク質遺伝子の発現等のさまざまな免疫反応も阻害されることから (Yoshioka, *et al.*, 2001)、オキシダティブバーストによって生成する一過的な活性酸素発生がその後に続く、抵抗性遺伝子発現や過敏感細胞死等の免疫反応を誘導するシグナルになっていることを示唆している。また、局所的に発生した活性酸素は、感染部位から離れた組織にもオキシダティブバーストを誘導し、全身的な抵抗性の付与にも関与することが知られている (Doke, 1983; Park *et al.*, 1998)。病原菌の感染に対して、このオキシダティブバーストが起こるか否かが、植物と病原菌間の罹病性 (親和性) か抵抗性 (非親和性) かを決定する鍵となっていることが知られているが、オキシダティブバーストそのものの機構や意義、抵抗性を誘導する機構などについては、まだ限られた知見しか得られていない。

NADPH オキシダーゼについては動物の生体防御に関与する食細胞の系において研究が進んでおり、多くの知見が得られている。動物の食細胞における NADPH オキシダーゼは複数のタンパク質からなる複合酵素系であり、細胞膜に存在するシトクロム b_{558} ($gp91^{phox}$, $p22^{phox}$) と細胞質因子 ($p67^{phox}$, $p47^{phox}$, $Rac2$) から構成されている。この酵素は、細胞質因子である $p47^{phox}$ がある種の刺激に応答してリン酸化され、 $p67^{phox}$ 、 $Rac2$ と共に細胞膜に移行した後、細胞膜因子と複合体を形成して活性化する。活性化した NADPH オキシダーゼは、細胞質の NADPH の酸化と共役して、細胞外の酸素分子 (O_2) を 1 電子還元してスーパーオキシド (O_2^-) を生成する。食細胞は微生物をエンドサイトーシスによって取り込み (食作用)、それにより形成された食胞 (ファゴソーム) の中で、細胞膜上の NADPH オキシダーゼにより発生した活性酸素種により殺菌を行っている。このように NADPH オキシダーゼは複数のタンパク質からなる複合体であるが、NADPH から酸素分子へ電子伝達を行うという酵素本体の働きは、膜貫通型タンパク質である $gp91^{phox}$ が担っており、本タンパク質が NADPH オキシダーゼの活性中心であることが知られている。Groom らは 1996 年に、イネのゲノム中にヒト $gp91^{phox}$ と相同な配列が存在することを示し、これを Rboh (respiratory burst oxidase homologue) と命名した (Groom *et al.*, 1996)。その他の活性化因子については、全ゲノム構造が明らかになったイネとシロイヌナズナでは細胞質因子である Rac の

みが存在していることが示されており、イネの OsRac が H_2O_2 の発生を調節していることが形質転換体により証明された (Kawasaki *et al.*, 1999)。その後、*Arabidopsis* (Torres *et al.*, 1998)、ジャガイモ (Yoshioka *et al.*, 2001)、トマト (Amicucci *et al.*, 1999) など様々な植物種から *rboh* 遺伝子がクローニングされ、得られた Rboh の推定アミノ酸配列を比較したところ、ヒト gp91^{phox} と同様に、6 ヶ所の膜貫通領域、FAD (flavin adenine dinucleotide) 結合部位および NADPH 結合部位、電子を受け渡すヘムとの結合に必要な 4 つの保存されたヒスチジン残基が保存されていた。植物の Rboh はまた、その N 末端領域において、ヒト gp91^{phox} とは異なり、細胞質内に局在すると考えられる親水性領域を持っており、さらに Ca^{2+} と特異的に結合する EF-hand モチーフが隣接して 2 ヶ所に認められることが明らかになった。このことは、植物の Rboh は動物と同様に活性酸素の発生に関わっていることを示すと同時に、その活性制御に Ca^{2+} が深く関与していることを示唆している。

Arabidopsis のゲノム解析により、*rboh* 遺伝子には 10 個のパラログが存在することが示されており (Foreman *et al.*, 2003)、それぞれの遺伝子産物は、器官特異的あるいは活性化刺激に対応して役割を分担している可能性が示されている。実際に、*AtrbohC* 遺伝子を欠損した *Arabidopsis* 突然変異体においては、 H_2O_2 から派生したヒドロキシラジカル ($\cdot\text{OH}$) により誘導される Ca^{2+} の流入が阻害され、根毛形成が著しく抑制されることが報告されている (Foreman *et al.*, 2003)。AtrbohD および AtrbohF は、防御応答に関与するだけでなく (Torres *et al.*, 2002)、孔辺細胞においてアブシジン酸投与により誘導されることが示されている (Kwak *et al.*, 2003)。この 2 つをコードする遺伝子を欠損した *Arabidopsis* では、 Ca^{2+} の流入が阻害され、アブシジン酸誘導による気孔閉鎖が抑制される。このことは、Rboh が多岐にわたって Ca^{2+} 流入を制御している可能性を示している。

イネでは、*OsrbohA*、*OsrbohB*、*OsrbohD*、*OsrbohE* の 4 つの Rboh ホモログが存在することが当研究室で明らかにされている (後藤、2002 ; Yoshie *et al.*, 2005)。イネの免疫反応誘導時における、各 *Osrboh* ホモログの発現を real time RT-PCR により調べたところ、*OsrbohA* が強く N1141 菌株接種後に特異的に発現誘導されることが明らかとなった。さらに、これら各 *Osrboh* ホモログを RNAi により特異的に抑制した形質転換体を作製し、免疫反応誘導への関与を調べたところ、*OsrbohA* 抑制株では、免疫誘導物質である N1141 菌株の精製フラジェリン処理後 2 時間をピークとして認められる活性酸素の発生が抑制されており、免疫反応の一つである過敏感細胞死も抑制されていた。さらに、抵抗性遺伝子である *Cht-1* (chitinase-1)、*EL2* の発現が *OsrbohA* 抑制株で抑制されていることが明らかとなった。一方、*OsrbohD* 抑制株では、非親和性菌株接種後 6 時間以降に認められる活性酸素の発生が抑制されており、抵抗性遺伝子である *Cht-1*、*EL2*、*LOX* (lipoxygenase) の発現誘導も抑制されていることが明らかとな

った。このことから、イネの免疫反応誘導には *OsrbohA* と *OsrbohD* が関与していることが示唆される共に、*OsrbohA* と *OsrbohD* によって発生する活性酸素はそれぞれ異なる情報伝達経路に関与し、それぞれの経路は異なる抵抗性遺伝子の発現誘導に関与することが示された (Yoshie *et al.*, 2005)。

植物が示す動的抵抗性として次に、過敏感細胞死が挙げられる。これは非親和性の病原体の侵入を受けた部位で急速に引き起こされる局所的な細胞死であり (Dangl *et al.*, 1996)、肉眼で確認できる免疫反応の指標として古くから知られていた。これまでに、この過敏感細胞死の誘導には、細胞内への Ca^{2+} の流入や (Xu and Heath, 1998; Levine *et al.*, 1996)、活性酸素の発生を必要とし (Levine *et al.*, 1994, Yu *et al.*, 2001)、かつ新規タンパク質の合成を必要とする (He *et al.*, 1993; Heath, 1997; Mould and Heath, 1999; Mansfield *et al.*, 1997) ことが報告されている。さらに、多くの過敏感応答 (HR: hypersensitive response) は原形質の収縮、核の凝集等の動物のアポトーシス様の特徴的な細胞形態変化を伴う場合も報告されていることから、植物の過敏感細胞死はプログラム細胞死 (PCD : programmed cell death) であると考えられている (Che *et al.*, 1999)。

植物の動的抵抗性として次に、様々な抵抗性関連タンパク質の発現誘導があげられる。植物が病原菌を認識した後、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ (PAL : phenylalanine ammonia-lyase)、カフェイン酸デヒドロゲナーゼ等のフェニルプロパノイド合成系酵素やカルコン合成酵素 (CHS : chalcone synthase) 等のイソフラボノイド系ファイトアレキシン合成に関与する遺伝子群の発現誘導と遺伝子産物の蓄積、また、HMG-CoA (3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A) -還元酵素等のテルペン系ファイトアレキシン合成に関与する遺伝子群の発現誘導と遺伝子産物の蓄積などが認められる。さらに、植物細胞は、侵入菌の細胞壁を分解するばかりでなく、侵入菌あるいは自己細胞壁からも植物免疫誘導因子を遊離させるキチナーゼやグルカナーゼ、あるいはその他の PR タンパク質の合成等を誘導して、病原菌の感染から自己を防御する (Dangl *et al.*, 1996; 山田ら、1997)。一般的に、植物が病原菌を認識して示すこのような様々な免疫反応が組織的にかつ同調的に誘導された場合、病原菌はその植物に感染できず非親和性となるのに対し、この様な抵抗性がほとんど誘導されないか、または遅延する場合、病原菌の感染は成立し親和性となる。このことから、免疫反応の誘導は植物と病原菌との間の親和性、非親和性を決定する重要なステップであると考えられる (Yang *et al.*, 1997; Keller *et al.*, 1999)。この様に、植物が病原菌を認識すると様々な免疫反応が誘導されるが、それぞれの免疫反応の意義や誘導機構、それぞれの免疫反応同士の相互関係に関してはほとんど知見が得られておらず、その全体像は未だ理解されていない。しかしながら、過敏感細胞死のような早期に誘導される免疫反応においても、新規のタンパク質合成が必要であることが示されていることから、このような免疫反応誘導には、新規の遺伝子発現が関与していることは間違いなく、非親和

性の病原菌による免疫反応誘導機構について詳細な知見を得るためには、非親和性菌の接種によって早期に誘導される遺伝子群の同定と、その機能解析が重要な手段となり得るであろう。

これまでに植物の免疫反応を誘導する因子が多数見いだされ、エリシターと呼ばれている。元来、エリシターという言葉はファイトアレキシン生成の誘導活性を有する因子を指したが、現在では植物免疫反応を誘導する物質の総称として広く用いられている。病原菌のエリシターには、グルカン、キチン、キチンオリゴマー、キトサンなどの多糖類や、ペプチド、糖ペプチド、脂質、アラキドン酸等多種多様な物質が含まれる。これら多種多様なエリシターには、植物種や品種に関係なく抵抗性を誘導する非特異的エリシターと、特定の植物種や品種のみに認識され抵抗性を誘導する特異的エリシターに大きく分類される (Boller, 1995)。非特異的エリシターとしては、 β -グルカン、あるいはキチンオリゴマーに代表される糖やその誘導体などが多く含まれており、特異的エリシターには、*Cochliobolus victoria* により生産される毒素である victorin や、*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* の *avrXa21*、*Cladosporium fulvum* の *avr9* 等の *avr* (avirulent) gene 産物などのタンパク質性エリシターが含まれる。また、バクテリアの鞭毛を構成するタンパク質であるフラジェリンのように、*Arabidopsis* やトマト等には非特異的なエリシターとして働くが (Felix *et al.*, 1999)、イネに対しては特異的エリシターとして働くといった両方の活性を併せ持つ例も報告されている (Che *et al.*, 2000)。これまでの研究で、これら特異的エリシターと非特異的エリシターは、作用する植物種やその特異性などが異なるものの、共通の情報伝達系を活性化し、同様な免疫反応を誘導することが知られている (Romeis *et al.*, 1999; Nürnberger and Scheel, 2001)。

エリシターによる植物の免疫反応誘導過程において、その最初のステップは植物によるエリシター分子の認識である。これまで、実際にグルカン系エリシターに特異的に結合する受容体がダイズ幼根から精製され、この遺伝子のクローニングに成功している (Umemoto *et al.*, 1997)。さらに、*Arabidopsis* において、植物の認識物質として作用し、免疫反応を誘導するエリシターであるバクテリアのフラジェリンの受容に関与すると思われる受容体型セリン/スレオニンキナーゼ FLS2 (*flagellin-sensitive2*) が単離・同定されている (Gomez-Gomez *et al.*, 1999, 2000)。Boller らのグループは、フラジェリンの N 末端部分の 22 アミノ酸からなる合成ペプチド flg22 が *Arabidopsis* の FLS2 を介して免疫反応を誘導することも報告している (Gomez-Gomez *et al.*, 2001)。バクテリアのフラジェリンは植物だけではなく、動物でも自然免疫の中心的役割を担う TLR (Toll-like receptor) ファミリーに属する TLR5 のリガンドとして作用することが明らかとなっており (Hayashi *et al.*, 2001)、*Arabidopsis* の FLS2 は、動物細胞の TLR と構造的に一部相同性が存在することも報告されている。

動物細胞において広く TLR は、微生物を感知することにより、細菌、真菌、寄生虫、ウィルスなど様々な病原体に対して初期の免疫応答を引き起こし、樹状細胞を始めとする抗原提示細胞の活性化によって獲得免疫を誘導する重要な役割を担っている。ショウジョウバエにおいて真菌感染に対する生体防御反応に必須の受容体である Toll と 相 同 性 を 示 す、これら進化上保持されている受容体は、PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) と呼ばれる微生物病原菌に特異的な、高度に保持された分子構造を認識する。PAMPs は、フラジェリン、バクテリア DNA、二本鎖 RNA ウィルスに加え、リポポリサッカライド (LPS : lipopolysaccharide)、ペプチドグリカン、リポペプチド等の様々な細胞壁構成成分を含む。TLR によりこれら PAMPs の認識が起こると、MyD88、IRAK (IL-1R-associated kinase) を含む細胞内シグナル伝達分子の活性化を引き起こして、転写因子 NF- κ B のリン酸化を促進することにより、炎症性サイトカイン産生を誘導して炎症反応を惹起し、病原体を排除する。TLR は、細胞外領域にタンパク質間相互作用に関わるモチーフであるロイシンリッチリピート (LRR) を持ち、細胞内領域にインターロイキン 1レセプター (IL-1R : interleukin-1 receptor) の細胞内領域と相同性を持つ Toll/IL-1R 相同領域 (TLR ドメイン) と呼ばれる保存領域を有する膜貫通タンパク質である。TLR の各サブファミリーは、認識するリガンドに応じて異なる細胞内局在を示す。TLR1, 2, 4, 6 は、主に細胞膜表面に局在しており、微生物由来の糖脂質成分を認識する。これに対して TLR3, 7, 8, 9 は、主に細胞内部に局在しており、微生物特異的な構造を含む核酸を認識する。今日までに、TLR はヒトでは TLR1 から TLR11 までの 11 種類からなるファミリーを構成しており、それぞれが異なるリガンドを認識することが明らかになっている。まず、TLR4 がグラム陰性細菌の細胞壁構成成分である LPS のシグナル伝達に必要な分子であることが明らかになった。TLR4 は単独で LPS のシグナルを伝えることが出来ず、MD-2 と呼ばれるアクセサリー分子を必要とする。TLR2 は、グラム陽性菌の細胞壁に存在するリポタイコ酸やペプチドグリカンを認識する。また TLR2 は、TLR1 や TLR6 とヘテロダイマーを形成し、細菌のポリペプチドの微細な構造の違いを認識し分ける。TLR3 は、ウィルス由来の二本鎖 RNA の認識に関与し、TLR5 は、バクテリアのフラジェリンを認識する。TLR-9 は、細菌ゲノム DNA に特徴的な配列である、非メチル化 CpG モチーフを認識する。さらに近年、TLR3 や TLR4 に加えて、TLR9 や TLR7, 8 が、ウィルス分子の認識に関わっていることが明らかになってきている。このように、TLR は適切な自然免疫の誘導にとって必要不可欠であり、PAMPs の認識を介して初期免疫応答を活性化するという重要な役割を担っている。

動物細胞において TLR4 により認識され、PAMPs として機能することが知られている LPS は、植物においても広くエリシターとして機能することが知られており (Zeidler *et al.*, 2004)、植物の免疫システムが動物の自然免疫と共通のシステムから進

化したことを示唆している (Dangl and Jones, 2001)。また興味深いことに、植物は、動物と異なり、親和性関係が成立する場合においても、これら分子を認識し、部分的に免疫応答を示すという報告もある (Zeidler *et al.*, 2004; Zipfel *et al.*, 2004)。

植物が自己の持つ受容体を介してエリシターを認識した後、その情報が細胞内に伝達されて様々な免疫反応に関与する遺伝子の転写が活性化されると考えられている。これまで、認識後の情報伝達経路に関してはほとんど明らかになっていなかった。しかし、近年フラジェリンの最も保存されたドメインを基に合成したペプチドである flg22 と、その受容体 FLS2 間での認識情報の伝達機構の研究において大きな進展が見られた。この FLS2 の下流で機能する完全な MAPK (mitogen-activated protein kinases) カスケードおよび、WRKY22 / WRKY29 転写因子の同定が報告されたのである (Asai *et al.*, 2002)。Asai らは、FLS2 によるフラジェリンの認識が、MEKK1 (MAP kinase kinase kinase 1)、MKK4 (MAP kinase kinase 4) / MKK5 および MKK3 / MKK6 で構成される MAPK 情報伝達カスケードの活性化を介して、植物特異的に存在する転写調節因子である WRKY29 や LRR キナーゼである FRK1 (flg22-induced receptor-like kinase 1) の転写を誘導し、糸状菌や細菌に対する抵抗性を誘導すること、さらにこの flg22 により活性化される MAPK カスケードは、H₂O₂ により活性化される MAPK 情報伝達カスケードとは異なること等を報告した。このようなことから、植物は、非親和性菌もしくはフラジェリンの認識後、速やかに認識情報を細胞内に伝達し、その情報に基づいて様々な遺伝子が誘導し、これら誘導された遺伝子によって各免疫反応を制御していることが示唆された。

褐条病細菌 *Acidovorax (Pseudomonas) avenae* は、イネ等の单子葉植物を宿主とするグラム陰性の植物病原細菌であり、感染した植物に葉の褐変や茎の屈曲を引き起こす (Kadota *et al.*, 1991)。本菌は、1909 年に Manns らによってエンバクの葉枯れの原因病原菌として最初に同定され (Manns, 1909)、その後、日本でもイネや、シコクビエ、トウモロコシ、アワ等の单子葉植物から様々な菌株が単離された (Nishiyama *et al.*, 1979; Kadota *et al.*, 1991)。日本における本菌の被害は、主にイネ幼苗で報告されており、イネの重要病害菌のひとつである。本菌に感染したイネは、葉鞘から葉身にかけて褐色の細長い条斑が現れ、個体の衰弱や成長抑制を引き起こしたり、葉鞘が屈曲し、イネの倒伏や枯死を引き起こすなどの病徴を示す (Kadota and Ohuchi, 1990)。近年では、高温、多湿、密播の育苗箱での発生が大きな問題になっている。本菌の特徴は、それぞれの菌株の宿主特異性が植物の種レベルで厳密に規定されており、一つの菌株が感染できる植物種はほぼ一種に限定されていることである。例えば、イネを宿主とする H8301 株および K1 株は、イネには感染できるがイネ以外の植物種には感染できず、また、シコクビエを宿主とする N1141 株はヒエ以外の植物種に感染することはない。当研究室では、この *A. avenae* とイネの間に見られる種間宿主特異性に注目

し、イネに対して親和性、非親和性の菌株を用いて本菌の宿主特異性決定機構について研究を行ってきた。これまでの研究で、*A. avenae* のイネ非親和性菌株をイネに接種した場合、核 DNA のラダー化や、細胞膜収縮といった動物のアポトーシス様の形態変化を伴う過敏感細胞死の誘導や、活性酸素の発生誘導、植物の免疫反応に関与すると考えられている *EL2*、*EL3* (Minami *et al.*, 1996; He *et al.*, 1998)、ファイトアレキシン合成に関与する *PAL*、キチナーゼをコードする *Cht-1*、ジャスモン酸の生成に関与するリポキシゲナーゼをコードする *LOX*、*PBZ-1* (*probenazole-inducible gene-1*) 等の免疫関連遺伝子の発現等が誘導されることが示された。一方、イネ親和性菌株をイネに接種した場合には、このような免疫反応は誘導されないことから、このイネに対する宿主特異性にはイネによる病原菌の認識と免疫反応誘導が関与することが明らかになった (Che *et al.*, 1999; Iwano *et al.*, 2002)。さらに、このような特異的認識に関与する物質の探索を行ったところ、この菌の鞭毛を構成するタンパク質であるフラジェリンが同定された。そこで、このフラジェリン遺伝子をマーカーイクスチェンジ法で破壊した $\Delta fla1141-2$ 株を作成し、解析を行ったところ、 $\Delta fla1141-2$ 株は N1141 野生株接種時に認められるイネ培養細胞の過敏感細胞死や H_2O_2 の発生の誘導、*EL2* や *EL3* 等の抵抗性関連遺伝子の発現を誘導しないことが明らかになり、フラジェリンがイネに対して特異的エリシターとして作用することが明らかとなった (Che *et al.*, 2000)。一方、このフラジェリン欠損株を用いた詳細な抵抗性関連遺伝子の発現解析の結果、 $\Delta fla1141-2$ 株を接種したイネ培養細胞では *PAL* や *Cht-1*、*PBZ-1* をコードする遺伝子の発現誘導は依然認められ、フラジェリン欠損によってこれら遺伝子の発現誘導能は喪失しないことが示された。また、イネ非親和性菌株より精製されたフラジェリンタンパク質をイネ培養細胞に接種した場合、同様に *PAL*、*Cht-1*、*PBZ-1* 遺伝子の発現が誘導されるが、*LOX* 遺伝子の発現は誘導されないことも明らかになった (Tanaka *et al.*, 2003)。このことは、フラジェリンはすべての免疫関連遺伝子の発現を制御しているのではないが、免疫反応誘導に重要なエリシターとして機能していることを示す (吉田, 2000; Tanaka *et al.*, 2003)

前述の通り、*Arabidopsis* ではフラジェリンの N 末端部分から合成された flg22 が FLS2 によって認識され MAP カスケードを介してその情報が伝達される。興味深いことに、*A. avenae* 非親和性菌株のフラジェリンは *Arabidopsis* に対して免疫反応を誘導するが、flg22 はイネに対して顕著な免疫反応を誘導しないことが明らかになっている。さらに、*A. avenae* 非親和性菌株のフラジェリンの様々な部分を大腸菌で発現させ、それぞれのドメインにおける免疫誘導活性を調べたところ、イネと *Arabidopsis* ではフラジェリンの認識部位が異なることが示された (Takai *et al.*, unpublished data)。また、イネにおけるフラジェリンの認識機構についても詳細に検討したところ、イネのフラジェリン認識機構は *Arabidopsis* のそれとは異なるものであることが推察されており、

イネには *Arabidopsis* とは異なるフラジェリンの認識機構とその情報伝達機構が存在することが示されている。しかし、イネが非親和性菌株のフラジェリンを特異的に認識できることは示されているが、その認識と情報の伝達機構、さらに免疫反応誘導の分子機構に関してはほとんど明らかになっていない。そこで本研究では、イネによる *A. avenae* フラジェリン認識後の情報伝達と免疫反応誘導の分子機構を明らかにすることを目的とした。

第一章では、まず、イネによる *A. avenae* 非親和性フラジェリン認識の情報伝達機構に関する情報を得るため、イネが *A. avenae* の非親和性菌株を認識して特異的に発現誘導する遺伝子にはどのようなものがあるのか、また、その中でフラジェリン認識の下流に制御されている遺伝子とはどういったものなのかをイネ cDNA マイクロアレイおよびイネ 22K オリゴマイクロアレイを用いて調べた。得られたマイクロアレイデータからそれぞれの遺伝子の発現プロファイリングを行った結果、フラジェリン認識下流遺伝子として約 150 遺伝子を同定した。そこで、これらフラジェリン認識下流遺伝子のうちいくつかの遺伝子の発現パターンを real time RT-PCR 法によって調べたところ、確認したすべての遺伝子でマイクロアレイと同様の結果を得ることが出来、さらにこれら遺伝子は精製した非親和性菌のフラジェリン接種によっても特異的に発現誘導されることが明らかとなった。これらフラジェリン認識下流遺伝子の多くは、 Ca^{2+} 結合モチーフである EF-hand を有するタンパク質をコードする遺伝子であったこと、また細胞外 Ca^{2+} キレート剤である EGTA (*O,O'*-Bis (2-aminoethyl) ethyleneglycol - *N,N,N',N'*-tetraacetic acid) によって多くのフラジェリン認識下流遺伝子の発現が抑制されることが real time RT-PCR およびマイクロアレイ解析で確認されたことより、非親和性菌株およびそのフラジェリンの認識シグナル伝達には Ca^{2+} シグナルが関与している可能性が示唆された。

第二章では、フラジェリン認識によって誘導される免疫反応と細胞内 Ca^{2+} 濃度変化との関連性について種々のカルシウム阻害剤を用いて調べ、免疫反応誘導時の細胞内 Ca^{2+} 動態の解析を行った。非親和性菌株またはそのフラジェリン接種によって誘導される活性酸素発生は、細胞外 Ca^{2+} キレート剤 EGTA や Ca^{2+} チャンネル遮断剤 nifedipine 等により阻害された。さらに、staurosporine や K252a といったタンパク質リン酸化阻害剤によっても活性酸素発生が顕著に阻害されることが明らかになった。また、同様に非親和性菌株接種によって誘導される過敏感細胞死も、 Ca^{2+} 阻害剤やタンパク質リン酸化阻害剤によって抑制されることが示された。そこで、免疫反応誘導時のイネ細胞内の Ca^{2+} 動態を調べるために、Yellow Cameleon 3.6 を発現させたイネ培養細胞を用いて細胞内 Ca^{2+} 動態の解析を行ったところ、非親和性菌株およびそのフラジェリンを接種したイネ培養細胞では、早期に $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ (cytosolic free Ca^{2+} concentration) の顕著な上昇が認められたが、親和性菌株およびそのフラジェリンではこのような濃度変化

は認められなかった。この $[Ca^{2+}]$ 上昇は EGTA 等により阻害されることから、非親和性フラジェリン分子を認識したイネ培養細胞で認められる細胞内の Ca^{2+} 濃度上昇は、細胞外からの Ca^{2+} の流入によって誘導されていることが示された。このことから、フラジェリン認識後の免疫反応誘導過程には、 Ca^{2+} シグナリングおよびタンパク質リン酸化プロセスが密接に関与していることが推定された。次に、マイクロアレイ解析によって得られたフラジェリン認識下流遺伝子の中には、いくつかのカルシウム依存性プロテインキナーゼ (CPK) をコードする遺伝子が含まれていたことから、イネに存在する CPK とフラジェリンシグナルによって誘導される免疫反応との関係に着目して実験を行った。イネに存在する 29 個の CPK すべての発現パターンを *A. avenae* の非親和性菌株と親和性菌株を接種したイネ培養細胞で調べたところ、*OsCPK7*, *8*, *10*, *12*, *13*, *19* が非親和性菌株特異的に発現誘導されることが明らかになった。そこで、これら *OsCPK* がフラジェリンによって誘導される免疫反応に関与するかどうかを調べるため、フラジェリン応答性遺伝子である *OsWRKY70* のプロモーターにルシフェラーゼ遺伝子を連結したベクターとそれぞれの *OsCPK* 遺伝子をイネプロトプラストで共発現させたところ、*OsCPK8* と *OsCPK13* の過剰発現の場合にのみ *OsWRKY70* の発現が誘導されることが示された。そこで、次に *OsCPK13* をウィルス発現系によって *Nicotiana benthamiana* に一過的に過剰発現させたところ、野生株と比較して強い生育阻害が認められた。さらに、この *OsCPK13* を発現した葉に非親和性の *A. avenae* と親和性の *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* を接種したところ、非親和性株だけでなく親和性株の接種によっても強い HR 様の細胞死が観察された。

以上の結果から、イネは非親和性菌株のフラジェリンを認識して、ごく早期に細胞内への Ca^{2+} 流入を引き起こし、この細胞内 $[Ca^{2+}]$ 上昇を受けて *OsCPK13* などのキナーゼが活性化し、これにより活性酸素発生や過敏感細胞死、下流遺伝子の転写が誘導されることが示された。

本研究によって、イネによる *A. avenae* の認識後の免疫反応誘導に関与するフラジェリンの下流制御遺伝子群を同定することが出来た。さらに、このフラジェリン認識情報のイネ細胞内伝達およびその後の活性酸素の発生、過敏感細胞死の誘導に、 Ca^{2+} シグナルとタンパク質のリン酸化が重要であることを示すことが出来た。

第一章 フラジェリン認識情報の下流で制御される イネ遺伝子群の解析

1-1 序

A. avenae は単子葉植物を宿主とするグラム陰性の植物病原細菌である。本菌の一つの菌株が感染できる植物種はほぼ一種に限定されており、菌株間における宿主特異性は非常に厳密に規定されている。これまでの研究で、*A. avenae* のイネ非親和性菌株をイネに接種した場合、核 DNA のラダー化や細胞膜収縮といった動物のアポトーシス様の特徴的な形態変化を伴う過敏感細胞死や、活性酸素の発生、*EL2*、*PAL*、*Cht-1*、*PBZ1*、*LOX* 等の抵抗性遺伝子の発現が誘導されることが示された。一方、イネ親和性菌をイネに接種した場合にはこのような免疫反応は誘導されないことも明らかとなり、本菌の親和性、非親和性決定にイネによる菌の認識と免疫反応誘導が関与することが示唆された (Che *et al.*, 1999, Iwano *et al.*, 2002)。このような親和性・非親和性決定に関わる菌側物質として、*A. avenae* の鞭毛を構成するタンパク質であるフラジェリンが同定された (Che *et al.*, 2000)。*A. avenae* の両菌株からそれぞれフラジェリンを精製し、イネ培養細胞に対する免疫反応誘導の有無を調べた。その結果、非親和性菌株のフラジェリンをイネ培養細胞に処理した場合は、過敏感細胞死や活性酸素の発生、*EL2*、*PAL*、*Cht-1* の抵抗性遺伝子の発現などの免疫反応を誘導するが、親和性菌株のフラジェリンを処理した場合は、このような反応は誘導されないことも明らかになった。このことから、イネ細胞がフラジェリンを認識することで引き起こす情報伝達カスケードが、免疫反応の誘導と宿主特性の決定に関わる重要なステップであると言える。このような免疫反応誘導におけるフラジェリンの役割とその情報伝達系を解明するに当たり、非親和性菌特異的または非親和性菌のフラジェリン特異的に発現誘導される遺伝子を広く知ることが有用な手掛かりとなる。そこで、第一章では、網羅的な遺伝子発現解析が可能なツールであるマイクロアレイを用いて、イネによるフラジェリンの認識後の情報伝達系を明らかにすることを目的として解析を行った。

1-2 材料と方法

本論文において、DW (Distilled Water) は基本的に高温滅菌処理した Milli-Q 水を用いた。ただし、細菌培養のための培地作成には蒸留水を、マイクロアレイ実験には UF (Ultra Filtrated) 水を用いた。また、文中に特に記載のない化学薬品は、和光純薬もしくはナカライテスクの製品を使用した。遺伝子工学用酵素は特に記載のない限り

Takara の製品を使用した。

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 (Baba *et al.*, 1986)。培養細胞は R2S 培地 (39.6 mM KNO₃, 2.5mM (NH₄)₂SO₄, 1.0 mM MgSO₄·7H₂O, 1.0 mM CaCl₂·2H₂O, 1.7 mM NaH₂PO₄·2H₂O, 20.1 μM EDTA·2Na (DOJINDO) , 19.8 μM FeSO₄·7H₂O, 6.6 μM MnSO₄·4H₂O, 7.7 μM ZnSO₄·4H₂O, 0.5 μM CuSO₄·5H₂O, 48.5 μM H₃BO₃, 0.6 μM NaMoO₄·2H₂O, 1% [w/v] Murashige and Skoog vitamin powder, 18 μM 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 87.6 mM sucrose, pH 5.6) を用い、100 ml 容三角フラスコ内で 30℃、108 rpm、連続光下で振盪培養を行った。細胞は一週間ごとに植え継ぎ、継代から 4 日目のものを実験に用いた。

細菌とその保存・培養条件

植物病原細菌として、イネから単離された *Acidovorax avenae* K1 菌株 (MAFF 301755; イネ親和性) (Fukumoto *et al.*, 1997)、およびシコクビエから単離された N1141 菌株 (MAFF 301141; イネ非親和性) (Che *et al.*, 2000; Kadota *et al.*, 1996) を用いた。また、N1141 フラジェリン欠損株 (Δ fla1141-2) は当研究室の吉田によって作成されたものを使用した (吉田, 2000)。本フラジェリン欠損株は、*A. avenae* のフラジェリンをコードしている *FlaA* 遺伝子の内部に tetracycline 耐性遺伝子を挿入してこの遺伝子を破壊したインサクションミュータントである (Che *et al.*, 2000)。菌体は Pseudomonas agar F (DIFCO, U.S.A.) プレート上で 30℃、一晩培養し、プレート 2 枚分に相当する菌をスキムミルク培地 (10% [w/v] skim milk powder, 1.5% [w/v] L-glutamic acid monosodium salt) 1 ml に懸濁して-80℃で凍結保存し、これをストック菌株とした。

イネ培養細胞への接種

A. avenae のストック菌株 10 μl を Pseudomonas F 培地 (1% [w/v] Bacto Tryptone (DIFCO) , 1% [w/v] Protease Peptone No. 3 (DIFCO) , 0.15% [w/v] di-potassium hydrogenphosphate, 0.15% [w/v] magnesium sulfate) 2 ml に懸濁し、一晩 30℃で振盪培養した。この培養液 100 μl を Pseudomonas agar F プレートに塗抹し、30℃で一晩培養した。この菌体を白金耳で掻き取り滅菌水中に懸濁し、分光光度計により波長 610 nm の吸光度を測定して菌体数を概算した (柘, 1997)。概算後、懸濁液を 1.0×10^7 cfu/μl に調整し、イネ培養細胞へは終濃度 1.0×10^8 cfu/ml になるように接種した。

フラジェリンの精製

A. avenae 菌体からフラジェリンを精製するために、各菌株のストック菌株 100 μl

を LB 培地 500 ml に懸濁し、30℃で 24 時間振盪培養を行った。培養液を 6,000×g、4℃で 20 分の遠心分離によって菌体を回収し、PBS (phosphate buffered saline) 250 ml を加えて再懸濁し、菌体を洗浄した。菌体懸濁液を同条件で再度遠心分離することにより菌体を回収し、フラジェリンバッファー (20 mM Tris-HCl [pH 7.5], 150 mM NaCl) 60 ml に再懸濁した。このフラジェリンバッファー中に懸濁した菌液をワーリングブレンダー (Ultra F Homogenizer HF-93F; TAITEC, Saitama, Japan) で 1 分間×3 回 (途中インターバル 5 分) 剪断化作業を行い、菌体から鞭毛を分離させた。破砕物を 6,000×g、4℃、30 分で遠心分離した後、上清を 16,000×g、4℃、1 時間で遠心分離を行い、菌体やその破砕物を沈殿物として除いた。この上清を 20,000×g、4℃、1 時間の超遠心を行い、ペレットとしてフラジェリンを回収した。フラジェリンは滅菌水 1 ml に懸濁し-80℃にて凍結保存した。タンパク質の定量は BIO-RAD protein assay-kit (BIO-RAD Laboratories, CA, USA) (Bradford, 1976) を用いて行った。概算後、アッセイには精製フラジェリンをイネ培養細胞へ終濃度 15 µg/µl になるように処理した。

Total RNA の精製と cDNA ライブラリーの構築

N1141 菌株接種 (1.0×10^8 cfu/ml) 1 時間後のイネ培養細胞、および非接種のイネ培養細胞より、それぞれ ISOGEN (Nippongene, Tokyo, Japan) を用いて total RNA を精製した。次に、精製した total RNA から Oligotex-dT30^{super} mRNA Purification kit (TaKaRa, Kyoto, Japan) を用いて Poly(A)⁺RNA を調整した。これを添付のプロトコールに従い、ZAPII-cDNA synthesis kit (Stratagene, LaJolla, CA, U.S.A.) を用いて、それぞれ Oc-N1 および Oc-N0 の 2 つの cDNA ライブラリーを構築した。ライブラリーのファージ液を大腸菌 XL1-Blue MRF' を混合することにより *in vivo excision* を行った。得られたファージミド液を感染用大腸菌 SOLR と混合し、得られたコロニーより M13R プライマーを用いてランダムシーケンスを行い、得られたそれぞれの配列データを FASTA アルゴリズムを用いて相同性解析を行い、重複のない単一クローンのみのデータベースを GENETIX-PDB ver. 3.0 を用いて構築し、GenBank/EMBL のデータを元に個々のクローンについて相同性解析により予測される遺伝子機能をデータベースに加えた。

cDNA マイクロアレイの作製

それぞれの cDNA ライブラリーより得られた重複のない 3,353 の cDNA クローンより、インサートを増幅するためにベクター側の配列より作成したプライマー (pBCSK-F; 5'-GTAATACGACTCACTATAGGGC-3', pBCSK-R; 5'-TCATTAGGCACC CCAGGCTTTACAC-3') を用いて PCR 反応を行った。得られた PCR 産物は 1.5% TAE agarose ゲルにて電気泳動することにより増幅を確認した後、イソプロパノール沈殿

を行った。DNA は濃度が約 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ になるように DW に溶解し、さらに Microarray crosslinking reagent D (Amersham Biotech, Piscataway, NJ, U.S.A.) を加えた。これら DNA 液を 384 well の Bar Coded microplates for microarray (Amersham Biotech) へ移し、Gen III Microarray Spotter (Amersham Biotech) を用いてスライドガラス Microarray slides Type 7 Star (Amersham Biotech) にスポッティングし、マイクロアレイスライドを製作した。

蛍光ラベルプローブ cDNA の合成

イネ培養細胞に *A. avenae* 菌体 (N1141 菌株、K1 菌株、 $\Delta\text{fla1141-2}$ 菌株) 接種もしくは DW を接種後、経時時間ごとに細胞を回収して液体窒素と共に破碎し、ISOGEN (Nippongene, Tokyo, Japan) を用いて total RNA を抽出後、Oligotex-dT30<super> mRNA Purification kit を用いて mRNA を精製した。この mRNA 1 μg より、CyScribe First-Strand cDNA Labelling kit (Amersham Biotech) を用いて、Cy3 もしくは Cy5 標識 cDNA をそれぞれ合成した。この 20 μl の合成 cDNA 溶液に 2 μl の 2.5 M NaOH を加えて 37°C で 15 分間インキュベートすることにより、余剰 mRNA の分解を行い、その後 10 μl の 2 M HEPES を加えて十分に混和して中和した。この CyDye 標識 cDNA プローブを CyScribe GFX Purification Kit (Amersham Biotech) を用いて精製し、さらに Cy3 標識 / Cy5 標識両プローブを Microcon YM-30 (Millipore, Bedford, MA, U.S.A.) に DW 300 μl と共に加え、残液量が 50 μl になるまで、6,500 $\times g$ 、室温で遠心分離操作を行って精製した。

cDNA マイクロアレイのハイブリダイゼーションとスキャンニング・データ解析

50 μl の Cy3 / Cy5 標識 cDNA サンプルに 50 μl の Hybridization buffer (Amersham Biotech)、100 μl の Formamide (Ambion) を加えてピペッティングによりよく混和し、95°C、2 分間の熱変性を行った後、氷上で急冷し、Rehydrate 処理によりプレトリートメントを行ったマイクロアレイスライドガラスと共に、42°C で 12 時間ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーションおよびその後のスライドガラスの洗浄・乾燥には Automated slide Processor (Amersham Biotech) を用いて行った。その後、マイクロアレイスライドは共焦点レーザースキャナー ScanArray 4000XL (GSL Lumonics, Billerica, MA, U.S.A.) およびソフトウェア ScanArray 3.1 を用いて、Cy3、Cy5 の蛍光強度をそれぞれ 10 μm per pixel の解像度でスキャンした。Cy3 および Cy5 の蛍光強度は画像解析ソフト ImaGene version 5.1 (BioDiscovery, Los Angeles, CA, U.S.A.) を用いて定量し、得られた数値データを基に GeneSpring version 5.0 (Silicon Genetics, Redwood, CA, U.S.A.) を用いて統計学的解析を行った。

Real time RT-PCR 法

cDNA マイクロアレイデータの結果検証および、正確かつ迅速・簡便な遺伝子発現解析のために real time RT-PCR による解析を行った。K1 菌株、N1141 菌株、 Δ fla1141-2 菌株、もしくは精製した K1 菌株のフラジェリン、N1141 菌株のフラジェリンそれぞれをイネ培養細胞に接種後、経時時間ごとに細胞を回収した。これらイネ培養細胞から RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いて total RNA の抽出を行った。目的遺伝子の転写産物を 150 bp 前後で PCR 産物として増幅するような目的遺伝子特異的なプライマーをそれぞれ設計した。100 ng の total RNA を鋳型として QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit (QIAGEN) を用いて反応系を MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate (Applied Biosystems, CA, USA) に作成し、ABI PRISM 7000 sequence detection system (Applied Biosystems) にて 50°C 30 分、95°C 15 分、(94°C 15 秒、55°C 30 秒、72°C 1 分) $\times$ 40 サイクルの反応条件で real time RT-PCR 反応を行った。反応終了後、蛍光値によって示される得られた増幅曲線データより、指数関数的増幅域に閾値 (Threshold) を設定し、閾値と増幅曲線が交わる点を Ct 値 (Threshold Cycle) として算出した。1 つのサンプルにつき real time RT-PCR は triplicate で実験を行い、それぞれの平均の Ct 値を用いた。水処理 0 時間後のサンプルより得られた Ct 値をコントロールとして、 $\Delta\Delta$ Ct 法により発現量比の算定を行った。なお、蛍光検出方法にはインターカレーター法 (SYBR Green) を用い、PCR 反応終了後、融解曲線分析を行うことで正しい増幅が行われていることを確認した。

Real time RT-PCR 用プライマー

遺伝子名 (Accession No.)	塩基配列
<i>OsCCD1</i> (AB118091)	forward, 5'-TGTTTCATAGCATCAGGATTCATCA-3' reverse, 5'-TGAGACTACAAATGCGATTGGAA-3'
<i>IAI2</i> (AB118169)	forward, 5'-AGAGCAGCACTCTCTTGGTGATC-3' reverse, 5'-TGCAACAGCAGCAAAGATTCC-3'
<i>WRKY</i> (AB117835)	forward, 5'-TTTCTCTCCTTTGGTTTCGATAGC-3' reverse, 5'-CAAAACCAGGAAAGTGGAGAAGA-3'
<i>EREBP1</i> (AB117844)	forward, 5'-GGCTCCAACAACCTGCTCAGAA-3' reverse, 5'-CCACACTTGACTTGGGTGCTT-3'
<i>OsNAC3</i> (AB118092)	forward, 5'-CTGTGACTGCACCACTGTATA-3' reverse, 5'-TCCAATCTGGAGTAACACTGC-3'
<i>OsNAC4</i> (AB118084)	forward, 5'-TCCTGCCACCATCTGAGATG-3' reverse, 5'-TTGCAGAATCATGCTTGCCAG-3'
<i>OsNAC6</i> (AB117812)	forward, 5'-GACAGAGGAGATGAGGAC-3'

	reverse,	5'-CATGCCACCCGATGCAATTG-3'
<i>OsEDS1</i> (AB118071)	forward,	5'-TAACGCAGGACCGTGCTTC-3'
	reverse,	5'-GGCGCTCAAACCTTGTGCAAGTC-3'
<i>OsCDPK7</i> (AB118094)	forward,	5'-CATCTCTCGGGCCACAAGAA-3'
	reverse,	5'-CATGACGATGTGCACGTATAGCT-3'
<i>myb</i> (AB118162)	forward,	5'-ACGAGCTGCTTGGCAACAG-3'
	reverse,	5'-GTGTGCCACACGTTCTTGATCT-3'
<i>acid phosphate</i> (AB118164)	forward,	5'-CGGCATTAGGCTGTGATTTGA-3'
	reverse,	5'-CAGCACGGTCTCGATGAAGA-3'
<i>blue copper protein</i> (AB118171)	forward,	5'-AGCTGAGTTTCATTGTCTGGAGAT-3'
	reverse,	5'-TCGCCCAAGCGGTGTAGT-3'
<i>zinc finger protein</i> (AB118082)	forward,	5'-AGCGAAGCTTAGCTAGCGGATA-3'
	reverse,	5'-TCCACCGCAATTCACAAAAG-3'
<i>EL2</i> (AB118093)	forward,	5'-TCCGCCCCATCACCAATA-3'
	reverse,	5'-TCAGGTATGGGTGGGCTTGT-3'
<i>Al-induced protein</i> (AB118069)	forward,	5'-AATGGCCTCTCTGGCTACGA-3'
	reverse,	5'-CTCCCCATGAACACGCAGTA-3'

イネ 22K オリゴマイクロアレイによる解析

より網羅的かつ正確な遺伝子発現プロファイリングを行うために、22K のイネオリゴマイクロアレイを用いて解析を行った (Agilent Technologies)。本アレイのプロブは、日本の農業生物資源研究所 (NIAS) による大規模なイネ (ジャポニカ米) cDNA ライブラリーから設計されており、イネゲノムの約 60 % をカバーしていると考えられている。イネ培養細胞に *A. avenae* 菌体 (N1141 菌株、K1 菌株、 Δ fla1141-2 菌株) 接種もしくは DW を接種し、0, 1, 3, 6 時間後に細胞を回収して液体窒素中で破碎し、ISOGEN (Nippongene) を用いて total RNA を抽出した。以降のすべてのマイクロアレイの手順はハイブリダイゼーションキット (Agilent Technologies) を用い、添付のプロトコールに従って行った。500 ng の total RNA より、T7 プロモーター部位のプライマーを用いて cRNA を合成した。合成した cRNA を Cy3 もしくは Cy5 蛍光色素で標識した後、RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いて精製し、240 μ l のターゲットソリューションを作製した。これに 10 μ l の 25 $\times$ フラグメンテーションバッファを加えて、遮光条件下で 60 $^{\circ}$ C、30 分インキュベートした後、プロブ液に 250 μ l の 2 $\times$ ハイブリダイゼーションバッファを加えてフラグメンテーションを停止させた。これを、15,000 rpm で 5 分間遠心操作を行い、上清のプロブ液を、チャンバーベースにセットしたアレイスライド表面にアプライし、チャンバーカバーをセッ

トして密封した後、ハイブリダイゼーションオーブン(Agilent Technologies)内で 60℃、17 時間インキュベートした。ハイブリダイゼーション終了後、アレイスライドを取り出し、洗浄バッファ 1 (6×SSPE, 0.005 % N-Lauroylsarcosine) 中に浸して 37℃で 1 分間攪拌した。次に、洗浄バッファ 2 (0.06×SSPE, 0.005% N-Lauroylsarcosine) 中に 1 分間浸して攪拌した後、洗浄液 3 (Agilent Stabilization and Drying Solution) 中で 37℃、10 秒間攪拌し、スライドガラスを取り出した。乾燥させたアレイスライドは、共焦点レーザースキャナーScanArray4000XL (GSI Lumonics, Billerica, MA, U.S.A.) を用いて Cy3、Cy5 の蛍光強度を解像度 10 μm per pixel でそれぞれ測定し、得られたイメージファイルを元にスポットのシグナル値を定量し、解析に用いた。マイクロアレイデータの解析には、ArrayVision 5.1 (Amersham) および GeneSpring GX 7.3 (Agilent Technologies) を用いた。データは Per Spot and Per Chip: Intensity dependent (LOWESS) Normalization を適用することにより補正を行った。このデータをもとに、少なくとも 1 点以上で $\text{Cy5/Cy3} < 0.5$ 、 $2 < \text{Cy5/Cy3}$ となる遺伝子のみを抽出した後、統計的学手法 (Parametric test, use all available error estimates, *P*-value 0.05、Benjamini and Hochberg False Discovery Rate、Cross-Gene Error Model is active) を用いて各処理間で発現パターンの異なる遺伝子を抽出し、解析を行った。

1-3 結果

1-3-1 イネ cDNA ライブラリーおよび cDNA マイクロアレイの作製

非親和性の病原体が植物と相互作用し、抵抗性反応が誘導される場合、細胞壁構成タンパク質、抗菌性二次代謝産物合成酵素や PR タンパク質と呼ばれる一連の抗菌性タンパク質をコードしている遺伝子などを含む、非常に多くの抵抗性に関わる植物遺伝子の転写量が増減することが知られている (Lamb *et al.*, 1992; van Loon *et al.*, 1994)。そこで、*A. avenae* のイネ非親和性 N1141 菌株、もしくはイネ親和性 K1 菌株を接種後のイネ培養細胞における遺伝子発現プロファイリングを、イネ cDNA マイクロアレイを用いて行い、非親和性相互作用特異的に発現誘導される遺伝子群の同定を試みた。まず、cDNA マイクロアレイチップ作製のため、イネ培養細胞 cDNA データベースの構築を行った。N1141 菌株接種 1 時間後、および非接種のイネ培養細胞より、mRNA を精製し、それぞれ Oc-N1、Oc-N0 の cDNA ライブラリーを作製した。それぞれのライブラリーより、インサート部分を PCR により増幅し、その PCR 産物より得られた 6,816 クローンのランダムシーケンス解析を行った結果、Oc-N1 ライブラリーより 2,662 クローン、Oc-N0 ライブラリーより 2,074 クローン、合計 4,736 クローンの cDNA

塩基配列を得ることが出来た。この配列データを元に、FASTA プログラムを用いて個々の配列同士の相同性を解析し、3,353 の重複のないクローンを得た。このようにして得られた cDNA クローンについて GenBank/EMBL データベースを元に配列の相同性解析により各遺伝子産物の機能予測を行い、イネ cDNA データベースを構築した。これら 3,353 の cDNA クローンを再度 PCR で増幅し、この PCR 産物を Type 7 Star Microarray Slide にデュアルでスポットティングした cDNA マイクロアレイチップを作製し、以降の実験に用いた。

1-3-2 非親和性相互作用特異的に発現誘導される遺伝子の同定

免疫反応誘導時特異的に発現変動する遺伝子を明らかにするために、*A. avenae* のイネ非親和性、親和性菌株を接種したイネ培養細胞における網羅的な遺伝子発現プロファイル解析を作製したイネ cDNA マイクロアレイを用いて行った。非親和性 N1141 菌株、親和性 K1 菌株をイネ培養細胞にそれぞれ接種し、0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6 時間後に回収したそれぞれの細胞から mRNA を精製し、これより Cy5 標識した cDNA プローブを合成した。リファレンスとしては同様に DW 接種後 0.5~6 時間のイネ培養細胞より抽出した mRNA から合成した Cy3 標識 cDNA プローブを用いた。両プローブを混合してアレイチップ上でハイブリダイゼーションを行い、共焦点レーザースキャナー装置を用いてシグナルイメージを検出し、得られたそれぞれのシグナル強度を数値化してデータ解析を行った。なお、すべての解析は少なくとも 4 回の反復実験の平均データを用いて行った。まず、N1141 菌株、K1 菌株を接種したイネ培養細胞間で異なる発現パターンを示す遺伝子について統計的手法 (Wilcoxon-Mann-Whitney test、*P*-value 0.05、Benjamini and Hochberg False Discovery Rate) を用いて解析したところ、178 遺伝子が抽出された。次に、この 178 遺伝子を、非階層的クラスタリングである K-Means クラスタリングにより、近似する経時的な発現パターンによって 9 つのクラスターに分類した。その結果、これらのクラスターの中でも、クラスター 1, 2, 3, 4, 5, 6 には N1141 菌株接種後特異的に発現誘導される計 136 個の遺伝子が含まれており、一方、クラスター 7 および 8 には K1 菌株接種後特異的に発現誘導される計 5 個の遺伝子が含まれていた (Fig. 1)。さらに、クラスター 9 には N1141 菌株接種後特異的に発現抑制される 37 個の遺伝子が含まれていた (Fig. 1)。これらのことから、N1141 菌株接種と K1 菌株接種後に異なる発現パターンを示した 178 遺伝子中、親和性相互作用特異的に発現誘導される遺伝子は 5 遺伝子と非常に少なく、非親和性相互作用 (免疫反応) 特異的に発現変動 (発現上昇もしくは抑制) する遺伝子は、97% の 173 遺伝子であることが明らかになった。これら 172 遺伝子の cDNA クローンの配列から推定される機能分類の比率をイネ cDNA データベース分類比率と比較したところ、転写調

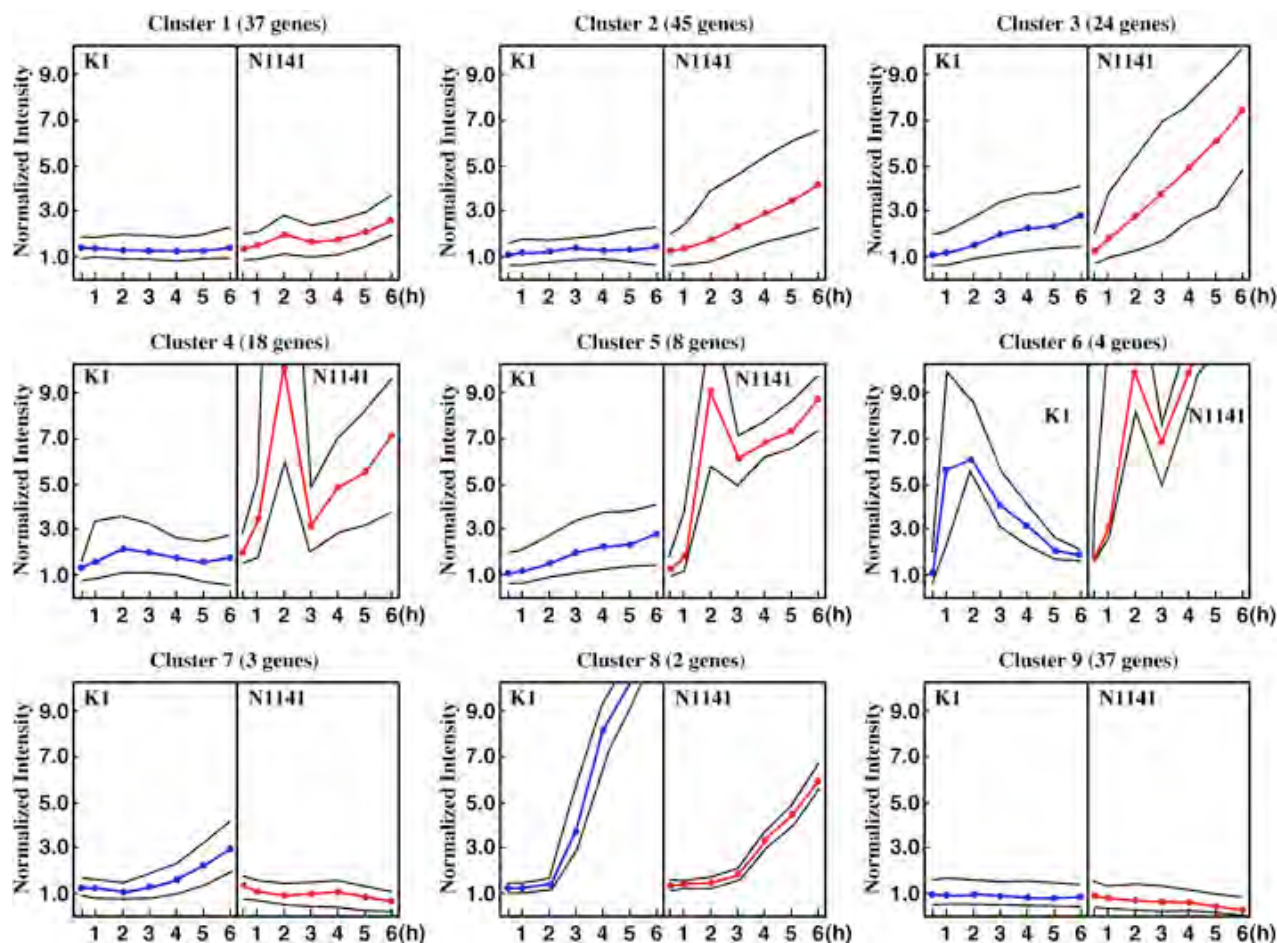


Figure 1. 親和性・非親和性相互作用間で異なる発現を示す遺伝子群のK-means クラスタリング解析

イネcDNAマイクロアレイの結果より得られた、N1141菌株接種とK1菌株接種の間で異なる発現パターンを示した全131遺伝子を非階層的クラスタリングであるK-means clusteringを行い、発現パターンの近似する9つのクラスターに分類した。それぞれのグラフは、クラスターに含まれる遺伝子の中央値の発現パターンを示している。青はK1菌株、赤はN1141菌株をそれぞれ接種した後のイネ培養細胞における遺伝子発現パターンを示す。

節と防御応答に関与する遺伝子の割合が顕著に増加していることが明らかになった (Fujiwara *et al.*, 2004)。非親和性相互作用時特異的に発現誘導される 136 遺伝子は、さらにその発現パターンから、クラスター1, 2, 3 のような N1141 菌株接種後 6 時間までに徐々に上昇する発現パターンを示すグループ (106 遺伝子) と、クラスター4, 5, 6 のような N1141 菌株接種後 2 時間と 6 時間に強く上昇する二相性の発現パターンを示すグループ (30 遺伝子) の、大きく 2 つのグループに分類されることも明らかとなった。

1-3-3 フラジェリン認識情報で発現制御される遺伝子の同定

N1141 菌株の鞭毛構成タンパク質であるフラジェリンは、イネに対して過敏感細胞死や活性酸素の発生といった免疫反応を誘導する特異的エリシターのひとつである。このフラジェリンを欠損させた N1141 菌株である Δ fla1141-2 菌株は、イネに対して過敏感細胞死や活性酸素の発生、抵抗性遺伝子発現等の免疫反応誘導能を失っていることが明らかとなった (Che *et al.*, 2000; Tanaka *et al.*, 2003)。しかし、このフラジェリンがイネの免疫システム情報伝達においてどのような役割を担っているのかは明らかになっていない。そこで、非親和性 N1141 菌株のフラジェリンがイネの免疫反応誘導にどのように関与しているのかを調べるため、 Δ fla1141-2 菌株を接種後 0.5~6 時間のイネ培養細胞より得られた mRNA を用いて、同様に cDNA マイクロアレイにより解析した。1-3-2 の統計的手法を用いて、N1141 菌野生株とフラジェリン欠損株を接種した培養細胞間で経時的に異なる発現パターンを示す遺伝子を抽出した。その結果、N1141 菌株特異的に発現変動する 173 遺伝子のうち、フラジェリン欠損株では 46 遺伝子の発現誘導が低下もしくは遅延していることが明らかになった。なお、これら 46 遺伝子に関しては、配列データを元に BLAST および RAP-DB (Rice Annotation Project Database; <http://rapdb.dna.affrc.go.jp/>) を用いて最新のデータと相同性解析を再度行った。早期に発現誘導される二相性の発現パターンを示すグループのフラジェリン認識下流遺伝子群の中には、イネのカルシウム依存性プロテインキナーゼ (CDPK : calcium dependent protein kinase) である *OsCDPK7* (Saijo *et al.*, 2000, 2001) と塩基配列レベルで 100 %の相同性を示す遺伝子 AB118094 や、*Typhula ishikariensis* 由来のエリシターを接種した小麦より単離された *CCD1* (Takezawa, 2000) と高い相同性を示す遺伝子 AB118091 が含まれていた。このタイプの遺伝子は他にも、*OsNAC3*、*OsNAC4*、zinc finger family protein、myb transcription factor、cytochrome P450 などをコードする遺伝子が含まれており、比較的転写因子をコードすると思われる遺伝子が多いことも示された。また、N1141 菌株接種後、比較的後期に発現誘導されるタイプのフラジェリン認識下流遺伝子群の中には、*OsEDS1* や、calmodulin-like protein、MAP kinase、thioredoxin、

peroxidase、heat shock protein、Aluminum-induced protein、leucine-rich repeat (LRR) protein kinase、calcium-binding EF hand family protein、thaumatin-like protein、phosphate translocator-related protein、MutT/nudix family protein、phosphoenolpyruvate carboxykinase 等をコードする遺伝子が含まれていることが明らかとなった (Table 1)。

cDNA マイクロアレイ解析の結果のまとめ

N1141 菌株と K1 菌株接種の間で発現に差がある遺伝子 (178)		
└─ N1141 菌株接種後に発現 <u>上昇</u> する遺伝子 (136) └─ N1141 菌株接種後に発現 <u>減少</u> する遺伝子 (37) └─ K1 菌株接種後に発現が上昇する遺伝子 (5)	└─ 後期発現誘導型遺伝子 (106) └─ 早期発現誘導型遺伝子 (30)	免疫反応特異的遺伝子 (173) └─ フラジェリン下流遺伝子 (46)

1-3-4 Real time RT-PCR によるフラジェリン認識下流遺伝子の発現解析

マイクロアレイより得られた結果が正しいかどうかを確認するため、フラジェリン認識下流遺伝子 *OsCCD1* (AB118091) および *OsCDPK7* (AB118094)、*OsEDS1* (AB118071)、*OsNAC4* (AB118084)、*OsNAC3* (AB118092)、非フラジェリン認識下流遺伝子 *OsNAC6* (AB117812) の発現パターンを、それぞれの遺伝子に特異的な配列を元に作製したプライマーを用い、real time RT-PCR により解析した。その結果、*OsCCD1* および *OsCDPK7* は共に N1141 菌株接種 2 時間後に強く発現誘導され、また 6 時間後に向かって徐々に発現誘導されるという二相性の発現パターンを示した (Fig. 2)。さらに、 Δ fla1141-2 菌株の接種では、N1141 菌株野生株接種後に認められるこの 2 時間後の発現ピークが認められず、また、K1 菌株接種ではほとんど発現誘導されないことが明らかとなった。この結果は、cDNA マイクロアレイから得られた結果とよく一致した (Fig. 2)。

同様に、*OsEDS1*、*OsNAC4*、*OsNAC3* 遺伝子においても、N1141 菌株接種後に強く発現が誘導されるものの、 Δ fla1141-2 菌株接種では発現が強く抑制されるか、もしくは非常に遅延した発現パターンを示した (Fig. 3)。しかし、非フラジェリン認識下流遺伝子である *OsNAC6* においては、N1141 菌株接種後に認められる発現が、 Δ fla1141-2 菌株接種後で抑制されることはなかった (Fig. 3)。このことは、これら *OsCCD1*、*OsCDPK7*、*OsEDS1*、*OsNAC4*、*OsNAC3* は、確かにフラジェリン欠損株接種で発現誘導が認められなくなる遺伝子であることを示しており、また、今回のマイクロアレイの結果が信頼し得る結果であることも示唆している。

Table 1. フラジェリン下流制御遺伝子

Accession No.	Putative gene identification																					
	BLAST						RAPDB															
	0.5	1	2	3	4	5	6	0.5	1	2	3	4	5	6	0.5	1	2	3	4	5	6	(h)
後期誘導型																						
ABI17882		1.5	1.6	2.4	1.8	2.4	3.5	4.0	1.5	1.4	1.6	1.3	1.7	1.4	1.6	1.5	2.0	2.2	2.0	1.9	1.8	1.8
ABI17889	Clathrin assembly protein		1.8	2.0	2.3	2.1	2.3	3.5	4.5	1.7	1.7	1.6	1.5	1.6	1.8	1.9	1.7	1.9	1.8	1.8	2.0	1.9
ABI17810	Calmodulin-like protein		1.5	1.6	2.2	2.4	2.3	2.6	3.3	1.4	1.2	1.3	1.6	1.9	1.8	1.9	1.3	1.3	1.5	1.5	1.9	2.2
ABI17861	Phosphate translocator-related		1.4	1.3	1.2	1.6	1.7	2.0	3.0	1.2	1.1	1.0	1.2	1.1	1.2	1.8	1.1	1.1	1.0	1.1	1.4	1.4
ABI17851	Unknown	None																				
ABI17851	MAP kinase protein for Oryza sativa.	Blast and wounding induced mitogen-activated protein kinase	1.0	0.9	1.3	2.3	5.0	6.7	6.2	0.9	1.0	1.0	1.5	2.1	2.0	2.2	0.9	1.0	1.1	1.5	2.1	2.6
ABI17848	Unknown	Protein of unknown function DUF689 family protein	1.0	0.9	1.3	1.3	2.2	3.0	3.1	0.9	0.8	0.8	1.2	1.3	1.2	1.2	0.9	0.9	0.8	1.3	1.6	2.0
ABI17816	Unknown	Conserved hypothetical protein	1.3	1.3	1.7	1.6	2.2	2.6	3.0	1.2	1.1	1.2	1.0	1.3	1.3	1.4	1.3	1.4	1.3	1.5	1.6	2.1
ABI17825	Unknown	Thioredoxin h	1.1	0.9	1.0	1.6	1.9	2.5	3.8	1.1	1.2	1.0	1.1	1.2	1.1	1.2	1.1	0.8	1.0	1.1	1.5	1.8
ABI17811	Unknown	Conserved hypothetical protein	1.2	4.4	2.4	1.7	3.6	3.0	4.5	1.2	1.3	1.4	2.0	1.5	1.5	1.6	1.2	1.3	2.0	2.6	2.2	2.7
ABI17822	Peroxidase	Conserved hypothetical protein	1.4	1.5	2.6	2.6	3.3	4.0	4.1	1.2	1.2	1.0	1.6	1.9	1.8	2.2	1.2	1.3	1.2	1.3	1.5	1.8
ABI17824	Heat shock protein	Peroxidase precursor (EC 1.11.1.7)	1.5	1.6	2.0	2.1	3.0	3.1	3.3	1.5	1.7	1.8	1.7	1.8	1.6	1.9	1.5	1.6	1.9	1.7	1.7	2.0
ABI18078	No Homology	LMW heat shock protein	1.3	1.4	2.4	3.4	5.0	8.3	9.0	1.3	1.4	1.1	2.0	3.1	4.2	4.5	1.3	1.2	1.3	1.9	2.1	3.0
ABI18080	Unknown	Zn-induced protein	1.5	1.4	1.4	3.4	3.4	4.7	7.1	1.4	1.3	1.6	2.2	2.9	2.6	3.1	1.4	1.4	1.6	1.9	3.0	2.8
ABI18072	Calcium-binding EF hand family protein	Viral coat and capsid protein family protein	1.4	1.4	2.7	3.0	5.0	6.7	9.0	1.3	1.5	1.4	2.0	2.7	3.6	3.1	1.3	1.3	1.5	1.8	2.1	3.1
ABI18057	No Homology	EF-hand Ca2+-binding protein CCD1	1.3	1.2	1.2	2.3	3.0	4.2	5.0	1.3	1.2	1.4	1.6	1.8	2.5	3.0	1.3	1.2	1.4	1.4	2.1	2.0
ABI18059	Unknown	Mitogen-activated protein kinase kinase 1	1.2	1.0	2.2	3.2	6.3	5.3	6.1	1.2	1.2	1.2	2.6	3.1	2.8	1.8	1.2	1.3	1.4	2.6	3.2	3.6
ABI18061	Unknown	Protein of unknown function DUF1336 domain containing protein	1.2	1.3	1.9	2.8	2.9	6.0	9.9	1.3	1.2	1.4	1.4	1.7	1.4	3.3	1.3	1.7	1.3	1.5	1.7	2.6
ABI18075	Aluminum-induced protein	Phosphoenolpyruvate carboxykinase	1.3	1.5	2.2	2.4	3.7	5.0	7.1	1.2	1.3	1.3	1.7	2.4	3.0	3.2	1.2	1.3	1.3	1.7	1.8	2.3
ABI18060	No Homology	Conserved hypothetical protein	1.1	0.9	1.8	3.0	2.6	3.0	4.1	1.1	0.9	1.2	1.6	1.6	1.6	1.7	1.1	0.9	1.4	1.6	1.9	2.1
ABI18062	Thaumatn like protein (PR-protein)	No hits	1.6	1.5	1.9	3.0	4.6	5.4	9.0	1.6	1.5	1.6	2.1	2.1	2.2	2.9	1.5	1.4	1.5	1.9	2.0	3.0
ABI18063	LRR transmembrane protein kinase	Protein of unknown function DUF581 family protein	1.6	1.5	1.9	2.9	4.4	5.0	8.1	1.5	1.4	1.3	1.9	2.6	2.5	2.4	1.5	1.4	1.3	1.8	1.9	2.1
ABI18065	Unknown	Bacterial blight resistance protein	1.4	1.4	2.0	4.0	4.2	15.2	19.9	1.4	1.3	1.5	2.9	3.7	6.6	9.2	1.3	1.5	1.5	2.3	2.0	4.6
ABI18067	Unknown	Flavin-containing amine oxidase family protein	1.5	1.5	3.1	4.6	8.0	11.1	13.3	1.4	1.4	1.6	3.5	3.1	3.0	3.1	1.5	1.4	1.4	2.5	2.8	3.1
ABI18071	Nicotiana benthamiana EDS1 homolog	Conserved hypothetical protein	1.5	1.5	3.1	4.6	8.0	11.1	13.3	1.4	1.4	1.6	3.5	3.1	3.0	3.1	1.5	1.4	1.4	2.5	2.8	3.1
ABI18073	Unknown	Cytochrome P450 family protein	1.5	2.2	4.8	3.1	16.1	22.6	32.2	1.5	2.3	1.9	2.4	5.1	5.9	6.0	1.6	3.2	1.9	2.9	3.4	8.2
ABI18074	MuT/nudix family protein	Thaumatn, pathogenesis-related family protein	2.1	3.5	7.9	9.1	19.6	21.1	28.1	2.4	2.4	4.2	5.2	6.1	4.3	5.3	2.2	3.4	4.9	7.5	7.1	13.6
早期誘導型		NUDIX hydrolase domain containing protein	1.2	2.0	8.8	10.2	49.2	24.5	87.6	1.1	1.2	2.8	8.3	10.3	15.2	18.8	1.2	1.2	1.5	1.8	3.4	4.2
ABI18086	Unknown	Protein of unknown function DUF584 family protein	1.2	1.4	3.3	2.8	4.3	4.2	7.6	1.3	1.2	1.5	1.4	1.3	1.3	2.1	1.3	1.4	1.6	3.0	2.2	3.2
ABI18095	Zinc finger (C3HC4-type RING finger) protein	Zn-finger, RING domain containing protein	1.6	1.5	6.4	1.8	3.3	3.8	7.1	1.5	1.4	1.5	2.1	1.6	1.6	2.0	1.5	1.5	1.4	1.8	1.6	3.3
ABI18097	Unknown	Conserved hypothetical protein	1.8	1.8	5.3	2.0	1.9	3.4	4.0	1.8	1.6	1.9	1.9	1.6	1.9	2.2	1.9	2.1	2.1	2.2	2.1	3.4
ABI18091	EF-hand Ca2+-binding protein CCD1	EF-hand Ca2+-binding protein CCD1	1.7	2.2	15.3	3.6	8.2	8.6	9.2	1.3	2.0	2.2	3.5	2.5	2.1	2.5	1.9	2.6	3.2	2.8	4.6	7.2
ABI18089	Unknown	Protein of unknown function DUF563 family protein	2.0	2.2	9.1	2.5	4.9	5.9	6.1	1.5	2.0	1.7	2.7	1.9	2.1	2.5	1.8	2.8	1.9	2.7	2.5	5.1
ABI18093	Rice EL2	EL2 protein	2.8	4.6	14.1	4.0	7.1	9.0	9.1	2.6	4.5	3.8	3.2	2.2	2.0	3.3	3.1	4.0	4.5	4.5	3.4	4.4
ABI18094	OsCDPK7	Calcium dependent protein kinase	1.0	1.2	6.3	2.6	5.3	5.4	7.3	1.0	1.3	1.6	2.4	1.8	1.8	2.2	1.1	1.4	1.5	2.0	1.8	2.0
ABI18096	Unknown	Hypothetical protein	3.0	3.6	16.2	4.3	6.2	7.7	10.2	2.7	2.8	4.2	4.6	2.5	1.9	2.1	3.2	3.3	4.0	6.1	5.1	12.3
ABI18092	OsNAC3 protein	OsNAC3 protein	1.6	1.4	5.2	4.8	5.8	6.1	6.2	1.4	1.4	1.9	2.2	2.3	3.1	2.8	1.3	1.6	2.3	2.7	3.1	3.0
ABI18082	Zinc finger (C2H2 type) family protein	Zn-finger, C2H2 type domain containing protein	2.1	3.0	32.0	6.5	16.0	12.0	21.3	1.8	3.8	3.9	4.3	4.0	3.3	3.6	2.0	4.5	6.9	8.8	8.4	11.0
ABI18083	Zinc finger (C2H2 type) family protein	Zn-finger, C2H2 type domain containing protein	1.5	1.5	2.7	1.8	2.5	2.8	3.6	1.4	1.5	1.5	1.7	1.7	1.9	2.2	1.4	1.5	1.4	1.9	2.0	2.0
ABI18084	OsNAC4 protein	No apical meristem (NAM) protein domain containing protein	2.1	2.6	3.2	2.1	3.9	4.2	5.0	1.7	2.0	2.1	2.2	1.8	2.3	2.1	2.0	2.1	2.1	2.0	1.9	2.2
ABI18085	Cytochrome P450	Cytochrome P450 family protein	1.6	1.5	15.2	6.0	5.9	8.2	15.2	1.6	1.4	2.1	3.2	2.5	3.4	4.0	1.6	1.5	3.1	4.6	3.2	6.5
ABI18098	Rice EL2	EL2 protein	2.7	5.0	14.0	4.3	6.9	8.6	8.4	2.7	3.8	3.1	1.8	2.7	2.3	2.9	2.8	4.9	5.3	4.2	3.5	4.1
ABI18163	No Homology	Retinon family protein	3.2	4.2	16.3	6.1	15.5	16.2	19.1	3.1	5.0	5.9	4.3	5.2	3.6	4.0	3.5	7.3	6.8	5.2	7.8	9.8
ABI18161	NAC protein	No apical meristem (NAM) protein	1.4	2.0	7.9	5.2	9.0	8.2	7.5	1.2	1.8	3.3	3.1	2.6	2.2	2.8	1.3	1.9	3.5	3.1	2.8	3.3
ABI18165	DNA-binding protein-related	Protein of unknown function DUF296 domain containing protein	1.3	1.4	8.8	6.4	5.1	9.1	12.1	1.2	1.3	3.2	4.8	3.3	4.0	4.1	1.2	1.6	4.1	3.8	4.2	5.4
ABI18168	Unknown	Zn-finger, RING domain containing protein	1.4	1.6	6.5	4.9	8.5	12.1	15.3	1.3	1.6	2.6	4.1	3.7	2.1	2.4	1.6	1.9	3.0	6.5	6.2	8.3
ABI18167	Unknown	ZIM domain containing protein	1.2	1.3	20.2	15.0	15.2	14.3	16.2	1.2	1.1	1.9	6.5	4.2	2.1	2.9	1.1	1.2	3.1	9.2	8.6	16.2
ABI18162	myb family transcription factor	Myb protein	1.9	1.9	7.5	3.6	8.1	6.5	7.2	1.8	1.7	1.9	2.1	2.4	2.2	2.3	1.8	1.8	2.5	4.2	4.9	6.2

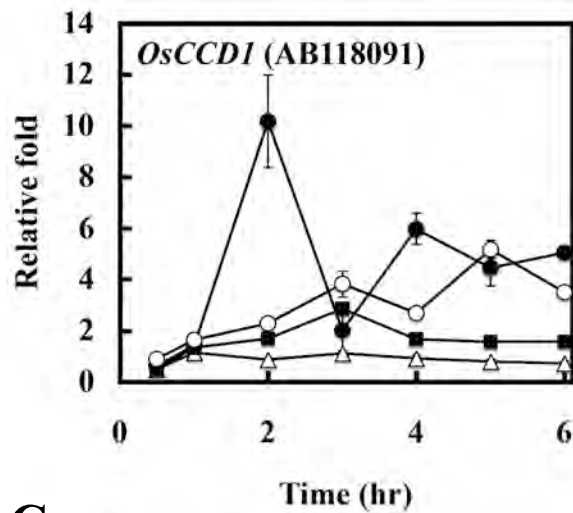
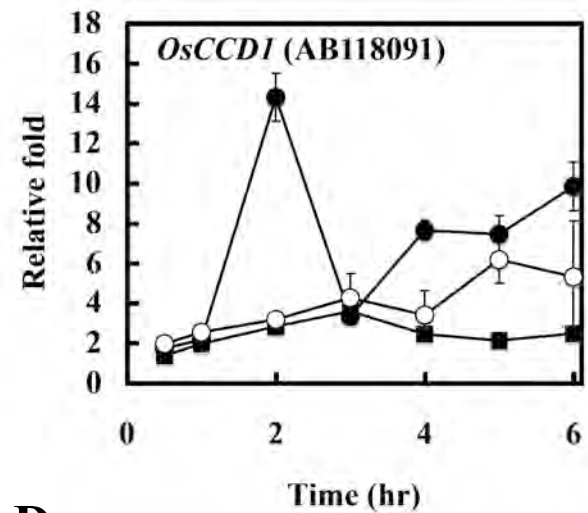
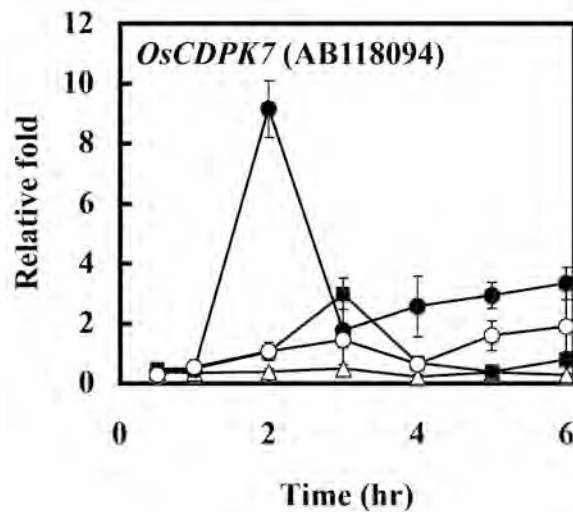
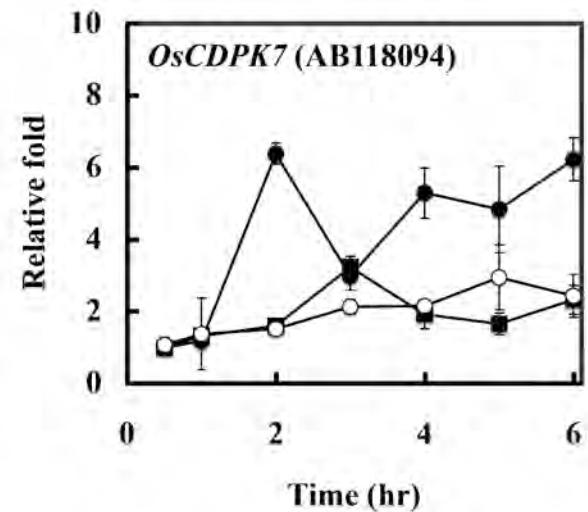
A**B****C****D**

Figure 2. *OsCCD1*および*OsCDPK7*の発現パターン解析

イネcDNAマイクロアレイ解析より同定されたフラジェリン認識の下流に制御される遺伝子である、(A), (B); *OsCCD1* (AB118091)、および(C), (D); *OsCDPK7* (AB118094) の発現パターンを解析した。(A)と(C)はreal time RT-PCRによる発現解析、(B)と(D)はマイクロアレイによる発現解析の結果をそれぞれ示している。イネ培養細胞にそれぞれN1141菌株 (●)、 Δ fla1141-2菌株 (○)、K1菌株 (■)、水 (△) を接種後0.5~6時間の細胞より抽出したtotal RNAを鋳型として用いた。各ポイントにおけるバーは3回繰り返した実験間の標準偏差を表す。

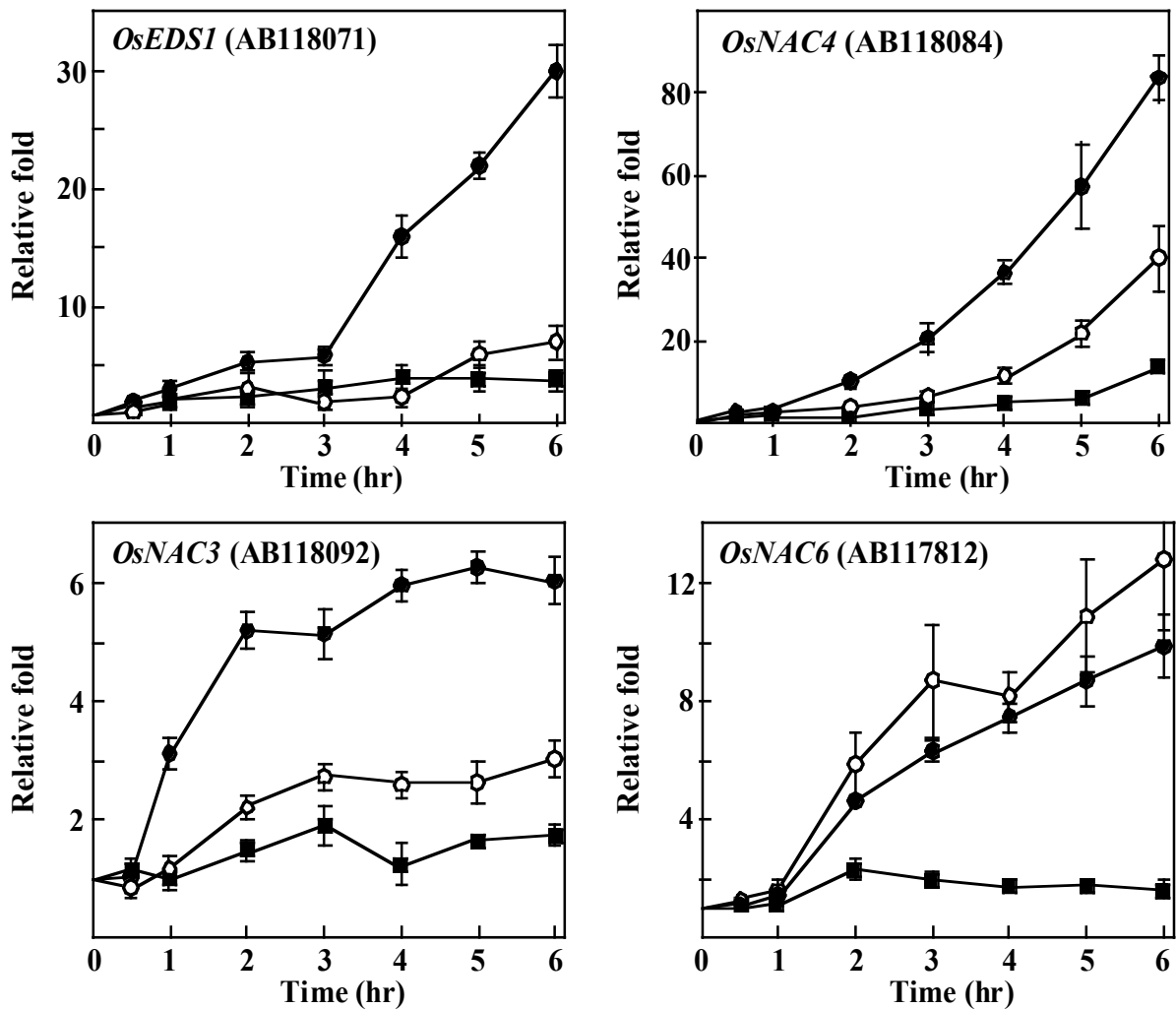


Figure 3. Real time RT-PCRによるマイクロアレイデータの検証

イネcDNAマイクロアレイ解析の結果の確認を行うために、フラジェリン認識の下流制御遺伝子として*OsEDS1* (AB118071)、*OsNAC4* (AB118084)、*OsNAC3* (AB118092)、フラジェリン認識の下流に制御されていない遺伝子として*OsNAC6* (AB117812)の発現パターンを解析した。イネ培養細胞にそれぞれN1141菌株(●)、 Δ fla1141-2菌株(○)、K1菌株(■)を接種後0.5~6時間の細胞より抽出したtotal RNAを鋳型としてreal time RT-PCRにより解析を行った。各ポイントにおけるバーは3回の実験間の標準偏差を表す。

1-3-5 精製フラジェリン処理による遺伝子発現誘導の解析

非親和性のフラジェリン認識の下流に制御されている遺伝子であるならば、菌体より精製したフラジェリン処理によっても、その発現が誘導されると考えられる。そこで、精製したフラジェリンを処理したイネ培養細胞において、これらいくつかのフラジェリン認識下流遺伝子を含む、免疫反応特異的に誘導される遺伝子群の発現パターンを real time RT-PCR により解析した。N1141 菌株もしくは K1 菌株より精製したフラジェリントタンパク質を、終濃度 15 µg/ml (500 nM) でイネ培養細胞に処理し、処理後 0, 0.5, 1, 2, 3, 4.5, 6 時間のイネ培養細胞より total RNA を抽出した。この total RNA を鋳型として用い、フラジェリン認識情報の下流で制御されていると予想される遺伝子 *OsCDPK7* (AB118094)、*OsCCD1* (AB118091)、*OsEDS1* (AB118071)、*OsNAC3* (AB118092)、*OsNAC4* (AB118084)、*myb* (AB118162)、免疫反応特異的遺伝子であるがフラジェリン認識情報の下流で制御されていないと予想される遺伝子 *OsNAC6* (AB117812)、*WRKY* (AB117842)、*WRKY* (AB117835)、*EREBP1* (AB117844)、*EREBP* (AB118068)、*IAI2* (bowman-birk proteinase inhibitor protein, AB118169) に対する配列特異的なプライマーを使って、遺伝子の発現パターン解析を行った。その結果、早期発現型のフラジェリン認識下流遺伝子である *OsCDPK7*、*OsCCD1*、*OsNAC3*、*OsNAC4*、*myb* は、N1141 菌株精製フラジェリン処理時特異的に発現誘導され、二相性の発現パターンを示した (Fig. 4)。また、後期発現型のフラジェリン認識下流遺伝子である *OsEDS1* は N1141 菌株精製フラジェリン処理時特異的に発現誘導され、処理後 6 時間に向けて徐々に誘導される発現パターンを示した (Fig. 4)。これら遺伝子の発現パターンは、N1141 菌体を接種した後の発現パターンとよく一致していることが明らかとなり (Table 1)、これら遺伝子群が確かにフラジェリン認識の下流に制御されていることが示唆された。さらに興味深いことに、 Δ fla1141-2 菌株接種でも N1141 野生株接種と同様に発現誘導される免疫反応特異的遺伝子である *OsNAC6*、*WRKY*、*EREBP*、*IAI2* も、N1141 菌株精製フラジェリン処理によって特異的に発現誘導されることが明らかとなった (Fig. 4)。このことは、非親和性菌のフラジェリンはこれら遺伝子の発現誘導に関与しているが、フラジェリンだけではなくそれ以外の分子もイネに認識されて下流の遺伝子発現誘導に関与していることを示唆している。また、*EREBP1* (*ethylene response element binding protein1*) 遺伝子は N1141 菌株、K1 菌株どちらの精製フラジェリン処理によっても N1141 野生株接種後のような発現誘導は認められなかった。このことは、N1141 菌株に存在するフラジェリン以外の分子が *EREBP1* 遺伝子の発現誘導に関与していることを示唆している。

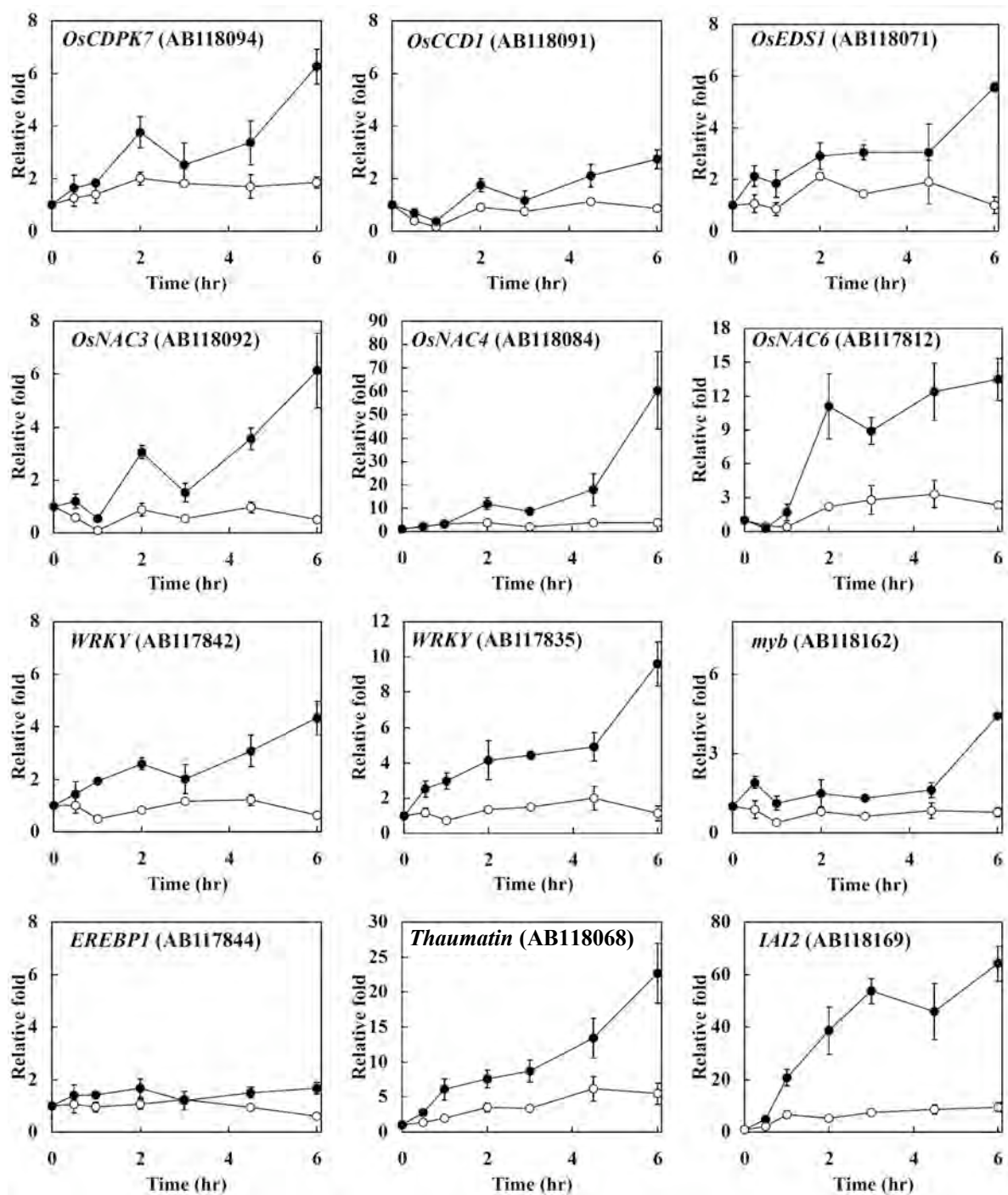


Figure 4. 精製フラジェリン処理による免疫反応関連遺伝子の発現解析

イネ培養細胞にそれぞれN1141菌株フラジェリン (●)、K1菌株フラジェリン (○)を15 $\mu\text{g/ml}$ になるように処理し、0.5~6時間後の細胞より抽出したtotal RNAを鋳型としてreal time RT-PCRによる解析を行った。各ポイントにおけるバーは3回の実験間の標準偏差を表す。フラジェリン下流遺伝子；*OsCDPK7* (AB118094), *OsCCD1* (AB118091), *OsEDS1* (AB118071), *OsNAC3* (AB118092), *OsNAC4* (AB118084), *myb* (AB118162)、免疫反応関連遺伝子；*OsNAC6* (AB117812), *WRKY* (AB117842, AB117835), *EREBP* (AB117844), *Thaumatococcus* (AB118068), *LA12* (AB118169)

1-3-6 22K イネオリゴマイクロアレイによる解析

単子葉植物として初めてイネは、その全塩基配列が 2004 年 12 月に完全解読が終了している。我が国の独立行政法人農業生物資源研究所を中心とした国際共同プロジェクト Rice Annotation Project で、イネのゲノム全塩基配列上に存在する 29,550 の遺伝子の位置を決定し、これをもとにイネの遺伝子数は約 32,000 個であると推定された (<http://rapdb.dna.affrc.go.jp/>, 2007)。この数は、かつて約 50,000 個とも予想された数よりも少なく、ゲノムサイズがイネの約 3 分の 1 である *Arabidopsis* (双子葉植物) の 26,000~27,000 個に比べても極端に大きなものでないことを示していた。本研究により、免疫反応特異的に発現変動する 178 遺伝子と、そのうちのフラジェリン認識の下流で制御されている 46 遺伝子を同定することが出来た。しかし、これまでに用いたイネ cDNA マイクロアレイは、予測されるイネ全遺伝子数から考えると、イネが有する全遺伝子の約 10 %程度であると考えられる。そこで、より広くフラジェリン認識の情報伝達に関わる遺伝子を探索するため、イネ 22 K オリゴマイクロアレイ (60 mer; Agilent Technologies) を用いて解析を行った。本オリゴマイクロアレイは、プローブ長を 60-mer にすることにより高感度を実現し、従来の方法では検出できなかった低発現のイネ遺伝子も検出可能であるという特徴を有している、非常に再現性の高い既成のマイクロアレイである。イネ培養細胞に DW もしくは、N1141 菌株、 Δ fla1141-2 菌株、K1 菌株を 1×10^8 cfu/ml、N1141 菌株より精製したフラジェリン 15 μ l/ml になるように、それぞれ接種または処理し、0, 1, 3, 6 時間後に細胞を回収し、total RNA を抽出して Cy5 で標識した蛍光プローブを合成した。DW 処理のサンプルからも同様に total RNA を抽出して Cy3 で標識した蛍光プローブを調製し、それぞれの菌体接種実験のコントロールとして用いた。ハイブリダイゼーション後、各シグナルの定量化および正規化を行った後、LOWESS メソッドにより得られたデータのノーマライゼーションを行った。免疫反応特異的に発現誘導される遺伝子群を同定するために、N1141 菌株、K1 菌株、 Δ fla1141-2 菌株もしくは精製フラジェリンそれぞれ接種後に、1 点以上で 2 倍以上発現変動した遺伝子を抽出したところ、6,610 遺伝子であることが分かった。さらに、Cross-Gene Error Model 適用後、これら遺伝子群を統計的手法 (Parametric test, use all available error estimates, *P*-value 0.05, Benjamini and Hochberg False Discovery Rate) によって、N1141 菌株接種と K1 菌株接種で発現パターンが異なる遺伝子を抽出したところ、221 遺伝子を得ることが出来た。この 221 遺伝子のうち、N1141 菌株と Δ fla1141-2 菌株とで発現パターンに差のある遺伝子を同様の統計的手法を用いて解析した結果、162 遺伝子を同定することが出来た。また、免疫反応特異的に発現変動する 221 遺伝子のうち、精製フラジェリン処理後に 2 倍以上発現上昇する遺伝子を抽出したところ、138 遺伝子を得ることが出来た。これら野生株と比べ Δ fla1141-2 菌株

接種で発現誘導が抑制される 162 遺伝子と精製フラジェリン処理後に発現誘導される 138 遺伝子は大部分の 117 遺伝子は共通であることも分かった。そこで、この 117 遺伝子をフラジェリン認識の下流で制御されている遺伝子として同定した (Table 2)。これらフラジェリン認識下流遺伝子には、myb factor (AK109011, AK060684, AK111798) や、cytochrome P450 (099925)、peroxidase (AK061809, AK065090)、EF-hand Ca^{2+} -binding protein CCD1 (AK109278)、zinc finger protein (AK059839)、OsNAC4 (AK073848)、OsCDPK7 (AK066495)、calmodulin (AK109470)、NPK1-related protein kinase (AK105196)、LMW heat shock protein (AK062091, AK101182) などをコードする遺伝子のように、1-3-3 の cDNA マイクロアレイの結果から得られた 46 個のフラジェリン認識下流遺伝子中に含まれる遺伝子が数多く認められることが明らかになった (Table 1, 2)。このことは今回のオリゴマイクロアレイ解析の結果の信憑性が高いことを示すものであると考える。フラジェリン認識下流遺伝子としてはこの他に、chitinase や oxidase、Rta1、serine/threonine protein kinase、DNA binding protein phosphatase 2C、phenylalanine ammonia-lyase (PAL)、glucosyltransferase、decarboxylase 1、AP2-related transcription factor (CDBP)、Clp protease ATP-binding subunit などをコードする遺伝子が含まれていることが明らかになった (Table 2)。

1-3-7 フラジェリン認識シグナル情報伝達系の解析

ここまでの研究により、*A. avenae* のイネ親和性 K1 菌株、非親和性 N1141 株およびそのフラジェリン欠損株と精製フラジェリンを接種・処理したイネ培養細胞における遺伝子発現を、イネ cDNA マイクロアレイおよび 22K オリゴマイクロアレイを用いて詳細に検討することにより、これらのシグナルにより制御される遺伝子群を同定することが出来た。そこで次に、これら得られた遺伝子群を相互比較することにより、フラジェリン認識後の情報伝達に関する知見を得たいと考え、解析を行った。まず、イネ cDNA マイクロアレイおよび 22K オリゴマイクロアレイを用いて同定したそれぞれのフラジェリン認識下流の遺伝子群について詳細に比較した。その結果、イネ cDNA マイクロアレイおよび 22K オリゴマイクロアレイの結果から得られた、それぞれ 46 と 117 個のフラジェリン認識下流遺伝子群の約半数は、機能未知のタンパク質をコードする遺伝子であった (Table 1, Table 2)。これら未知遺伝子以外のフラジェリン認識下流遺伝子について詳細に検討したところ、その機能相同性から考えて、イネ cDNA マイクロアレイで得られたフラジェリン認識下流遺伝子のうち、22K オリゴマイクロアレイで得られたフラジェリン認識下流制御遺伝子に含まれるのは 19 個 (46 遺伝子の 60%、117 遺伝子の約 35%) であった。このように両方の解析で共に得られた遺伝子には、EF-hand Ca^{2+} -binding protein CCD1 (AB118072, AB118091, AK109278) や CDPK7

Table 2. 22Kオリゴマイクロアレイ解析より同定されたフラジェリン認識の下流遺伝子群(117遺伝子)

Accession No.	N1141				Δfla-N1141			flagellin			putative gene identification
	0 h	1 h	3 h	6 h	1 h	3 h	6 h	1 h	3 h	6 h	
AK058934	0.9	3.7	36.4	33.4	1.0	10.1	32.4	4.0	6.2	22.6	Unknown expressed protein
AK059734	1.2	2.2	31.0	59.3	1.3	6.6	39.8	2.2	1.4	1.9	ZmRR2
AK059839	1.1	25.8	168.9	136.9	2.8	47.4	123.1	8.7	20.1	72.9	Zinc-finger protein WZF1
AK060684	1.1	6.0	58.6	22.3	1.8	6.0	15.3	1.9	2.7	3.0	Myb protein
AK060705	1.1	2.1	17.4	22.1	1.1	5.3	16.7	4.2	4.2	16.0	Hydroxycinnamoyl transferase
AK060724	1.0	1.0	18.3	18.9	0.9	2.9	23.1	2.0	8.5	12.0	Unknown expressed protein
AK060962	1.1	2.2	49.9	90.2	1.2	16.5	120.2	4.8	7.5	5.8	Unknown expressed protein
AK061210	1.3	1.7	11.6	156.5	1.1	2.0	73.5	4.2	4.1	1.9	Unknown expressed protein
AK061486	1.4	1.5	17.6	21.3	1.5	2.9	21.2	3.6	3.0	3.3	Unknown expressed protein
AK061602	0.7	6.7	24.0	22.1	0.8	7.4	16.5	4.6	5.0	8.6	PnFL-2
AK061809	1.0	1.1	39.1	54.9	0.7	5.9	41.0	1.7	4.8	12.9	Peroxidase (pox2 gene)
AK062091	1.1	2.2	24.1	16.3	1.0	9.7	22.9	3.7	6.1	6.7	LMW heat shock protein
AK062484	0.9	1.5	8.0	33.5	1.1	3.9	28.8	2.7	2.8	3.5	Unknown expressed protein
AK062595	1.3	2.4	73.8	29.6	2.3	8.6	42.1	5.3	10.6	32.7	Unknown expressed protein
AK062714	1.4	2.7	3.4	20.9	1.5	4.1	20.7	2.0	1.2	2.1	Unknown expressed protein
AK062784	1.6	5.3	105.3	67.4	2.4	16.8	50.7	16.6	9.9	7.4	Unknown expressed protein
AK063234	1.4	2.7	52.4	68.0	1.6	5.8	55.4	3.6	5.8	5.9	Pathogenic related protein 4
AK063243	1.0	2.1	5.8	32.0	1.1	6.7	33.6	2.6	3.8	9.3	Unknown expressed protein
AK063715	1.2	2.2	50.6	26.5	1.5	10.7	15.4	5.0	8.2	20.8	Unknown expressed protein
AK063773	1.5	2.2	17.3	56.6	1.6	6.0	35.4	7.9	16.5	32.0	Glutathione S-transferase OsGSTU12
AK064250	1.1	6.8	33.5	69.7	2.8	25.9	37.5	20.2	28.5	59.4	1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase
AK064287	1.0	14.4	38.4	29.7	1.3	14.2	18.6	7.1	12.5	25.3	Unknown expressed protein
AK065090	1.0	1.7	31.5	24.4	1.1	4.4	20.2	2.0	6.7	61.2	Anionic peroxidase
AK065359	1.3	3.3	20.7	22.6	1.6	13.0	32.8	5.7	9.1	48.3	Unknown expressed protein
AK065438	1.2	1.0	22.4	27.0	0.9	2.9	21.8	5.1	4.4	3.2	Unknown expressed protein
AK065445	1.2	1.3	35.7	21.6	1.1	2.5	15.0	1.2	2.5	2.0	Unknown expressed protein
AK065505	1.0	4.0	27.2	21.0	1.4	8.9	16.4	6.4	7.3	10.6	Unknown expressed protein
AK065964	1.2	3.0	60.3	44.0	1.0	11.3	27.7	2.5	4.7	5.6	Unknown expressed protein
AK066000	1.2	2.7	8.2	21.4	1.5	5.4	11.0	2.9	1.6	3.3	Serine/threonine protein kinase
AK066495	1.1	2.1	7.9	6.3	0.9	4.8	4.3	1.6	2.7	3.3	OsCDPK7
AK066734	1.0	1.2	12.1	38.1	0.8	3.2	22.0	1.6	2.7	2.1	Tryptophan synthase alpha (TSAlike)
AK066978	1.0	9.1	30.7	53.2	1.0	29.9	128.5	10.1	11.0	15.4	Protein kinase
AK067339	1.0	5.0	14.8	17.0	1.3	9.0	24.1	4.2	4.0	6.3	MAP kinase 1
AK067907	1.0	29.5	87.9	84.0	1.3	60.7	105.4	9.9	18.5	23.6	Fatty acid longase (fae2 gene)
AK068381	1.1	1.9	5.0	29.0	1.5	3.6	11.5	1.5	2.5	1.8	Unknown expressed protein
AK068451	1.2	1.6	16.6	16.1	1.5	7.8	11.9	2.6	1.4	1.6	Receptor serine/threonine kinase
AK068566	1.7	1.9	9.2	22.3	1.2	7.7	18.7	4.1	6.2	11.8	Unknown expressed protein
AK068638	1.1	6.5	88.9	41.0	0.8	31.3	31.1	5.3	17.0	90.3	Glycolate oxidase (gox)
AK068727	1.3	1.1	9.3	30.7	0.9	1.0	20.3	1.4	1.5	2.7	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit
AK068862	1.2	3.3	25.9	24.3	1.1	9.2	24.2	2.6	3.0	2.6	Unknown expressed protein
AK069496	1.4	1.5	13.3	26.5	1.3	1.6	16.2	1.2	2.4	13.9	Unknown expressed protein
AK070149	1.0	2.5	12.1	43.5	1.3	10.6	43.1	6.1	4.0	3.7	Membrane protein (pon1 gene)
AK070360	0.9	15.1	84.8	69.0		40.2	66.3	7.4	17.4	16.1	NADP dependent malic enzyme
AK070381	0.9	4.3	14.2	48.3	4.8	9.8	43.2	41.8	3.2	4.7	Anthranilate N-hydroxycinnamoyl/benzoyltransferase
AK070385	1.3	1.6	53.8	48.9	0.9	6.8	32.2	2.4	4.6	17.2	Unknown expressed protein
AK070706	1.0	2.4	34.2	54.8	1.3	10.3	41.6	3.3	3.0	4.1	Unknown expressed protein
AK070719	0.9	5.7	46.7	34.7	1.2	12.4	31.2	3.3	2.4	7.2	Unknown expressed protein
AK070966	1.1	4.4	19.0	21.0	1.2	7.5	12.1	3.9	8.3	14.8	Unknown expressed protein
AK071155	0.9	3.2	40.6	35.3	1.6	8.7	28.0	7.0	6.4	17.3	Unknown expressed protein
AK071968	0.8	3.1	14.5	30.3	2.7	6.6	30.3	28.3	3.3	4.3	Choline kinase GmCK3p
AK072394	1.3	11.1	44.2	22.1	1.5	13.2	15.9	3.1	4.2	4.1	Unknown expressed protein
AK072535	1.3	1.4	9.6	31.4	1.0	1.9	19.5	3.1	2.4	2.4	Tryptophan synthase beta-subunit (TSB1)
AK072854	1.1	1.2	7.7	19.4	1.0	2.1	13.4	1.5	2.2	2.2	Unknown expressed protein
AK073133	0.8	1.7	11.3	21.6	1.1	4.5	16.2	2.9	3.5	6.0	Ethylene responsive protein (ebp-89 gene)
AK073812	1.3	1.7	23.1	42.4	1.4	5.8	38.6	1.6	3.3	3.2	AP2-related transcription factor (CDBP)
AK073848	1.3	19.6	134.2	48.3	1.8	30.8	59.6	11.6	8.4	21.5	OsNAC4 protein
AK073913	1.2	4.7	79.3	67.2	1.5	22.5	41.9	5.2	4.0	20.2	Unknown expressed protein
AK099563	1.4	15.1	59.6	25.9	1.8	19.2	23.3	5.9	10.2	25.7	Unknown expressed protein
AK099720	1.3	4.8	14.7	56.2	1.1	14.7	19.0	2.7	2.9	0.7	DNA-binding protein phosphatase 2C (DBP1)

Table 2. (continued from preceding page)

Accession No.	N1141				Δfla-N1141			flagellin			putative gene identification
	0 h	1 h	3 h	6 h	1 h	3 h	6 h	1 h	3 h	6 h	
AK099925	1.2	8.8	20.3	56.5	0.8	14.1	47.4	5.7	3.8	6.7	Cytochrome P450-like protein
AK100034	1.0	1.2	11.1	16.8	0.8	4.6	14.6	1.9	3.7	3.1	12-oxophytodienoic acid reductase (RRJ4)
AK100082	1.2	0.9	16.7	25.2	1.1	4.1	29.2	2.5	2.0	2.9	Receptor protein kinase
AK100316	1.1	19.8	9.1	30.0	4.0	26.5	54.9	22.8	23.3	31.8	Syntaxin
AK100465	1.3	1.5	20.8	30.6	1.3	3.4	29.9	4.7	4.9	3.4	RRJ1
AK100678	1.4	1.4	34.4	11.8	0.6	11.7	17.2	1.6	6.7	3.9	Decarboxylase 1 (pdc1)
AK100816	1.5	4.4	73.9	103.4	2.3	14.5	74.2	1.5	6.3	3.7	Hypothetical protein
AK100973	1.2	2.2	107.4	70.3	1.5	9.4	72.7	5.3	13.7	31.3	Acidic class III chitinase OsChib3a
AK101182	1.3	2.5	12.0	29.1	3.9	3.5	38.7	29.4	21.9	21.4	Heat shock transcription factor 34
AK101683	1.0	5.1	16.5	17.7	1.6	11.3	21.1	4.5	4.9	15.3	Unknown expressed protein
AK102303	1.1	1.5	24.0	7.3	1.4	3.5	8.4	3.5	4.4	4.1	Unknown expressed protein
AK102505	1.1	3.8	37.5	19.4	1.1	9.6	18.5	3.7	7.2	10.1	Chitinase
AK102726	1.5	1.8	7.4	23.7	1.3	4.7	35.6	7.5	10.9	15.6	Unknown expressed protein
AK102817	0.9	4.2	22.3	16.6	1.1	7.4	13.3	2.3	2.1	3.6	Phenylalanine ammonia-lyase
AK102832	0.9	1.0	18.6	12.1	0.8	2.5	15.7	1.9	6.5	7.5	Receptor protein kinase PERK1
AK102964	0.9	3.9	3.6	27.2	1.8	8.4	28.8	2.5	3.0	2.9	Unknown expressed protein
AK103051	0.8	5.7	27.3	27.7	2.5	20.5	66.4	21.0	39.0	68.6	Rtac1 (rtac1)
AK103223	0.9	1.0	13.7	43.1	1.0	3.4	22.2	1.5	2.0	2.7	Unknown expressed protein
AK103257	1.0	0.9	19.2	39.0	0.9	2.2	52.1	3.5	6.7	17.0	Lactate dehydrogenase
AK103579	1.1	3.2	50.1	50.3	2.4	13.1	41.9	4.6	16.6	26.5	Rtac1 (rtac1)
AK103599	1.4	1.9	8.3	49.3	1.3	6.5	43.8	2.4	2.6	4.4	Unknown expressed protein
AK103603	1.0	3.2	9.1	31.0	1.9	6.6	25.2	3.9	8.0	7.7	Unknown expressed protein
AK103609	1.0	1.6	15.3	23.1	1.1	4.6	24.0	2.3	5.3	8.4	Unknown expressed protein
AK104985	1.2	3.7	29.4	10.5	1.4	7.4	8.8	4.0	5.3	5.2	UDP-glucose glucosyltransferase
AK105175	1.0	0.7	18.1	63.4	1.0	2.5	57.2	2.3	1.1	1.3	Unknown expressed protein
AK105196	1.0	1.3	19.9	40.8	1.0	3.4	27.8	0.8	0.9	4.5	NPK1-related protein kinase-like protein (mapkkk1)
AK105533	1.5	18.0	20.0	46.7	1.1	14.7	48.5	9.6	3.9	11.8	Pirin
AK105659	0.8	1.3	32.9	39.1	0.9	4.5	31.8	3.7	4.5	12.2	Taxane 13- α -hydroxylase
AK105978	0.8	1.2	21.5	108.5	0.9	3.4	70.0	4.0	7.5	11.8	Unknown expressed protein
AK106062	1.5	1.5	51.8	46.0	1.3	4.7	56.9	1.6	6.2	9.7	Unknown expressed protein
AK106282	1.4	1.4	26.3	14.6	1.5	5.5	14.2	2.5	5.4	15.9	DNA-binding protein
AK106333		12.0	54.5	61.8	1.1	20.8	47.0	10.2	12.4	24.7	Unknown expressed protein
AK106404	1.0	2.3	6.0	30.3	1.8	3.5	19.3	8.8	5.8	21.3	Unknown expressed protein
AK106493	1.0	49.2	79.8	78.4	1.2	37.9	45.6	5.6	4.3	19.2	Unknown expressed protein
AK107370	1.3	1.6	10.7	20.8	1.5	3.0	11.8	0.9	3.0	1.9	Secreted glycoprotein
AK107376	1.1	4.1	5.4	21.4	1.4	6.6	18.7	0.8	1.4	2.9	Alternative oxidase (AOX1b)
AK107530	1.0	1.5	22.2	30.3	0.9	5.7	19.0	4.0	1.3	1.4	Unknown expressed protein
AK107937	1.0	4.0	51.2	79.4	1.9	26.6	52.6	14.2	7.7	17.2	Unknown expressed protein
AK107938	1.2	5.6	9.9	23.0	1.3	9.1	15.8	3.9	4.0	7.9	Unknown expressed protein
AK107989	1.1	2.8	25.1	33.3	1.2	6.9	29.3	3.7	2.0	1.8	Unknown expressed protein
AK108109	1.0	18.2	16.9	49.5	2.0	26.9	57.8	10.3	9.2	21.6	Unknown expressed protein
AK108413	1.0	7.1	43.9	87.1	1.8	29.2	54.2	10.9	9.4	15.9	Unknown expressed protein
AK108738	1.4	1.8	20.3	28.2	1.9	8.3	19.7	4.4	6.2	6.6	PnFL-2
AK109007	1.0	5.5	26.6	9.4	0.7	12.4	10.8	2.2	4.7	14.7	Glucosyltransferase-3 (AdGt-3)
AK109011	1.1	1.6	17.6	43.3	1.3	9.3	39.8	6.0	6.9	26.7	Myb factor
AK109134	1.2	3.2	41.9	27.8	1.3	11.7	14.8	4.2	5.8	12.5	Membrane protein
AK109215	1.3	3.8	22.2	35.5	1.1	8.2	28.6	1.5	2.4	0.2	Unknown expressed protein
AK109228	1.4	1.7	11.4	28.5	2.0	2.4	19.0	2.5	3.0	2.2	Unknown expressed protein
AK109278	1.2	5.5	7.9	33.2	1.9	11.1	19.3	14.2	7.5	3.4	EF-hand Ca ²⁺ -binding protein CCD1 (ccd1)
AK109470	1.1	3.9	21.7	42.3	1.2	5.4	19.4	0.7	1.1	4.8	Calmodulin-like protein
AK110551	1.4	4.2	12.6	22.5	2.2	10.1	24.1	2.8	2.6	2.9	Unknown expressed protein
AK110593		6.3	16.3	66.1	2.0	16.2	37.7	4.6	2.4	5.9	Unknown expressed protein
AK110639	1.1	1.3	24.3	13.1	1.3	9.9	22.3	3.2	8.5	27.8	Unknown expressed protein
AK110725	1.2	4.9	38.1	119.7	1.1	11.3	98.4	2.5	5.7	3.2	Unknown expressed protein
AK110892	1.0	1.1	49.1	110.6	0.9	3.4	57.1	2.1	5.9	24.8	UDP-glucose:salicylic acid glucosyltransferase
AK111059	1.1	5.7	43.9	29.9	1.5	14.9	23.7	7.4	10.5	41.6	Unknown expressed protein
AK111266	1.3	9.0	17.1	43.1	1.5	11.8	31.8	10.1	9.0	24.8	Unknown expressed protein
AK111798	0.9	4.9	8.3	32.1	1.1	7.8	21.2	1.0	1.1	2.7	Myb factor

(AB118094, AK066495)、calmodulin (AB117889, AK109470) など、その発現と機能制御に Ca^{2+} シグナルを必要とするものが多いことが明らかとなった (共通のフラジェリン認識下流遺伝子のうち約 22%)。さらにこれらの遺伝子は、22K オリゴマイクロアレイの結果より、精製フラジェリン処理でもイネ培養細胞において発現誘導されることが示されている。これらのことは、イネにおけるフラジェリン認識後の免疫反応誘導に Ca^{2+} シグナルが関与する可能性を示唆するものである。さらに、これら以外のフラジェリン認識下流遺伝子について調べたところ、C3HC4 タイプ (RING finger 型) または C2H2 タイプの zinc finger family protein をコードする遺伝子や、OsNAC3、OsNAC4 を含む NAC 遺伝子が含まれていることも明らかになった (Table 1, 2)。

1-3-8 Ca^{2+} シグナルによって発現制御される遺伝子の同定

Ca^{2+} シグナルによって、発現または機能制御されていると予測される多くのタンパク質をコードする遺伝子がフラジェリンによって発現制御を受けているということが明らかになったことから、次に、フラジェリンと Ca^{2+} シグナルとの関与に焦点を絞って研究を進めた。

1) Real time RT-PCR による解析

まず、免疫反応特異的遺伝子およびフラジェリン認識下流遺伝子の発現誘導に Ca^{2+} シグナルが関与しているのかどうかを明らかにするために、 Ca^{2+} キレート剤である EGTA を培地に加えたイネ培養細胞に菌体を接種し、それぞれの遺伝子の発現誘導パターンを real time RT-PCR によって調べた。イネ培養細胞に、DW、10 mM EGTA、N1141 菌株、10 mM EGTA + N1141 菌株をそれぞれ処理し、0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6 時間後の培養細胞を回収し、total RNA を抽出した。なお、EGTA は菌体接種の 30 分前に処理した。この total RNA を鋳型として、CCDI (AB118091) および OsCDPK7 (AB118094) 遺伝子に特異的なプライマーを用いて real time RT-PCR を行った結果、測定したすべての時間で N1141 菌株接種による CCDI および OsCDPK7 の発現誘導が、EGTA 存在下ではほぼ完全に抑制されていることが明らかとなった (Fig. 5)。また、EGTA 単独処理ではこれら遺伝子の発現に何ら影響を及ぼすことはなかった。このことから、これらフラジェリン認識下流遺伝子の発現誘導に細胞外からの Ca^{2+} 流入が関与していることが示唆された。さらに、他のフラジェリン認識下流遺伝子 myb (AB118162)、zinc finger family protein (AB118082)、EF hand Ca^{2+} binding protein (AB118091)、EL2 (AB118093) を含む免疫反応特異的遺伝子 blue copper protein (AB118171)、IAI2 (AB118169)、acid phosphate (AB118164)、Aluminum-induced protein (AB118069) について、N1141 菌株接種後 2, 6 時間の 2 点での発現を real time RT-PCR により調べた。

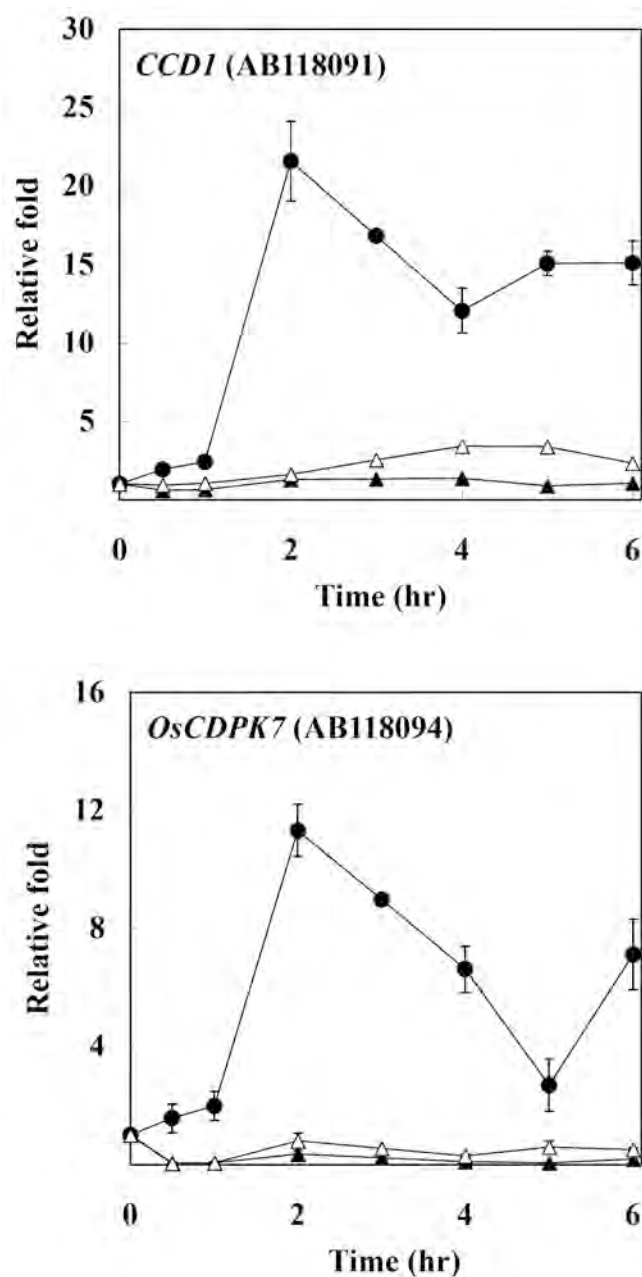


Figure 5. *CCD1*および*OsCDPK7*の発現誘導に及ぼすカルシウムキレート剤の影響
フラジェリン認識下流遺伝子の発現誘導に対する Ca^{2+} シグナルの関与を調べた。イネ培養細胞にN1141菌株 (●)、N1141菌株 + 10 mM EGTA (▲)、10 mM EGTA (△) をそれぞれ接種後0.5~6時間の細胞より抽出したtotal RNAを鋳型としてreal time RT-PCRによる発現解析を行った。なお、EGTAは菌体接種の30分前に培地中に加えた。値は水接種後の発現を基準として算出し、各ポイントにおけるバーは3回の実験間の標準偏差を表す。

その結果、フラジェリン認識下流遺伝子である *myb*、*zinc finger family protein*、*EF hand* Ca^{2+} *binding protein*、*EL2* のすべての遺伝子の発現が EGTA 存在下では N1141 菌株接種によっても全く誘導されないことが明らかになった (Fig. 6)。このことから、細胞内への Ca^{2+} の流入はフラジェリン認識の情報伝達に関与することが示された。さらに、これらフラジェリン認識下流遺伝子ではないが植物免疫に関与することが予想されるいくつかの遺伝子、*blue copper protein*、*IAI2*、*acid phosphate*、*aluminium induced protein* も EGTA 存在下で N1141 接種による発現誘導が部分的に抑制されることが示された。このことは、 Ca^{2+} はフラジェリン認識情報の伝達だけでなく、免疫反応を誘導するフラジェリン以外の分子の認識情報伝達にも関与していることを示している。以上のことから、細胞内への Ca^{2+} の流入は免疫反応を誘導する上で重要なシグナル伝達の役割を担っている可能性が示唆された。

2) cDNA マイクロアレイによる解析

フラジェリンの認識情報の伝達に Ca^{2+} シグナルが関与することが予想されたため、フラジェリン下流制御遺伝子のうち、どの程度の遺伝子の発現に Ca^{2+} シグナルが関与しているかをカルシウムキレート剤 EGTA とイネ cDNA マイクロアレイを用いて詳細に調べた。EGTA、N1141 菌株、N1141 菌株+EGTA のそれぞれをイネ培養細胞に処理し、0, 2, 4, 6 時間後の細胞より total RNA を抽出した。これを用いて Cy5 で標識した cDNA プローブを合成し、コントロールとして DW 処理後の細胞から同様に抽出した total RNA より Cy3 標識した cDNA プローブを合成し、マイクロアレイ解析を行った。得られたシグナル値からデータの正規化・ノーマライゼーションを行った後、2 倍以上の発現変動をした 1,603 遺伝子を抽出した。さらに統計的手法 (Parametric test, use all available error estimates, *P*-value 0.05、Benjamini and Hochberg False Discovery Rate, Cross-Gene Error Model is active) により、N1141 菌株単独接種と EGTA 存在下で N1141 菌株を接種した場合の遺伝子発現間に差がある遺伝子として 259 遺伝子を抽出した。これら Ca^{2+} シグナルの下流で制御されている遺伝子の中には、*Zn-induced protein* や *blue copper protein*、*IAI2*、*heat shock protein*、*Aluminum-induced protein*、*phosphoenolpyruvate carboxykinase* 等をコードする遺伝子が含まれていることが明らかになった。またこれら遺伝子の多くは免疫反応特異的遺伝子群およびフラジェリン認識下流遺伝子群に含まれる遺伝子と同じものを多く含んでいることが明らかになった。そこで、この EGTA 存在下で発現誘導が抑制される 259 遺伝子とフラジェリン認識の下流に制御される遺伝子の積集合を調べたところ、フラジェリン認識の下流制御遺伝子のうち、約 5 割が EGTA の存在下でその発現誘導が抑制される遺伝子であることが示された。このことから、イネ細胞におけるフラジェリン認識によって誘導される免疫反応には Ca^{2+} が重要な働きをしていることが明らかとなった。

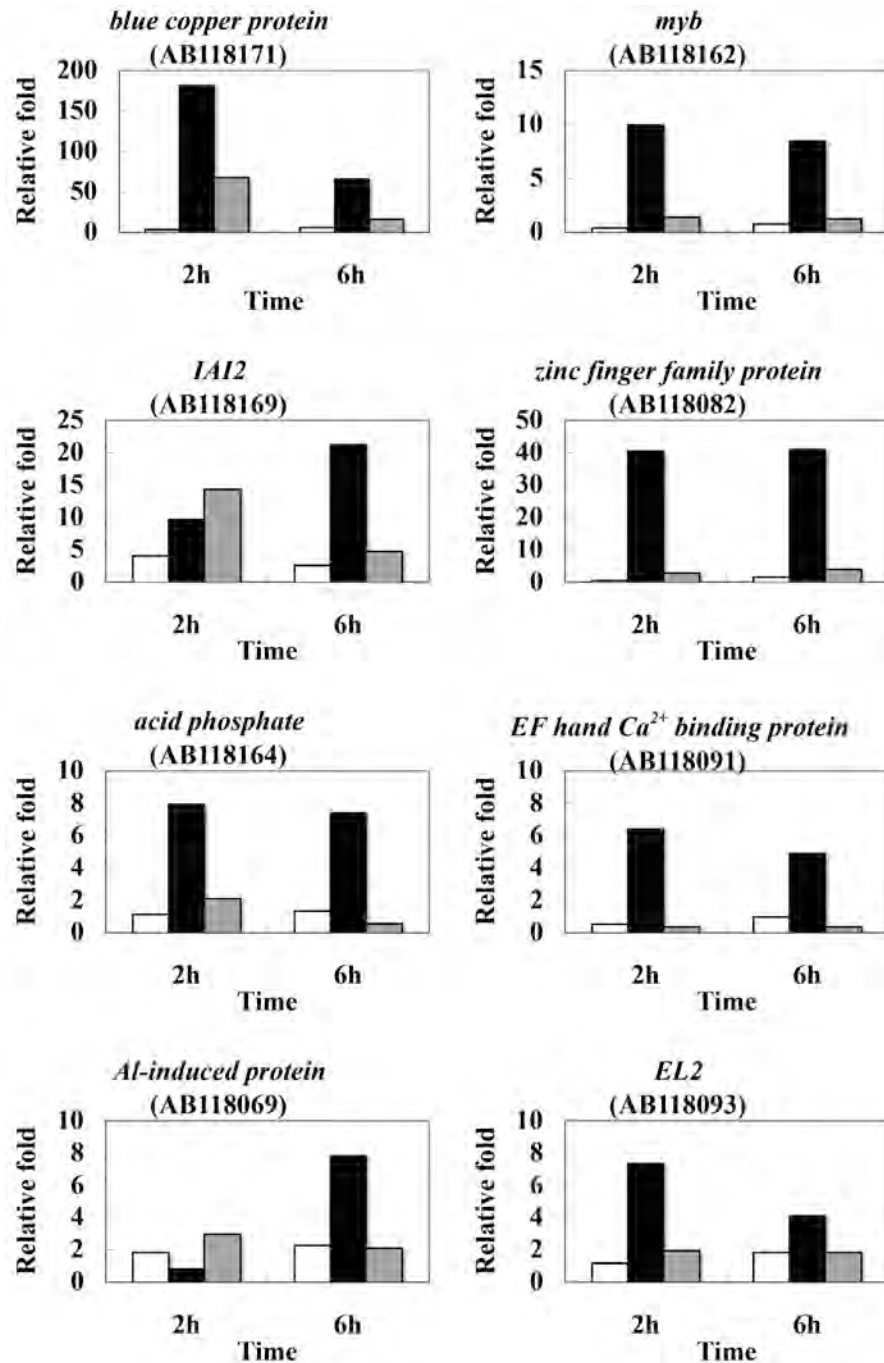


Figure 6. 免疫反応関連遺伝子の発現誘導に及ぼすカルシウムキレート剤の影響
フラジェリン下流遺伝子を含む免疫反応関連遺伝子の発現誘導へのCa²⁺シグナルの関与を調べた。イネ培養細胞にN1141菌株 (■)、N1141菌株 + 10 mM EGTA (■)、10 mM EGTA (□) をそれぞれ接種後2, 6時間の細胞より抽出したtotal RNAを鋳型としてreal time RT-PCRによる発現解析を行った。免疫応答関連遺伝子 ; *blue copper protein* (AB118171), *IAI2* (AB118169), *acid phosphate* (AB118164), *Aluminum-induced protein* (AB118069)、フラジェリン認識下流遺伝子 ; *myb* (AB118162), *zinc finger family protein* (AB118091), *EF-hand Ca²⁺ binding protein* (AB118091), *EL2* (AB118093)

1-4 考察

第一章では、イネに対して *A. avenae* のイネ非親和性 N1141 菌株が誘導する免疫反応において、N1141 菌株の鞭毛構成タンパク質であるフラジェリンがどのような役割を持っているのか、また、イネ細胞がフラジェリンを認識した後にどのようにしてその情報を伝達して免疫反応を誘導しているのかを明らかにすることを目的として、免疫反応誘導時の遺伝子発現に注目して解析を行った。

イネは、2004 年に日本を中心とする国際イネゲノム解読プロジェクト (International Rice Genome Sequencing Project : IRGSP) によって *Oryza sativa* ssp. *japonica* cultivar *Nipponbare* ゲノムの完全解読が達成され、イネ研究はポストゲノムの時代に突入した (IRGSP, 2005)。さらに、2007 年 1 月には、イネの高精度アノテーション情報を収録したデータベース「RAP-DB」が、独立行政法人農業生物資源研究所、独立行政法人産業技術総合研究所および大学共同利用機関法人情報・システム研究機構国立遺伝学研究所との 3 機関を中心とした国際共同プロジェクトにより公開された。これによると、イネの遺伝子数は約 32,000 個と推定され、イネゲノム上の遺伝子のうち 28,540 が実際にタンパク質合成に関与する遺伝子である可能性を明らかにするとともに、コンピューターによる情報解析とデータ精査の結果、それらのタンパク質のおよそ 70 % に当たる 19,969 遺伝子の推定機能が明らかにされた。第一章では、まずイネ培養細胞由来の 3,353 個のユニークな cDNA クローンを含む cDNA ライブラリーを構築し、これを用いて cDNA マイクロアレイを作製した。これは、数値上では推定されるイネの全遺伝子数の約 10 % に過ぎないが、当 cDNA ライブラリーは N1141 菌株接種および非接種の培養細胞より作製したため、免疫反応に関連して転写レベルが上昇する遺伝子の大部分が、本 cDNA マイクロアレイ内の遺伝子に含まれていると予測される。

非親和性菌株もしくは親和性菌株を接種した 0~6 時間後までのイネ培養細胞の発現プロファイル解析を行った結果、非親和性相互作用特異的に発現変動する遺伝子として 178 遺伝子を同定した。これら 178 遺伝子の中でも、N1141 菌株接種後 0.5~2 時間までの早期に大きく発現変動する遺伝子は 30 個であり、発現変動する遺伝子の中では比較的少ないことが明らかとなった (Fig. 1)。同様な結果は *Arabidopsis* を用いた実験でも示されている。Narusaka らは、*Arabidopsis* に非親和性の *Alternaria brassicicola* を接種した後、発現する遺伝子を 7000 遺伝子がスポットされた cDNA マイクロアレイで調べた結果、発現変動が認められる 689 遺伝子の中で比較的早期に誘導される遺伝子は少ないことを報告している (Narusaka *et al.*, 2003)。以上の結果は、免疫反応に関与する遺伝子の中で免疫反応初期のイベントには比較的少数の遺伝子に関与しており、これら遺伝子によってそれ以降の免疫反応が誘導されている可能性が示唆され

る。

筆者はさらにこの 178 遺伝子のうち、非親和性菌のフラジェリン欠損株接種によって野生株接種時のような発現変動が認められない 46 遺伝子を、フラジェリン認識の下流に制御されている遺伝子として同定した (Table 1)。これらフラジェリン認識下流遺伝子は、非親和性菌の精製フラジェリンによってのみ特異的に発現誘導されることが、real time RT-PCR の結果明らかになった (Fig. 3)。これら遺伝子の中でも、*OsEDS1* は非親和性相互作用特異的に強く発現誘導される遺伝子のひとつである (Table 1, Fig. 3, 4)。*Arabidopsis* において *EDS1* は、*TIR-NB-LRR* (toll/interleukin receptor-nucleotide binding-leucine rich repeat) 遺伝子である *RPS4* などの *R gene* を介する抵抗性に不可欠な遺伝子であることが示されている (Falk *et al.*, 1999)。*EDS1* は、*N* 末端領域に真核生物のリパーゼの触媒サイトと相同性のある領域を持っているため、hydrolase 活性を有するタンパク質であると考えられている。*Nicotiana benthamiana* において *EDS1* は、Skp1-Cullin-F box (SCF) 型 E3 ユビキチンリガーゼ複合体の構成因子である酵母の SGT1 のホモログである NbSGT1 と、HSP90 (heat shock protein90) と共に、*RPS4* による過敏感細胞死の誘導に必要とされることが報告されている (Zhang *et al.*, 2004)。

また、フラジェリン下流制御遺伝子の中には、多くの C3HC4 タイプ (RING finger 型) の zinc finger family protein をコードする遺伝子が多く含まれていた (Table 1)。このことは、フラジェリン認識後の情報伝達に、タンパク質のユビキチン化が関与している可能性を示唆している。ユビキチン化はプロテアソームにおけるタンパク質の分解だけではなく、シグナル伝達にも関与していることが酵母や動物、高等植物において近年数多く報告されている。高等植物ではユビキチンプロテアソーム系は、オーキシン、ジベレリン、ジャスモン酸等の植物ホルモン応答や (Gray *et al.*, 2001; Sasaki *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2002)、ナス科バラ科植物の自家不和合性における花粉-雌蕊間の自己識別機構 (Takayama and Isogai, 2005)、側根形成 (Stirnberg *et al.*, 2002)、光周期制御 (Imaizumi *et al.*, 2003)、植物-病原微生物相互作用 (Tzfira *et al.*, 2004) 等多くの情報伝達系に関与していることが報告されている。このようなことから、フラジェリン認識の下流に制御される遺伝子群に、ユビキチンプロテアソーム系の関与が示唆されたことは非常に興味深い事実である。

さらに、フラジェリン下流制御遺伝子には、*OsNAC3* および *OsNAC4* などの *NAC* 遺伝子がいくつか含まれていた (Table 1, Fig. 3, 4)。これら *NAC* 遺伝子の中でも *OsNAC6* は、フラジェリン欠損株接種でも精製フラジェリンの処理によってもその発現が誘導されたことから (Fig. 3, 4)、フラジェリンとそれ以外の認識物質の両方に制御されている遺伝子であることが示された。*NAC* ファミリータンパク質は、*N* 末端領域に存在する *NAC* ドメイン (*Petunia* *NAM*、*Arabidopsis* *ATAF1* および *CUC2*) と呼ばれる保存された配列を有している。イネには *NAC* 遺伝子ファミリーとして、*OsNAC1* から

OsNAC8 までが存在しており、NAC ドメインのアミノ酸配列に基づいて、ATAF サブファミリー、*OsNAC3* サブファミリー、NAM サブファミリーに分類されている。それぞれの NAC は器官特異的な発現パターンを示し、特に *OsNAC6* はすべての組織で発現していることが明らかになっている (Kikuchi *et al.*, 2000)。OsNAC6 をはじめとする NAC タンパク質はその構造から様々な他の遺伝子の転写を制御する転写因子である可能性が示されているが、その詳細な機能については不明な点が多い。これまで、*OsNAC4* は N1141 菌株接種後に発現誘導され、蓄積した *OsNAC4* は細胞質から核へと移行し、抵抗性関連遺伝子の転写活性化や過敏感細胞死の誘導に関与していることが当研究室で明らかにされた (Kaneda *et al.*, unpublished)。また、ジャガイモの *StNAC* は、ジャガイモ疫病菌 *Phytophthora infestans* の接種や傷害に応答して、その転写レベルが上昇することが明らかになっている (Collinge and Boller, 2001)。現在までのところ、NAC 遺伝子は細菌や動物のゲノムからは同定されていないことから、NAC は植物特有の転写因子として遺伝子の発現制御に関与していることが考えられる。

フラジェリン下流遺伝子には、*EL2* も含まれていた。*EL2* は、糸状菌の細胞壁成分でありファイトアレキシン誘導活性を持つ、*N-acetylchitoheptaose* を処理したイネ培養細胞で、処理後 15 分で発現誘導が認められる遺伝子として単離された (Minami *et al.*, 1996)。*EL2* 遺伝子の機能については未だほとんど明らかにされてはいないが、*N-acetylchitoheptaose* を処理したイネ培養細胞で、*PAL* 遺伝子と同様に、細胞質の酸性化とリン酸化・脱リン酸化を介して誘導される遺伝子であり (Nishizawa *et al.*, 1999; He *et al.*, 1998)、抵抗性に関与する遺伝子であると考えられている (Minami *et al.*, 1996)。当研究室において、イネの抵抗性関連遺伝子として知られている *EL2*、*PAL*、*Cht-1*、*LOX*、*PBZ1*、*PR-1a* の 6 つの遺伝子について、ノーザンハイブリダイゼーションにより発現を調べたところ、N1141 菌株接種で *EL2*、*PAL*、*Cht-1*、*LOX*、*PBZ1* 各遺伝子の発現が強く誘導され、このような発現誘導は K1 菌株接種では認められないことが明らかになった (Tanaka *et al.*, 2003)。また、 Δ fla1141-2 菌株接種では *PAL*、*Cht-1*、*LOX*、*PBZ1* 遺伝子の発現は依然として誘導されたが、*EL2* 遺伝子の発現誘導は顕著に低下しており、さらに、*EL2* 遺伝子は N1141 菌株の精製フラジェリン処理によっても特異的に発現誘導される遺伝子であることも示されたことから、*EL2* の発現はフラジェリンの認識のみによって制御されていることが明らかになっている (Tanaka *et al.*, 2003)。今回、*EL2* がマイクロアレイでもフラジェリン下流遺伝子として同定されてきたことは、フラジェリン認識下流遺伝子を探索する上で、本マイクロアレイが非常に有用なツールとして機能していることを示唆している。

一方、*EREBP* は N1141 菌株接種時特異的に発現が誘導される遺伝子のひとつであるが、精製フラジェリン処理したイネ培養細胞ではこの遺伝子の発現誘導は認められなかった (Fig. 3)。*EREBP* はエチレン応答性転写調節因子であり、エチレン誘導性遺

伝子プロモーター上に共通して認められるシス配列である GCC ボックスに結合することで、塩基性 PR タンパク質遺伝子の転写を誘導する (Kunkel and Brooks, 2002)。エチレンは、種子の発芽や形態形成など非常に多岐に渡る生理現象に関わっている植物ホルモンであり、サリチル酸やジャスモン酸と共に植物の病害抵抗性や細胞死に関与することもよく知られている。これらのことから、イネの *A. avenae* に対する免疫反応誘導にも *EREBP* を介したエチレン情報伝達が関与しているが、このエチレン情報伝達経路の活性化にはフラジェリンは関与していないことが考えられる。この様な推察を支持するものとして、*EREBP* は、他のエチレン応答性因子 *OsERF3* と共に、N1141 菌株の *hrp* (*hypersensitive response/pathogenicity*) 遺伝子群によって発現制御を受けていることを、以前筆者は報告した (藤原、2003)。*hrp* 遺伝子のいくつかは、細菌の内膜・外膜・ペリプラズム領域に局在する複数のタンパク質がトンネル構造を形成して、病原性タンパク質を細菌の細胞外に直接分泌する、タイプ III 分泌機構と呼ばれる多くのグラム陰性植物病原細菌に存在する装置をコードしていることが知られている (He, 1997; Huang *et al.*, 1995)。また、*hrp* 遺伝子クラスター内にはエリシター活性を有する *harpin* や *popA* といったタンパク質をコードする遺伝子も存在しており、これらがイネの *A. avenae* の認識と免疫応答誘導に関与している可能性を示した (藤原、2003)。したがって、*EREBP* を介したエチレン情報伝達系は、フラジェリン認識情報伝達経路とは独立しており、N1141 菌株のタイプ III 分泌機構に依存して活性化されることが示唆される。

フラジェリン認識の下流に制御される遺伝子として最も特徴的であったのは、EF-hand Ca^{2+} -binding protein *CCD1* や *CDPK7*、*calmodulin* など、 Ca^{2+} シグナルに関連するタンパク質をコードする遺伝子が高い割合で含まれていることであった (Table 1, 2)。また、*CCD1* と *CDPK7* は他のフラジェリン認識下流遺伝子である *EL2* や *myb* などと共に、 Ca^{2+} 選択的キレート剤である EGTA の存在下で、N1141 菌株接種による発現誘導が抑制された (Fig. 5, 6)。これらのことは、イネ細胞内においてフラジェリン認識情報が Ca^{2+} シグナルを介して伝達されている可能性を示唆している。*CCD1* は、コムギの cDNA ライブラリーから MAP キナーゼの基質のスクリーニング過程で単離された (Fukunaga and Hunter, 1997)。*CCD1* は、helix-loop-helix 構造を形成して Ca^{2+} と結合する EF-hand モチーフを一つ有する 14.2 kDa のタンパク質であり、そのモチーフ内に 12 個すべての共通アミノ酸残基が含まれていたことから、*CCD1* は Ca^{2+} に対して高親和性であることが示されている (Takezawa, 2000)。*CCD1* の C 末端領域は、真核生物に普遍的に存在する 20 kDa の Ca^{2+} 結合骨格タンパク質である *centrin* に 30 % 程度の相同性を有している。*CCD1* は、雪枯れ病菌 *Typhula ishikariensis* 由来のエリシター処理により、処理後 10 分から転写誘導され、その発現は Ca^{2+} イオノフォアである 4-bromo A23187 (終濃度 10 μM) 処理によりミミックされた。また、このような

CCD1 の転写誘導は、 Ca^{2+} キレート剤である BAPTA (*O,O'*-Bis (2-aminophenyl) ethyleneglycol-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid; 25 mM) や Ca^{2+} チャネル遮断剤である La^{3+} (5 mM LaCl_3) 存在下でほぼ完全に抑制された (Takezawa, 1999, 2000)。このことより、エリシター処理によるコムギの *CCD1* の転写誘導に Ca^{2+} の細胞内への流入が重要であることが示された。コムギで認められたこのような知見は、今回の筆者らがマイクロアレイと real time-RT PCR を用いて得た知見と良い一致を示すものである。一方、OsCDPK7 は、*N* 末端領域にセリン/スレオニン型プロテインキナーゼドメインを持ち、自己制御ドメインを挟んで、*C* 末端領域に 4 つの EF-hand Ca^{2+} 結合サイトを含む calmodulin 様ドメインを持つという、植物独自のカルシウム依存性プロテインキナーゼ (CDPK) であり、共通に認められる構造を有している。さらに、OsCDPK7 の *N* 末端領域には、膜アンカーとして機能する *N*-ミリストイル化モチーフが存在していることから、OsCDPK7 は細胞膜かオルガネラ膜にアンカーされた形で存在しているものと推定されている (Hrabak *et al.*, 2003)。一般的に、 Ca^{2+} 結合タンパク質は、外的刺激に応答してその転写が誘導されるという特徴を有していることが知られており、OsCDPK7 も、低温や塩/乾燥ストレス処理に応答して転写誘導されることが報告されている (Saijo *et al.*, 2000)。OsCDPK7 を恒常的に過剰発現させた形質転換イネでは低温、塩/乾燥ストレスへの耐性が増強されることが明らかになり、OsCDPK7 はこれら環境ストレスへの適応に重要な役割を担っていることが示された (Saijo *et al.*, 2000)。OsCDPK7 はまた、N1141 菌株の精製フラジェリン処理によっても早期に発現誘導されることが示されたことから (Fig. 4)、フラジェリン認識シグナリングと低温、塩/乾燥ストレスシグナリングは部分的に重複している可能性が示唆された。さらに、OsCDPK7 とアミノ酸レベルで約 67% の相同性を有しているタバコの NtCDPK2 が過敏応答 (HR) に至る Avr9/Cf-9 のレース特異的シグナル経路に関与していることを J.D.G. Jones らのグループが報告している (Romeis *et al.*, 2000, 2001)。Cf-9 は、トマト葉かび病菌 *Cladosporium fulvum* のエリシター Avr9 を発現しているレースに対する抵抗性に必要な植物側 *R* gene であり、細胞外に LRR ドメインを持つ受容体様膜タンパク質をコードしている (van der Hoorn *et al.*, 2005)。Cf-9 発現植物体に Avr9 を処理すると、急速なイオン流入 (Piedras *et al.*, 1998; Blatt *et al.*, 1999) や、活性酸素種の生成 (Piedras *et al.*, 1998)、MAPKs や CDPKs の活性化 (Romeis *et al.*, 1999, 2000, 2001) が起こることが報告されている。この Avr9/Cf-9 により誘導される遺伝子群と、*Arabidopsis* のフラジェリン受容体である FLS2 によるリガンド flg22 の認識によって誘導される免疫反応の過程で誘導される遺伝子群 (Gomez-Gomez *et al.*, 1999, 2000; Gomez-Gomez and Boller, 2000) とを比較したところ、Avr9/Cf-9 と flg22/FLS2 の系の間で重複する遺伝子が多いことが認められた (Navarro *et al.*, 2004)。このように、タバコにおいても Avr9/Cf-9 や flg22/FLS2 を介した免疫反応の誘導に、OsCDPK7 のオ

ルソログである NtCDPK2 が重要な役割を担っていることは、フラジェリンによって誘導されるイネの免疫反応誘導において OsCDPK7 が重要な機能を果たしている可能性を示唆するものである。

植物や動物、酵母を含むすべての生物は、代謝制御や外的環境への適応を行うために情報を認識しその情報を細胞内に伝達する情報伝達経路を有している。このような情報伝達経路の中でも、 Ca^{2+} は様々な生物で普遍的にセカンドメッセンジャーとして機能することが知られている。これまでに高等植物では、植物ホルモン、病原体による感染、傷害、低温および乾燥ストレスや光応答などの環境要因を含む多種多様な刺激に応答して、細胞内への Ca^{2+} 流入が引き起こされることが知られている (Doke and Miura, 1995, Noritake *et al.*, 1996)。このような一過的に上昇した細胞内 Ca^{2+} は、いくつかの Ca^{2+} 結合タンパク質によって認識され、タンパク質のリン酸化や遺伝子発現誘導といったさらに下流の応答を引き起こすことが知られている。

本章では、広く網羅的な遺伝子発現プロファイル解析を行うことが可能なマイクロアレイを有効に用い、非親和性菌特異的および非親和性菌のフラジェリン特異的にイネ培養細胞で発現誘導される遺伝子を同定することが出来た。さらに、フラジェリン認識の下流に制御されている遺伝子は、特に Ca^{2+} シグナルに関与するタンパク質をコードする遺伝子を多く含んでいたこと、フラジェリン認識の下流遺伝子は Ca^{2+} キレート剤で発現が抑制されたことから、フラジェリン認識後の情報伝達に Ca^{2+} が関与する可能性を指摘した。すなわち、*A. avenae* がイネ細胞に感染を試みた場合、イネはフラジェリンをエリシターとして認識することによって、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇を引き起こし、CCD1 や OsCDPK7、calmodulin 等の Ca^{2+} 結合タンパク質を介してフラジェリン認識情報を伝達して下流の免疫反応を誘起している可能性が考えられる。そこで次章では、イネが非親和性菌株またはフラジェリンを認識した場合、実際にイネ細胞内への Ca^{2+} の流入が引き起こされるのかどうか、またこのような細胞内 Ca^{2+} 上昇が免疫反応誘導に関与しているかどうかを調べると共に、免疫反応誘導における Ca^{2+} シグナルがどのような分子を介して伝達されているのかを明らかにするため、第一章で得られた知見を基にさらに詳細に解析を行った。

第二章 イネにおけるフラジェリン認識情報の Ca²⁺シグナルを介した伝達機構

2-1 序

イネにおける *A. avenae* の親和性、非親和性の宿主特異性の決定と、過敏感細胞死や活性酸素の発生などを含む免疫反応の誘導に、*A. avenae* の鞭毛構成タンパク質であるフラジェリンのイネによる認識が関わっている。第一章において、K1 菌株、N1141 菌株およびそのフラジェリン欠損株と精製フラジェリンを用いて、マイクロアレイによる網羅的な遺伝子発現プロファイル解析を行った結果より、イネにおけるフラジェリン認識の下流に制御されている遺伝子群を同定することが出来た。さらに、フラジェリン認識後の情報伝達に CCD1 や OsCDPK7、calmodulin 等のタンパク質を介した Ca²⁺シグナルが関与している可能性が示された。そこで、第二章では、イネがフラジェリンを認識した後の免疫反応誘導に関与する Ca²⁺シグナルを介した情報伝達機構を明らかにすることを目的として研究を行った。まず、N1141 菌株やその精製フラジェリン処理によって誘導される過敏感細胞死や活性酸素の発生等の免疫反応への各種カルシウム阻害剤の影響を調べ、免疫反応情報伝達系への Ca²⁺シグナルの関与を明らかにした。次に、免疫反応誘導時のイネ細胞内における[Ca²⁺]の変動を観察するために、Yellow Cameleon 3.6 を一過的に発現させたイネ培養細胞を用いてモニター系を構築し、K1 菌株、N1141 菌株、およびそれらのフラジェリン欠損株の接種や精製フラジェリンの処理後のイネ細胞内[Ca²⁺]動態を明らかにすると共に、この細胞内[Ca²⁺]変動へのカルシウム阻害剤の影響を調べた。さらに、イネゲノムに存在する全 29 個の *OsCPK* のうち、免疫反応特異的に発現誘導される *OsCPKs* を明らかにし、これら *OsCPK* の一過的過剰発現がフラジェリン応答遺伝子の転写を誘導するかどうか、*OsCPK* 過剰発現植物体において、免疫反応を誘導するかどうかを明らかにし、フラジェリン認識後の情報伝達系に関与する Ca²⁺シグナルおよび、*OsCPK* の役割について議論する。

2-2 材料と方法

植物および細菌

イネ培養細胞は、Oc 細胞 (*Oryza sativa* L. C5924) を第一章で述べたのと同様の条件で培養し、実験に用いた。植物病原細菌は、*Acidovorax avenae* K1 菌株、N1141 菌株、N1141 フラジェリン欠損株、K1 フラジェリン欠損株を第一章で述べたのと同条

件で培養し、イネ培養細胞への接種実験に用いた。なお、本章の研究で用いた N1141 菌株のフラジェリン欠損株は第一章で用いたフラジェリン遺伝子のインサクションミュータントではなく、フラジェリンをコードする約 1.5 kbp の *FlaA* 遺伝子を完全に欠損させた株である。このフラジェリン欠損株が、フラジェリン生産能を完全に失っており、この欠損株をイネ培養細胞に接種してもインサクションミュータントと同様に過敏感細胞死やフラジェリン認識の下流で制御される遺伝子群の誘導が認められないことは確認済みである。

タバコ植物体 (*Nicotiana benthamiana*) は、種子の播種 3 週間後にポットに植え替え、人工気象器内で明期 16 時間、暗期 8 時間の光周期、25°C の条件下で 3 週間生育させたものをウイルス感染用タバコ植物体として用いた。ウイルス感染後および菌体接種後のタバコ植物体は、高湿度を保ち 23°C で生育させた。タバコ親和性菌である *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* は、King's B (KB) 培地で 27°C で生育させた。タバコ植物体への接種実験には、KB 培地で生育させた *P. syringae* を遠心操作によって集菌して濃度を概算した後、10 mM MgSO₄ - 0.02% Silwet L77 (OSI Specialties Inc., Danbury, CT, U.S.A.) にて 1.0×10^7 cfu/ml に調整したものを用いた (Takeuchi *et al.*, 2003)。

フラジェリンの精製

A. avenae 菌体からのフラジェリンタンパク質の精製は、第一章で述べたのと同様の方法を用いた。タンパク質の定量は BIO-RAD protein assay-kit を用いて行い、精製フラジェリンタンパク質のイネ培養細胞への処理は、それぞれの実験条件に応じて終濃度 15~50 µg/µl になるように適宜希釈したものを用いた。

細胞死検定

A. avenae の各菌株を終濃度 1×10^8 cfu/ml になるようにイネ培養細胞に接種し、30°C、光条件下で振盪培養した。経時時間ごとに液体培地 0.5 ml 分の培養細胞を 24 穴マイクロプレート (IWAKI, Chiba, Japan) に移し、液体培地を除去した。回収した細胞に 0.05% [w/v] Evans blue 溶液を加えて 15 分間染色した後、余剰色素を 1 ml の滅菌水で 3 回洗浄し、0.5 ml の抽出液 (1% [w/v] SDS, 50% methanol) を加えて一晩静置した。この抽出液 200 µl をそれぞれ 96 穴マイクロプレートに移し、595 nm における吸光度を測定することにより細胞死を定量した (Turner and Novacky, 1974)。

H₂O₂ の検出

イネ培養細胞における、1) N1141 菌株接種により誘導される活性酸素の発生、および 2) N1141 菌株の精製フラジェリン処理によって誘導される活性酸素の発生をそれぞれ検出するために以下の方法を用いた。

1) DAB (3,3'-diaminobenzidine) 染色法

DAB 染色法による H_2O_2 の検出には、細胞死の検出と同条件で各菌株を接種したイネ培養細胞を用いた。*A. avenae* 接種後、一定時間ごとに先切りチップを用いて液体培地 1 ml 分の培養細胞を 24 穴マイクロプレート (IWAKI, Chiba, Japan) に移し、液体培地を除去した後、細胞を 1 ml の PBS で 2 回洗浄し、1 ml の DAB 溶液 (1 mg/ml DAB-HCl, 50 mM Tris-HCl [pH 6.0]) (Sigma, U.S.A.) を加えて 20 分間染色した。余剰の DAB を 1 ml の PBS で 3 回洗浄し、固定液 (30% [v/v] lactic acid, 30% [v/v] phenol) を加えて色素を固定した。染色した細胞をマイクロプレートに入った状態で CCD カメラ (Progres 3012, Carl Zeiss, Germany) で撮影し画像化した。得られたカラー画像を 256 階調のグレースケール画像に変換した後、NIH Image を用いて DAB の染色度合いを数値化し、活性酸素の発生を定量した (Iwano *et al.*, 2002)。

2) ルミノール法

ルミノール法による活性酸素の測定には植え継ぎ後 4 日目の培養細胞を用いた。ろ紙上にのせて水分を切った培養細胞約 10 mg (湿重量) を量り取り、12 穴マイクロプレート (IWAKI, Chiba, Japan) に移し、新たに R2S 培地を 1 ml 加えた。これを 30℃ で 3~8 時間程度、振盪培養して馴化させたものをアッセイに用いた。EGTA は 10 mM になるように測定開始 30 分前に培地中に添加し、N1141 精製フラジェリンは 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で接種した。一定時間ごとにこの培養培地中から細胞を吸わないように 10 μl を専用チューブ (GL-100-ST, マイクロテック・ニチオン) に取り、そこに 160 μl の 50 mM potassium phosphate buffer [pH 7.9]、10 μl の 1.1 mM luminol、20 μl の 14 mM potassium ferricyanide を加え、攪拌後すぐにルミノメーター GENE LIGHT 55 (マイクロテック・ニチオン, Japan) で 10 秒間発光を測定した。実験は 3 回繰り返し、3 回の値の平均値をデータとして用いた。

パーティクルボンバードメント法によるイネ培養細胞の形質転換

イネ培養細胞に目的遺伝子を一過的過剰発現させるために、パーティクルガンを用いて目的遺伝子の導入を行った。植え継ぎ後 4 日目の培養細胞のフラスコより培地のみをスポイトを用いて除去し、20 ml の R2O (R2S 培地 + 165 mM mannitol, 165 mM sorbitol) を加えて懸濁した。先切りチップを用いて 500 μl の細胞懸濁液を取り、5 cm 径のろ紙の中央に細胞が重ならないように広げた。このろ紙を 3 g/l phytagel を含む R2O のプレート上に乗せ、30℃、暗所で 4 時間静置培養した。エッペンチューブに 5 μg の目的導入遺伝子のプラスミド液を分注して、50 μl に懸濁した 3 mg の金粒子 (1.0 micron gold)、50 μl の 2.5 M CaCl_2 、20 μl の 0.1 M spermidine を加えて 3 分間激しく攪拌した。その後、2 分間静置し、10,000 rpm で 10 秒間遠心分離して上清を除去し、250

μl の 100% ethanol を加えて軽く超音波破碎、激しく攪拌後、同条件で再度遠心分離し上清を除去した。得られた沈殿物を 60 μl の 100% ethanol で懸濁し、このうちの 10 μl を macro carrier holder にセットした macro carrier の中央にのせ、ethanol を乾燥させた。パーティクルガン Biolistic PDS-1000/He (Bio-Rad) 内に、1,100 psi の rupture disk、stopping screen と共にセットし、減圧装置とヘリウムガスの圧力を利用して、目的 DNA を付着させた金粒子をイネ細胞に打ち込むことによって目的遺伝子を導入した。これを 30°C、暗所で 12~14 時間静置培養し、アッセイに用いた。なお、パーティクルガン法に用いる macro carrier など はすべて Optimization Kit (Bio-Rad, Richmond, CA, U.S.A.) 付属のものを 70% ethanol で滅菌処理を行ったものを用いた。

Yellow Cameleon 3.6 による細胞内 Ca^{2+} 動態の解析

イネ細胞内の Ca^{2+} 動態は、 Ca^{2+} センサータンパク質である Yellow Cameleon 3.6 (YC 3.6) を用いて行った。Yellow Cameleon は Ca^{2+} が結合することにより構造変化を生じ、励起された ECFP (enhanced cyan fluorescent protein) から EYFP (enhanced yellow fluorescent protein) に蛍光エネルギーの共鳴移動 (FRET: Fluorescent Resonance Energy Transfer) が起こるため、この ECFP と EYFP の蛍光強度比を測定することで細胞内の Ca^{2+} の変動の可視化が可能なタンパク質である (Miyawaki, 1999)。まず、イネ細胞で YC 3.6 を一過的に発現させるために、約 2.0 kbp の YC 3.6 遺伝子フラグメントを maize の ubiquitin プロモーター (Christensen *et al.*, 1992) 下流に連結した pAHC17 プラスミドを作製した。このプラスミドをパーティクルボンバーメント法によりイネ培養細胞に導入し、30°C で一晩静置培養し、YC 3.6 を発現させた。ごく少量の YC 3.6 導入細胞を 24×40 mm の Micro cover glass (Matsunami, Japan) 上に移し、30 μl の菌体懸濁液 (N1141 菌株、K1 菌株、N1141 フラジェリン欠損株、K1 フラジェリン欠損株; 終濃度 1×10^8 cfu/ml) もしくは N1141 菌株、K1 菌株の精製フラジェリン懸濁液 (終濃度 25 $\mu\text{g/ml}$) を加えて 18×18 mm の Micro cover glass (Matsunami) を上から被せた。カバーガラスの上からやさしく押さえて細胞を均一にし、ペーパーボン드로カバーガラスを固定し、すばやく共焦点レーザー顕微鏡 LSM 510 META (Zeiss) による測定を開始した。なお、それぞれの菌体およびフラジェリンは、細胞への接種時の急な浸透圧変化の影響を除くため、R2O 培地に懸濁したものを用い、長時間の測定には Micro cover glass の代わりにガラスボトムディッシュ (MS-Coated 35mm Dish, Matsunami) を用いた。また、測定中は常に焦点がずれないように微調整し、蛍光強度が擬似的に変化するのを防いだ。YC 3.6 のスペクトルは、40×レンズ、458 nm の励起波長で 468 nm から 548 nm の蛍光波長領域を 10 nm 間隔で、5 秒間隔で取得した。得られたデータを CFP 像と YFP 像にスプリットし、ECFP と EYFP の蛍光強度の値をそれぞれ得た。これを用いて EYFP/ECFP の Ratio 値を算出し、 Ca^{2+} 動態解析を行った。Ratio 画像は 3

×3 pixel を平均化し、Ratio 値の強度を 256 階調の擬似カラーにて表示した。

Real time RT-PCR 法

目的遺伝子の発現を real time RT-PCR によって定量的な解析を行った。鋳型として使用する total RNA は、RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いてイネ培養細胞から抽出した。目的遺伝子の転写産物を 150 bp 前後で増幅するような目的遺伝子特異的なプライマーをそれぞれ設計した。K1 菌株、N1141 菌株、 Δ fla1141-2 菌株、もしくは精製した K1 菌株のフラジェリン、N1141 菌株のフラジェリンそれぞれをイネ培養細胞に接種後、一定時間ごとに細胞を回収した。これら細胞より精製した 100 ng の total RNA を鋳型として real time RT-PCR 反応を行った。反応条件、解析方法は第一章と同様の方法を用いた。

Real time RT-PCR 用プライマー

遺伝子名		塩基配列	増幅産物サイズ (bp)
<i>OsCPK1</i>	forward,	5'-GACAATGCACATGAACAGATTGGAG-3'	245
	reverse,	5'-GTTGGGAGCAATCTCAGGGTT-3'	
<i>OsCPK2</i>	forward,	5'-AGCAAGCGCTGAGGGAGAAAGG-3'	159
	reverse,	5'-CGTCCCGTCGCTTCTTGGGATT-3'	
<i>OsCPK3</i>	forward,	5'-TGGCAAGATTAGCTATGACGAA-3'	147
	reverse,	5'-CACTCATTGACCAGTTTTACGG-3'	
<i>OsCPK4</i>	forward,	5'-GCATGCAGATAAAGTTTCGGT-3'	163
	reverse,	5'-CAGGCAACTTTATTGCGATGA-3'	
<i>OsCPK5</i>	forward,	5'-AGAATTCATTGCTGCTACTCTG-3'	166
	reverse,	5'-ACGTCATCGAGAAAAGCATC-3'	
<i>OsCPK6</i>	forward,	5'-TCAATTCACAACCTCCGACTCAC-3'	232
	reverse,	5'-GGTACCCACATATACAAATTGCTTC-3'	
<i>OsCPK7</i>	forward,	5'-CTATGGAGACAATAGCATGAG-3'	166
	reverse,	5'-TAGAGTTACGCAAACATGAC-3'	
<i>OsCPK8</i>	forward,	5'-CACGCAATAGACTGGACAGAGA-3'	141
	reverse,	5'-ATCGCTGCTGGTAAGCACAA-3'	
<i>OsCPK9</i>	forward,	5'-TTGGGTTTTCCATTTTCGTCCAA-3'	169
	reverse,	5'-CCACCGTTACCACATAATTACACC-3'	
<i>OsCPK10</i>	forward,	5'-CTTGAGGATGTCTTGGGAAAC-3'	155
	reverse,	5'-CTCTACGCCTGTACGTACAC-3'	
<i>OsCPK11</i>	forward,	5'-ATGAGCTTCAAAAGGCATGT-3'	161

	reverse,	5'-CTATGCTGACCCATTTTACCC-3'	
<i>OsCPK12</i>	forward,	5'-GATTACTCGGAGTTCCTCACA-3'	197
	reverse,	5'-TGTCTTTGTCAACTTCATCCAG-3'	
<i>OsCPK13</i>	forward,	5'-TTCCTGCCCAACGAACCTCCT-3'	175
	reverse,	5'-AGAGTTGAGCAATGGCGTACGA-3'	
<i>OsCPK14</i>	forward,	5'-ACCTCTACACCGCGTTCCAGT-3'	200
	reverse,	5'-AGCGCTTGCTCGAGCTCTTC-3'	
<i>OsCPK15</i>	forward,	5'-TGGTTCCATCTTAGGGAAGTGAG-3'	181
	reverse,	5'-AACATATGGCCAGAAAGCACAA-3'	
<i>OsCPK16</i>	forward,	5'-ACCCACTAAGCAGAGACCTT-3'	202
	reverse,	5'-CAACAAGCATGGGTACAGTGA-3'	
<i>OsCPK17</i>	forward,	5'-ACACAAGAAAGCCACGTACT-3'	200
	reverse,	5'-GTCAAAGCTTCACCGTCTCA-3'	
<i>OsCPK18</i>	forward,	5'-GCAAGCATGAGTTCACGCAA-3'	195
	reverse,	5'-CTAGCTTCAGTCCTACATGTCCA-3'	
<i>OsCPK19</i>	forward,	5'-CCTATGAGGCTCAAATAGTCTG-3'	202
	reverse,	5'-AGGACATTCAAATCACTACACC-3'	
<i>OsCPK20</i>	forward,	5'-AGCATTAGGTGATTGTTGGAAG-3'	232
	reverse,	5'-CGTGTGTTGTAAGTTCAGTCTC-3'	
<i>OsCPK21</i>	forward,	5'-AGCAGGAGGCTCTGCAAGGATAC-3'	180
	reverse,	5'-CGCATCGTGTTGCCACTCCAA-3'	
<i>OsCPK22</i>	forward,	5'-TCAGTTGCATAGATGACAAGGTTCA-3'	155
	reverse,	5'-ACATTTGGTAAGTGGATTGCATGTC-3'	
<i>OsCPK23</i>	forward,	5'-CACCCCAAGTATACTGAACTC-3'	185
	reverse,	5'-GCTATTAGGTACTAAGAGAGTCTTC-3'	
<i>OsCPK24</i>	forward,	5'-CGCTGAAGAATTTTCGTAGCAGT-3'	180
	reverse,	5'-CCCCAACTATCAACAATGTTTCAGTC-3'	
<i>OsCPK25, 26</i>	forward,	5'-GCACATGAACAAAATGGATCGAG-3'	186
	reverse,	5'-AATCTATCCGCCCATCCTACA-3'	
<i>OsCPK27</i>	forward,	5'-GACATGATAGGCGAAGTAGATCAGG-3'	123
	reverse,	5'-AAGGCATCCCTAAAACCGCTAA-3'	
<i>OsCPK28</i>	forward,	5'-CTGCGAACAGTTTGGCCTTT-3'	200
	reverse,	5'-CAAACCTCGCTGTAATCAATTTGTCC-3'	
<i>OsCPK29</i>	forward,	5'-AGATGTCAAAGAGCAGGCTT-3'	147
	reverse,	5'-AATATGAGATTTCGGCCTACCTC-3'	

PAL forward 5'-GGCGAGGACTGCAACAAGGTGTT-3'
 reverse 5'-TGGGTGTATGGCAATGGCAATGA-3'

プロトプラストの調整と PEG 法による形質転換

プロトプラスト調整に用いるイネ培養細胞は植え継ぎ後 4 日目のものを用いた。イネ培養細胞 5 ml から、メスピペットを用いて培地を除去し、使用直前に調整した 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, 5 mM MES-KOH [pH 5.7], 10 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.1% BSA) を 0.22 μm 径のフィルター MILLEX-GS (Millipore, Billerica, MA, U.S.A.) を通して加えた。これを 30°C、3 時間暗所で静置培養した後、100 μm 径のセルストレイナー (Beckton Dickinson Labware, USA) を通して濾過し、プロトプラストを回収した。この濾液を swing rotor を用いて、100×*g* で室温、5 分間遠心分離し、上清を除去した後、15 ml のプロトプラスト洗浄液 (117 mM KCl, 82 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 85 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, [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た。上清を除去し、3 ml のプロトプラスト洗浄液を加えて緩やかに混合し、血球計算板を用いて顕微鏡観察下で 0.1 mm^3 当たりの細胞数を数えることにより、細胞密度を算出した後、MMg solution (400 mM mannitol, 15 mM MgCl_2 , 4mM MES-KOH [pH 5.7]) に懸濁して細胞密度 2×10^5 cells/ml のプロトプラスト液を得た。エッペンチューブに 1 μg の目的導入遺伝子を含むプラスミド液を入れ、プロトプラスト液 200 μl (4×10^4 cells) を加え、さらに 200 μl の PEG solution (40% [v/v] PEG 4000 (Fluka) , 200 mM mannitol, 100 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) を加えて、先切りチップを用いて緩やかに 20 回ピペッティングを行った。室温で 15 分間静置した後、swing rotar の遠心機を用いて、100×*g* で室温、5 分間遠心分離して上清を除去し、200 μl の MMg solution に懸濁して 30°C、暗所で 12~14 時間清置培養した後のプロトプラストを実験に用いた。

OsCPK のクローニングおよび発現コンストラクトの作製

N1141 菌株接種後特異的に発現誘導される *OsCPK* の機能を詳細に解析するために、イネに存在するそれぞれの *OsCPK* のクローニングを行った。まず、N1141 菌株接種 6 時間後のイネ培養細胞から抽出した 500 ng の total RNA より、SuperScript II RNase H Reverse Transcriptase (GIBCO BRL) を用いて cDNA を合成した。これを鋳型として用い、制限酵素サイトを付加して作製した、各 *OsCPK* 遺伝子の ORF 領域を増幅させるプライマーを用いて PCR を行い、得られた PCR 産物を pGEM-T vector cloning Kit (Promega) を用いて pGEM-T ベクターにクローニングした。シークエンスによりインサート DNA 塩基配列を解析し、目的導入遺伝子と完全一致することを確認した後、インサート配列を pAHC17 vector にクローニングした。プラスミドは QIAfilter Plasmid

Midi Kit (QIAGEN) を用いて精製し、これをプロトプラスト一過的過剰発現に用いるコンストラクトとした。cDNA からのクローニングに用いたプライマーはそれぞれ、*OsCPK7* (forward; 5'- ACCTAGATCTATGGGGAATCAGTGCCAGAAC-3', reverse; 5'- ACCTA

GATCTTCAATGTACTTGAGGTGCGTC-3'), *OsCPK8* (forward; 5'- ACCTTGATCAATGGGCAACTGCTGCGGCACG-3', reverse; 5'- ACCTTGATCACTATTGCGTGTGCGTCAC TGAT-3'), *OsCPK10* (forward; 5'- ACCTGGATCCATGGGGAACACGTGCGTCGGC-3', reverse; 5'- ACCTGGATCCCTATGGAAGACAACATATCGA-3'), *OsCPK12* (forward; 5'- ACCTGGATCCATGGGCAACTGCTTCACCAAG-3', reverse; 5'- ACCTGGATCCTCAG GTTTGTATTTCCTTTCCT-3'), *OsCPK13* (forward; 5'-CTAGCTCTGCTGTTTCTGTG-3', reverse; 5'-CTAGTTCACCGAACACCTTC-3'), *OsCPK19* (forward; 5'- ACCTAGATCTA TGGGGTCGTGTTGCAGCAGA-3', reverse; 5'- ACCTAGATCTCTATTTGAGCCTCATA GGCTG-3') である。

OsCPK13 (OsCDPK7) の細胞内局在解析

イネ細胞における *OsCPK13* の細胞内局在を解析するために、*OsCPK13* と RFP の融合タンパク質をイネ培養細胞で一過的に発現する系を構築した。*OsCPK13* の全 ORF の C 末端領域に RFP (Clontech) を連結した 2.5 kbp のフラグメント、および N 末端領域の Met から Thr までの N-myristoylation モチーフを含む 26 アミノ酸残基を欠損させた *OsCPK13* (*OsCPK13Δ1-26*) に RFP を連結した 2.0 kbp のフラグメントを、イネ細胞で一過的に発現させるため、それぞれ pAHC17 の ubiquitin プロモーター下流に組み込んだ (*OsCPK13-RFP*、*OsCPK13Δ1-26-RFP*)。これらプラスミドをパーティクルボンバードメント法によりイネ培養細胞に導入し、30℃で一晩静置培養した後、共焦点レーザー顕微鏡 LSM 510 META にて RFP の蛍光を観察することにより、*OsCPK13*、*OsCPK13Δ1-26* の局在を解析した。なお、それぞれのフラグメントを得るための制限酵素サイトを付加した PCR プライマーは *OsCPK13* (1,728 bp) ; forward 5'-CGGGATCCGTGCTGTTTCTGTGA-3', reverse 5'-CGACGCGTCGCCTCATGCTGATAT-3'、*OsCPK13Δ1-29* (1,556 bp) ; forward 5'-CGGGATCCCGGACGACAACAACAA-3', reverse プライマーは *OsCPK13* と共通のものを使用した。

デュアルルシフェラーゼアッセイ

デュアルルシフェラーゼアッセイは、Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega) を用いて行った。上記の方法より得られた 50 μl のプロトプラスト液 (1×10⁴ cells) を swing rotor を用いて 100×g で室温、5 分間遠心分離し、上清を除去した。そこへ 50 μl の 1×Passive lysis buffer を加えて、タッピングで混合した後、15 分間、室温で

静置し、細胞抽出液とした。あらかじめ測定チューブに luciferase assay substrate を luciferase assay buffer II に懸濁した luciferase assay reagent II を 25 μ l 分注しておき、そこへ 5 μ l の細胞抽出液を加え、ピペティングで 3 回混和した。この測定チューブをルミノメーターGENE LIGHT 55（マイクロテック・ニチオン, Japan）に設置し、First luciferase（ホタルルシフェラーゼ）活性を測定した。続いて、ルミノメーターから測定チューブを取り出し、1 ml の Stop Glo buffer に 20 μ l の 50 $\times$ Stop Glo substrate を加えて作製した 1 $\times$ Stop Glo reagent 25 μ l を加え、ボルテックスで混和した。これをルミノメーターに設置して、Second luciferase（ウミシイタケルシフェラーゼ）活性を測定した。化学発光の測定は GENE LIGHT55 の Dual Luciferase Assay MODE を用い、First Luciferase、second Luciferase 共に delay time 3 sec、count time 10 sec で測定した。なお、アッセイには N1141 菌株の精製フラジェリンを 15 μ g/ml (500 nM) になるように処理して 6 時間後のプロトプラストを用い、コントロールには pAHC17 の empty ベクターを導入したプロトプラストを用いた。また、ルシフェラーゼ活性はホタルルシフェラーゼ活性の値を、共発現したウミシイタケルシフェラーゼ活性の値で補正した。

ウィルスを用いた *Nicotiana benthamiana* の一過的過剰発現系

OsCPK13 を *Nicotiana benthamiana* に一過的に発現させる系を構築するために *OsCPK13* 発現用のウィルス RNA の作製を行った。まず、*OsCPK13* の ORF 全長を TogJ ベクターに組み込んだプラスミドを *Mlu*I により制限酵素消化し、開環状の DNA を得た。消化後 DNA 約 1 μ g を 0.5 % SDS、100 μ g/ml Proteinase K と共に 50 $^{\circ}$ C、30 分間加熱した後、順にフェノール/クロロホルム沈殿、イソアミルアルコール/クロロホルム沈殿、エタノール沈殿を行って得られたペレットを DW に溶解した。これをテンプレートとして、T7-MEGA script（Ambion）および Ribo m7G Cap analog（Promega）を用い、Kit のプロトコールに従い 37 $^{\circ}$ C、3 時間 *in vitro* translation を行い、ウィルス RNA 液を得た。播種後 6 週齢の *Nicotiana benthamiana* 植物体の下葉から数枚目の完全展開葉の表側に約 1 g 程度のカーボランダム（600 メッシュ）を散布し、葉脈を挟んだ葉の表面両側にこのウィルス RNA 液を 5 μ l ずつのせて摩擦接種した。タバコ植物体は 25 $^{\circ}$ C、16 時間照明で栽培してウィルスを増殖させた。ウィルス接種 5 日後の植物体を 10^7 cfu/ml に調整した *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* をシリンジを用いてタバコ葉の裏面より細胞間隙に infiltration した。ウィルス感染後および菌体接種後のタバコ植物体は、*P. syringae* の病原性・毒素生産性を保つため、高湿度条件で 23 $^{\circ}$ C で生育させた。形態観察は菌体接種 14 日後に行った。

2-3 結果

2-3-1 免疫反応誘導時の活性酸素発生への Ca^{2+} シグナルの関与

イネ非親和性である *A. avenae* の N1141 菌株、およびその精製フラジェリンは、イネ培養細胞に対し、免疫反応のひとつである活性酸素の発生を誘導する。さらに、N1141 菌株およびそのフラジェリンによって誘導される遺伝子を詳細に調べたところ、 Ca^{2+} シグナルに関与する遺伝子が多く含まれることが示された。そこでまず、この活性酸素の発生に、 Ca^{2+} シグナルが関与しているかどうかを調べるために、各種のカルシウム阻害剤の活性酸素発生誘導への影響を検討した。

1) N1141 菌株接種による活性酸素の発生へのカルシウム阻害剤の影響

N1141 菌株をイネ培養細胞に接種した後に認められる活性酸素の発生へのカルシウム阻害剤の影響を、DAB 染色法により調べた。カルシウム阻害剤としては、細胞外カルシウムキレート剤：EGTA, EDTA、細胞内カルシウムキレート剤：BAPTA-AM (*O,O'*-Bis (2-aminophenyl) ethyleneglycol-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid, tetraacetoxymethyl ester)、カルシウムチャネル遮断剤：nifedipine, verapamil-HCl, diltiazem hydrochloride, CoCl_2 , CaM (calmodulin) 阻害剤：W-7·HCl、および Ca^{2+} イオノフォアである 4-bromo A23187 を使用した。まず、各種のカルシウム阻害剤が *A. avenae* 菌体の生育に影響を及ぼさないかどうか確認するために、それぞれの阻害剤を加えた R2S 培地に N1141 菌株を 1×10^8 cfu/ml になるように接種し、 30°C で振盪培養した 9 時間後の培養上清を 1 ml 取り、分光光度計にて 610 nm の吸光度を測定し、菌体濃度を概算した。その結果、1 mM CoCl_2 処理区でのみ菌体の増殖が抑制されたが、その他の阻害剤については菌体の生育に大きな影響を及ぼさないことを確認した (Fig. 7)。

そこで次に、イネ培養細胞に各種カルシウム阻害剤を菌体接種 30 分前に処理し 30 分間培養した後、イネ培養細胞に N1141 菌株を接種し、0, 3, 6, 9, 12 時間後に培地 1 ml 分の細胞を 24 穴マイクロプレートに移し、PBS で洗浄した後、DAB 染色液で 20 分間染色し、固定液で色素の固定を行った。染色した細胞は CCD カメラで撮影後、256 階調のグレースケール画像化したものを、NIH image を用いて染色度合いを数値化することにより活性酸素の発生量を定量した。その結果、N1141 菌株のみを接種したイネ培養細胞では、接種後約 3 時間から徐々に活性酸素の発生が認められたが、1 mM EGTA、および 1 mM nifedipine の存在下では、活性酸素の発生が半分程度まで抑制されていることが明らかになった (Fig. 8-A, B)。これら以外の阻害剤は、今回用いた処理濃度において N1141 菌株接種 12 時間後までに誘導される活性酸素の発生に顕著な

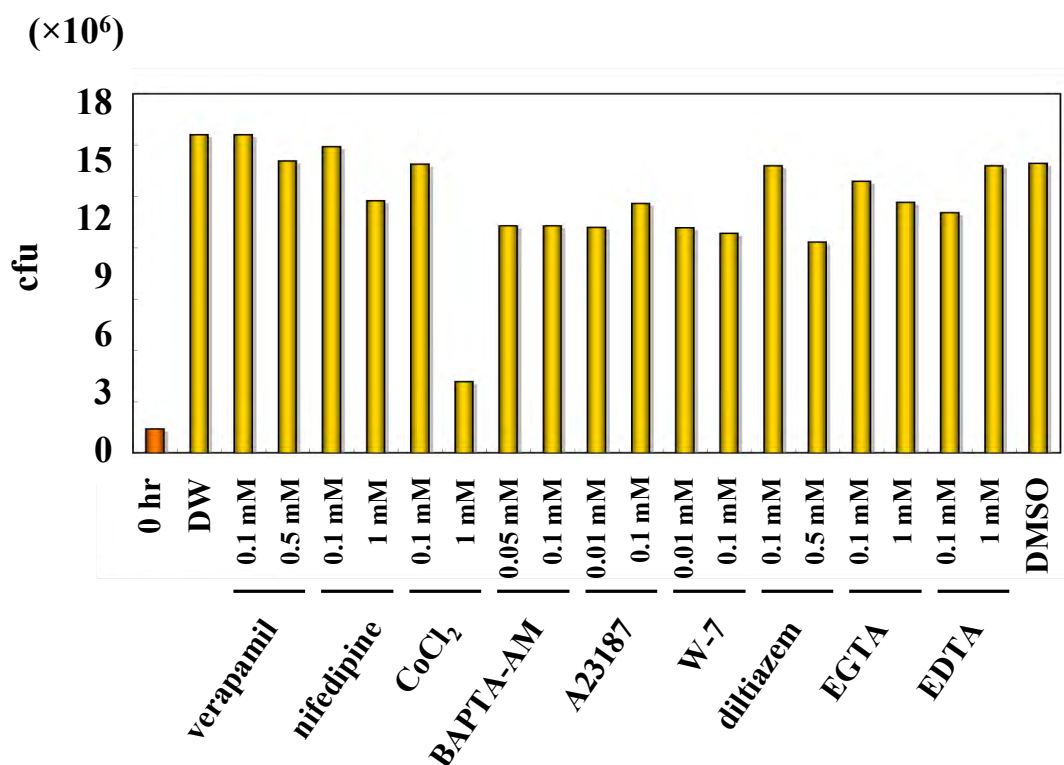


Figure 7. *A. avenae* 菌体生育へのカルシウム阻害剤の影響

免疫反応誘導へのカルシウム阻害剤の効果を調べるに当たり、まず*A. avenae*のN1141菌株の生育への各種カルシウム阻害剤の影響を調べた。R2S培地にN1141菌株を 1×10^8 cfu/mlになるように接種し、培養9時間後の培養上清の610 nmにおける吸光度を測定し、菌体濃度を概算した。カルシウム阻害剤としてはそれぞれ、カルシウムチャネル遮断剤；verapamil, nifedipine, CoCl₂, diltiazem、カルシウムキレート剤；BAPTA-AM, EGTA, EDTA、CaM阻害剤；W-7、カルシウムイオノフォア；A23187を使用した。

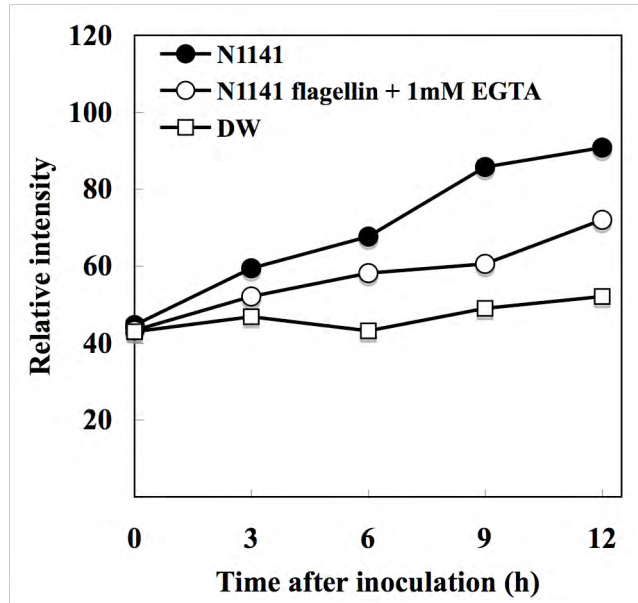
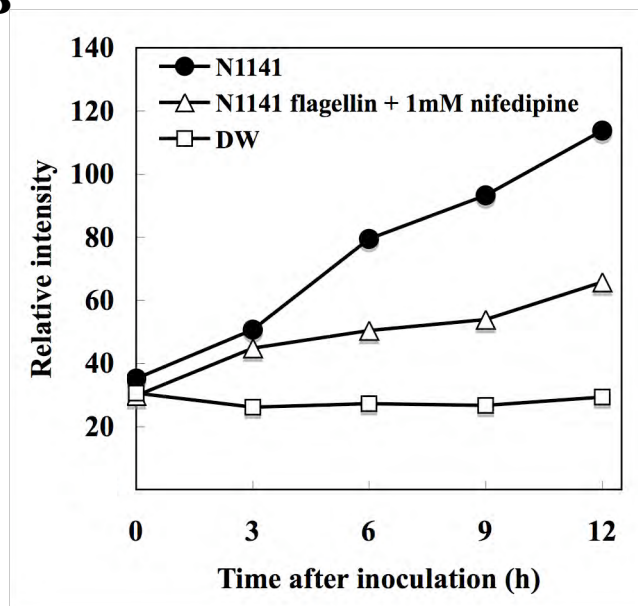
A**B**

Figure 8. 免疫反応である活性酸素発生へのカルシウム阻害剤の影響

N1141菌株接種後に誘導される活性酸素の発生へのカルシウム阻害剤の影響をDAB染色法により調べた。各種阻害剤は菌体接種の30分前に処理し、イネ培養細胞にN1141菌株(●)、N1141菌株 + 1 mM EGTA(○)、N1141菌株 + 1 mM nifedipine(△)、DW(□)をそれぞれ接種し、経時時間ごとに細胞を移し取り、DABにより活性酸素を検出した。染色された細胞はCCDカメラで撮影し、得られたグレースケール画像を数値化して活性酸素の発生量を定量した。

影響は与えなかった (data not shown)。

2) N1141 精製フラジェリン接種による活性酸素の発生

次に、N1141 菌株の精製フラジェリン処理によって誘導される活性酸素の発生へのカルシウム阻害剤の影響を調べた。湿重量 10 mg 分のイネ培養細胞を量り取り、1 ml の R2S 培地と共に 24 穴マイクロプレートに移した。30℃で 4 時間程度培養した後、各種カルシウム阻害剤はフラジェリン処理の 30 分前に培養液中加入した。N1141 菌株より精製したフラジェリントタンパク質を終濃度 15 µg/ml (500 nM) でイネ培養細胞に処理した。フラジェリン処理後 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 3 時間後に細胞の培地上清をそれぞれ 10 µl ずつ専用チューブに取り、160 µl の 50 mM カリウムリン酸バッファー、10 µl の 1.1 mM ルミノール、20 µl の 14 mM フェリシアン化カリウムを加えて、素早くルミノメーターで活性酸素の発生量を測定した。なお、すべてのサンプルについてアッセイは 3 回行い、得られた値の平均値を解析に使用した。その結果、精製フラジェリン単独処理では、処理後 0.5 時間から 2 時間後をピークとする強い活性酸素の発生が認められたが、10 mM EGTA、および 1 mM nifedipine の存在下で、完全にフラジェリン処理による活性酸素の発生が抑制されることが明らかになった (Fig. 9)。また、この活性酸素発生はカルシウムチャネル遮断剤である 5 mM LaCl₃ の存在下でも強く抑制されたが、同じくカルシウムチャネル遮断剤である 1 mM GdCl₃ の存在下ではほとんど抑制は認められなかった (Fig. 9)。また、5 mM LaCl₃ をフラジェリン処理の 30 分後に加えた場合では、その後の活性酸素の発生を顕著に抑制することはないことも明らかになった (Fig. 9)。なお、他のカルシウムチャネル遮断剤 0.5 mM verapamil や 0.5 mM diltiazem、1 mM CoCl₂、1 mM EDTA、0.1 mM BAPTA-AM、0.1 mM W-7 では 5~7 割程度の抑制効果しか示さなかった (data not shown)。これらのことから、細胞外からの Ca²⁺流入が、免疫反応時の活性酸素の発生誘導に必要であることが明らかになった。しかしながら、細胞内 Ca²⁺流入を引き起こすカルシウムイオノフォアである 0.1 mM A23187 の存在下では逆に活性酸素の発生が抑制されることも明らかになった (Fig. 10)。さらに、N1141 菌株の精製フラジェリンを処理したイネ培養細胞における処理後 30 分までの活性酸素の発生を詳細に調べたところ、フラジェリン処理約 10 分後から、活性酸素の発生が徐々に誘導されていることが明らかになった (Fig. 11)。また、細胞外から人為的に Ca²⁺を流入させた場合、活性酸素の発生が認められるかどうかを調べるため、終濃度 100 mM CaCl₂ の非常に高い [Ca²⁺] 培地中のイネ培養細胞に、フラジェリンの代わりに 100 µM A23187 を処理したところ、活性酸素の発生は認められず、逆に未処理の細胞よりも強く活性酸素の発生が抑制されていることが明らかになった (Fig. 11)。これらのことは、フラジェリン認識後の活性酸素発生誘導に、細胞外からの Ca²⁺流入が必須

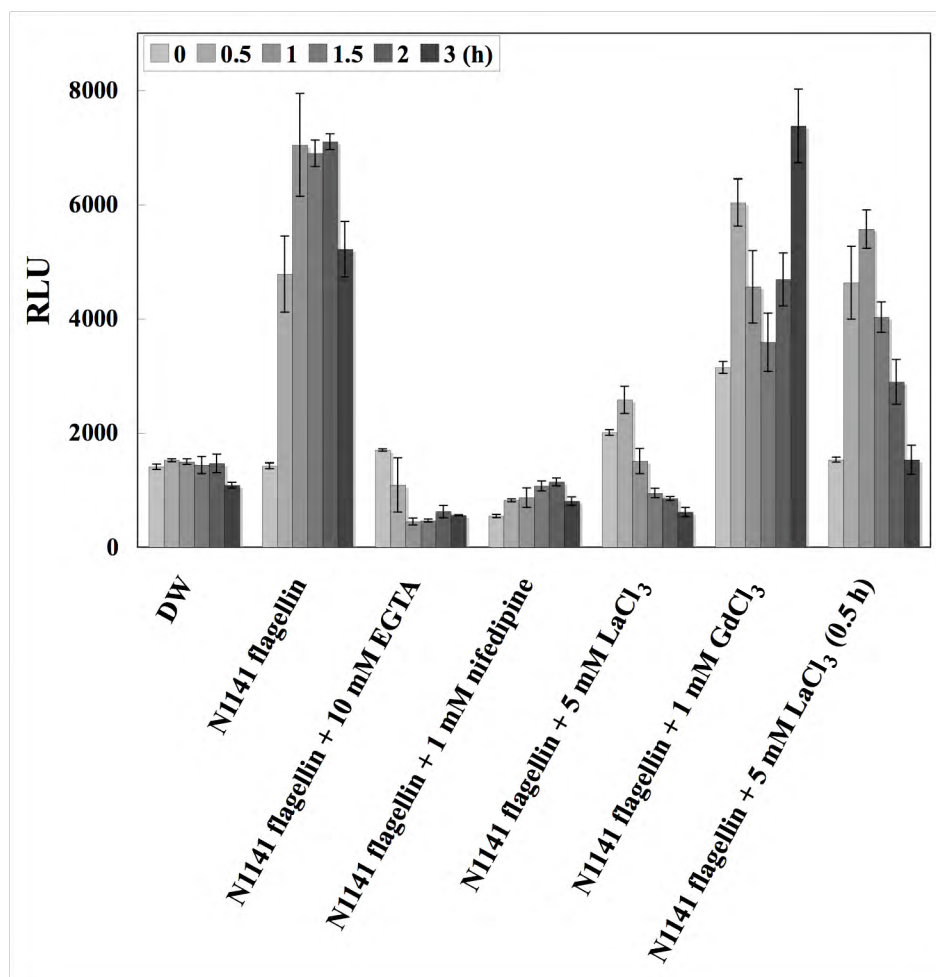


Figure 9. 免疫反応である活性酸素発生へのカルシウム阻害剤の影響

N1141菌株の精製フラジェリン処理により誘導される活性酸素の発生へのカルシウム阻害剤の影響をルミノール法により調べた。各種阻害剤はフラジェリン処理の30分前に加え、イネ培養細胞にN1141菌株の精製フラジェリンを15 $\mu\text{g/ml}$ になるように処理し、処理後0～3時間まで経時時間ごとに培地上清を取り、ルミノメーターを用いて活性酸素の発生量を定量した。5 mM LaCl₃ (0.5 h) についてはフラジェリン処理の30分後に阻害剤を培地に加えた。カルシウム阻害剤としては、カルシウムキレート剤；EGTA、カルシウムチャネル遮断剤；nifedipine、LaCl₃、GdCl₃を用いた。グラフの縦軸は、Luminescence Intensity (RLU; relative light units) を表している。

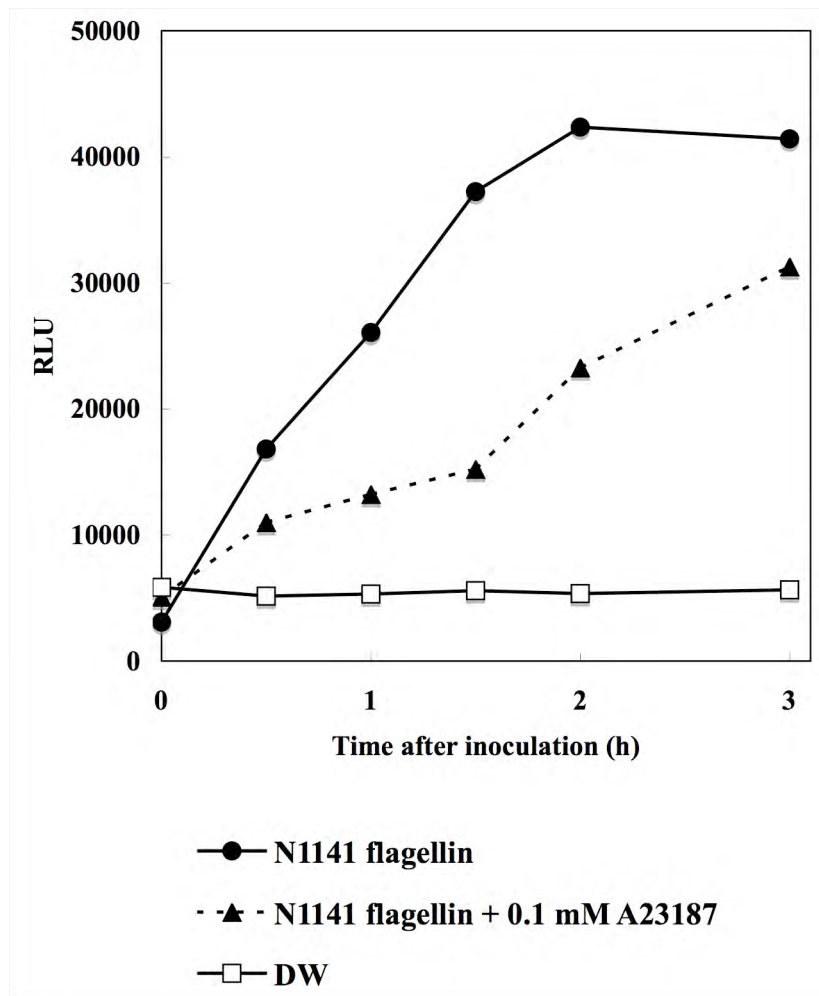


Figure 10. 免疫反応である活性酸素発生へのカルシウムイオノフォアの影響

N1141菌株の精製フラジェリン処理により誘導される活性酸素の発生へのカルシウムイオノフォアの影響をルミノール法により調べた。各種阻害剤はフラジェリン処理の30分前に加え、N1141菌株の精製フラジェリンをイネ培養細胞に終濃度15 $\mu\text{g/ml}$ になるように処理し、経時時間ごとに培地上清を取り、ルミノメーターで測定し、活性酸素の発生量を定量した。

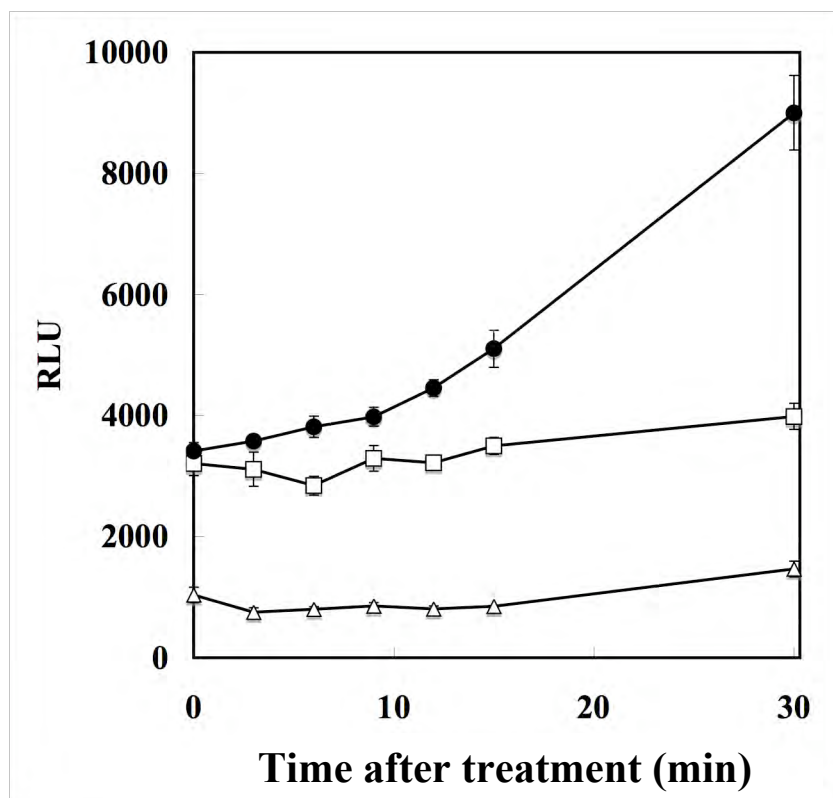


Figure 11. フラジェリン処理により誘導される活性酸素発生

N1141菌株の精製フラジェリン処理後30分までの活性酸素の発生をルミノール法により調べた。各種阻害剤はフラジェリン処理の30分前に加え、精製フラジェリンは15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるようにイネ培養細胞に処理した。●:N1141菌株精製フラジェリン処理、□:DW処理、△:100 mM CaCl_2 + 0.1 mM A23187

であるものの、通常の細胞内環境では有り得ない極端な濃度の人為的な Ca^{2+} 流入は、逆に活性酸素の発生を抑制する効果があることを示唆する。

2-3-2 免疫反応である過敏感細胞死への Ca^{2+} の関与

イネ非親和性である *A. avenae* N1141 菌株は、イネ培養細胞に過敏感細胞死を誘導する (Che *et al.*, 1999)。そこで、この過敏感細胞死の誘導に Ca^{2+} シグナルが関与しているかどうかを調べるために、過敏感細胞死誘導へのカルシウム阻害剤の影響を調べた。各種カルシウム阻害剤は菌体接種 30 分前に処理した。イネ培養細胞に N1141 菌株を接種し、光条件下で振盪培養した。菌体接種 0, 3, 6, 9, 12 時間後に、液体培地 0.5 ml 分の培養細胞を 24 穴マイクロプレートに移し、液体培地を除去した。回収した細胞に 0.05% [w/v] Evans blue 溶液を加えて 15 分間染色して余剰色素を除いた後、0.5 ml の抽出液を加えて一晩静置した。この抽出液を 96 穴マイクロプレートに移し、595 nm における吸光度を測定することによって細胞死の定量を行った。その結果、N1141 菌株接種によって接種後約 6 時間から強い細胞死の誘導が認められたが、その細胞死誘導は特に、1 mM nifedipine および 1 mM EGTA の存在下で強く抑制されることが明らかになった (Fig. 12)。このことから、免疫反応時の過敏感細胞死の誘導にも Ca^{2+} シグナルが関与していることが明らかになった。

2-3-3 免疫反応である活性酸素発生へのタンパク質リン酸化の関与

高等植物における細胞内情報伝達経路には、タンパク質リン酸化を伴うカスケードが関与していることが知られている (Torii, 2000)。これまでに、様々な病原菌エリシターや傷害、植物ホルモン等によって、MAP キナーゼを含む種々のタンパク質リン酸化酵素が活性化されることが報告されている (Zhang *et al.*, 2000)。さらに、*in vivo* ラベリングによるリン酸化タンパク質の解析や、非特異的なタンパク質リン酸化酵素阻害剤を用いた解析などによって、エリシター認識後の下流の情報伝達系において、タンパク質リン酸化酵素が植物細胞の免疫反応誘導に関与していることが示唆されている (Romeis, 2001)。また、*Arabidopsis* のフラジェリン (flg22) 受容体と考えられている FLS2 を介した情報伝達に AtMEKK1、AtMKK4-5、AtMPK3-6 を介した MAPK リン酸化カスケードが関与することも報告されている (Asai *et al.*, 2002)。そこで、イネ培養細胞において N1141 菌株の精製フラジェリンが誘導する活性酸素の発生に、タンパク質リン酸化が関与するのかどうかを調べるために、この活性酸素の発生へのタンパク質リン酸化阻害剤の影響を調べた。2-3-1 の 2) と同様に、1 ml の R2S と共に 24 穴マイクロプレートに移した 10 mg のイネ培養細胞に、CaMK (calmodulin kinase) や

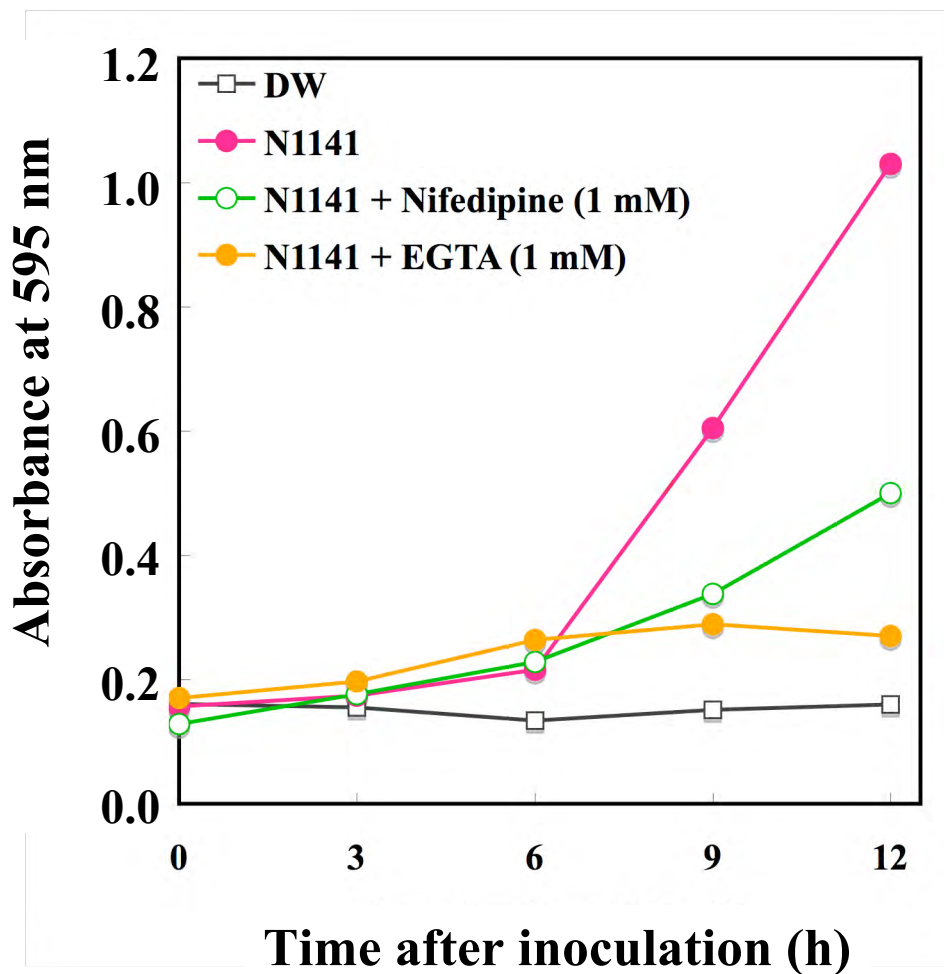


Figure 12. 免疫反応である過敏感細胞死へのカルシウム阻害剤の影響

N1141菌株の接種後にイネ培養細胞で誘導される過敏感細胞死へのカルシウム阻害剤の影響をEvans blue染色法により調べた。各種阻害剤はN1141菌株接種の30分前に加え、イネ培養細胞に終濃度 1×10^8 cfu/mlのN1141菌株)、N1141 + 1 mM nifedipine、N1141菌株 + 1 mM EGTA、DWをそれぞれ接種し、0~12時間後の細胞死を検出した。

MLCK (myosin light chain kinase)、PKA (protein kinase A)、PKC (protein kinase C)、PKG (protein kinase G) など広範囲に強力に作用する細胞浸透性プロテインキナーゼ阻害剤である staurosporine (終濃度 5 μ M) および K252a (終濃度 5 μ M) を加え、30 分間培養した後に N1141 菌株の精製フラジェリンを 15 μ g/ml で処理し、0~4 時間後の活性酸素の発生を経時的にルミノール法により定量した。その結果、精製フラジェリンの処理によって、処理後 2 時間後をピークとした強い活性酸素の発生が認められたが、これらタンパク質リン酸化阻害剤の存在下では、活性酸素の発生誘導が強く抑制されることが明らかとなった (Fig. 13)。このことは、フラジェリン認識後の活性酸素の発生誘導にタンパク質のリン酸化が関与していることを示している。

2-3-4 免疫反応である過敏感細胞死へのタンパク質リン酸化の関与

次に、イネ培養細胞に N1141 菌株を接種した後に認められる過敏感細胞死へのタンパク質リン酸化の関与を調べた。2-3-2 と同様に、液体培地 0.5 ml 分のイネ培養細胞にタンパク質リン酸化阻害剤 (5 μ M staurosporine, 5 μ M K252a) および、タンパク質脱リン酸化阻害剤 (5 μ M Okadaic acid, 5 μ M calyculin A ; セリン/スレオニンフォスファターゼ Type 1 および 2A 阻害剤) をそれぞれ加えて 30 分間培養した後、N1141 菌株を 1×10^8 cfu/ml になるように接種し、0, 4, 6, 8, 10 時間後における過敏感細胞死を Evans blue 染色によって定量した。その結果、N1141 菌株接種によって誘導される過敏感細胞死には、Okadaic acid や calyculin A が今回の処理濃度において何ら影響を及ぼさないことが示された (Fig. 14-A)。一方、5 μ M staurosporine 存在下では過敏感細胞死誘導の完全な抑制が認められ、5 μ M K252a 存在下においても強い細胞死誘導の抑制が認められることが明らかになった (Fig. 14-B)。このことは、N1141 菌株によって誘導される過敏感細胞死にも、タンパク質リン酸化が関与していることを示唆している。

2-3-5 免疫反応誘導時のイネ細胞内における Ca^{2+} 動態の解析

植物の抵抗性反応誘導の初期の情報伝達系では、細胞膜におけるイオン透過性の一過的な変化が共通して起こることが知られている (Zimmermann *et al.*, 1997; Jabs *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 2001)。ここまでの本研究により、フラジェリン認識の情報伝達に Ca^{2+} シグナルが関与していることが示唆されたことから、イネ培養細胞においても N1141 菌株もしくはそのフラジェリン認識後に、細胞内 $[\text{Ca}^{2+}]$ の変化が起こっている可能性が考えられた。そこで、Yellow Cameleon 3.6 を一過的に発現させたイネ培養細胞を用いて、*A. avenae* の各菌株接種、およびその精製フラジェリン処理後のイネ細胞内 Ca^{2+}

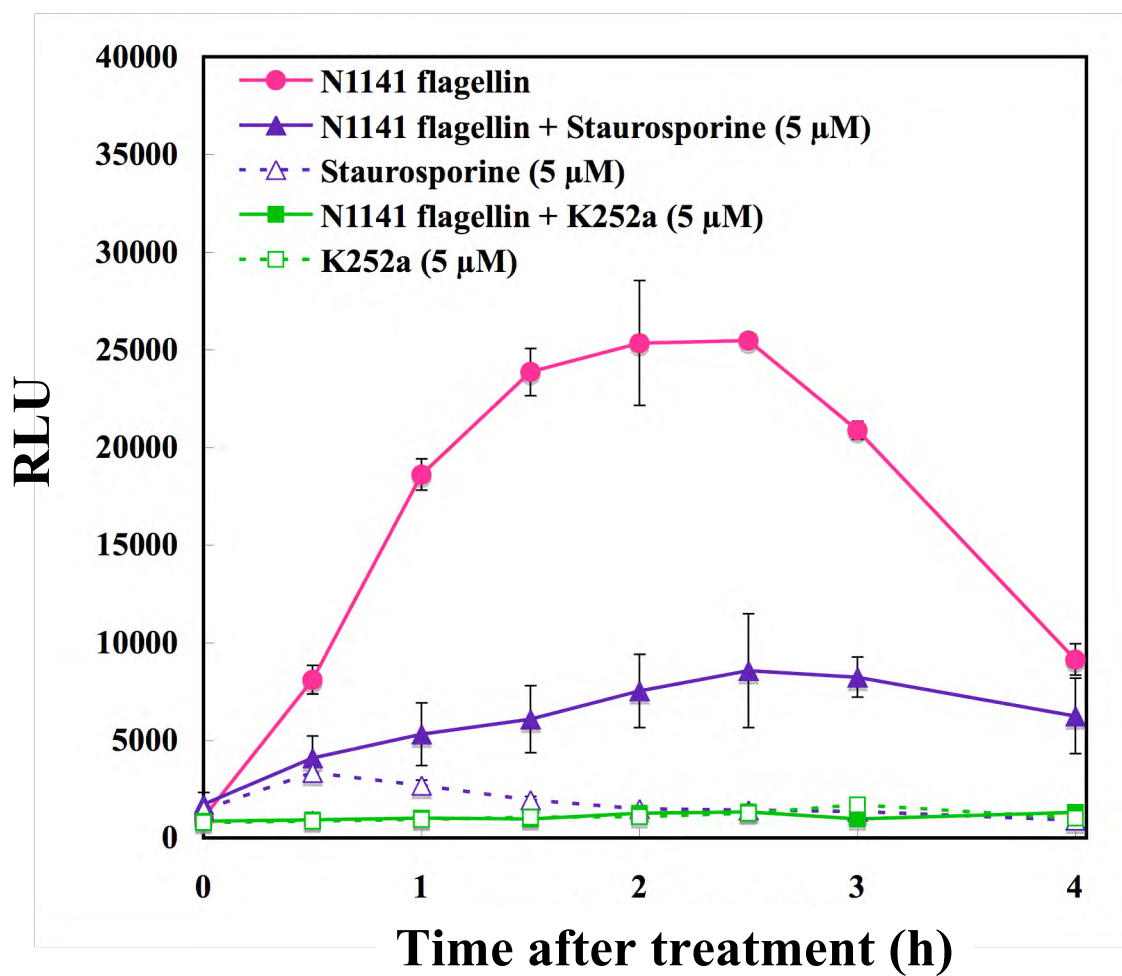


Figure 13. 活性酸素発生へのリン酸化阻害剤の影響

N1141菌株の精製フラジェリン処理後30分までの活性酸素の発生をルミノール法により調べた。タンパク質リン酸化阻害剤はフラジェリン処理の30分前に加え、精製フラジェリンは15 μ g/mlになるようにイネ培養細胞に処理し、処理後0~4時間の活性酸素の発生を定量した。

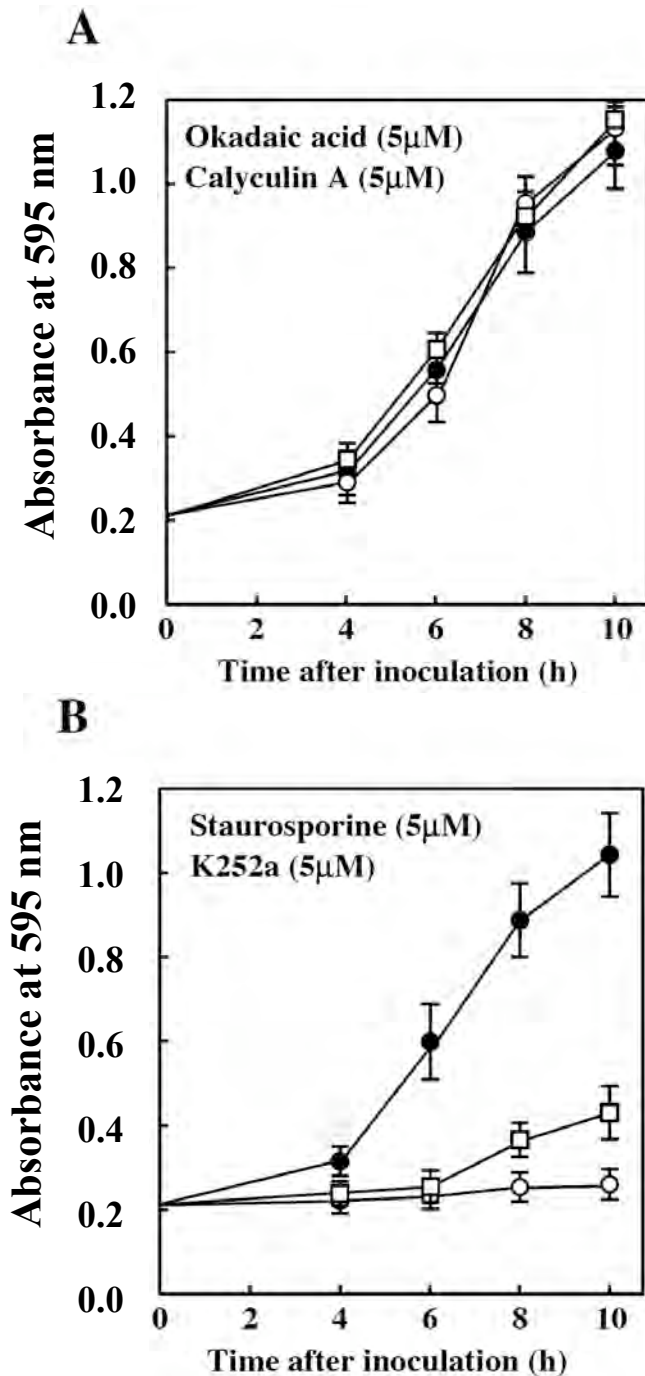


Figure 14. 過敏感細胞死誘導へのリン酸化・脱リン酸化阻害剤の影響

N1141菌株接種後に誘導される過敏感細胞死へのタンパク質リン酸化阻害剤、タンパク質脱リン酸化阻害剤の影響を、Evans blue染色法により調べた。各種阻害剤はN1141菌株接種の30分前に加え、N1141菌株はイネ培養細胞に 1×10^8 cfu/mlになるように接種し、0～10時間後の細胞死を検出した。(A) ●: N1141菌株、○: N1141菌株 + 5 μ M Okadaic acid、□: N1141菌株 + 5 μ M Calyculin A、(B) ●: N1141菌株、○: N1141菌株 + 5 μ M Staurosporine、□: N1141菌株 + 5 μ M K252a

動態を詳細に解析した。Yellow Cameleon は、ECFP、calmodulin、M13、EYFP からなる Ca^{2+} センサータンパク質である。 Ca^{2+} 存在化で calmodulin が活性化されて構造変化を生じ、励起された ECFP (Donor) から EYFP (Acceptor) に蛍光エネルギーの共鳴移動 FRET (Fuluoresent Resonance Energy Transfer) が起こり、ECFP の強度が減少し、EYFP の強度が上昇する。この ECFP と EYFP の蛍光強度比 (Ratio) をモニターすることで、細胞内の Ca^{2+} の変動を可視化することが出来る (Miyawaki, 1999)。Yellow Cameleon は Ca^{2+} との親和性の異なる数種類のものが開発されているが、本研究で用いた YC 3.6 は Ca^{2+} 結合時の ECFP と EYFP の相対距離が近く FRET のエネルギー転換効率が高い新規の Yellow Cameleon である (Nagai *et al.*, 2004)。すなわち、YC 3.6 は $[\text{Ca}^{2+}]$ の変動に伴って起こる蛍光強度の変化が大きいため、EYFP/ECFP で示される Ratio 値の変動も大きく、 $[\text{Ca}^{2+}]$ の微細な変化も詳細に捉えることが出来ると期待される。ubiquitin プロモーター下に制御された YC 3.6 遺伝子をパーティクルボンバードメント法によりイネ培養細胞に導入した。約 12 時間静置培養した後、イネ培養細胞に R2O もしくは R2O に懸濁した菌体・精製フラジェリンを接種して、その直後より共焦点レーザー顕微鏡 LSM 510 META を用いて FRET の測定を開始した。LSM 510 META は、取得した画像を構成する全画素に波長情報を持たせ、参照となる各蛍光波長を用いて計算 (Emission Fingerprinting) することで各蛍光を明瞭に分離することが可能なレーザスキャン蛍光顕微鏡システムである。そのため、ECFP や EYFP の蛍光スペクトル、植物細胞が葉緑体や細胞壁などから発する自家蛍光のスペクトル同士の重なりを解消し、効率的にシグナルを検出することが可能であり、EYFP/ECFP の蛍光強度比によって示される $[\text{Ca}^{2+}]$ 変動をより正確に議論することが出来ると期待される。

1) 未処理のイネ細胞内における Ca^{2+} 動態解析

まず、未処理 (R2O 培地処理) のイネ培養細胞をカバーガラスに固定し、YC 3.6 の蛍光スペクトルを 458 nm の励起波長で 468 nm から 548 nm の蛍光波長領域を 10 nm ずつ、5 秒間隔で約 30 分間取得した。得られた ECFP と EYFP の蛍光強度のそれぞれの値より、観察細胞の全領域を ROI (region of interest) として Ratio 値を算出した (以下の観察も同様)。その結果、未処理細胞では、測定開始から細胞内 $[\text{Ca}^{2+}]$ の若干の上昇は認められるものの大きな $[\text{Ca}^{2+}]$ 変動は認められなかった (Fig. 15-A)。このとき得られたデータを 3×3 pixel で平均化し、256 階調の擬似カラーを付けて表示した Ratio 画像を Fig. 16 に示した。未処理細胞におけるごくわずかな $[\text{Ca}^{2+}]$ 上昇は、非常に再現良く認められ、その濃度上昇は主に核で認められている。このような若干の $[\text{Ca}^{2+}]$ 変動は、観測の際の接触刺激、固形培地から液体培地への環境変化等に起因する可能性が考えられるが、以後の観測に支障は与えないと判断し、以下の実験もこの観測法で

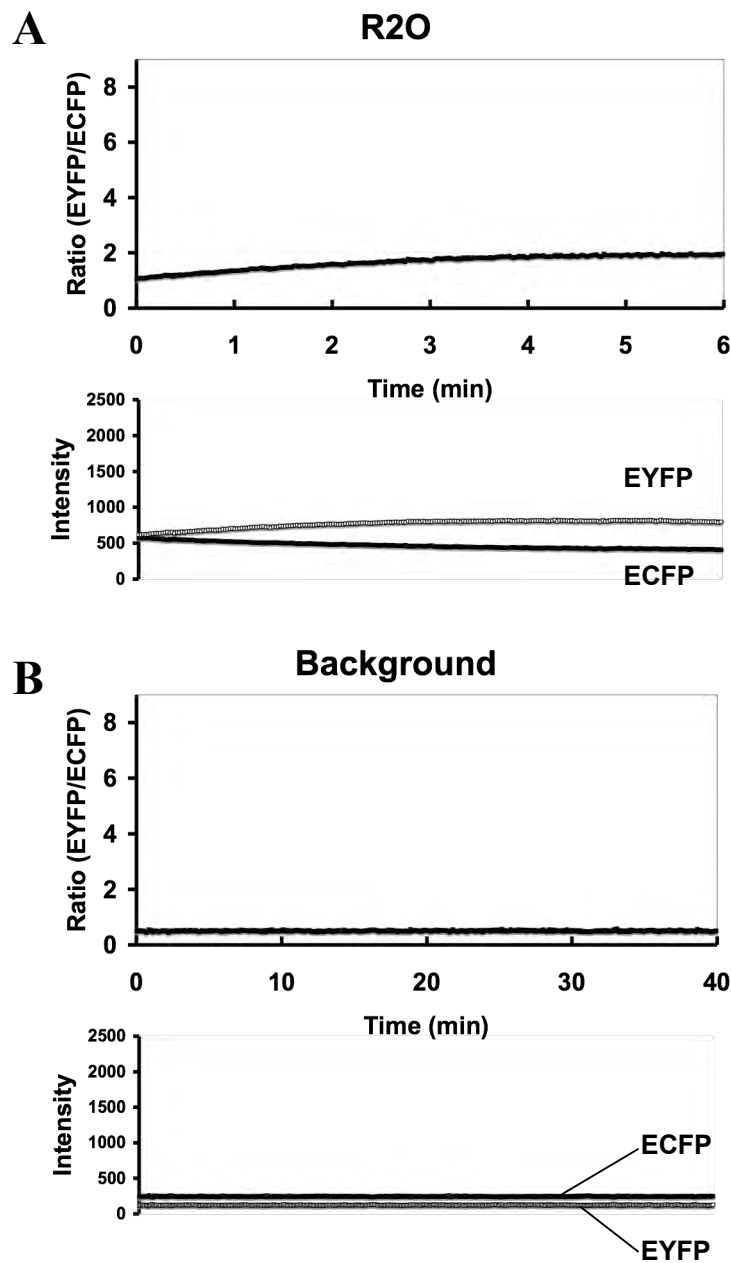


Figure 15. Yellowameleon 3.6発現イネ培養細胞における Ca^{2+} 動態の解析

イネ培養細胞にパーティクルボンバードメント法により、Yellowameleon 3.6を一過的に発現させた。これを用いて、各種処理後のイネ細胞内 Ca^{2+} 動態の詳細な解析を行った。(A) 未処理 (R2O培地処理) のイネ培養細胞をカバーガラスに固定し、YC 3.6の蛍光スペクトルを458 nmの励起波長で468 nmから548 nmの蛍光波長領域を10 nmずつ、5秒間隔で約30分間取得した。得られたデータをCFP像とYFP像にスプリットし、ECFPとEYFPの蛍光強度の値をそれぞれ得た (グラフ下段にデータを示した)。これを用いてEYFP/ECFPのRatio値を算出し、 Ca^{2+} 動態解析を行った (グラフ上段)。なお、Ratioは観察細胞の全領域をROIとしてRatio値を算出した。(B) YC 3.6を発現している観測細胞以外の領域をROIとして同様にデータの取得を行い、これをバックグラウンドとした。

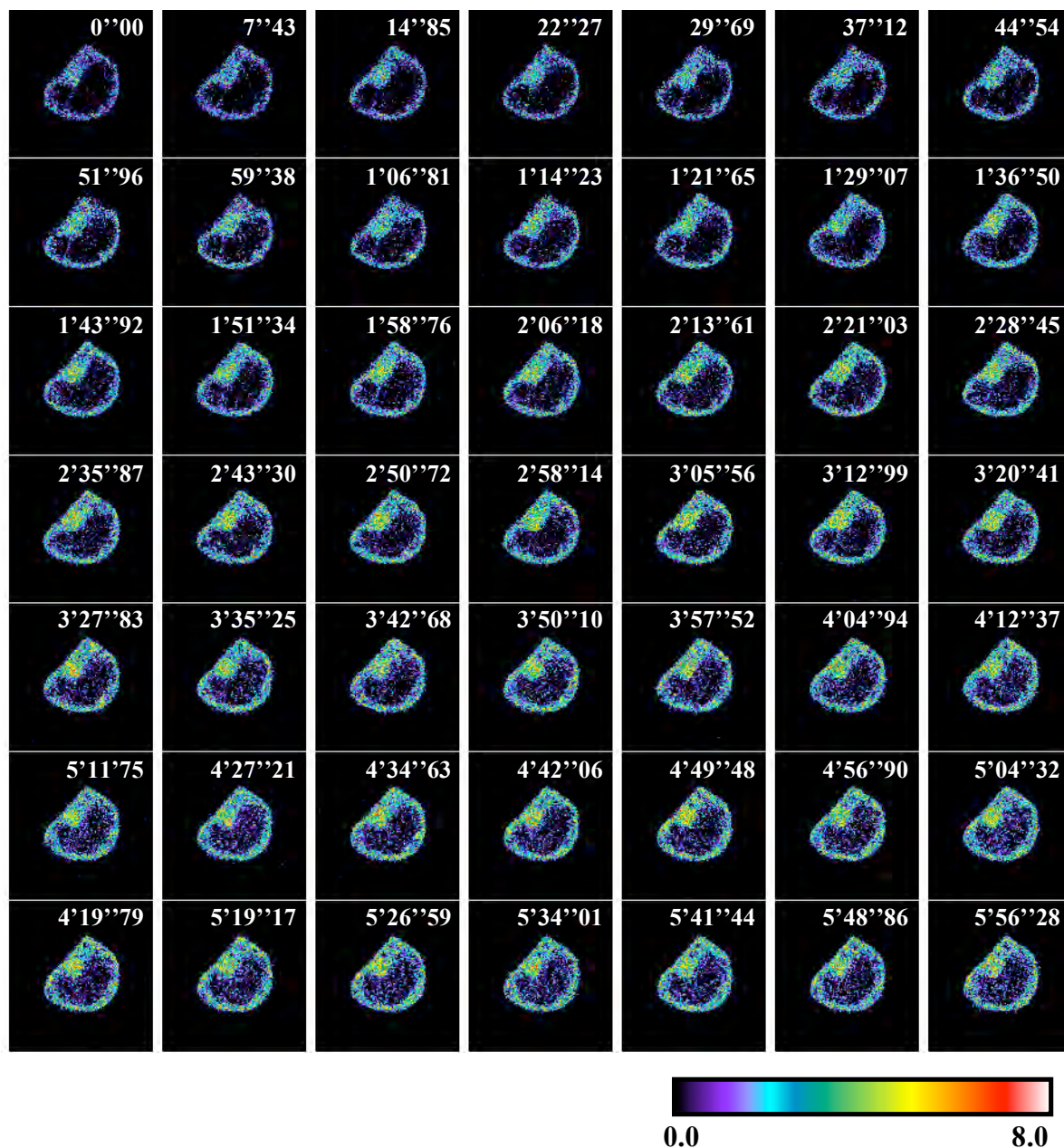


Figure 16. 未処理のイネ培養細胞における $[Ca^{2+}]$ 濃度の変動

未処理（R2O培地処理）のイネ培養細胞から得られたEYFP/ECFPのRatio画像を 3×3 pixelで平均化し、Ratio値の強度を256階調の擬似カラーにて表示した。観測開始を0''00とし、約6分後までのRatio像を示す。下段カラーバーはEYFP/ECFPのRatio値の強度を示している。

行った。また、バックグラウンドとして観測中の細胞外の領域に関しては、全観測を通してほぼ ECFP、EYFP の蛍光は認められなかった (Fig. 15-B)。

2) *A. avenae* 菌株接種後のイネ細胞内における Ca^{2+} 動態解析

次に、N1141 菌株、K1 菌株、N1141 菌のフラジェリン欠損株、K1 菌株のフラジェリン欠損株それぞれを 1×10^8 cfu/ml で YC 3.6 発現イネ培養細胞に接種し、 Ca^{2+} 動態の解析を行った。その結果、N1141 菌株接種では、測定開始直後である約 20 秒後から強い細胞内 $[\text{Ca}^{2+}]$ の上昇が認められることが明らかとなった (Fig. 17-A, 18)。一方、K1 菌株接種では、このような $[\text{Ca}^{2+}]$ 上昇は認められなかったことから (Fig. 17-B, 19)、イネ細胞では N1141 菌株接種後、特異的に細胞内 $[\text{Ca}^{2+}]$ の上昇が引き起こされていることが示された。さらに、N1141 菌のフラジェリン欠損株、および K1 菌株のフラジェリン欠損株をそれぞれイネ培養細胞に接種した場合、両菌株接種共に大きな $[\text{Ca}^{2+}]$ 変動は認められないことも明らかとなった (Fig. 17-C, D)。このことから、N1141 菌株接種後のイネ細胞における $[\text{Ca}^{2+}]$ 上昇は、N1141 菌株のフラジェリンが重要な役割を担っていることが示された。

3) 精製フラジェリン処理後のイネ細胞内における Ca^{2+} 動態解析

そこで、N1141 菌株および K1 菌株それぞれから精製したフラジェリンを、25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように培養細胞に処理したところ、N1141 菌株の精製フラジェリン処理では、N1141 菌株接種とよく似た非常に早期からの強い $[\text{Ca}^{2+}]$ 上昇が認められることが明らかとなった (Fig. 20-A)。この N1141 菌株フラジェリン処理後の経時的なイネ細胞内の $[\text{Ca}^{2+}]$ 変動を示す Ratio 像を Fig. 21 に示した。一方、K1 菌株の精製フラジェリンの処理では、このような強い $[\text{Ca}^{2+}]$ 上昇は認められなかった (Fig. 20-B, 22)。また、このような N1141 菌株フラジェリン特異的な強い $[\text{Ca}^{2+}]$ 上昇は、終濃度 10~50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のフラジェリン処理によっても誘導され、その細胞内 $[\text{Ca}^{2+}]$ の上昇度合いは、処理したフラジェリンの濃度と正の相関があり、両者間には濃度依存性が存在することも明らかになった (Fig. 20-C)。一方、K1 菌株フラジェリン処理では、これらいかなる濃度でも強い $[\text{Ca}^{2+}]$ 上昇は誘導しなかった (Fig. 20-D)。さらに、このような N1141 菌株フラジェリン処理後に認められる強い $[\text{Ca}^{2+}]$ の上昇は、処理後 4~5 分をピークとし、約 40 分後には定常濃度に戻る一過的な変動であり、その後 6 時間までにさらなる $[\text{Ca}^{2+}]$ の変動は認められないことも明らかとなった (Fig. 20-E)。これらのことより、イネ細胞は N1141 菌株のフラジェリンを特異的に認識することにより、一過的な強い $[\text{Ca}^{2+}]$ 上昇を引き起こしていることが示された。

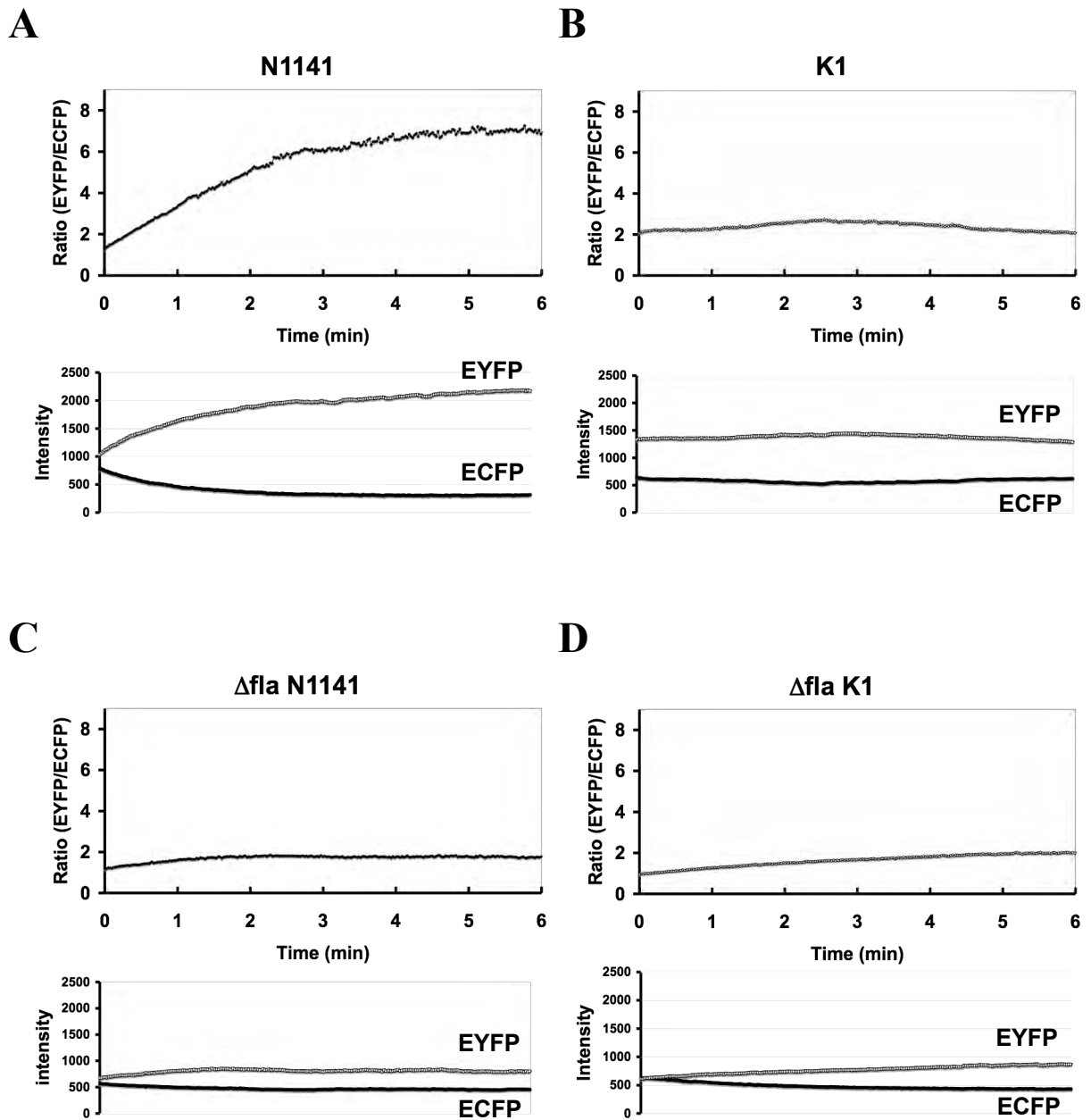


Figure 17. Yellow cameleon 3.6発現イネ培養細胞における Ca^{2+} 動態の解析

Yellow cameleon 3.6を一過的に発現させたイネ培養細胞を用いて、各種の*A. avenae*菌株接種後の細胞内 Ca^{2+} 動態の解析を行った。(A) R2O培地に 1×10^8 cfu/ml になるように懸濁したN1141菌株、(B) K1菌株、(C) N1141菌のフラジェリン欠損株、(D) K1菌のフラジェリン欠損株接種後の、イネ細胞内における $[\text{Ca}^{2+}]$ 濃度の変動をそれぞれ示している。なお、YC 3.6の蛍光スペクトルは、458 nmの励起波長で468 nmから548 nmの蛍光波長領域を10 nmずつ、5秒間隔で取得し、Ratioは観察細胞の全領域をROIとしてRatio値を算出した。

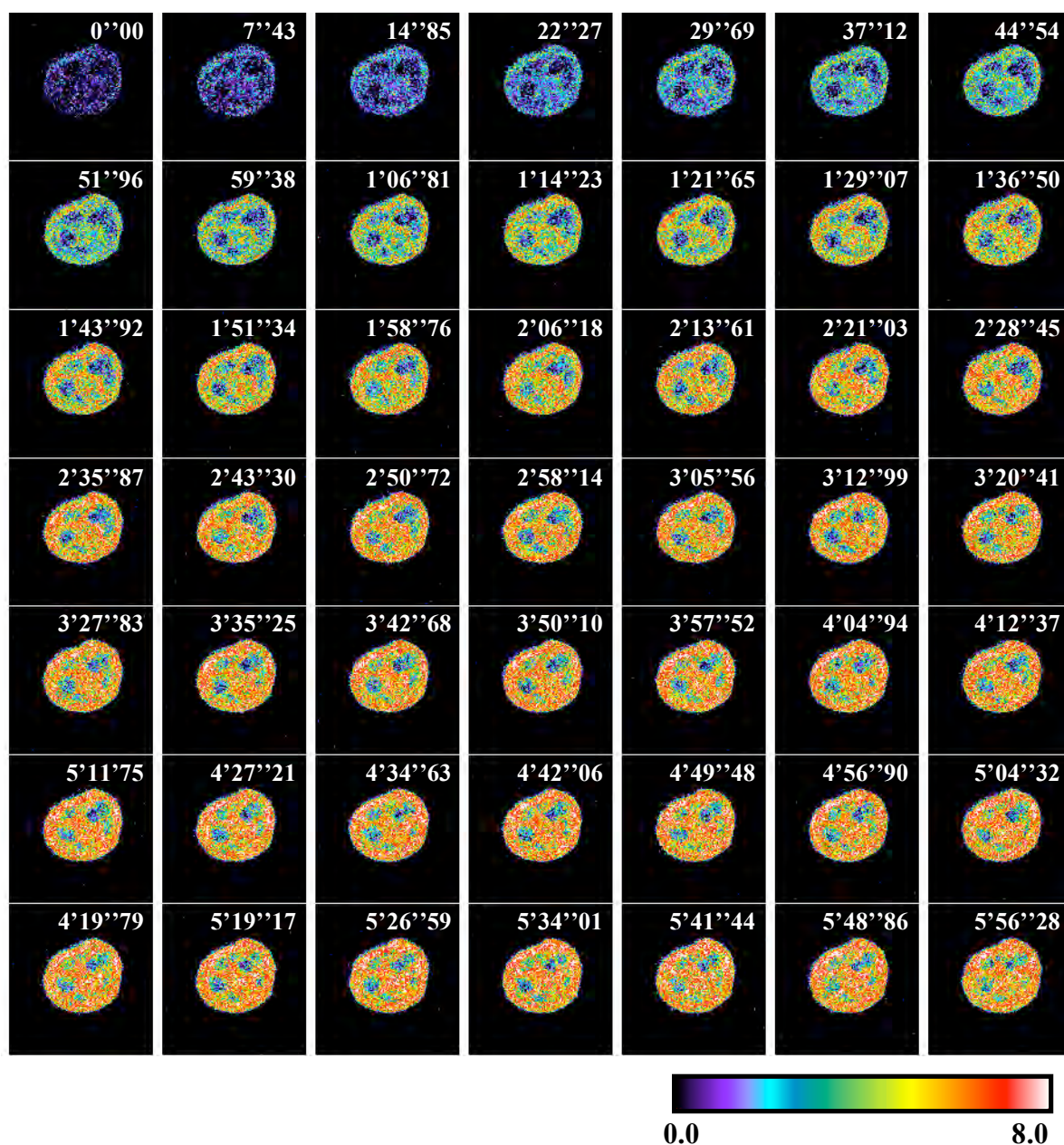


Figure 18. N1141菌株接種後のイネ培養細胞における $[Ca^{2+}]$ 濃度の変動

R2O培地に 1×10^8 cfu/mlになるように懸濁したN1141菌株を接種したYC 3.6発現イネ培養細胞から得られたEYFP/ECFPのRatio画像を 3×3 pixelで平均化し、Ratio値の強度を256階調の擬似カラーにて表示した。観測開始を0''00とし、約6分後までのRatio像を示す。下段カラーバーはEYFP/ECFPのRatio値の強度を示している。

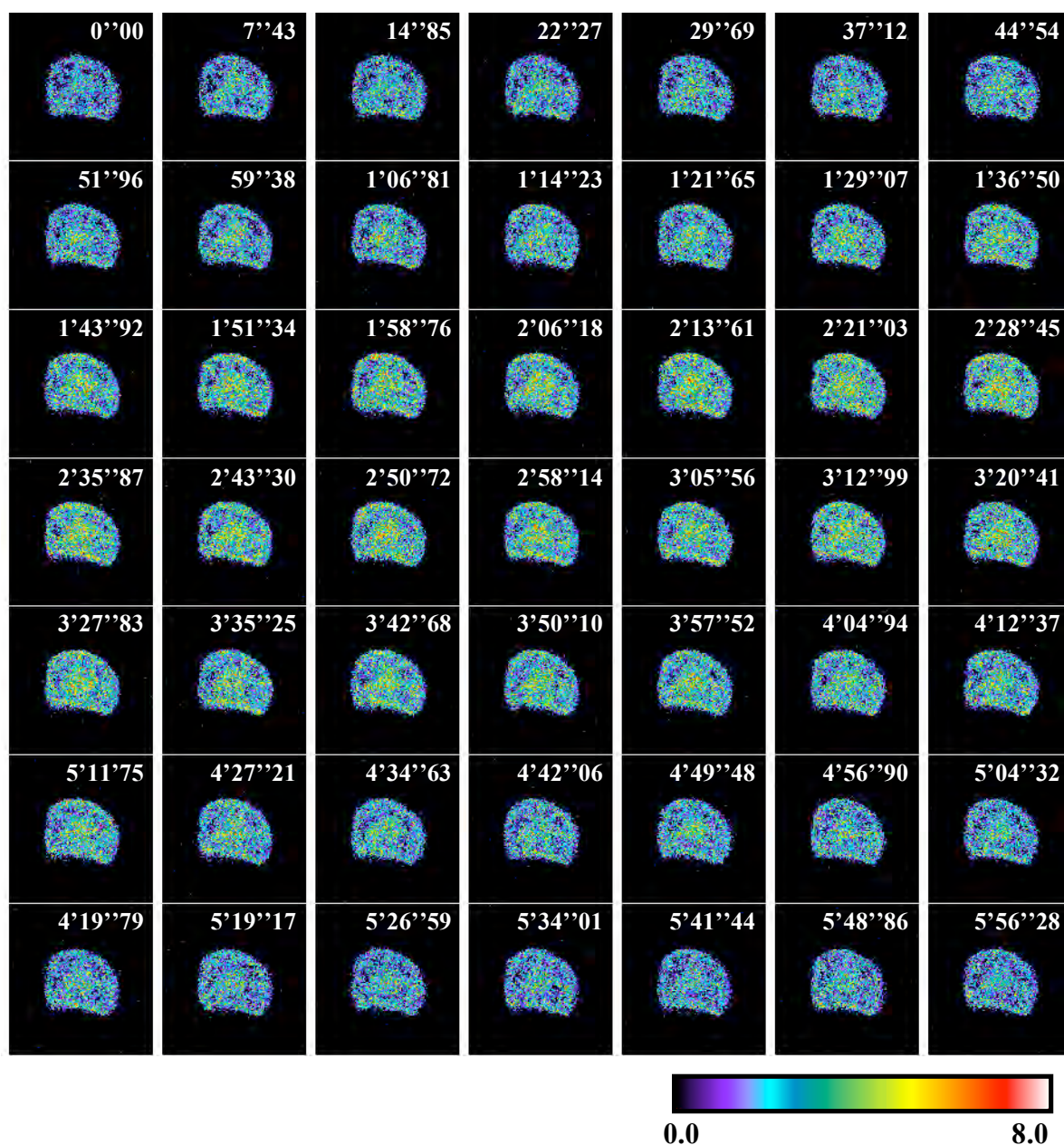


Figure 19. K1菌株接種後のイネ培養細胞における $[Ca^{2+}]$ 濃度の変動

R2O培地に 1×10^8 cfu/mlになるように懸濁したK1菌株を接種したYC 3.6発現イネ培養細胞から得られたEYFP/ECFPのRatio画像を 3×3 pixelで平均化し、Ratio値の強度を256階調の擬似カラーにて表示した。観測開始を0'00とし、約6分後までのRatio像を示す。下段カラーバーはEYFP/ECFPのRatio値の強度を示している。

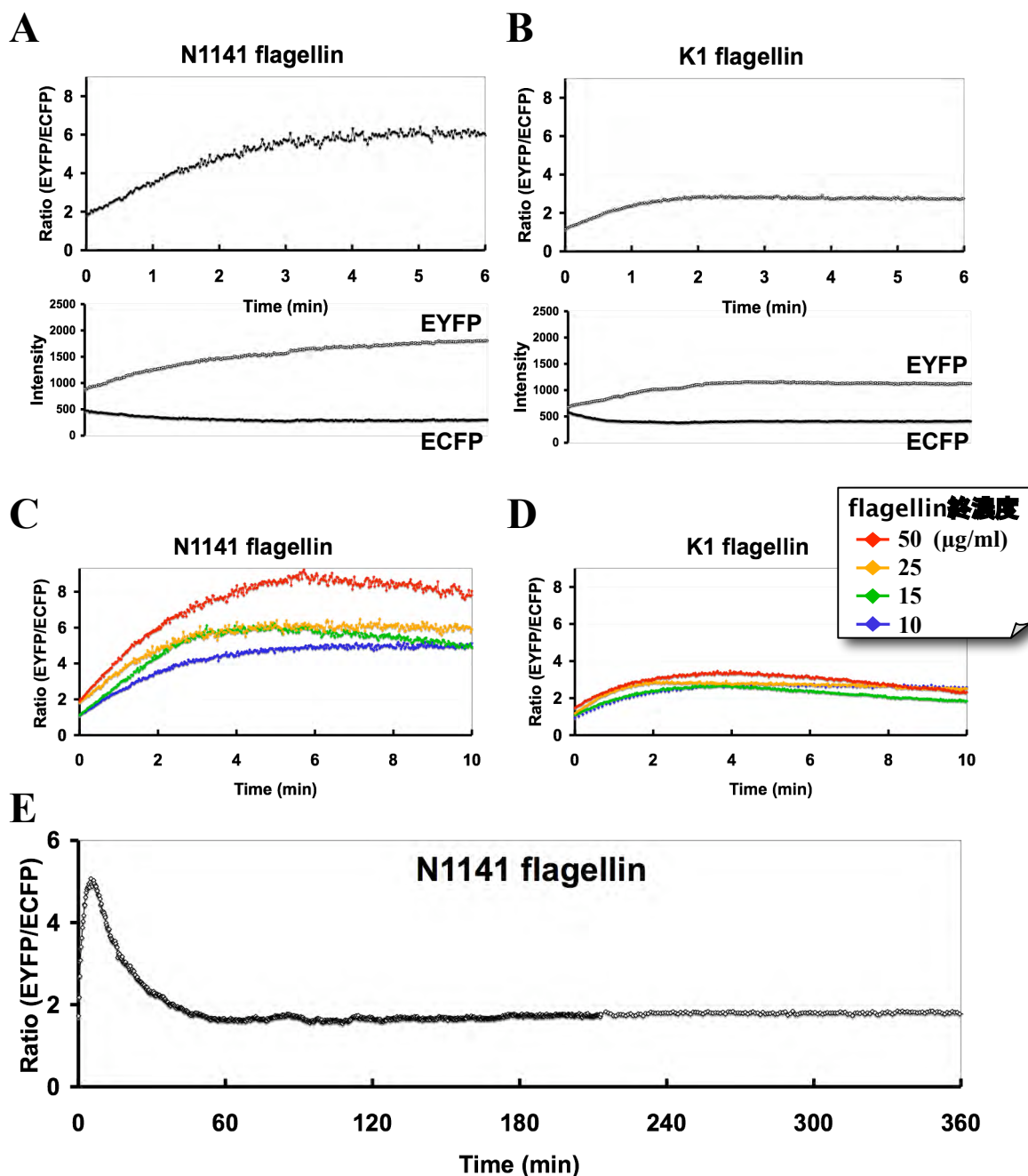


Figure 20. Yellow cameleon 3.6発現イネ培養細胞を用いたフラジェリン処理後の細胞内 Ca^{2+} 動態の解析

Yellow Cameleon 3.6を一過的に発現させたイネ培養細胞を用いて、精製フラジェリン処理後の細胞内 Ca^{2+} 動態の解析を行った。(A) R2O培地に25 μg/mlになるように懸濁したN1141菌株の精製フラジェリン、(B) K1菌株の精製フラジェリン処理後のイネ細胞内における $[\text{Ca}^{2+}]$ 濃度の変動をそれぞれ示している。(C) N1141菌株の精製フラジェリン、(D) K1菌株の精製フラジェリンを終濃度10～50 μg/mlで処理した。(E) 終濃度25 μg/mlのN1141菌株の精製フラジェリン処理後、6時間までの $[\text{Ca}^{2+}]$ 濃度変動をガラスボトム上で観測した。なお、YC 3.6の蛍光スペクトルは、(A)～(D)5秒間隔、(E)60秒間隔で取得し、Ratioは観察細胞の全領域をROIとしてRatio値を算出した。

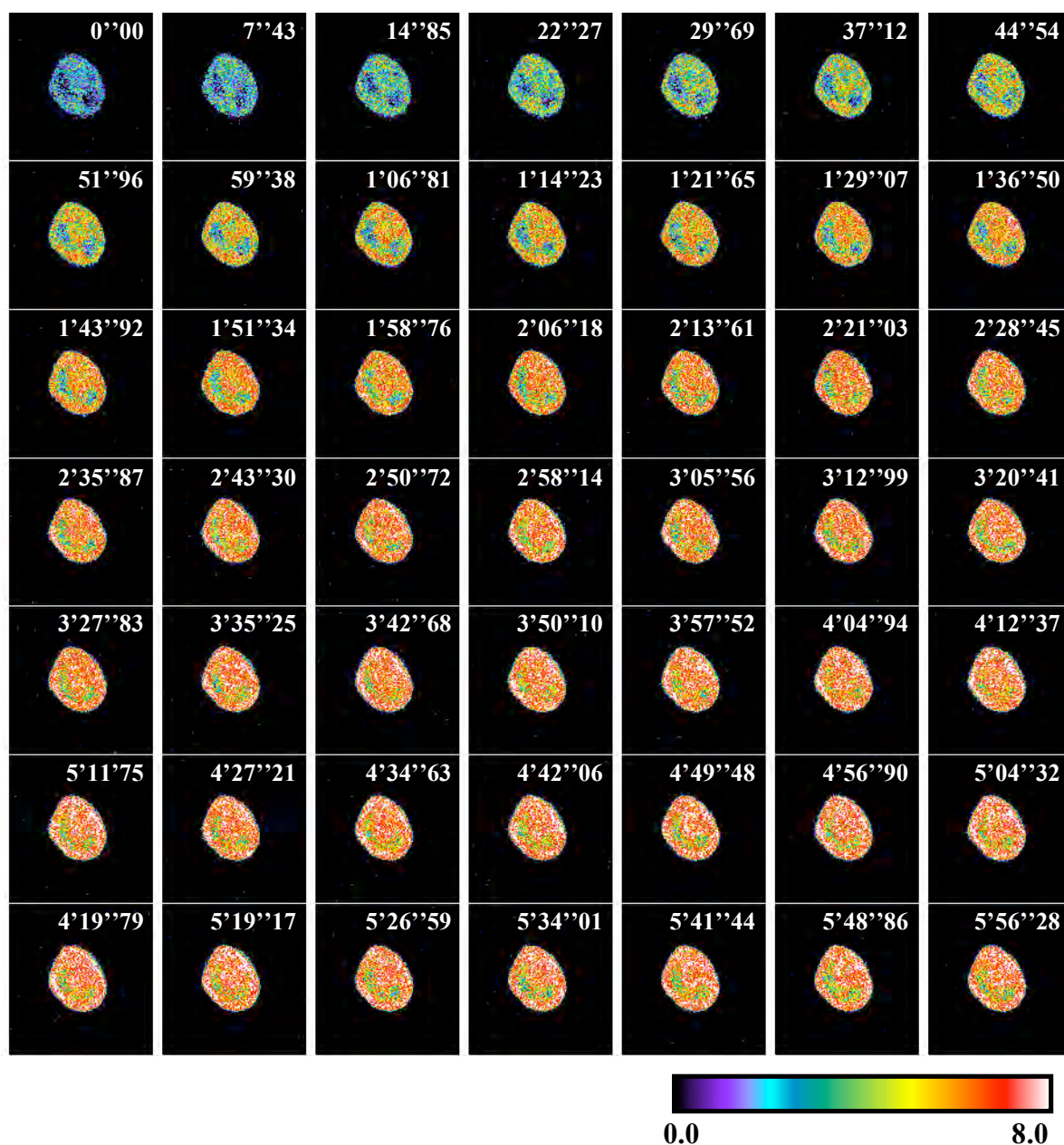


Figure 21. N1141菌株精製フラジェリン処理後のイネ培養細胞における $[Ca^{2+}]$ 濃度の変動

R2O培地に25 $\mu\text{g/ml}$ になるように懸濁したN1141菌株の精製フラジェリンを処理したYC 3.6発現イネ培養細胞から得られたEYFP/ECFPのRatio画像を3×3 pixelで平均化し、Ratio値の強度を256階調の擬似カラーにて表示した。観測開始を0''00とし、約6分後までのRatio像を示す。下段カラーバーはEYFP/ECFPのRatio値の強度を示している。

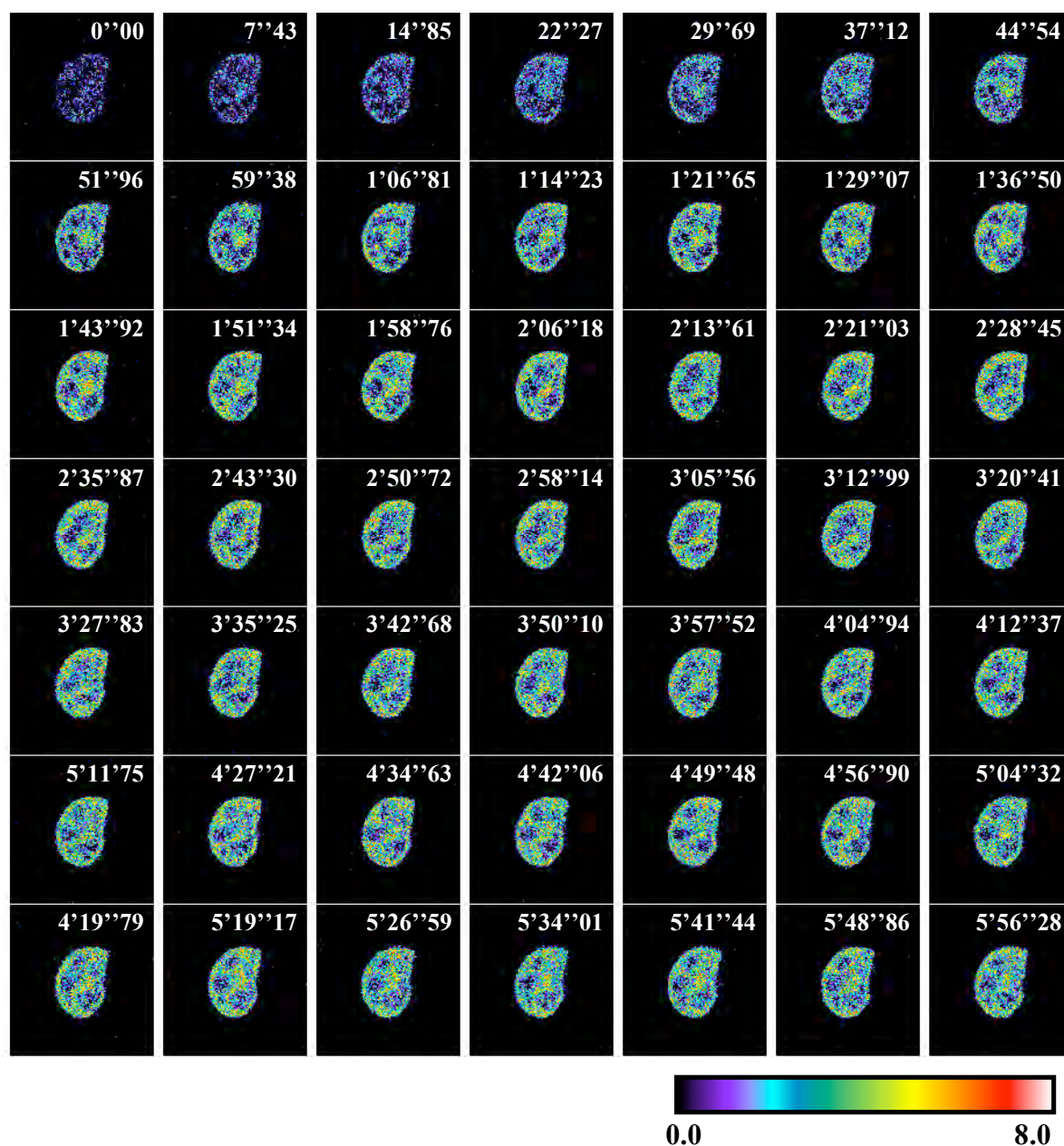


Figure 22. K1菌株精製フラジェリン処理後のイネ培養細胞における $[Ca^{2+}]$ 濃度の変動

R2O培地に25 $\mu\text{g/ml}$ になるように懸濁したK1菌株の精製フラジェリンを処理したYC 3.6発現イネ培養細胞から得られたEYFP/ECFPのRatio画像を3×3 pixelで平均化し、Ratio値の強度を256階調の擬似カラーにて表示した。観測開始を0''00とし、約6分後までのRatio像を示す。下段カラーバーはEYFP/ECFPのRatio値の強度を示している。

4) 免疫反応誘導時の $[Ca^{2+}]$ 変動に対するカルシウム阻害剤の影響

次に、このような N1141 菌株フラジェリン特異的な細胞内 $[Ca^{2+}]$ 上昇へのカルシウム阻害剤が及ぼす影響について検討を行った。10 mM EGTA もしくは、1 mM nifedipine を加えた R2O に N1141 菌株を 1×10^8 cfu/ml になるように懸濁した菌液をイネ培養細胞に接種し、 Ca^{2+} 動態の解析を行った。その結果、10 mM EGTA 存在下では N1141 菌株接種による一過的な強い $[Ca^{2+}]$ 上昇は認められなかった (Fig. 23-A)。また、1 mM nifedipine の存在下では完全ではないものの、N1141 菌株接種後に認められる $[Ca^{2+}]$ 上昇の大部分が抑制されていた (Fig. 23-B)。さらに、10 mM EGTA、1 mM nifedipine、5 mM $LaCl_3$ 、1 mM $GdCl_3$ を加えた R2O に N1141 菌株の精製フラジェリンを 25 μ g/ml になるように懸濁したフラジェリン液をイネ培養細胞に処理し、 Ca^{2+} 動態の解析を行った。その結果、10 mM EGTA、および 1 mM nifedipine 存在下では N1141 菌株フラジェリン処理による一過的な強い $[Ca^{2+}]$ 上昇は完全に抑制されていることが明らかになった (Fig. 24-A, B)。一方、5 mM $LaCl_3$ 、および 1 mM $GdCl_3$ 存在下では N1141 菌株フラジェリン処理に中程度の $[Ca^{2+}]$ 上昇が認められることが明らかとなった (Fig. 24-C, D)。これらのことは、N1141 菌株および N1141 菌株のフラジェリン処理によって誘導される一過的な $[Ca^{2+}]$ 上昇は、細胞外から細胞内への Ca^{2+} 流入によることを示している。5 mM $LaCl_3$ 、1 mM $GdCl_3$ 存在下で、N1141 菌株フラジェリン処理による $[Ca^{2+}]$ 上昇が完全に抑制されなかったことは、N1141 菌株フラジェリン処理によって誘導される活性酸素の発生が、これら 5 mM $LaCl_3$ 、1 mM $GdCl_3$ 存在下では完全に阻害されなかったことと良い一致を示している (Fig. 9)。

2-3-6 イネに存在する全 *OsCPK* 遺伝子の発現解析

ここまでの結果より、イネ細胞において非親和性菌株のフラジェリン認識後に、一過的な $[Ca^{2+}]$ 上昇が起ること、また、その免疫反応誘導に関わる情報伝達系には Ca^{2+} シグナルだけでなくタンパク質リン酸化プロセスも密接に関与することが明らかになった。この様なフラジェリン認識の情報伝達に関わる分子として、マイクロアレイ解析の結果フラジェリン認識下流遺伝子として同定された、カルシウム依存性プロテインキナーゼである *OsCDPK7* が有力な候補であると考えた。しかしながら、*CDPK* は大きな遺伝子ファミリーを構成しており、近年のイネゲノム解析の結果より、イネのゲノム上には 29 個の *CPK* 遺伝子が存在することが報告されていることから (Asano *et al.*, 2005)、*OsCDPK7* 以外の *CDPK* がこの情報伝達経路で機能している可能性も考えられた。*OsCPK9* は、いもち病菌 *Magnaphorthe grisea* の接種により、イネ葉鞘で強く発現が誘導されることが明らかになっている (Asano *et al.*, 2005)。また、イネ培養細胞に対して、活性酸素 (Kuchitsu *et al.*, 1995) やファイトアレキシンの生成

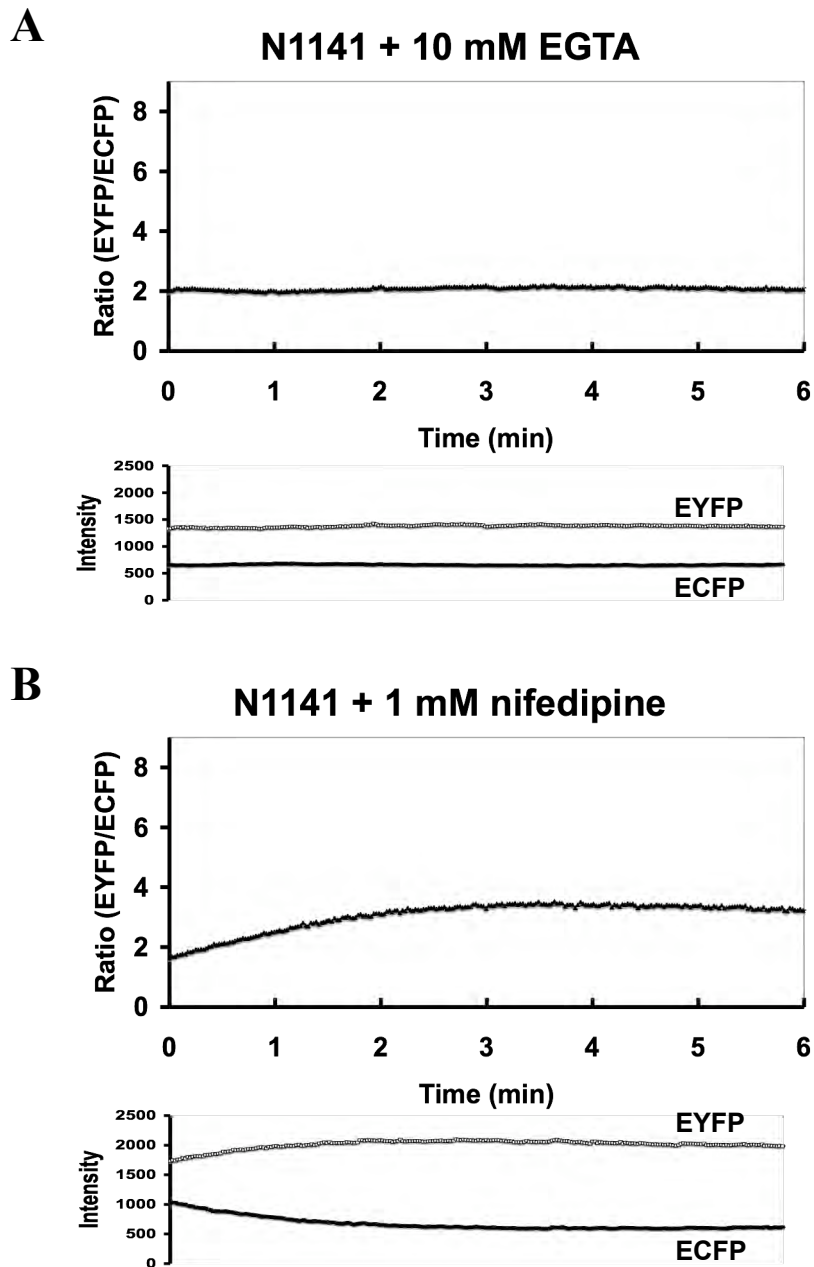


Figure 23. Yellow cameleon 3.6発現イネ培養細胞を用いたカルシウム阻害剤の細胞内 Ca^{2+} 動態への影響

Yellow cameleon 3.6を一過的に発現させたイネ培養細胞を用いて、N1141菌株接種後の細胞内 $[\text{Ca}^{2+}]$ 変動へのカルシウム阻害剤の影響を調べた。(A) 10 mM EGTAもしくは、(B) 1 mM nifedipineを加えたR2Oに、N1141菌株を 1×10^8 cfu/mlになるように懸濁した菌液をイネ培養細胞に接種した後の、イネ細胞内における $[\text{Ca}^{2+}]$ 濃度の変動をそれぞれ示している。なお、YC 3.6の蛍光スペクトルは、458 nmの励起波長で468 nmから548 nmの蛍光波長領域を10 nmずつ、5秒間隔で取得し、Ratioは観察細胞の全領域をROIとしてRatio値を算出した。

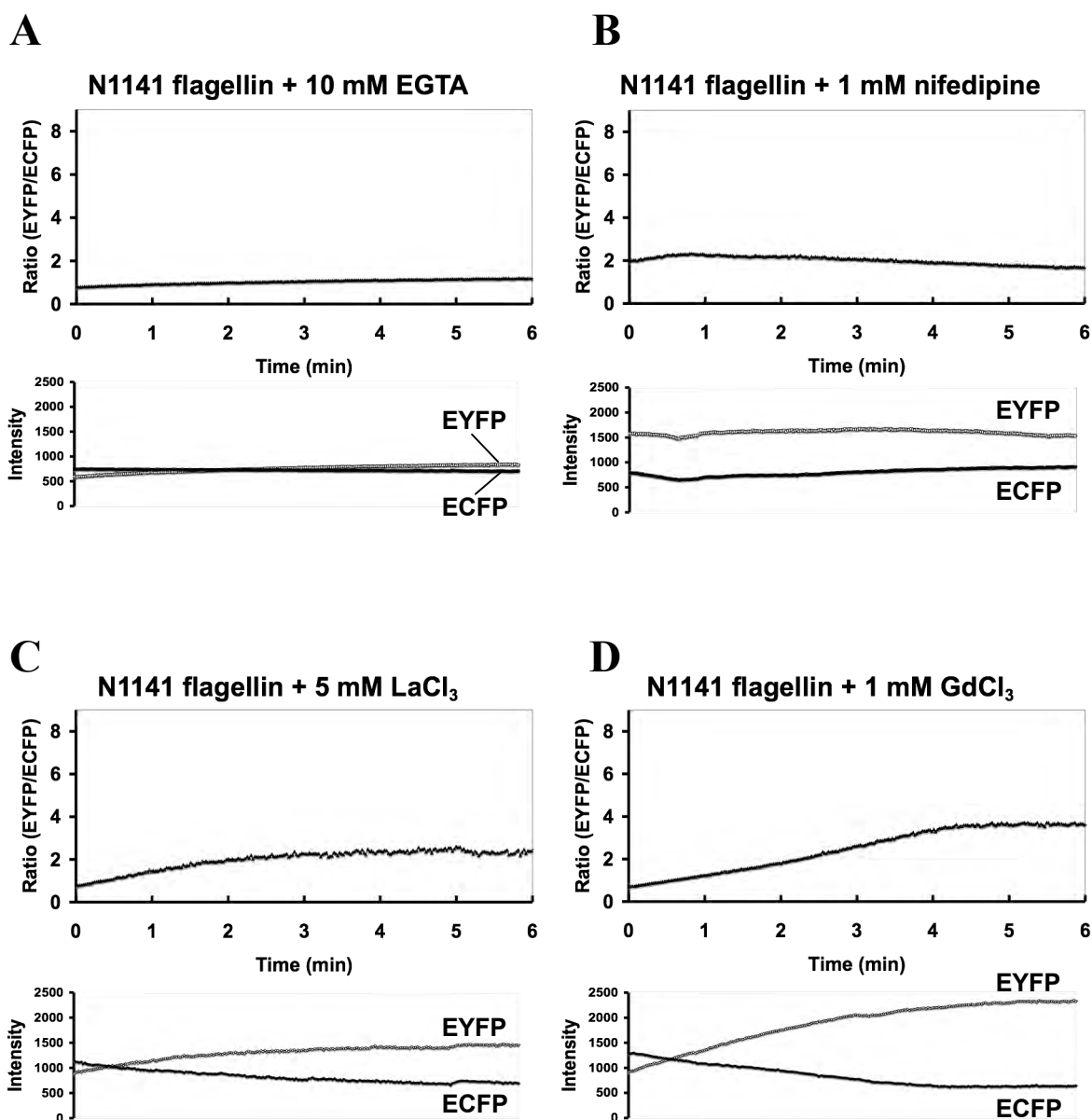


Figure 24. Yellow camaleon 3.6発現イネ培養細胞を用いたカルシウム阻害剤の細胞内Ca²⁺動態への影響

Yellow camaleon 3.6を一過的に発現させたイネ培養細胞を用いて、N1141菌株の精製フラジェリン処理後の細胞内[Ca²⁺]変動へのカルシウム阻害剤の影響を調べた。(A) 10 mM EGTA、(B) 1 mM nifedipine、(C) 5 mM LaCl₃、(D) 1 mM GdCl₃を加えたR20にN1141菌株の精製フラジェリンを25 µg/mlになるように懸濁して処理したイネ細胞内における[Ca²⁺]濃度の変動をそれぞれ示している。なお、YC 3.6の蛍光スペクトルは、458 nmの励起波長で468 nmから548 nmの蛍光波長領域を10 nmずつ、5秒間隔で取得し、Ratioは観察細胞の全領域をROIとしてRatio値を算出した。

(Yamada *et al.*, 1993)、*PAL*、*chitinase* 等の抵抗性関連遺伝子 (He *et al.*, 1998; Nishizawa *et al.*, 1999) の発現などを含む免疫反応を誘導するエリシターである、*N*-acetylchitooctase の処理によって、*OsCDPK7* 以外の 5 つの *CDPK* の発現がイネ培養細胞において誘導されることが、イネマイクロアレイ解析の結果より報告されており (Akimoto-Tomiyama *et al.*, 2003)、複数の *CDPK* が免疫反応誘導に関与していることを示唆している。そこで、イネに存在する *CDPK7* 以外の *CDPK* (*CPK*) についても、フラジェリン認識後の免疫反応誘導との関係に着目して研究を行った。

まず、22K オリゴマイクロアレイ上の遺伝子に含まれていた *OsCPK* の発現パターンについて詳細に検討した。その結果、オリゴマイクロアレイのデータより、*OsCPK2* (AK112112)、*OsCPK4* (*CDPK1*; AK060738)、*OsCPK7* (AK066500)、*OsCPK8* (AK066615)、*OsCPK10* (AK072204)、*OsCPK13* (*OsCDPK7*; AK066495)、*OsCPK15* (AK070346)、*OsCPK17* (AK068414)、*OsCPK19* (*OsCDPK2*; AK069341)、*OsCPK20* (AK068315)、*OsCPK21* (AK103306)、*OsCPK23* (AK065456)、*OsCPK24* (AK102308)、*OsCPK29* (AK072981) の計 14 個の *OsCPK* がマイクロアレイに含まれており、それぞれの発現パターンデータを取得することが出来た (Fig. 25)。そこで、このマイクロアレイデータからこれらの発現パターンを解析したところ、これら 14 個の *OsCPK* のうち、*OsCPK7*、*OsCPK8*、*OsCPK10*、*OsCPK13* (*OsCDPK7*)、*OsCPK19* の 5 つが N1141 菌株接種後特異的に発現誘導されることが明らかとなった (Fig. 25)。

さらに、イネに存在する他の *OsCPK* の発現パターンを調べるために real time RT-PCR によって解析を行った。N1141 菌株、K1 菌株を 1×10^8 cfu/ml になるようにイネ培養細胞に接種し、0, 1, 3, 6 時間後の細胞より total RNA を抽出した。これを鋳型として用い、それぞれの *CPK* 遺伝子を特異的に増幅するようなプライマーを作製して real time RT-PCR を行い、経時的な遺伝子の発現を解析した。その結果、全 29 個の *OsCPK* 遺伝子のうち、*OsCPK7*、*OsCPK8*、*OsCPK10*、*OsCPK12*、*OsCPK13* (*OsCDPK7*)、*OsCPK19* の 6 つの *OsCPK* が N1141 菌株接種後特異的に発現誘導されることが明らかとなった (Fig. 26)。この結果は、先のオリゴマイクロアレイの結果と非常に良い一致を示すものであったことから、これら 6 つのうちいずれか、もしくはいくつかの *OsCPK* がイネの免疫反応の誘導に関係した Ca^{2+} シグナルを介した情報伝達に関与している可能性が高いと考え、これら 6 つの *OsCPK* についてさらに解析を進めた。

2-3-7 *OsCPK13* のキャラクタライゼーション

これら非親和性相互作用特異的に発現誘導されることが明らかになった *OsCPK7*、*OsCPK8*、*OsCPK10*、*OsCPK12*、*OsCPK13* (*OsCDPK7*)、*OsCPK19* の 6 つの *OsCPK* の中でも *OsCPK13* (*OsCDPK7*) は、本研究のイネ cDNA マイクロアレイ、オリゴマ

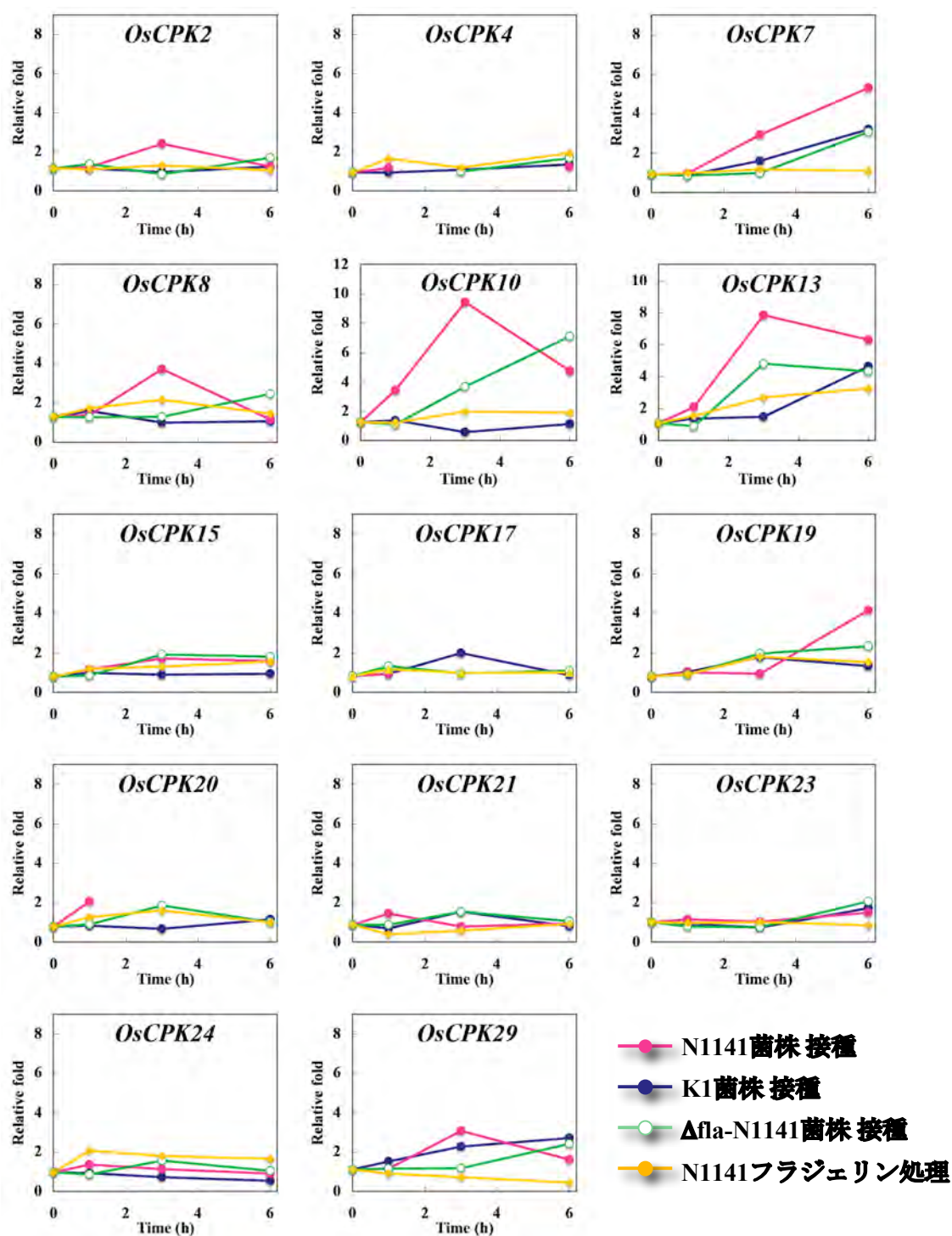


Figure 25. オリゴマイクロアレイ上に認められた*OsCPK*遺伝子の発現解析

22Kオリゴマイクロアレイ上の遺伝子に含まれていた全*OsCPK*の発現パターンについて解析した。アレイデータより得られた*OsCPK2* (AK112112), *OsCPK4* (CDPK1; AK060738), *OsCPK7* (AK066500), *OsCPK8* (AK066615), *OsCPK10* (AK072204), *OsCPK13* (*OsCDPK7*; AK066495), *OsCPK15* (AK070346), *OsCPK17* (AK068414), *OsCPK19* (*OsCDPK2*; AK069341), *OsCPK20* (AK068315), *OsCPK21* (AK103306), *OsCPK23* (AK065456), *OsCPK24* (AK102308), *OsCPK29* (AK07298)の14個の*OsCPK*の発現パターンをグラフに示した。

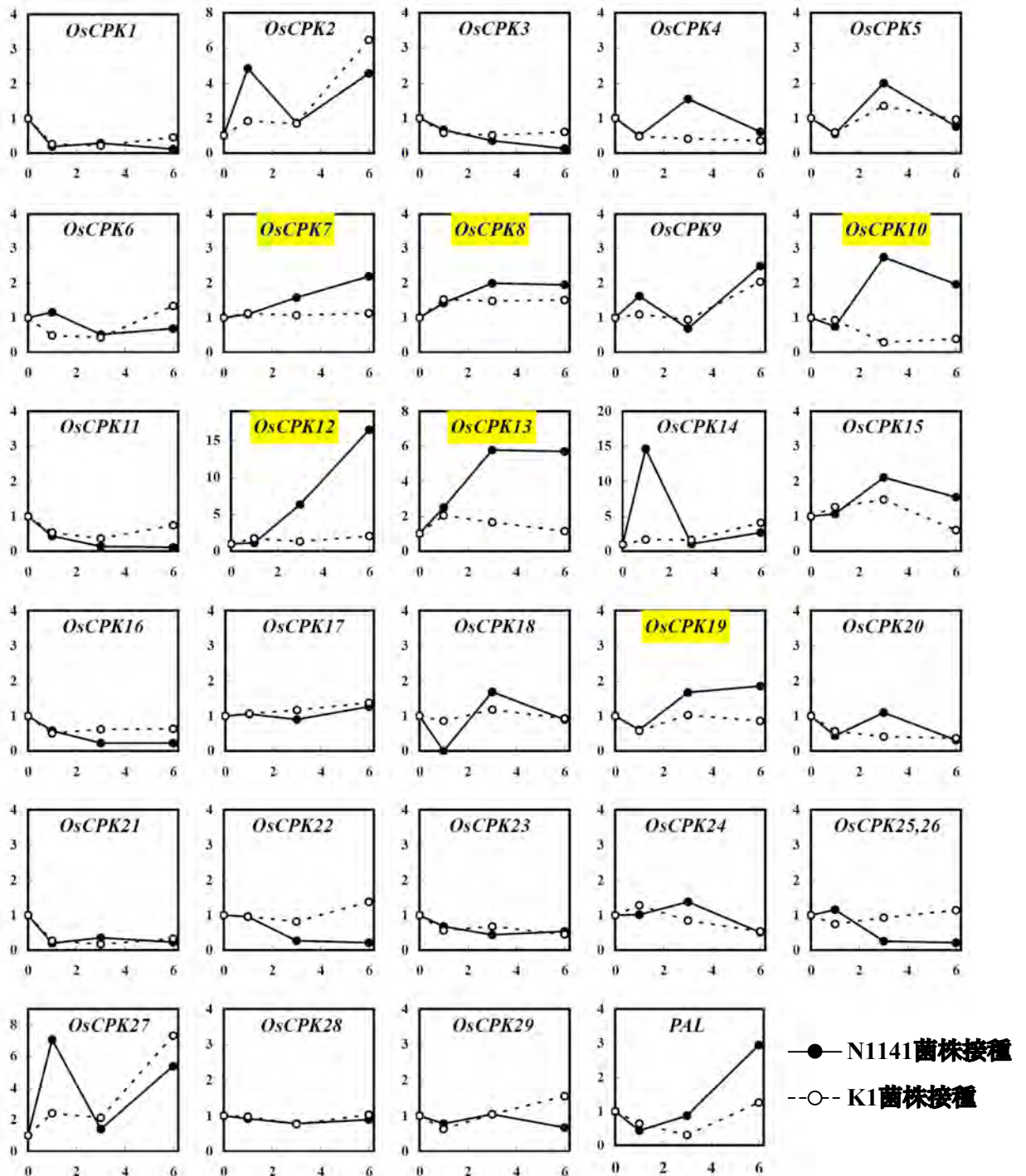


Figure 26. 定量的real time RT-PCRによるイネの全*OsCPK*の発現解析

イネのゲノムに存在する全29個の*OsCPK*遺伝子の発現を、各*OsCPK*に特異的なプライマーを用いてreal time RT-PCRにより確認した。N1141菌株もしくはK1菌株を 1×10^8 cfu/mlになるようにイネ培養細胞に接種し、0, 1, 3, 6時間後の細胞よりtotal RNAを抽出した。これを鋳型として用いてreal time RT-PCRを行い、経時的な遺伝子の発現を解析した。グラフの縦軸と横軸はそれぞれ、0時間のイネ細胞における発現量を1としたときのRelative foldと、菌体接種後の時間 (h) を表している。免疫反応誘導の指標として*PAL*遺伝子の発現の誘導を確認した。

マイクロアレイ、real time RT-PCR すべての結果よりフラジェリン認識の下流に制御されていることが示されている。そこで、この *OsCPK13* について詳細に解析を行った。イネの KOME データベースより得られた *OsCPK13* は、cDNA が 2,254 bp の長さであり、551 残基のアミノ酸をコードしていた (Fig. 27-A)。このアミノ酸配列を基に、Pfam 等のアミノ酸ドメイン・モチーフデータベースで解析を行ったところ、*OsCPK13* は、*N*末端領域に *N*-myristoylation (*N*-ミリストイル化) モチーフを有することが明らかになった。*N*-myristoylation モチーフは、タンパク質の *N*末端領域に存在するコンセンサス配列 (Met-Gly-X-X-X-Ser/Cys-X) であり、ミリスチル化による翻訳後修飾を受ける。このような *N*-myristoylation モチーフを持つタンパク質は、細胞質の遊離リボソーム上におけるタンパク質の翻訳途中にメチオニンアミノペプチダーゼにより開始メチオニンが切断除去された後、露出した *N*末端グリシン残基の α -アミノ基に *N*-ミリストイル転移酵素によりミリストイル化-CoA を基質としてミリストイル基がこの部位に転移される。そして、この様に細胞質で合成された *N*-ミリストイル化タンパク質は、核、ミトコンドリア、小胞体膜、ゴルジ体膜、細胞膜といった様々な細胞小器官へ移行し、特異的機能を発現することが知られている。そこで、*OsCPK13* と RFP の融合タンパク質をイネ培養細胞に一過的に発現させ、RFP の蛍光を指標としての *OsCPK13* の細胞内局在を解析した。まず、N1141 菌株接種 6 時間後のイネ培養細胞より抽出した 500 ng の total RNA から逆転写酵素を用いて cDNA を合成した。これを鋳型として *OsCPK13* のクローニングを行った。さらに、これより *OsCPK13* の全 ORF に RFP を連結したコンストラクト (*OsCPK13*-RFP)、および *N*末端領域の *N*-myristoylation モチーフを含む 26 アミノ酸残基を欠損させた *OsCPK13* に RFP を連結したコンストラクト (*OsCPK13* Δ 1-26-RFP) を作製し、それぞれ pAHC17 に組み込みプラスミドを得た。これらをパーティクルボンバードメント法により、イネ培養細胞に導入し、発現したタンパク質の RFP 蛍光を共焦点レーザー顕微鏡 LSM 510 META で観測観察した。その結果、*OsCPK13* Δ 1-26-RFP は細胞質や核で蛍光が認められたのに対し、*OsCPK13*-RFP は核では蛍光が認められず、小胞体膜のような細胞内の膜系において蛍光が認められ、*OsCPK13* Δ 1-26-RFP とは異なる細胞内局在を示すことが明らかになった (Fig. 27-B)。このことより、*OsCPK13* の正常な細胞内局在には、*N*末端領域のミリストイル化が必須であることが示された。

2-3-8 *OsCPK* の一過的過剰発現によるフラジェリン認識情報伝達系への関与の解析

2-3-6 で得られた 6 つの *OsCPK* について、フラジェリン認識によって誘導される情報伝達系に関与しているかどうか調べるため、デュアルルシフェラーゼアッセイによって解析を行った。まず、2-3-7 で得られたイネ培養細胞の cDNA を鋳型とし、5 つの

A

N-myristoylation site
MGNACGGSLRSKYLSFKQTASQRHDTDDNNNAAAADSPKKPSRPPAAAKTDDHPVSA
Serine/Threonine kinase domain
SAPAAAMRRGQAPADLGSVLGHPTPNLRDLYAMGRKL**GQGQFGTTYLCTELSTGV****DY**
ATP-binding region
ACKSISKRKLITKEDIEDVRREIQIMHLSGHKNVVAIKGAYEDQLYVHIVMELCAG
GELFDRIIQRGHYSERKAAELTRIIVGVVEACHSL**GVMHRDLKPENFLANKDDDLS**
Active site
LKAIDFGLSVFFKPGQFTDVGSPYYVAPEVLLKHYGPEADVWTAGVILYILLSGV
PPFWAETQQGIFDAVLKGFIDFSDPWPVISESAKDLITKMLNPRPKERLTAHEVLC
Autoinhibitory domain
HPWIRDHGVAPDRPLDPAVL**SRIKQFSAMNKLK****KMALRVIAESLSEEEIAGLKEMFQ**
Calmodulin-like domain
EF-hand
TMDADNSGAITYDELKEGLRKYGSTLKDTEIRDLMDAADIDNSGTIDYIEFIAATLH
EF-hand
LNKLEREEHLVAAFSYFDKDGSYITVDELQQACKEHNMPDAFLDDVINEADQDNDG
EF-hand
RIDYGEFVAMMTKGNMGVGRRTMRNSLNISMRDAPGAL
551 a.a.

B

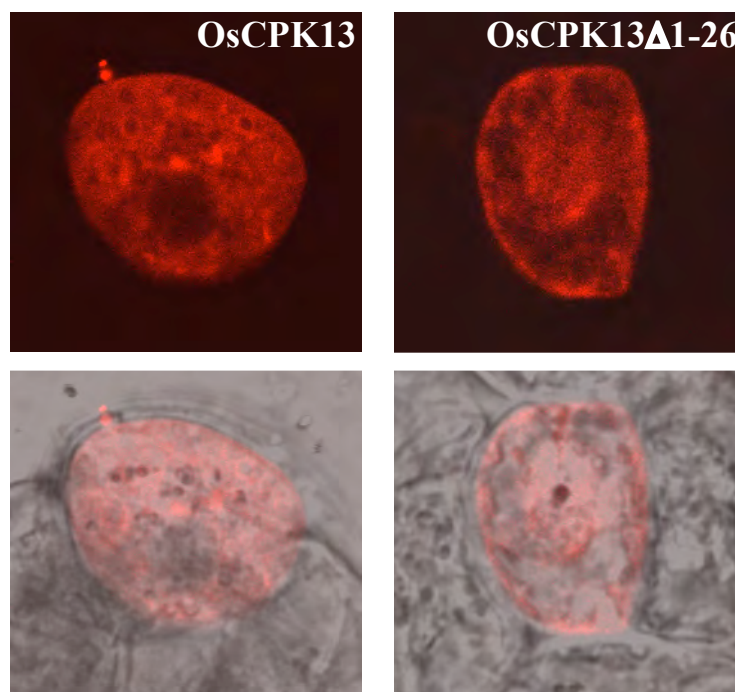


Figure 27. OsCPK13 (OsCDPK7) の推定アミノ酸配列と細胞内局在解析

(A) OsCPK13のアミノ酸配列と予測される機能ドメインを示した。図で示すようにOsCPK13は、セリン／スレオニンキナーゼドメイン、カルモジュリン様ドメイン含む特徴的な構造を有する植物特有のカルシウム依存性プロテインキナーゼである。(B) OsCPK13-RFP (左)、OsCPK13Δ1-26-RFP (右) それぞれの融合タンパク質をイネ培養細胞に一過的に過剰発現させ、細胞内の局在を解析した。上段はRFPの蛍光像、下段は明視野とのmerge像を示す。

OsCPK の ORF 領域をそれぞれ特異的に増幅するようなプライマーを用い、PCR により *OsCPK* のクローニングを試みた。その結果、先の *OsCPK13* (*OsCDPK7*) に加えて、*OsCPK7*、*OsCPK8*、*OsCPK19* の 4 つの *OsCPK* をクローニングすることが出来た。次に、これら 4 つの *OsCPK* をそれぞれ、ubiquitin プロモーターの下流に連結したベクター、および当研究室のフラジェリンを用いたマイクロアレイ解析でその発現誘導がフラジェリン認識によって制御されていることが明らかになっている *OsWRKY70* のプロモーターの下流にレポーター遺伝子としてホタルルシフェラーゼ遺伝子 (*Fluc*) を連結したベクター、ubiquitin プロモーター下流にウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子 (*Rluc*) を連結したベクターを作製した。イネ培養細胞より得たプロトプラストに、これら *OsWRKY70* pro:*Fluc* と *ubi* pro:*Rluc*、*ubi* pro:*OsCPK* の 3 つのベクターを PEG 法により導入し、30°C、暗所で 12~14 時間培養して共発現させた (Takai *et al.*, 2007 inpress)。これら一過的 *OsCPK* 過剰発現プロトプラストのルシフェラーゼ活性測定を Dual Luciferase Reporter Assay System を用いて行ったところ、*OsCPK8* および *OsCPK13* の過剰発現の場合にのみ、N1141 菌株フラジェリン処理によって誘導されるのと同程度まで、*OsWRKY70* の発現が誘導されることが明らかとなった (Fig. 27)。一方、*OsCPK7*、*OsCPK9* の過剰発現による *OsWRKY70* の発現上昇に有意な影響は認められなかった (Fig. 27)。このことより、イネ細胞において、フラジェリン認識後に *OsCPK8* および *OsCPK13* が活性化することで *OsWRKY70* 等の抵抗性関連遺伝子の転写誘導を活性化していることが示唆された。

2-3-9 *OsCPK13* の *Nicotiana benthamiana* 一過的過剰発現体の作製および解析

ここまでの結果より、*OsCPK8* および *OsCPK13* (*OsCDPK7*) が免疫反応を誘導するフラジェリン認識後の情報伝達経路に関与することが明らかになった。そこで次に、これら *OsCPK* の過剰発現が植物体にどのような影響を及ぼすのかを明らかにすることを目的として実験を行った。*OsCPK13* の ORF 全長をウィルス過剰発現系を用いて、タバコ植物体に導入するためにまず、T7-MEGA script を用いて *in vitro* translation を行い、*OsCPK13* 過剰発現用のウィルス RNA を得た。播種後 6 週齢の背丈約 10 cm のタバコ *N. benthamiana* 植物体の完全展開葉にカーボランダムを用いてウィルス RNA を接種し、*OsCPK13* 過剰発現体を計 6 株得た。ウィルス液の代わりに DW を同様に処理した 3 株の植物体をコントロールとして用い、植物体にウィルスを接種した後、25°C、明期 16 時間で 5 日間栽培した。その結果、*OsCPK13* 過剰発現株はすべての株において、ウィルス接種 4 日後には上位葉のカーリングが見られ、その後もコントロール株と比較して生育阻害を受けていた。次に、ウィルス接種 5 日後の植物体に、 1×10^7 cfu/ml になるように MgSO_4 に懸濁した *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (親和性；病原

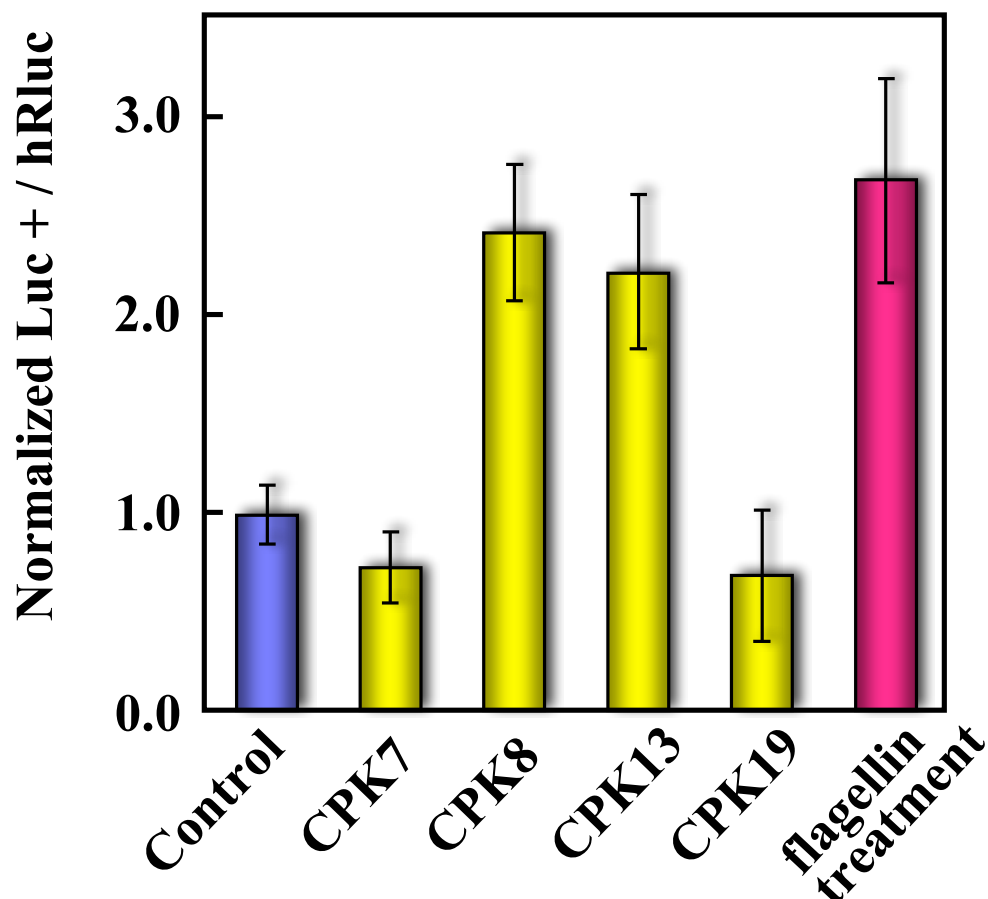
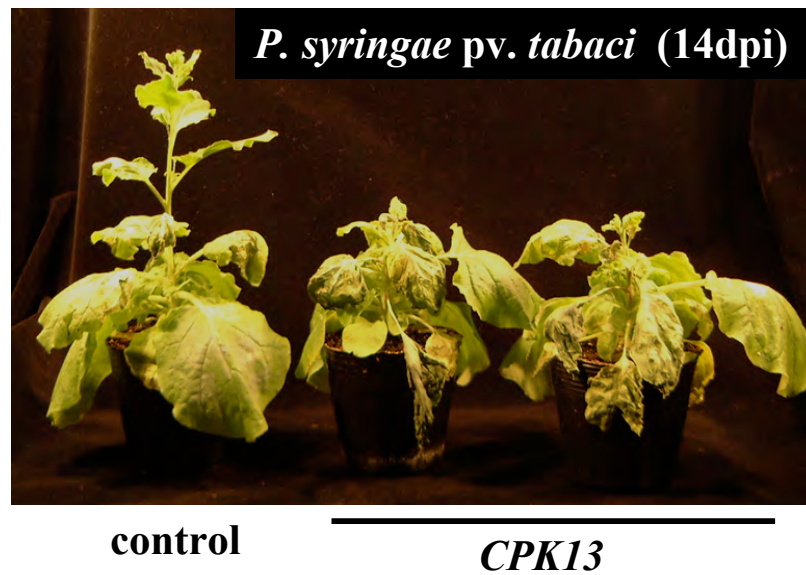


Figure 28. イネプロトプラストにおける*OsCPK*の一過的過剰発現による*OsWRKY70*の発現誘導解析

N1141菌株接種により特異的に発現誘導される*OsCPK*の機能を解析するため、それぞれの*OsCPK* (*ubi pro: OsCPK7*, *ubi pro::OsCPK8*, *ubi pro: OsCPK13*, *ubi pro::OsCPK19*) および、*OsWRKY70 pro:Firefly luciferase*、*ubi pro:Renilla luciferase*の3つのコンストラクトをイネプロトプラストに共発現させ、12～14時間培養した後、ルシフェラーゼ活性を測定した。なお、ポジティブコントロールの精製フラジェリンは15 $\mu\text{g/ml}$ になるように処理し、ルシフェラーゼ活性はホタルルシフェラーゼ活性の値を、共発現したウミシイタケルシフェラーゼ活性の値で補正した。

A



B

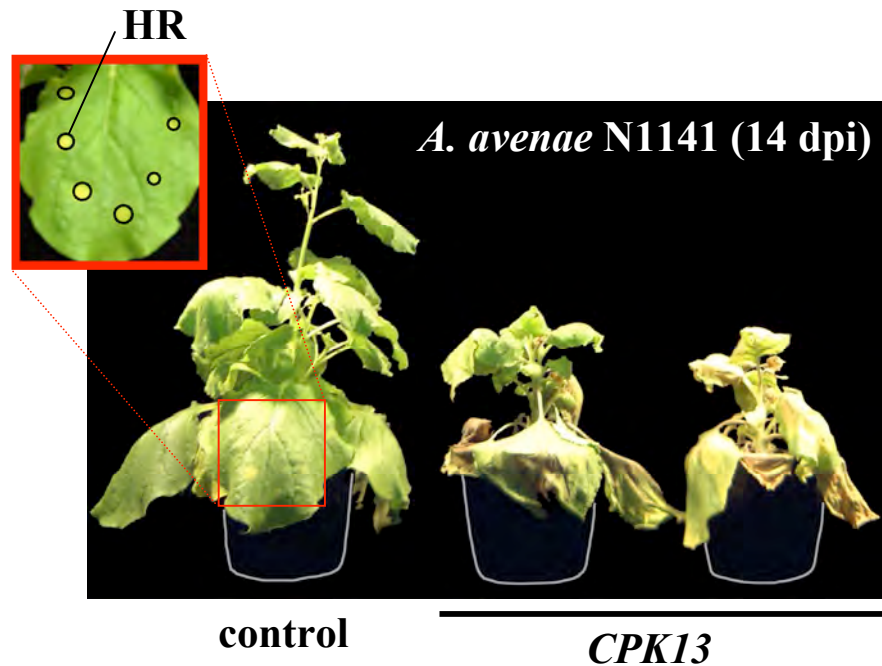


Figure 29. *OsCPK13*の*Nicotiana benthamiana*一過的過剰発現体の作製および解析
*OsCPK13*の植物体内における機能を解析するために、ウィルス一過的過剰発現系を用いて、*OsCPK13*過剰発現タバコ (*Nicotiana benthamiana*) を作出した。
*OsCPK13*過剰発現用ウィルスの代わりにDWを摩擦接種した植物体をコントロール株として用いた。写真はそれぞれ、(A) *P. syringae* pv. *tabaci*菌株、(B) *A. avenae* N1141菌株を 1×10^7 cfu/mlで接種し、14日後の植物体を示している。(B)のコントロール株では、接種葉のinfiltrationを行った部位がHRを起こしているのが認められる。また、いずれの菌株接種によっても、*OsCPK13*過剰発現植物体は、非常に強い生育阻害を受けていることが示された。

性) もしくは *A. avenae* N1141 菌株 (非親和性) をそれぞれ *OsCPK13* 過剰発現体およびコントロール株のタバコ葉に infiltration を行った。菌接種のコントロールとしては MgSO_4 のみをそれぞれの植物体に同様に処理したものを用いた。*P. syringae* の病原性・毒素生産性を保つために菌体接種後のタバコ植物体は、23℃、高湿度条件で生育して形態観察を行った。菌体接種 7 日後では、コントロール株は野生株と同様の通常の生育を示したのに対し、*OsCPK13* 過剰発現植物体は、親和性、非親和性どちらの菌体接種後でも、上位葉の展開が停止するなどの非常に強い生育阻害が認められ、コントロール株より 5~6 cm 背丈が低くなることが明らかになった。なお、同様に GFP を一過的に過剰発現させた植物においてはこのような生育阻害は全く認められないことは確認済みである。親和性の *P. syringae* pv. *tabaci* 接種 14 日後のコントロール株では wilting 等の通常の病徴が認められたのに対し、*OsCPK13* 過剰発現体では驚いたことに、親和性菌の接種によって植物体全体で激しい HR 様の細胞死が誘導されていることが明らかになった (Fig. 29-A)。一方、非親和性の *A. avenae* N1141 菌株を接種 14 日後のコントロール株では、infiltration を行った部位のみで葉が黄化する HR が認められたが、*OsCPK13* 過剰発現体では菌体接種葉以外の植物体全体でも非常に激しい HR が認められることが明らかになった (Fig. 29-B)。これらのことより、*OsCPK13* を過剰発現したタバコ植物体では親和性、非親和性いずれの菌体接種によっても非常に強い HR が誘導されることが示された。このことから、植物体が菌体を認識した後に誘導する免疫反応である過敏感細胞死 (HR) に関与する情報伝達経路が、*OsCPK13* の活性化によって制御されている可能性が示唆される。

2-2 考察

第二章では、イネ細胞のフラジェリン認識情報の Ca^{2+} シグナルを介した伝達機構を明らかにすることを目的として、免疫反応誘導と Ca^{2+} シグナルとの関与を調べることで研究を行った。まず、N1141 菌株接種や N1141 菌株の精製フラジェリン処理によって誘導される過敏感細胞死や活性酸素の発生への各種カルシウム阻害剤の影響を検討した。その結果、N1141 菌株接種によって誘導される活性酸素の発生 (Fig. 8) や過敏感細胞死の誘導 (Fig. 12)、N1141 菌株のフラジェリン処理によって誘導される活性酸素の発生 (Fig. 9) のいずれもカルシウムキレート剤である EGTA および L 型カルシウムチャネル遮断剤である nifedipine の存在下で顕著に抑制された。さらに、この活性酸素の発生と過敏感細胞死は、タンパク質リン酸化阻害剤である K252a や staurosporine でも顕著に抑制された (Fig. 13, 14)。これらのことは、免疫反応である活性酸素の発生や過敏感細胞死の誘導に Ca^{2+} シグナルを介した情報伝達系とタンパ

ク質のリン酸化が関与していることを示している。同様の推察を示す結果が、他の植物とエリシター相互作用の系においても多数報告されている。イネ苗立枯病菌 *Trichoderma viride* 由来の xylanase タンパク質 (TvX) がイネ培養細胞において特異的に強く誘導する過敏感細胞死、活性酸素種の生成、MAPK の活性化、PBZ1、Cht 等の防御応答遺伝子の発現誘導などの一連の防御応答が、培地中の Ca^{2+} を除くことによって抑制された (Kurusu *et al.*, 2005)。また、ジャガイモ疫病菌 *Phytophthora infestans* 由来の菌体壁成分 (HWC エリシター ; hyphal wall component elicitor) 処理による、ジャガイモ塊茎におけるオキシダティブバーストは、EGTA および、verapamil、nifedipine、diltiazem、 CoCl_2 等のカルシウムチャネル遮断剤により阻害された (Doke *et al.*, 1996)。さらに、カルモジュリン阻害剤である W-7、オフィオボリンやタンパク質リン酸化阻害剤 (staurosporine、K252) が、このオキシダティブバーストの誘導を阻害した (道家、1997)。他にもこれら阻害剤が、ファイトアレキシン誘導 (Ebel *et al.*, 1995) や HR (Tavernier *et al.*, 1995; Binet *et al.*, 2001)、SIPK や WIPK 等の MAPK の活性化、PAL や *hsr203J* 等の抵抗性関連遺伝子の転写誘導 (Lecourieux *et al.*, 2002) を抑制するという報告が、各種の植物の実験系で確認されている。これらのデータは *A. avenae* の非親和性菌株やフラジェリンによって誘導される免疫反応誘導に、細胞外からの Ca^{2+} 流入およびタンパク質のリン酸化酵素が密接に関与しているという今回の結論を支持するものである。

次に筆者は、Yellow Cameleon 3.6 を一過的に発現させたイネ培養細胞を用いて、 Ca^{2+} 動態をモニターできる系を構築し、免疫反応誘導時のイネ細胞における $[\text{Ca}^{2+}]$ 濃度変動の観察を行った (Fig. 15, 16)。N1141 菌株接種、およびその精製フラジェリン処理の非親和性相互作用時に、接種後約 1 分後から非常に強い一過的な細胞内 $[\text{Ca}^{2+}]$ の上昇が認められた (Fig. 17, 18, 20, 21)。このような強い細胞内 $[\text{Ca}^{2+}]$ の上昇は、K1 菌株やフラジェリン欠損株の接種では認められず (Fig. 17)、さらに、EGTA や nifedipine の存在下ではほぼ完全に抑制された (Fig. 23, 24)。これらの結果は、イネ細胞が非親和性菌株のフラジェリンを認識することにより、細胞外からの Ca^{2+} 流入が引き起こされ、細胞内の一過的な細胞内 $[\text{Ca}^{2+}]$ の上昇を起さることを示している。これまでに、様々なエリシター刺激が、細胞内への Ca^{2+} 流入を引き起こすことが知られている (Doke and Miura, 1995, Noritake *et al.*, 1996)。 Ca^{2+} 蛍光指示薬である Fluo-3 をエレクトロポレーションによって取り込ませたジャガイモ塊茎スライスに、HWC エリシター刺激を加えると、Fluo-3 由来の蛍光強度上昇が速やかに認められ、 Ca^{2+} の流入が起こることが確認された (道家、2005)。また、 Ca^{2+} 感受性発光タンパク質 aequorin を発現したタバコ BY-2 細胞や、イオン選択性電極を用いたマルチチャネル同時測定装置を用いた解析の結果より、過敏感細胞死誘導能を有するトマト根腐疫病菌 *Phytophthora cryptogea* 由来のタンパク質性エリシター cryptogein の処理により、約 1 分後から一過

性かつ二相性の $[Ca^{2+}]_{cyt}$ の変化が誘導された (Kadota *et al.*, 2004)。さらに Kadota らは、カルシウムキレート剤、phospholipase C (Inositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃) 生成酵素) の阻害剤、リン酸化阻害剤等の各種阻害剤を用いた薬理的解析により、cryptogein エリシター処理後の二相性の $[Ca^{2+}]_{cyt}$ の変化の最初の上昇は細胞外からの Ca^{2+} 動員によるものであり、二回目の上昇は phospholipase C を介した細胞内 Ca^{2+} ストアからの Ca^{2+} 動員であるという興味深い知見を得ている (Kadota *et al.*, 2004)。さらに。この $[Ca^{2+}]$ 変化は 1 μ M K252a 存在下で完全に抑制されることから、エリシター誘導性の細胞内への Ca^{2+} 動員はタンパク質のリン酸化により制御されていることも示した (Kadota *et al.*, 2004)。同様に、Lecourieux らも cryptogein 処理によるタバコ培養細胞における一過的な $[Ca^{2+}]_{cyt}$ の変化が、EGTA、BAPTA、LaCl₃、GdCl₃、staurosporine の存在下ではほぼ完全に抑制されることを報告した (Lecourieux *et al.*, 2002)。これらのことは、筆者の結果とよい一致を示すものであり、フラジェリン処理後の急速な細胞内 $[Ca^{2+}]$ 上昇にも同様に、 Ca^{2+} シグナルだけではなくタンパク質リン酸化も関与している可能性も推察される。

このような $[Ca^{2+}]_{cyt}$ の変化はエリシターだけではなく、植物ホルモン、光、非生物学的ストレス等を含む様々なシグナルに対しても誘導されることが報告されている (Sanders *et al.*, 1999; Reddy, 2001; Rudd and Franklin-Tong, 2001; White and Broadley, 2003)。このような異なる刺激に対して同じように誘導される $[Ca^{2+}]$ の各刺激に対する特異性は、 Ca^{2+} スパイクの振幅や持続時間、局在、頻度によって区別されているという報告が近年なされてきている (Dolmetsch *et al.*, 1998; McAinsh and Hetherington, 1998; Trewavas and Malho, 1998; Knight, 2000; Allen and Schroeder, 2001; Ng and McAinsh, 2003; Hetherington and Brownlee, 2004)。現在では、 Ca^{2+} は、植物において数多くの情報伝達経路におけるセカンドメッセンジャーであり、環境や成長など様々な要因に対し、適切な生理学的応答を引き起こすための情報伝達経路に広く関与していると考えられている。定常状態において、真核細胞の細胞質内の Ca^{2+} 濃度は外液 (1~2 mM) に比べて低く、細胞質の遊離カルシウム濃度 ($[Ca^{2+}]_{cyt}$) はアポプラスト液の 10^4 分の 1、細胞オルガネラの $10^4 \sim 10^5$ 分の 1 である 100~200 nM の間に保たれている (Bush, 1995)。こうした低濃度を維持するのは、細胞膜と小胞体膜にあり Ca^{2+} を細胞質から能動輸送している Ca^{2+} -ATPase の働きによる部分が多い (Bush, 1995; Sanders *et al.*, 1999, 2002)。このように $[Ca^{2+}]_{cyt}$ を低く保つことで、種々のシグナルに応答して変化した $[Ca^{2+}]_{cyt}$ の上昇に敏感に反応することが出来るのであろう。

筆者の研究により、イネ細胞がフラジェリンを認識することによって、細胞内 $[Ca^{2+}]$ の一過的な変化を引き起こし、これにより免疫反応である活性酸素の発生を誘導していることが示唆された。これまで、初期の免疫応答イベント間の関係について、様々な系において研究がなされてきたが、大部分が未解明のままである。特に、エリシタ

一誘導性の $[Ca^{2+}]_{cyt}$ の変化と活性酸素種の発生の関係については議論が分かれるところである。Mithöfer らは、ダイズにおける β -glucan 誘導性の H_2O_2 の生成は、 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ の変化に依存しないと報告している (Mithöfer *et al.*, 2001)。一方、Chandra らは、タバコ細胞におけるオリゴガラクトロナイド (OG) 誘導性の活性酸素種の発生開始に $[Ca^{2+}]_{cyt}$ の変化が必須であることを示した (Chandra *et al.*, 1997)。Cessna and Low らは、糸状菌エリシター誘導性のオキシダティブバーストは、細胞内ストアからの Ca^{2+} 動員に依存しており、細胞外からの Ca^{2+} 流入は関与していないと報告している (Cessna and Low, 2001)。さらに、細胞への H_2O_2 処理は $[Ca^{2+}]_{cyt}$ の変化を誘導することが報告されており (Price *et al.*, 1994; Levine *et al.*, 1996; Takahashi *et al.*, 1998; Kawano and Muto, 2000)、孔辺細胞のアブシジン酸 (ABA) 情報伝達系における $[Ca^{2+}]_{cyt}$ の上昇に H_2O_2 が重要な役割を担っていることが示されている (Pei *et al.*, 2000, Kwak *et al.*, 2003)。これ以外にも、エリシター情報伝達における $[Ca^{2+}]_{cyt}$ に活性酸素種が影響を及ぼす可能性も示されている (Lecourieux *et al.*, 2002)。近年、Kadota らは、タバコ BY-2 細胞における cryptogein 誘導性の $[Ca^{2+}]_{cyt}$ の変化は時間的に活性酸素種の発生より先立って起こること、2~5 μM の NADPH oxidase 阻害剤である DPI (diphenylene iodonium) により活性酸素種の発生が完全に阻害されたが、cryptogein によって引き起こされる初期の $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 上昇には DPI による影響を受けなかったこと、cryptogein 誘導性の H_2O_2 の発生は DIDS (4,4'-diisothiocyanostilbene-2,2'-disulfonate; Cl^- チャンネル遮断剤)、BAPTA、K252a により阻害され、活性酸素種の発生には Ca^{2+} 流入、 Cl^- 流出、タンパク質リン酸化が必要であることを示し、cryptogein 誘導性の一過的 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 上昇に活性酸素種が直接関与してはならず、活性酸素種の発生は初期の $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 応答の下流に存在することを報告した (Kadota *et al.*, 2004)。

このような一過的な $[Ca^{2+}]_{cyt}$ の変化の情報は、 Ca^{2+} 結合タンパク質によって解読され、下流のタンパク質リン酸化や遺伝子発現パターンの変化を誘導する情報伝達カスケードを活性化させる (Rudd and Franklin-Tong, 2001; Sanders *et al.*, 2002)。植物に存在する多くの Ca^{2+} 結合タンパク質は、CaM、CaM 関連タンパク質、カルシニューリン B 様タンパク質 (CBL) や、 Ca^{2+} 依存性プロテインキナーゼ (CDPK) に分類され (Luan *et al.*, 2002; Sanders *et al.*, 2002; Reddy and Reddy, 2004)、これらが Ca^{2+} により構造変化を受けて機能し、下流にシグナルを伝達する (Harmon *et al.*, 2000; Zhang and Lu, 2003; Harper *et al.*, 2004)。筆者は、マイクロアレイにより同定したフラジェリン認識の下流制御遺伝子群の解析により、*OsCDPK7* が非親和性相互作用特異的に、 Ca^{2+} シグナル依存的な強い発現誘導を受ける遺伝子であることを発見した。CDPK は *N* 末端のセリン/スレオニンプロテインキナーゼドメインと *C* 末端の EF-hand Ca^{2+} 結合サイトを含む CaM 様ドメインからなる特徴的な構造を有している (Cheng *et al.*, 2002; Harmon *et al.*, 2001)。また、キナーゼドメインと CaM 様ドメインを挟む部分はジャンクション

ドメインとよばれ、 Ca^{2+} の非存在下におけるリン酸化を阻害し、CDPKの活性を低く保つ疑似基質自己抑制ドメインとして機能している (Harmon *et al.*, 1994)。細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇することにより、CDPKはそのEF-handドメインを介して Ca^{2+} と直接結合することによって、ジャンクションドメインによる自己抑制が解除され、活性化されるものと考えられている。

アラビドプシスの全ゲノム配列解析の結果、34の遺伝子がCDPKをコードしていることが明らかになった。さらにダイズ、トマト、トウモロコシ等の植物にもCDPKマルチ遺伝子ファミリーが存在することが示唆されている (Harmon *et al.*, 2001)。イネのゲノムには29個のOsCPK (OsCDPK) が存在することが報告された (Asano *et al.*, 2005)。現在までに、様々な刺激に対する応答により発現制御を受けていることが報告されているOsCPKには、OsCPK7 (ジャスモン酸処理; Akimoto-Tomiyama *et al.*, 2003、ジベレリン処理; Yang *et al.*, 2003)、OsCPK9 (いもち病菌接種; Asano *et al.*, 20005)、OsCPK13 (エリシター処理; Akimoto-Tomiyama *et al.*, 2003、低温・塩ストレス; Saijo *et al.*, 2000)、OsCPK15 (エリシター処理; Akimoto-Tomiyama *et al.*, 2003)、OsCPK19 (光照射; Breviario *et al.*, 1995)、OsCPK20 (エリシター処理; Akimoto-Tomiyama *et al.*, 2003)、OsCPK23 (ジャスモン酸処理; Akimoto-Tomiyama *et al.*, 2003、種子の発育・貯蔵産物の蓄積に関与; Asano *et al.*, 2002)、OsCPK24 (エリシター処理; Akimoto-Tomiyama *et al.*, 2003) 等がある。このようなことから、免疫反応情報伝達に全CDPKの中でOsCPK13 (OsCDPK7) のみが免疫反応誘導に関与しているというよりは、これ以外の複数のイネCDPKが協調して免疫反応に関連した情報伝達を制御している可能性が考えられる。そこで、イネに存在する29個すべてのOsCPKの発現を、オリゴマイクロアレイと定量的real time RT-PCRにより得られた結果を基に解析を行った。その結果、N1141菌株接種後特異的に発現誘導されるOsCPKとして、OsCPK7、OsCPK8、OsCPK10、OsCPK12、OsCPK13 (OsCDPK7)、OsCPK19を同定した (Fig. 25, 26)。これらの6つのOsCPKのうち、OsCPK8、OsCPK12、OsCPK13、OsCPK19の4つのOsCPKはそのN末端領域にミリスチル化モチーフを有している。一般的に、CDPKのN末端領域は非常に多様性に富んでいるが、いくつかのCDPKはN末端領域のミリスチル化、もしくはパルミトイル化モチーフを有していることが知られている (Ellard-Ivey *et al.*, 1999; Martin and Busconi, 2000; Rutschmann *et al.*, 2002)。そこで、フラジェリン認識の下流に制御されている遺伝子として同定したOsCPK13の細胞内局在解析を試みた。OsCPK13もしくは、OsCPK13 Δ 1-26とRFPとの融合タンパク質をイネ培養細胞に一過的に発現させて局在解析をおこなったところ、OsCPK13はN末端領域のミリスチル化を介して細胞内のオルガネラ膜に局在していることが示唆された。しかしながら、この結果だけではどのオルガネラ膜に局在しているかを確証するものではないため、OsCPK13の局在については、特異抗体を用

いた免疫電子顕微鏡による観察、もしくは小胞体などのオルガネラに局在するマーカー蛍光タンパク質との共発現による解析など、さらなる詳細な解析が必要であると考えられる。CDPK の細胞内局在に関しては、他の植物においても、GFP との融合 CDPK タンパク質の発現や、tag を付加した CDPK タンパク質の western blot 解析などによって調べられている。糸状菌毒素 fusicoccin 処理によって転写が誘導されるトマトの LeCPK1 は、ミリストイル化を介して細胞膜に局在した (Rutschmann *et al.*, 2002)。水欠乏ストレスによって転写誘導される、アイスプラント *Mesembryanthemum crystallinum* の McCPK1 もやはり、ミリストイル化を介して細胞膜に局在することが示された (Chehab *et al.*, 2004)。塊茎の発育時に活性が上昇するジャガイモの StCDPK1 は、N 末端領域にミリストイル化とパルミトイル化の両モチーフを有しており、これらの二重修飾を介して非常に安定に細胞膜に局在することが示された (Raíces *et al.*, 2003)。また、*Arabidopsis* の AtCPK1 はペルオキシソームに局在することが示された (Dammann *et al.*, 2003)。N-ミリストイル化は、タンパク質の N 末端に炭素数 14 の飽和脂肪酸であるミリスチン酸が共有結合する脂質修飾である。N-ミリストイル化タンパク質は細胞膜やオルガネラ膜との結合や、特異的なタンパク質-タンパク質相互作用を介して細胞情報伝達において重要な機能を発現することが知られている。アポトーシス経路に参与する BID タンパク質 (p22) は、分子中央部が caspase 8 で切断されると、生成した 15 kDa の C 末端側断片の N 末端領域にミリストイル化のコンセンサス配列が生まれ、その結果、N 末端 Gly 残基の α -アミノ基がミリスチル化されることで修飾タンパク質はミトコンドリアに移行する (Zha *et al.*, 2000)。また、ミリストイル化がカルモジュリンとその標的タンパク質との相互作用の制御に関与しているとの報告もある (Matsubara *et al.*, 2005)。*Arabidopsis* の *sos3* (salt overly sensitive3) 変異体解析より得られた SOS3 は、塩耐性に関わる N-ミリストイル化 Ca^{2+} 結合タンパク質である。SOS3 のミリストイル化モチーフ内の Gly を Ala に置換した非ミリストイル化変異型 SOS3 は、 Ca^{2+} との結合能が低下した結果、Ser/Thr プロテインキナーゼである SOS2 との相互作用が出来ず、SOS2 のキナーゼ活性の誘導能を失った。このことより、SOS3 の N-ミリストイル化が *Arabidopsis* の塩耐性獲得に必須であることが示された (Ishitani *et al.*, 2000)。また、トマトの Pto キナーゼは、斑点病菌 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* 由来の *avrPto* に対応するトマト R タンパク質であり、直接 *avrPto* と相互作用することによって HR を含む防御応答を誘導する (Tang *et al.*, 1996; Scofield *et al.*, 1996)。Pto タンパク質は N 末端領域にミリストイル化モチーフを有しており、このミリストイル化モチーフ内の Gly 残基を Ala 残基に置換した変異型タンパク質は、*avrPto* との相互作用による HR 誘導能を失っていた。同時に、野生型 Pto と変異型 Pto の細胞内局在に変化はなかったことも示された (de Vries *et al.*, 2006)。Pto のキナーゼ活性は、N-ミリストイル化により負に制御されていた。このように近年、タンパク質

の *N*-ミリストイル化は、必ずしも細胞内局在だけに関わるのではなく、タンパク質間相互作用や、自己キナーゼ活性の抑制に関わっているということも明らかになっている (Andriotis and Rathjen, 2006)。このようなことから、*OsCPK13* の *N*-ミリストイル化もまた、細胞内局在だけでなく *OsCPK13* の機能そのものに関与している可能性があり、*N*-ミリストイル化されない変異体等を用いた機能解析が重要となってくるであろう。

次に、筆者はイネにおけるフラジェリン認識シグナルへのこれら *OsCPK* の関与を、フラジェリンによって発現が制御される遺伝子である *OsWRKY70* の転写誘導能を指標に、デュアルルシフェラーゼアッセイによって解析し、*OsCPK8* および *OsCPK13* の過剰発現が精製フラジェリンの接種と同程度の *OsWRKY70* の転写誘導能を示すことを明らかにした (Fig. 28)。このことは、フラジェリン認識シグナルに *OsCPK8* および *OsCPK13* が関与しており、これらキナーゼが活性化することで下流にシグナルを伝達し、*OsWRKY70* 等の抵抗性関連遺伝子の転写を誘導していることを示唆している。WRKY は、植物特有の転写因子スーパーファミリーを構成しており、イネにおいては 83 個の WRKY が同定されている (Goff *et al.*, 2002)。WRKY タンパク質は、zinc-finger モチーフと共に *N* 末端領域に WRKYGQK という保存されたアミノ酸配列を有しており、その一次構造から転写活性もしくは転写抑制に関与することが示されている (Eulgem *et al.*, 2000)。WRKY ファミリーのいくつかは、病原体に対する防御応答や老化、トリコームの発達等の植物特有の生理的応答の調節に関与していることが知られている。近年、全身獲得抵抗性 (SAR; systemic acquired resistance) の指標となる *PR-1* 遺伝子のプロモーター領域や、植物の免疫反応誘導に関わるポジティブレギュレーターである *Arabidopsis* の *NPR1* 遺伝子のプロモーター領域に、WRKY タンパク質が特異的に結合する TAGC コア配列からなる W-box 配列が存在することが示された (Maleck *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2001)。また、*Arabidopsis* におけるフラジェリン受容体である FLS2 によって flg22 が認識されることにより、AtMEKK1, AtMKK4/5, AtMPK3/6 で構成される MAPK カスケードを介して AtWRKY22、AtWRKY29 の転写が誘導されることが示されている (Asai *et al.*, 2002)。この様に、WRKY は植物の免疫反応誘導に関わる転写因子として重要な役割を担っていると考えられているが、その機能についてはごく一部しか明らかにされていないのが現状である。今回用いたイネの *OsWRKY70* はフラジェリン処理によって早期に転写が誘導されることから、*OsCPK8*、*OsCPK13* を介したフラジェリン認識後の情報伝達系において、免疫反応を誘導する転写因子のひとつとして機能している可能性が考えられ、これら *OsWRKY70* を含む転写因子の機能の解析が、今後、フラジェリン認識後の情報伝達系を解明する上で重要であると考えられる。

さらに、筆者は *N. benthamiana* とウィルス一過的発現系を用いて、*OsCPK13* 過剰発

現タバコを作出し、非親和性、親和性の菌体接種を行い、形態観察を行った。*OsCPK13* 過剰発現体は、コントロール株と比較して強い生育阻害を受けており、非親和性菌株の接種だけでなく親和性菌株の接種によっても、非常に強い HR（もしくは HR 様の細胞死）を誘導した（Fig. 29）。このことより、植物体が菌体を認識した後に誘導する HR の情報伝達経路に、*OsCPK13* の活性化による制御が関与していることが示唆された。Jones らのグループは、*OsCPK13* とアミノ酸レベルで約 67% の相同性を有しており *OsCPK13* のタバコ *Nicotiana tabacum* におけるオルソログであると考えられる *NtCDPK2* が過敏感応答（HR : hypersensitive response）に至る *Avr9/Cf-9* のレース特異的シグナル経路に関与していることを報告している（Romeis *et al.*, 2000, 2001）。*Cf-9* 発現植物体に *Avr9* を処理すると、急速なイオン流入や、活性酸素種の生成、MAPKs や CDPKs の活性化といった、イネ培養細胞へのフラジェリン処理により誘導される免疫反応と非常に類似した一連の免疫反応が起こる（Piedras *et al.*, 1998; Blatt *et al.*, 1999; Romeis *et al.*, 1999, 2000, 2001）。タバコの CDPK 遺伝子である *NtCDPK2* および *NtCDPK3* はレース特異的エリシター処理や浸透圧ストレスに応答して転写誘導され、この *NtCDPK2/3* 遺伝子ファミリーをウィルス誘導性ジーンサイレンシングによって抑制すると、レース特異的エリシター処理後の HR の減少が見られた（Romeis *et al.*, 2001）。この結果は、*NtCDPK2* および近縁のサブファミリーメンバーが免疫反応情報伝達に必要であることを示唆している。

トウモロコシプロトプラスト系において C 末端を削った、キナーゼドメインと可変ドメインのみからなる truncated-CDPK は恒常的活性型 CDPK となり、*Arabidopsis* において truncated-*AtCPK10* および *AtCPK30* の過剰発現によって低温、乾燥、塩ストレス応答経路を活性化することを Sheen らは発見した（Sheen, 1996）。さらに、Jones らは、truncated-*NtCDPK2* を発現させた *N. benthamiana* の葉は、弱い非生物学的ストレス刺激に対して HR 様の細胞死を示し、活性酸素種の発生や抵抗性関連遺伝子の発現が誘導されることを明らかにした。一方、*NtCDPK2* と相同性の高いアイソフォームである *NtCDPK3* の truncated-*NtCDPK3* の *N. benthamiana* への発現では、このような HR 様の細胞死を含む防御応答が誘導されなかった。これは、*NtCDPK2* が特異的に植物の防御応答に関与していることを明確に示唆している（Ludwig *et al.*, 2004）。これらの報告は、*N. benthamiana* における *OsCPK13* 過剰発現株が、非親和性菌株、親和性菌株のどちらの菌株の接種によっても、植物体に強い HR 様の細胞死を誘導したことで非常に良い一致を示すものである（Fig. 29）。また、データは示していないが、*OsCPK13* 過剰発現株へ MgSO_4 のインフィルトレーションを行うことによっても HR 様の細胞死を誘導した。これらのことは、*NtCDPK2* と高い相同性を有する *OsCPK13* の過剰発現によって、*N. benthamiana* 植物体内で *OsCPK13* が *NtCDPK2* と同様の機能を有していたことを示している。さらに興味深いことに、*NtCDPK2* と同様の CDPK サブファ

ミリーに属している、*Arabidopsis* の AtCPK1 もまた植物の防御応答に関与していることが報告されている。トマトのプロトプラスト系で *AtCPK1* を過剰発現させると、NADPH oxidase の活性が上昇し、活性酸素種の発生が上昇した (Xing *et al.*, 2001)。先にも述べたとおり、活性酸素種の発生は病原菌の感染に対する、植物の防御応答の最も初期に起こる反応であり、 Ca^{2+} が活性酸素種の生成、および過敏反応の誘導の両方において重要な役割を担っていることがよく知られている (Blumwald *et al.*, 1998; Piedras *et al.*, 1998)。細胞膜存在する NADPH oxidase は、 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ の上昇により活性化した CDPK によるリン酸化ターゲットである可能性が示されている (Blumwald *et al.*, 1998; Romeis *et al.*, 1998; Xing *et al.*, 1997)。これらのことから、イネ OsCPK13 は、フラジェリンの認識によるイネ細胞における $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 上昇によって活性化され、HR を含む免疫反応を誘導する情報伝達系の中心的役割を担うタンパク質である可能性が示唆される。

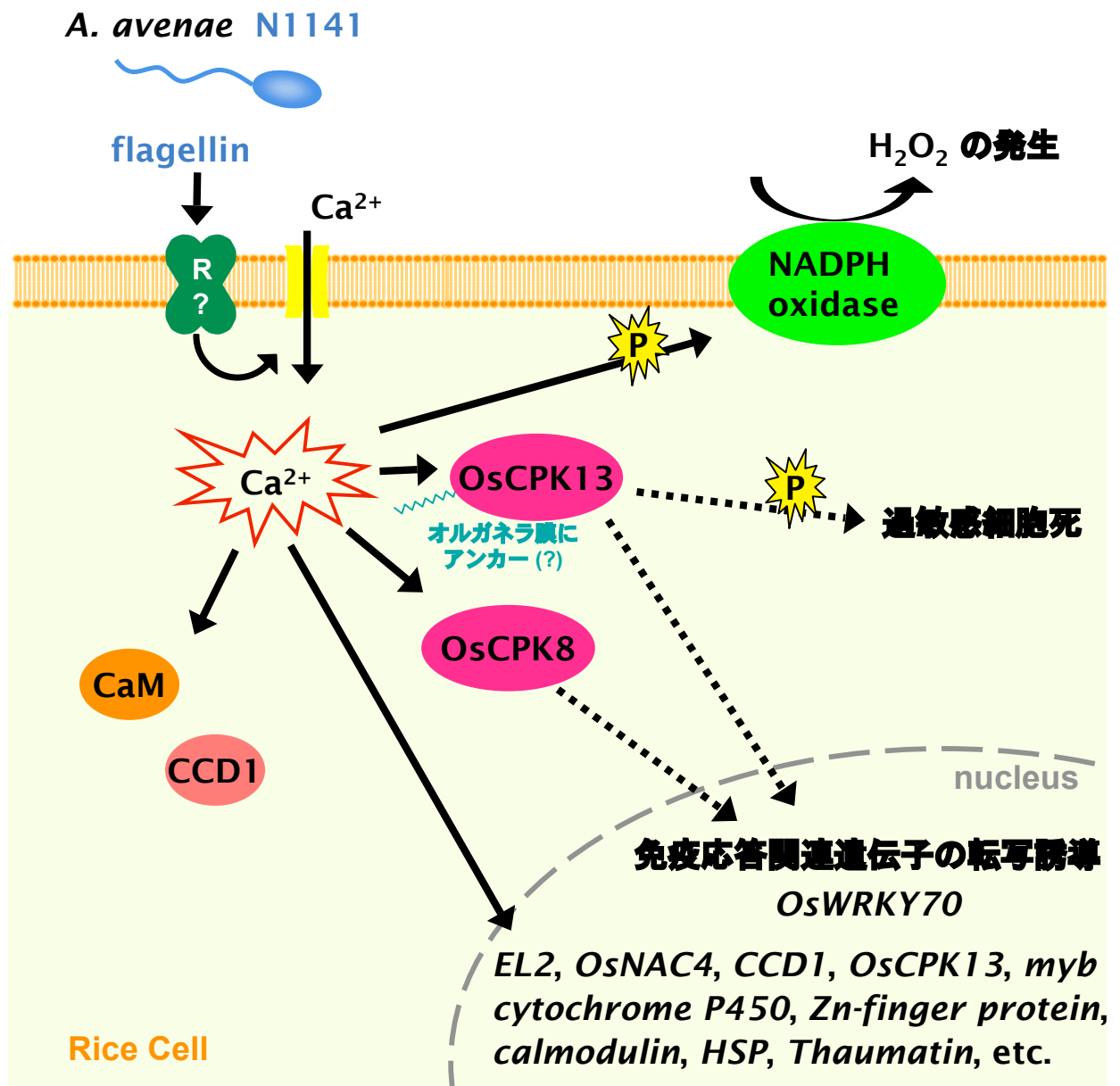


Figure 30. Ca^{2+} シグナルを介したイネ免疫反応誘導時のモデル図

本研究より得られた知見を基に、イネ非親和性*A. avenae* N1141菌株のフラジェリンがイネ細胞によって認識された後に誘導される免疫反応の情報伝達のモデル図を作成した。N1141菌株のフラジェリンは受容体により認識された後、急速な Ca^{2+} 流入を引き起こし、一過的な細胞内 $[\text{Ca}^{2+}]$ 上昇が起こる。この $[\text{Ca}^{2+}]$ 上昇は、OsCPK13やOsCPK8、CaM、CCD1といった Ca^{2+} センサータンパク質に認識され、下流にそのシグナルを伝達する。これら Ca^{2+} シグナルによって、多くの免疫応答関連遺伝子の転写を誘導する。さらにタンパク質リン酸化を介した過程を経て、初期の活性酸素の発生、および過敏細胞死が誘導される。

総合考察

本研究では、イネによる *Acidovorax avenae* 非親和性菌株のフラジェリン認識後の情報伝達と免疫反応誘導の分子機構を明らかにすることを目的として解析を行った。

第一章では、マイクロアレイを用いた網羅的かつ詳細な解析を行うことにより、イネ培養細胞におけるフラジェリン認識の下流に制御されている遺伝子の同定に成功した。得られたフラジェリン認識下流遺伝子群には、CCD1 や calmodulin、OsCDPK7 (OsCPK13) などの Ca^{2+} シグナルに関与するタンパク質をコードする遺伝子が多く含まれていることが示された。さらに、細胞外 Ca^{2+} キレート剤を用いたフラジェリン下流遺伝子の発現解析により、イネ細胞内におけるフラジェリン認識情報が Ca^{2+} シグナルを介して伝達されている可能性を示唆した。

第二章では、フラジェリン認識によって誘導される免疫反応と細胞内 Ca^{2+} 濃度変化に注目して解析を行った。その結果、フラジェリン認識後の免疫反応誘導には、 Ca^{2+} シグナルとタンパク質リン酸化が密接に関与していることが示された。さらに、Yellow Cameleon 3.6 を用いて細胞内 Ca^{2+} 動態の解析を行った結果、非親和性菌株のフラジェリン特異的に早期の細胞内 $[\text{Ca}^{2+}]$ の変動が認められた。そこで、イネに存在する全 CDPK の発現を調べたところ、OsCPK13 を含む 6 個の OsCPK が N1141 菌株特異的に発現誘導されることを明らかにした。これら OsCPK の過剰発現による、OsWRKY70 転写誘導能を調べた結果、OsCPK8 と OsCPK13 がフラジェリン処理と同程度の転写誘導活性を示した。この OsCPK13 の *N. benthamiana* における一過的過剰発現株は、非親和性、親和性どちらの菌株接種や機械的刺激によって強い HR 様の細胞死が観察された。

以上の結果から、イネは非親和性菌株のフラジェリンを認識して、ごく早期に細胞外からの Ca^{2+} 流入が引き起こされ、この細胞内 $[\text{Ca}^{2+}]$ 上昇を受けて OsCPK13 などのキナーゼが活性化し、これにより活性酸素発生や過敏感細胞死、下流遺伝子の転写が誘導されるというフラジェリン認識情報伝達を介した免疫反応誘導機構が存在することが示された。本研究により得られた知見から考えられるモデル図を Fig. 30 に示した。

細菌の鞭毛構成タンパク質であるフラジェリンは、植物の免疫反応を誘導するだけでなく、動物やショウジョウバエの自然免疫システムにおいても PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) として機能することが明らかになってきた。動物細胞では、フラジェリンは自然免疫の中心的役割を担う細胞膜受容体である TLR5 のリガンドとして作用することが近年明らかとなっている。病原微生物をはじめとする様々な異物に対抗する生体防御システムは、脊椎動物において大きく 2 種類に分類される。一つは獲得免疫と呼ばれ、主に T 細胞や B 細胞などのリンパ球系細胞

により担われる。病原微生物の抗原を特異的に認識するリンパ球は、免疫記憶により、同一抗原の再感作によって特異的リンパ球が速やかに活性化され、強力な感染防御を成立させる。これに対して、無脊椎動物を含む多くの動物種は、自然免疫と呼ばれる生体防御機構を備えている。自然免疫は、液性因子である補体、マクロファージ、樹状細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞などによって構成され、感染初期における生体防御を司る。これらの自然免疫担当細胞は、PAMPs と総称される外来異物特異的に存在する分子パターンを、TLR 受容体が認識することによってリン酸化経路を介した NF- κ B による抗菌性ペプチド遺伝子や低分子物質合成に関与する酵素遺伝子の転写が促進され、感染防御が行われる。TLR を介した認識は、獲得免疫に比べて特異性が緩やかであるが、それにより広く PAMPs を認識して免疫反応を誘導することができる。また、自然免疫は、獲得免疫の活性化にも重要な役割を果たしている。TLR の発見以降、自然免疫の活性化のメカニズムが急速に明らかになってきた。しかしながら、個々の TLR の下流のシグナル伝達はそれぞれに異なり、また細胞の種類によっても特異的であるなど、その機構は非常に複雑である。植物におけるフラジェリン認識とその情報伝達機構に関する本研究で得られた知見は、このように複雑な動物の自然免疫システムの解明にも貢献することが期待される。

植物は病原菌特有の様々な分子をシグナル分子として認識し、免疫反応を誘導することにより病原菌の感染から身を守っている。近年、植物が病原菌を認識し、誘導する生体防御システムは脊椎動物の免疫システムの中でも自然免疫と共通性が高いことが明らかになり、植物においても生体防御システムを植物免疫と呼ぶようになった。この免疫反応には、動物の系と同様に MAPK カスケードや活性酸素の生成機構や、抗菌活性タンパク質や低分子抗菌活性物質の生成などが含まれており、両防御システム間では多くの共通性が認められる。フラジェリンのように動物と植物が細菌由来の同様の分子を認識して免疫反応を引き起こすということは、生物の基本的機能である生体防御システムの進化の面からも興味を持たれる点である。本研究によって得られた知見は、植物免疫システムの統合的理解に大きく寄与するだけでなく、昆虫や動物の自然免疫の発生とその進化、および生物の有する免疫システムの共通性と多様性に関する研究にも大きく貢献することが期待される。

謝 辞

本研究を遂行するに当たり、この上なく素晴らしい環境を与えて頂き、いつもの確かなご指導を賜りました奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科細胞間情報学講座教授（現 奈良先端科学技術大学院大学理事・副学長）磯貝彰教授に厚く御礼申し上げます。

そして、奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科細胞間情報学講座助手（現 長浜バイオ大学バイオサイエンス研究科教授）蔡晃植先生には博士課程修了までの6年間の間、丁寧なご指導を直接賜りました。心から謹んで感謝いたします。

また、同バイオサイエンス研究科細胞間情報学講座教授 高山誠司先生、同助手 岩野恵先生、同助手 円谷徹之先生、同助手 柴博史先生、下里裕子博士、高井亮太博士、田中則子博士にはいつも丁寧なご指導、ご助言を頂きましたことを心より感謝いたします。

同大学バイオサイエンス研究科植物分子遺伝学講座 島本功教授をはじめ、同大学分化形態形成学講座 横田明穂教授、同大学植物遺伝子機能学講座 橋本隆教授には本研究を進める上で、丁寧なご助言、ご指導を賜りました。心より感謝申し上げます。

同大学の大正製薬ゲノム機能解析講座助手（現 DNA チップ研究所）的場亮先生、Lim Chum Ren 博士には、cDNA マイクロアレイに関する数々の有益な方法、および機器の使用に際する丁寧なご指導、ご助言を頂きましたことに深く感謝申し上げます。

同大学バイオテクノロジー開発技術研究組合の山川清栄博士には、cDNA マイクロアレイに関する機器の使用に際して大変お世話になりました。謹んで感謝いたします。

岡山大学農学部遺伝子工学研究室の一瀬勇規教授には、*Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* 菌株をご供与して頂きました。謹んで感謝申し上げます。

イネマイクロアレイや遺伝子操作をはじめとする諸実験において、大変お世話になりました細胞間情報学講座実験補助員の佐藤寛子様、岡本英里子様に心より感謝申し上げます。

OsCPK の関連実験において、昼夜問わず実験に励み、ご協力頂きました長浜バイオ大学バイオサイエンス研究科 環境生命科学植物 環境分子生理学研究室 笹木亮志君に深く感謝申し上げます。

本研究を進めていく上で、奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科細胞間情報学講座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深く御礼申し上げます。

最後に、このような大学院での長い研究生活を快諾してもらい、いつも支え続け、見守り続けてくれた両親に深く感謝いたします。

参考文献

- Agrios GN. (1997) How pathogens attack plants. *In* Plant Pathology, 4th ed. Edited by Agrios GN. pp. 66-72. Academic Press, Sandiego.
- Akimoto-Tomiyama C, Sakata K, Yazaki J, Nakamura K, Fujii F, Shimbo K, Yamamoto K, Sasaki T, Kishimoto N, Kikuchi S, Shibuya N, Minami E. (2003) Rice gene expression in response to *N*-acetylchitoooligosaccharide elicitor: comprehensive analysis by DNA microarray with randomly selected ESTs. *Plant Mol. Biol.* 52: 537-551.
- Allen GJ, and Schroeder JI. (2001) Combining genetics and cell biology to crack the code of plant cell calcium signaling. *Sci. STKE* 102, RE13.
- Amicucci E, Gaschler K, and Ward JM. (1999) NADPH oxidase genes from tomato (*Lycopersicon esculentum*) and curly-leaf pondweed (*Potamogeton crispus*). *Plant Biol.* 1: 524-528.
- Andriotis VM, Rathjen JP. (2006) The Pto kinase of tomato, which regulates plant immunity, is repressed by its myristoylated *N* terminus. *J. Biol. Chem.* 281, 36: 26578-26586.
- Asai T, Tena G, Plotnikova J, Willmann MR, Chiu WL, Gomez-Gomez L, Boller T, Ausubel FM and Sheen J. (2002) MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature* 415: 977-983.
- Asano T, Tanaka N, Yang G, Hayashi N, Komatsu S. (2005) Genome-wide identification of the rice calcium-dependent protein kinase and its closely related kinase gene families: comprehensive analysis of the *CDPKs* gene family in rice. *Plant Cell Physiol.* 46, 2: 356-366.
- Baba A, Hasezawa S and Syono K. (1986) Cultivation of rice protoplasts and their transformation mediated by *Agrobacterium* spheroplasts. *Plant Cell Physiol.* 27: 463-471.
- Binet MN, Humbert C, Lecourieux D, Vantard M, and Pugin A. (2001) Disruption of microtubular cytoskeleton induced by cryptogein, an elicitor of hypersensitive response in tobacco cells. *Plant Physiol.* 125: 564-572.
- Blatt MR, Grabov A, Brearley J, Hammond-Kosack K, Jones JD. (1999) K⁺ channels of Cf-9 transgenic tobacco guard cells as targets for *Cladosporium fulvum* Avr9 elicitor-dependent signal transduction. *Plant J.* 19, 4: 453-462.
- Blumwald E, Aharon GS, Lam BCH. (1998) Early signal transduction pathways in

- plant-pathogen interactions. Trends in Plant Science 3: 342-346.
- Boller T. (1995) Chemoperception of microbial signals in plant cells. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 46: 189-214.
- Bradford MM. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-254.
- Bradley DJ, Kjellbom P, and Lamb CJ. (1992) Elicitor- and wound-induced oxidative cross-linking of a proline-rich plant cell wall protein: A novel, rapid defense response. Cell 70: 21-30.
- Breviario D, Morello L and Giani S. (1995) Molecular cloning of two novel rice cDNA sequences encoding putative calcium-dependent protein kinases. Plant Mol. Biol. 27: 953-967.
- Bush DS. (1995) Calcium regulation in plant cells and its role in signaling. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 46: 95-122
- Cessna SG and Low PS. (2001) Activation of the oxidative burst in aequorin-transformed *Nicotiana tabacum* cells is mediated by protein kinase and anion channel-dependent release of Ca^{2+} from internal stores. Planta 214: 126-134.
- Chandra S, Stennis M and Low PS. (1997) Measurement of Ca^{2+} fluxes during elicitation of the oxidative burst in aequorin-transformed tobacco cells. J. Biol. Chem. 272: 28274-28280.
- Che FS, Iwano M, Tanaka N, Takayama S, Minami E, Shibuya N, Kadota I and Isogai A. (1999) Biochemical and morphological features of rice cell death induced by *Pseudomonas avenae*. Plant Cell Physiol. 40: 1036-1045.
- Che FS, Nakajima Y, Tanaka N, Iwano M, Yoshida T, Takayama S, Kadota I and Isogai A. (2000) Flagellin from an incompatible strain of *Pseudomonas avenae* induces a resistance response in cultured rice cells. J. Biol. Chem. 275: 32347-32356.
- Chehab EW, Patharkar OR, Hegeman AD, Taybi T, Cushman JC. (2004) Autophosphorylation and subcellular localization dynamics of a salt- and water deficit-induced calcium-dependent protein kinase from ice plant. Plant Physiol. 135, 3: 1430-1446.
- Cheng SH, Willmann MR, Chen HC, Sheen J. (2002) Calcium signalling through protein

- kinases. The *Arabidopsis* calcium-dependent protein kinase gene family. *Plant Physiology* 129: 469-485.
- Christensen AH, Sharrock RA, Quail PH. (1992) Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation. *Plant Mol. Biol.* 18, 4: 675-689.
- Collinge M and Boller T. (2001) Differential induction of two potato genes, *Stprx2* and *StNAC*, in response to infection by *Phytophthora infestans* and to wounding. *Plant Mol. Biol.* 46: 521-529.
- Dammann C, Ichida A, Hong B, Romanowsky SM, Hrabak EM, Harmon AC, Pickard BG, Harper JF. (2003) Subcellular targeting of nine calcium-dependent protein kinase isoforms from *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 132, 4: 1840-1848.
- Dangl JL, Dietrich RA and Richberg MH. (1996) Death don't have no mercy: cell death programs in plant-microbe interactions. *Plant Cell* 8: 1793-1807.
- Dangl JL and Jones JD. (2001) Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411, 6839: 826-833.
- de Vries JS, Andriotis VM, Wu AJ, Rathjen JP. (2006) Tomato Pto encodes a functional *N*-myristoylation motif that is required for signal transduction in *Nicotiana benthamiana*. *Plant J.* 45, 1: 31-45.
- Desikan R, Hancock JT, Coffey MJ, Neill SJ. (1996) Generation of active oxygen in elicited cells of *Arabidopsis thaliana* is mediated by a NADPH oxidase-like enzyme. *FEBS Lett.* 382, 1: 213-217.
- Doke N, Miura Y. (1995) *In vitro* activation of NADPH-dependent superoxide generating system in a plasma membrane- rich fraction of potato tuber tissues by treatment with an elicitor from *Phytophthora infestans* or with digitonin. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 46: 17-28.
- 道家紀志 (1997)、オキシダティブバーストと抵抗性発現、細胞工学別冊 植物細胞工学シリーズ 8、分子レベルから見た植物の耐病性 -植物と病原菌の相互作用に迫る-、秀潤社、東京: 115-123.
- 道家紀志 (2005)、植物におけるオキシダティブバーストとシグナル伝達、化学と生物 43, 8: 501-508
- Doke N. (1983) Generation of superoxide anion by potato tuber protoplasts upon the

- hypersensitive response to hyphal wall components of *Phytophthora infestans* and specific inhibition of the reaction by suppressor of hypersensitivity. *Physiol. Plant Pathol.* 23: 359-367.
- Doke N. (1983) Involvement of superoxide anion generation in hypersensitive response of potato tuber tissues to infection with an incompatible race of *Phytophthora infestans*. *Physiol. Plant Pathol.* 23: 345-347.
- Doke N, Miura Y, Sanchez LM, Park HJ, Noritake T, Yoshioka H, Kawakita K. (1996) The oxidative burst protects plants against pathogen attack: mechanism and role as an emergency signal for plant bio-defence--a review. *Gene* 179: 45-51.
- Dolmetsch RE, Xu K, and Lewis RS. (1998) Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression. *Nature* 392: 933-936.
- Ebel J, Bhagwat AA, Cosio EG, Freger M, Kissel U, Mithöfer A, Waldmüller T. (1995) Elicitor-binding proteins and signal transduction in the activation of a phytoalexin defense response. *Can. J. Bot. Suppl.* 73: S506-S510.
- Ebel J, Cosio EG. (1994) Elicitors of plant defense responses. *Int. Rev. Cytol.* 148: 1-36.
- Ellard-Ivey M, Hopkins RB, White TJ, Lomax TL. (1999) Cloning, expression and *N*-terminal myristoylation of CpCPK1, a calcium-dependent protein kinase from zucchini (*Cucurbita pepo* L.). *Plant Molecular Biology* 39: 199-208.
- Eulgem T, Rushton PJ, Robatzek S, Somssich IE. (2000) The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends Plant Sci.* 5, 5: 199-206.
- Felix G, Duran JD, Volko S and Boller T. (1999) Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *Plant J.* 18: 265-276.
- Foreman J, Demidchik V, Bothwell JH, Mylona P, Miedema H, Torres MA, Linstead P, Costa S, Brownlee C, Jones JD, Davies JM, Dolan L. (2003) Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature* 422, 6930: 442-446.
- 藤原沙都姫 (2003) イネ cDNA マイクロアレイを用いた病害抵抗性反応誘導機構の解析、修士論文 (奈良先端科学技術大学院大学)
- Fujiwara S, Tanaka N, Kaneda T, Takayama S, Isogai A, Che FS. (2004) Rice cDNA microarray-based gene expression profiling of the response to flagellin perception in cultured rice cells. *Mol. Plant Microbe Interact.* 17, 9: 986-998.
- Fukumoto F, Sato M, Minobe Y. (1997) Transformation of pBR322-Derived Plasmids in

- Phytopathogenic *Pseudomonas avenae* and Enhanced Transformation in Its Proline-Auxotrophic Mutant. *Curr. Microbiol.* Mar 34, 3: 138-143.
- Fukunaga R, Hunter T. (1997) MNK1, a new MAP kinase-activated protein kinase, isolated by a novel expression screening method for identifying protein kinase substrates. *EMBO J.* Apr 15 16, 8: 1921-1933.
- Goff SA, Ricke D, Lan TH, Presting G, Wang R, Dunn M, Glazebrook J, Sessions A, Oeller P, Varma H, Hadley D, Hutchison D, Martin C, Katagiri F, Lange BM, Moughamer T, Xia Y, Budworth P, Zhong J, Miguel T, Paszkowski U, Zhang S, Colbert M, Sun WL, Chen L, Cooper B, Park S, Wood TC, Mao L, Quail P, Wing R, Dean R, Yu Y, Zharkikh A, Shen R, Sahasrabudhe S, Thomas A, Cannings R, Gutin A, Pruss D, Reid J, Tavtigian S, Mitchell J, Eldredge G, Scholl T, Miller RM, Bhatnagar S, Adey N, Rubano T, Tusneem N, Robinson R, Feldhaus J, Macalma T, Oliphant A, Briggs S. (2002) A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*). *Science* 296, 5565: 92-100.
- Gómez-Gómez L, Bauer Z, Boller T. (2001) Both the extracellular leucine-rich repeat domain and the kinase activity of FLS2 are required for flagellin binding and signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 13, 5: 1155-1163.
- Gómez-Gómez L, Boller T. (2002) Flagellin perception: a paradigm for innate immunity. *Trends Plant Sci.* 7, 6: 251-256.
- Gomez-Gomez L and Boller T. (2000) FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*. *Mol. Cell* 5: 1003-1011.
- Gomez-Gomez L, Felix G and Boller T. (1999) A single locus determines sensitivity to bacterial flagellin in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 18: 277-284.
- 後藤一法 (2002) イネの抵抗性反応誘導における活性酸素種の関与とその発生機構、修士論文 (奈良先端科学技術大学院大学)
- Gray WM, Kepinski S, Rouse D, Leyser O, Estelle M. (2001) Auxin regulates SCF(TIR1)-dependent degradation of AUX/IAA proteins. *Nature* 414, 6861: 271-276.
- Groom QJ, Torres MA, Fordham-Skelton AP, Hammond-Kosack KE, Robinson NJ, Jones JD. (1996) *rbhA*, a rice homologue of the mammalian gp91^{phox} respiratory burst oxidase gene. *Plant J.* 10, 3: 515-322.
- Harmon AC, Gribskov M, Gubrium E, Harper JF. (2001) The CDPK superfamily of protein kinases. *New Phytologist* 151: 175-183.

- Harmon AC, Grisbov M, Harper JF. (2000) CDPKs - a kinase for every Ca^{2+} signal. Trends in Plant Science 5: 154-159.
- Harmon AC, Yoo BC, McCaffery C. (1994) Pseudosubstrate inhibition of CDPK, a protein kinase with a calmodulin-like domain. Biochemistry 33: 7278-7287.
- Harper JF, Breton G, Harmon A. (2004) Decoding Ca^{2+} signals through plant protein kinases. Annual Review of Plant Biology 55: 263-288.
- Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, Eng JK, Akira S, Underhill DM, Aderem A. (2001) The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. Nature 410, 6832: 1099-1103.
- He DY, Yazaki Y, Nishizawa Y, Takai R, Yamada K, Sakano K, Shibuya N and Minami E. (1998) Gene activation by cytoplasmic acidification in suspension-cultured rice cells in response to the potent elicitor, *N*-acetylchitoheptaose. Mol. Plant-Microbe Interact. 11: 1167-1174.
- He SY. (1997) Hrp-controlled interkingdom protein transport: learning from flagellar assembly? Trends Microbiol. 5: 489-495.
- He SY, Huang HC and Collmer A. (1993) *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* harpin_{ps}: a protein that is secreted via the hrp pathway and elicits the hypersensitive response in plants. Cell 73: 1255-1266.
- Heath MC. (1997) Evolution of plant resistance and susceptibility to fungal parasites. In: Carrol GC, Tudzynski P (eds), The Mycota, Vol. V Part B, pp.257-276. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Heese A, Ludwig AA, Jones JD. (2005) Rapid phosphorylation of a syntaxin during the Avr9/Cf-9-race-specific signaling pathway. Plant Physiol. 138, 4: 2406-2416.
- Hetherington AM, Brownlee C. (2004) The generation of Ca^{2+} signals in plants. Annu. Rev. Plant Biol. 55: 401-427.
- Hrabak EM, Chan CW, Gribskov M, Harper JF, Choi JH, Halford N, Kudla J, Luan S, Nimmo HG, Sussman MR, Thomas M, Walker-Simmons K, Zhu JK, Harmon AC. (2003) The *Arabidopsis* CDPK-SnRK superfamily of protein kinases. Plant Physiol. 132, 2: 666-680.
- Hrabak EM. (2000) Calcium-dependent protein kinases and their relatives. Adv. Bot. Res. 32: 185-223.

- Huang HC, Lin RH, Chang CJ, Collmer A and Deng WL. (1995) The complete *hrp* gene cluster of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 61 includes two blocks of genes required for harpin_{PSS} secretion that are arranged colinearly with *Yersinia* ysc homologs. Mol. Plant-Microbe Interact. 8: 733-746.
- Imaizumi T, Tran HG, Swartz TE, Briggs WR, Kay SA. (2003) FKF1 is essential for photoperiodic-specific light signalling in *Arabidopsis*. Nature 426, 6964: 302-6.
- 稲垣昌樹ら(2006)、実験医学別冊タンパク質の翻訳後修飾解析プロトコール: 12-15, 186-205
- International Rice Genome Sequencing Project. (2005) The map-based sequence of the rice genome. Nature 436, 7052: 793-800.
- Ishitani M, Liu J, Halfter U, Kim CS, Shi W, Zhu JK. (2000) SOS3 function in plant salt tolerance requires *N*-myristoylation and calcium binding. Plant Cell 12, 9: 1667-1678.
- Iwano M, Shiba H, Miwa T, Che FS, Takayama S, Nagai T, Miyawaki A, Isogai A. (2004) Ca²⁺ dynamics in a pollen grain and papilla cell during pollination of *Arabidopsis*. Plant Physiol. 136, 3: 3562-3571.
- Iwano M, Che FS, Goto K, Tanaka N, Takayama S and Isogai A. (2002) Electron microscopic analysis of the H₂O₂ accumulation preceding hypersensitive cell death induced by an incompatible strain of *Pseudomonas avenae* in cultured rice cells. Mol. Plant Pathol. 3: 1-8.
- Jabs T, Tschope M, Colling C, Hahlbrock K, and Scheel D. (1997) Elicitor-stimulated ion fluxes and O²⁻ from the oxidative burst are essential components in triggering defense gene activation and phytoalexin synthesis in parsley. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94: 4800-4805.
- Joo JH, Bae YS, Lee JS. (2001) Role of auxin-induced reactive oxygen species in root gravitropism. Plant Physiol. 126, 3: 1055-1060.
- Kadota I, and Ohuchi A. (1990) Symptoms and ecology of bacterial brown stripe of rice. Japan. Agricultural Research Quarterly, 24: 15-21.
- Kadota I, Ohuchi A and Nishiyama K. (1991) Serological properties and specificity of *Pseudomonas avenae* Manns 1909 pathogenic to rice. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 57: 268-273.
- Kadota Y, Fujii S, Ogasawara Y, Maeda Y, Higashi K, Kuchitsu K. (2006) Continuous

- recognition of the elicitor signal for several hours is prerequisite for induction of cell death and prolonged activation of signaling events in tobacco BY-2 cells. *Plant Cell Physiol.* 47, 9: 1337-1342.
- Kadota Y, Furuichi T, Ogasawara Y, Goh T, Higashi K, Muto S, Kuchitsu K. (2004) Identification of putative voltage-dependent Ca^{2+} -permeable channels involved in cryptogein-induced Ca^{2+} transients and defense responses in tobacco BY-2 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 317, 3: 823-830.
- Kadota Y, Furuichi T, Sano T, Kaya H, Gunji W, Murakami Y, Muto S, Hasezawa S, Kuchitsu K. (2005) Cell-cycle-dependent regulation of oxidative stress responses and Ca^{2+} permeable channels NtTPC1A/B in tobacco BY-2 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 336, 4: 1259-1267.
- Kadota Y, Goh T, Tomatsu H, Tamauchi R, Higashi K, Muto S, Kuchitsu K. (2004) Cryptogein-induced initial events in tobacco BY-2 cells: pharmacological characterization of molecular relationship among cytosolic Ca^{2+} transients, anion efflux and production of reactive oxygen species. *Plant Cell Physiol.* 45, 2: 160-170.
- Kaplan B, Davydov O, Knight H, Galon Y, Knight MR, Fluhr R, Fromm H. (2006) Rapid transcriptome changes induced by cytosolic Ca^{2+} transients reveal ABRE-related sequences as Ca^{2+} -responsive cis elements in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18, 10: 2733-2748.
- Kawano T and Muto S. (2000) Mechanism of peroxidase actions for salicylic acid-induced generation of active oxygen species and an increase in cytosolic calcium in tobacco cell suspension culture. *J. Exp. Bot.* 51: 685-693.
- Kawasaki T, Henmi K, Ono E, Hatakeyama S, Iwano M, Satoh H, Shimamoto K. (1999) The small GTP-binding protein rac is a regulator of cell death in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 19: 10922-10926.
- Keller H, Pamboukdjian N, Ponchet M, Poupet A, Delon R, Verrier JL, Roby D and Ricci P. (1999) Pathogen-induced elicitor production in transgenic tobacco generates a hypersensitive response and nonspecific disease resistance. *Plant Cell* 11: 223-235.
- Kikuchi K, Ueguchi Tanaka M, Yoshida KT, Nagato Y, Matsusoka M and Hirano HY. (2000) Molecular analysis of the *NAC* gene family in rice. *Mol. Gen. Genet.* 262: 1047-1051.
- Knight H. (2000) Calcium signaling during abiotic stress in plants. *Omt. Rev. Cytol.* 195: 269-324.
- Kuchitsu K, Kosaka H, Shiga T, Shibuya N. (1995) EPR evidence for generation of hydroxyl

- radical triggered by *N*-acetylchitoooligosaccharide elicitor and a protein phosphatase inhibitor in suspension-cultured rice cells. *Protoplasma* 188: 138-142.
- Kunkel BN and Brooks DM. (2002) Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. *Current Opin. Plant Biology* 5: 325-332.
- Kurusu T, Sakurai Y, Miyao A, Hirochika H, Kuchitsu K. (2004) Identification of a putative voltage-gated Ca^{2+} -permeable channel (*OsTPC1*) involved in Ca^{2+} influx and regulation of growth and development in rice. *Plant Cell Physiol* . 45, 6: 693-702.
- Kurusu T, Yagala T, Miyao A, Hirochika H, Kuchitsu K. (2005) Identification of a putative voltage-gated Ca^{2+} channel as a key regulator of elicitor-induced hypersensitive cell death and mitogen-activated protein kinase activation in rice. *Plant J.* 42, 6: 798-809.
- Kwak JM, Mori IC, Pei ZM, Leonhardt N, Torres MA, Dangl JL, Bloom RE, Bodde S, Jones JD, Schroeder JI. (2003) NADPH oxidase *AtrbohD* and *AtrbohF* genes function in ROS-dependent ABA signaling in *Arabidopsis*. *EMBO J.* 22, 11: 2623-2633.
- Lamb CJ, Ryals JA, Ward ER, Dixon RA. (1992) Emerging strategies for enhancing crop resistance to microbial pathogens. *Biotechnology (NY)* 10, 11: 1436-1445.
- Lecourieux D, Mazars C, Pauly N, Ranjeva R, Pugin A. (2002) Analysis and effects of cytosolic free calcium increases in response to elicitors in *Nicotiana plumbaginifolia* cells. *Plant Cell* 14, 10: 2627-2641.
- Lee AG, and East JM. (2001) What the structure of a calcium pump tells us about its mechanism. *Biochem. J.* 356: 665-683.
- Léon J, Lawton MA, and Raskin I. (1995). Hydrogen peroxide stimulates salicylic acid biosynthesis in tobacco. *Plant Physiol.* 108: 1673-1678.
- Levine A, Pennell RI, Alvarez ME, Palmer R, Lamb C. (1996) Calcium-mediated apoptosis in a plant hypersensitive disease resistance response. *Curr. Biol.* 6, 4: 427-437.
- Levine A, Tenhaken R, Dixon R, Lamb C. (1994) H_2O_2 from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* 79, 4: 583-593.
- Luan S, Kudla J, Rodriguez-Concepcion M, Yalovsky S, Gruissem W. (2002) Calmodulins and calcineurin B-like proteins: calcium sensors for specific signal response coupling in plants. *Plant Cell* 14: S389-S400.
- Ludwig AA, Romeis T, Jones JD. (2004) CDPK-mediated signalling pathways: specificity and cross-talk. *J. Exp. Bot.* 55, 395: 181-188.

- Maleck K, Levine A, Eulgem T, Morgan A, Schmid J, Lawton KA, Dangl JL, Dietrich RA. (2000) The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance. Nat. Genet. 26, 4: 403-410.
- Manns TF. (1909) The blade blight of oats - a bacterial disease. Bulletin of the Ohio Agriculture Experiment Station 210: 91-167.
- Mansfield JW, Bennett MH, Bestwick CS and Woods-Tor AM. (1997) Phenotypic expression of gene-for-gene interaction involving fungal and bacterial pathogens variation from recognition to response. In: I.R. Crute, J.J. Burden and E.B. Holub, Editors, The Gene-for-Gene Relationship in Host-Parasite Interactions, CAB International, London, UK: 265-291.
- Martin M, Busconi L. (2000) Membrane localization of a rice calcium-dependent protein kinase (CDPK) is mediated by myristoylation and palmitoylation. The Plant Journal 24: 429-435.
- Matsubara M, Jing T, Kawamura K, Shimojo N, Titani K, Hashimoto K, Hayashi N. (2005) Myristoyl moiety of HIV Nef is involved in regulation of the interaction with calmodulin *in vivo*. Protein Sci. 14, 2: 494-503.
- McAinsh MR, and Hetherington AM. (1998) Encoding specificity in Ca^{2+} signalling systems. Trends in Plant Science 3: 32-36.
- Minami E, Kuchitsu K, He DY, Kouchi H, Midoh N, Ohtsuki Y, Shibuya N. (1996) Two novel genes rapidly and transiently activated in suspension-cultured rice cells by treatment with *N*-acetylchitoheptaose, a biotic elicitor for phytoalexin production. Plant Cell Physiol. 37, 4: 563-567.
- Mithöfer A, Fliegmann J, Daxberger A, Ebel C, Neuhaus-Url G, Bhagwat AA, Keister DL and Ebel J. (2001) Induction of H_2O_2 synthesis by beta-glucan elicitors in soybean is independent of cytosolic calcium transients. FEBS Lett. 508: 191-195.
- Miura Y, Yoshioka H and Doke N. (1995) An autophotographic determination of the active oxygen generation in potato tuber discs during hypersensitive response to fungal infection or elicitor. Plant Sci. 105: 45-52.
- Miyawaki A, Griesbeck O, Heim R, Tsien RY. (1999) Dynamic and quantitative Ca^{2+} measurements using improved cameleons. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96, 5: 2135-2140.
- Mould MJR, Heath MC. (1999) Ultrastructural evidence of differential changes in transcription, translation, and cortical microtubules during in planta penetration of cells

- resistant or susceptible to rust infection. *Physiol. mol. plant pathol.* 55, 4: 225-236
- Murphy TM, Auh CK. (1996) The Superoxide Synthases of Plasma Membrane Preparations from Cultured Rose Cells. *Plant Physiol.* 110, 2: 621-629.
- Nagai T, Yamada S, Tominaga T, Ichikawa M, Miyawaki A. (2004) Expanded dynamic range of fluorescent indicators for Ca^{2+} by circularly permuted yellow fluorescent proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* Jul 20 101, 29: 10554-10559.
- Nagai T, Ibata K, Park ES, Kubota M, Mikoshiba K, and Miyawaki A. (2002) A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nat. Biotechnol.* 20: 87-90.
- Narusaka Y, Narusaka M, Seki M, Ishida J, Nakashima M, Kamiya A, Enju A, Sakurai T, Satoh M, Kobayashi M, Tosa Y, Park P, Shinozaki K. (2003) The cDNA microarray analysis using an *Arabidopsis pad3* mutant reveals the expression profiles and classification of genes induced by *Alternaria brassicicola* attack. *Plant Cell Physiol.* 44, 4: 377-387.
- Navarro L, Zipfel C, Rowland O, Keller I, Robatzek S, Boller T, Jones JD. (2004) The transcriptional innate immune response to flg22. Interplay and overlap with *Avr* gene-dependent defense responses and bacterial pathogenesis. *Plant Physiol.* 135, 2: 1113-1128.
- Ng CK, McAinsh MR. (2003) Encoding specificity in plant calcium signalling: hot-spotting the ups and downs and waves. *Ann. Bot. (Lond)* 92: 477-485.
- Nishiyama K, Nishihara N and Ezuka A. (1979) Bacterial brown stripe of ragi caused by *Pseudomonas alboprecipitans*. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 45: 25-31.
- Nishizawa Y, Kawakami A, Hibi T, He D-Y, Shibuya N, Minami E. (1999) Regulation of the chitinase gene expression in suspension-cultured rice cells by *N*-acetylchitooligosaccharides: differences in the signal transduction pathways leading to the activation of elicitor-responsive genes. *Plant Molecular Biology*, 39, 5: 907-914.
- Noritake T, Kawakita K and Doke N. (1996) Nitric oxide induces phytoalexin accumulation in potato tuber tissue. *Plant Cell Physiology* 37: 113-116.
- Nürnberg T and Scheel D. (2001) Signal transmission in the plant immune response. *Trends Plant Sci.* 6: 372-379.
- Orozco-Cárdenas ML, Narváez-Vásquez J, Ryan CA. (2001) Hydrogen peroxide acts as a

- second messenger for the induction of defense genes in tomato plants in response to wounding, systemin, and methyl jasmonate. *Plant Cell* 13, 1: 179-191.
- Park JI, Grant CM, Davies MJ, Dawes IW. (1998) The cytoplasmic Cu,Zn superoxide dismutase of *Saccharomyces cerevisiae* is required for resistance to freeze-thaw stress. Generation of free radicals during freezing and thawing. *J. Biol. Chem.* 273, 36: 22921-22928.
- Pei ZM, Murata Y, Benning G, Thomine S, Klüsener B, Allen GJ, Grill E, Schroeder JI. (2000) Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. *Nature* 406, 6797: 731-734.
- Peng M., and Kuc J. (1992) Peroxidase-generated hydrogen peroxide as a source of antifungal activity *in vitro* and on tobacco leaf discs. *Phytopathology* 82: 696-699.
- Piedras P, Hammond-Kosack KE, Harrison K, Jones JDG (1998) Rapid, *Cf-9*- and *Avr9*-dependent production of active oxygen species in tobacco suspension cultures. *Mol. Plant Microbe Interact.* 11: 1155-1166.
- Price AH, Taylor A, Ripley SJ, Griffith A, Trewavas AJ and Knight MR. (1994) Oxidative signals in tobacco increase cytosolic calcium. *Plant Cell* 6: 1301-1310.
- Raíces M, Gargantini PR, Chinchilla D, Crespi M, Téllez-Iñón MT, Ulloa RM. (2003) Regulation of CDPK isoforms during tuber development. *Plant Mol. Biol.* 52, 5: 1011-1024.
- Reddy ASN. (2001) Calcium: silver bullet in signaling. *Plant Sci.* 160: 381-404.
- Reddy VS, Reddy AS. (2004) Proteomics of calcium-signalling components in plants. *Phytochemistry* 65: 1745-1776.
- Rentel MC, Lecourieux D, Ouaked F, Usher SL, Petersen L, Okamoto H, Knight H, Peck SC, Grierson CS, Hirt H, Knight MR. (2004) OXI1 kinase is necessary for oxidative burst-mediated signalling in *Arabidopsis*. *Nature* 427, 6977: 858-861.
- Romeis T, Ludwig AA, Martin R, Jones JD. (2001) Calcium-dependent protein kinases play an essential role in a plant defence response. *EMBO J.* 20, 20: 5556-5567.
- Romeis T, Piedras P, Jones JD. (2000) Resistance gene-dependent activation of a calcium-dependent protein kinase in the plant defense response. *Plant Cell* 12, 5: 803-816.
- Romeis T, Piedras P, Zhang S, Klessig DF, Hirt H, Jones JD. (1999) Rapid *Avr9*- and *Cf-9*-dependent activation of MAP kinases in tobacco cell cultures and leaves: convergence of

- resistance gene, elicitor, wound, and salicylate responses. *Plant Cell* 11, 2: 273-287.
- Romeis T. (2001) Protein kinases in the plant defence response. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4, 5: 407-414.
- Rudd JJ and Franklin-Tong VE. (2001) Unravelling response-specificity in Ca^{2+} pathways in plant cells. *New Phytol.* 151: 7-33.
- Rutschmann F, Stalder U, Piotrowski M, Oecking C, Schaller A. (2002) LeCPK1, a calcium-dependent protein kinase from tomato. Plasma membrane targeting and biochemical characterization. *Plant Physiology* 129: 156-168.
- Saijo Y, Hata S, Kyojuka J, Shimamoto K, Izui K. (2000) Over-expression of a single Ca^{2+} -dependent protein kinase confers both cold and salt/drought tolerance on rice plants. *Plant J.* 23, 3: 319-327.
- Saijo Y, Kinoshita N, Ishiyama K, Hata S, Kyojuka J, Hayakawa T, Nakamura T, Shimamoto K, Yamaya T, Izui K. (2001) A Ca^{2+} -dependent protein kinase that endows rice plants with cold- and salt-stress tolerance functions in vascular bundles. *Plant Cell Physiol.* 42, 11: 1228-1233.
- Sanders D, Brownlee C, and Harper JF. (1999) Communicating with calcium. *Plant Cell* 11: 691-706.
- Sanders D, Pelloux J, Brownlee C, Harper JF. (2002) Calcium at the crossroads of signaling. *Plant Cell* 14 Suppl: S401-S417.
- Sano T, Higaki T, Handa K, Kadota Y, Kuchitsu K, Hasezawa S, Hoffmann A, Endter J, Zimmermann U, Hedrich R, Roitsch T. (2006) Calcium ions are involved in the delay of plant cell cycle progression by abiotic stresses. *FEBS Lett.* 580, 2: 597-602.
- Sasaki A, Itoh H, Gomi K, Ueguchi-Tanaka M, Ishiyama K, Kobayashi M, Jeong DH, An G, Kitano H, Ashikari M, Matsuoka M. (2003) Accumulation of phosphorylated repressor for gibberellin signaling in an F-box mutant. *Science* 299, 5614: 1896-1898.
- Scofield SR, Tobias CM, Rathjen JP, Chang JH, Lavelle DT, Michelmore RW, Staskawicz BJ. (1996) Molecular Basis of Gene-for-Gene Specificity in Bacterial Speck Disease of Tomato. *Science* 274, 5295: 2063-2065.
- Sheen J. (1996) Ca^{2+} -dependent protein kinases and stress signal transduction in plants. *Science* 274: 1900-1902.
- Stirnberg P, van De Sande K, Leyser HM. (2002) MAX1 and MAX2 control shoot lateral

- branching in *Arabidopsis*. Development 129, 5: 1131-1141.
- Takabatake R, Karita E, Seo S, Mitsuhashi I, Kuchitsu K, Ohashi Y. (2007) Pathogen-induced calmodulin isoforms in basal resistance against bacterial and fungal pathogens in tobacco. Plant Cell Physiol.
- Takahashi K., Isobe M. and Muto S. (1998) Mastoparan induces an increase in cytosolic calcium ion concentration and subsequent activation of protein kinases in tobacco suspension culture cells. Biochim. Biophys. Acta 1401: 339-346.
- Takai R, Kaneda T, Isogai A, Takayama S and Che FS. (2007) A new method of defense response analysis using a transient expression system in rice protoplasts. Biosci. Biotechnol. Biochem. in press.
- Takayama S, Isogai A. (2005) Self-incompatibility in plants. Annu. Rev. Plant Biol. 56, 0: 467-489.
- Takeuchi K, Taguchi F, Inagaki Y, Toyoda K, Shiraishi T, Ichinose Y. (2003) Flagellin glycosylation island in *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* and its role in host specificity. J. Bacteriol. 185, 22: 6658-6665.
- Takezawa D. (2000) A rapid induction by elicitors of the mRNA encoding *CCD-1*, a 14kDa Ca^{2+} -binding protein in wheat cultured cells. Plant Mol. Biol. 42, 6: 807-817.
- Tanaka N, Che FS, Watanabe N, Fujiwara S, Takayama S and Isogai A. (2003) Flagellin from incompatible strain of *Acidovorax avenae* mediates H_2O_2 generation, hypersensitive cell death and *PAL*, *Chl-1*, and *PBZ1* expression, but not *LOX* expression in rice. Mol. Plant-Microbe Interact. 16: 422-428.
- Tang X, Frederick RD, Zhou J, Halterman DA, Jia Y, Martin GB. (1996) Initiation of Plant Disease Resistance by Physical Interaction of AvrPto and Pto Kinase. Science 274, 5295: 2060-2063.
- Tavernier E, Wendehenne D, Blein JP, Pugin A. (1995). Involvement of Free Calcium in Action of Cryptogein, a Proteinaceous Elicitor of Hypersensitive Reaction in Tobacco Cells. Plant Physiol. 109: 1025-1031.
- Thomas Robert Malthus (1798) 『An Essay on the Principle of Population, as it Affects the Future Improvement of Society with Remarks on the Speculations of Mr. Godwin, M. Condorcet, and Other Writers.』
- Torii KU. (2000) Receptor kinase activation and signal transduction in plants: an emerging

- picture. Curr. Opin. Plant Biol. 3, 5: 361-367.
- Torres MA, Dangl JL, Jones JD. (2002) *Arabidopsis* gp91^{phox} homologues *AtrbohD* and *AtrbohF* are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99, 1: 517-522.
- Torres MA, Onouchi H, Hamada S, Machida C, Hammond-Kosack KE, Jones JD. (1998) Six *Arabidopsis thaliana* homologues of the human respiratory burst oxidase (gp91^{phox}). Plant J. 14, 3: 365-370.
- Trewavas AJ, and Malhó R. (1998) Ca²⁺ signalling in plant cells: the big network! Curr. Opin. Plant Biol. 1: 428-433.
- 柘浩一郎 (1997) 植物病原細菌 *Pseudomonas avenae* の病徴発現・宿主認識機構に関する研究、修士論文 (奈良先端科学技術大学院大学)
- Turner JG, Novacky A (1974) The quantitative relation between plant and bacterial cells involved in the hypersensitive reaction. Phytopathology 64: 885-890.
- Tzfira T, Vaidya M, Citovsky V. (2004) Involvement of targeted proteolysis in plant genetic transformation by *Agrobacterium*. Nature 431, 7004: 87-92.
- 内海俊彦 (2004)、実験医学、22 (9) : 1252-1259
- Umemoto N, Kakitani M, Iwamatsu A, Yoshikawa M, Yamaoka N and Ishida I. (1997) The structure and function of a soybean β -glucan-elicitor-binding protein. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94: 1029-1034.
- van der Hoorn RA, Wulff BB, Rivas S, Durrant MC, van der Ploeg A, de Wit PJ, Jones JD. (2005) Structure-function analysis of cf-9, a receptor-like protein with extracytoplasmic leucine-rich repeats. Plant Cell 17, 3: 1000-1015.
- Van Loon LC, Pierpoint WS, Boller T, Conejero V. (1994) Recommendation for naming plant pathogenesis-related proteins. Plant Mol. Biol. Rep. 12: 245-264.
- White PJ, and Broadley MR. (2003) Calcium in plants. Ann. Bot. (Lond) 92: 487-511.
- Xie DX, Feys BF, James S, Nieto-Rostro M, Turner JG. (1998) *COI1*: an *Arabidopsis* gene required for jasmonate-regulated defense and fertility. Science 280, 5366: 1091-1094.
- Xing T, Higgins VJ, Blumwald E. (1997) Race-specific elicitors of *Cladosporium fulvum* promote translocation of cytosolic components of NADPH oxidase to the plasma membrane of tomato cells. The Plant Cell 9: 249-259.

- Xing T, Wang XJ, Malik K, Miki BL. (2001) Ectopic expression of an *Arabidopsis* calmodulin-like domain protein kinase-enhanced NADPH oxidase activity and oxidative burst in tomato protoplasts. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14: 1261-1264.
- Xu H, Heath MC. (1998) Role of calcium in signal transduction during the hypersensitive response caused by basidiospore-derived infection of the cowpea rust fungus. *Plant Cell* 10, 4: 585-598.
- Xu L, Liu F, Lechner E, Genschik P, Crosby WL, Ma H, Peng W, Huang D, Xie D. (2002) The SCF(COI1) ubiquitin-ligase complexes are required for jasmonate response in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 14, 8: 1919-1935.
- 山田哲治、島本功、渡辺雄一郎 (1997) 細胞工学別冊 植物細胞工学シリーズ8、分子レベルから見た植物の耐病性—植物と病原菌の相互作用に迫る—、秀潤社、東京
- 山田康之、佐野浩 (1999) 遺伝子組換え植物の光と影. 学会出版センター、東京
- Yamada A, Shibuya N, Kodama O, and Akatsuka T. (1993) Induction of phytoalexin formation in suspension-cultured rice cells by *N*-acetylchitooligosaccharides. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 57: 405-409.
- Yang G, Shen S, Yang S & Komatsu S. (2003) *OsCDPK13*, a calcium-dependent protein kinase gene from rice, is induced in response to cold and gibberellin. *Plant Physiology and Biochemistry* 41: 369-374.
- Yang Y, Shah J and Klessig DF. (1997) Signal perception and transduction in plant defense responses. *Genes Dev.* 11: 1621-1639.
- 吉田朋美 (2000) 植物病原細菌 *Pseudomonas avenae* のフラジェリンによるイネの抵抗性反応誘導に関する研究、奈良先端科学技術大学院大学 修士論文
- 吉江義明 (2004) イネ抵抗性反応時の活性酸素種発生に関与する *Osrboh* 遺伝子群の解析、修士論文 (奈良先端科学技術大学院大学)
- Yoshie Y, Goto K, Takai R, Iwano M, Takayama S, Isogai A, Che FS. (2005) Function of the rice gp91^{phox} homologs *OsrbohA* and *OsrbohE* genes in ROS-dependent plant immune responses. *Plant Biotech.* 22: 127-135.
- Yoshioka H, Sugie K, Park HJ, Maeda H, Tsuda N, Kawakita K, Doke N. (2001) Induction of plant gp91^{phox} homolog by fungal cell wall, arachidonic acid, and salicylic acid in potato. *Mol. Plant Microbe Interact.* 14, 6: 725-736.
- 吉岡博文、川北一人、道家紀志 (2004)、植物の生体防御機構、細胞工学別冊 植物細胞

工学シリーズ 19、新版分子レベルからみた植物の耐病性 -ポストゲノム時代の植物免疫研究-秀潤社、東京: 103-110.

- Yu D, Chen C and Chen Z. (2001) Evidence for an important role of WRKY DNA binding proteins in the regulation of *NPR1* gene expression. *Plant Cell* 13: 1527-1540.
- Zeidler D, Zähringer U, Gerber I, Dubery I, Hartung T, Bors W, Hutzler P, Durner J. (2004) Innate immunity in *Arabidopsis thaliana*: lipopolysaccharides activate nitric oxide synthase (NOS) and induce defense genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 44: 15811-15816.
- Zha J, Weiler S, Oh KJ, Wei MC, Korsmeyer SJ. (2000) Posttranslational *N*-myristoylation of BID as a molecular switch for targeting mitochondria and apoptosis. *Science* 290, 5497: 1761-1765.
- Zhang L, Lu YT. (2003) Calmodulin-binding protein kinases in plants. *Trends in Plant Science* 8: 123-127.
- Zhang S, Klessig DF. (2000) Pathogen-induced MAP kinases in tobacco. *Results Probl. Cell Differ.* 27, 0: 65-84.
- Zhang Y, Dorey S, Swiderski M, Jones JD. (2004) Expression of *RPS4* in tobacco induces an AvrRps4-independent HR that requires EDS1, SGT1 and HSP90. *Plant J.* 40, 2: 213-224.
- Zimmermann S, Nürnberger T, Frachisse JM, Wirtz W, Guern J, and Hedrich R, Scheel D. (1997) Receptor-mediated activation of a plant Ca^{2+} -permeable ion channel involved in pathogen defense. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94: 2751-2755.
- Zipfel C, Robatzek S, Navarro L, Oakeley EJ, Jones JD, Felix G, Boller T. (2004) Bacterial disease resistance in *Arabidopsis* through flagellin perception. *Nature* 428, 6984: 764-767.

論文目録

学位論文の主たる部分を公表した論文

Rice cDNA Microarray Based Gene Expression Profiling of the Response to Flagellin Perception in Cultured Rice Cells.

Satsuki Fujiwara, Noriko Tanaka, Takashi Kaneda, Seiji Takayama, Akira Isogai and Fang-Sik Che. (2004) Mol. Plant Microbe. Interact. Vol. 9, pp. 986-998

参考論文

Identification of genes involved in induction of plant hypersensitive cell death.

Takashi Kaneda, Satsuki Fujiwara, Ryota Takai, Seiji Takayama, Akira Isogai and Fang-Sik Che. (2006, submitted) Plant Biotechnol.

Flagellin from an Incompatible Strain of *Acidovorax avenae* Mediates H₂O₂ Generation Accompanying Hypersensitive Cell Death and Expression of *PAL*, *Cht-1*, and *PBZ-1*, but Not of *LOX* in Rice.

Noriko Tanaka, Fang-Sik Che, Naohide Watanabe, Satsuki Fujiwara, Seiji Takayama, and Akira Isogai. (2003) Mol. Plant Microbe. Interact. Vol. 5, pp. 422-428