

学位申請論文

イネプロテインキナーゼ BSR1 が関わる  
病虫害応答・抵抗性機構の解析

2020年3月

東京理科大学大学院 理工学研究科 応用生物科学専攻

博士後期課程

神田 恭和

## 論文要旨

自然界の植物は細菌や糸状菌、害虫といった様々な生物による攻撃にさらされており、こういった病虫害は農業生産を常に脅かしている。植物側の抵抗性を強化するという観点から、植物の病害抵抗性に関わる遺伝子の単離やその分子機構の解明に向けた研究がなされてきた。*BSR1* (*Broad-Spectrum Resistance 1*) は、過剰発現によって病害抵抗性を賦与する遺伝子としてイネから単離された。*BSR1* 過剰発現イネはイネ白葉枯病菌 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) やイネもみ枯細菌病菌 (*Burkholderia glumae*) といった病原細菌とイネいもち病菌 (*Pyricularia oryzae*) やイネごま葉枯病菌 (*Cochliobolus miyabeanus*) といった病原糸状菌に対して抵抗性を示す。また、*BSR1* による病原細菌と病原糸状菌への抵抗性は双子葉植物のシロイヌナズナにおいても生じる。一つの遺伝子が、系統学的にこれほど広い範囲の植物において多様な病原体に対して有効な複合病害抵抗性を与える例は極めて珍しく、病害防除への応用が期待されている。本研究では、植物の有する抵抗性機構において *BSR1* がどのような機能を担っているのかを解明することを目的とした。

はじめに、*BSR1* が receptor-like cytoplasmic kinase (RLCK) サブファミリーVII に分類されるプロテインキナーゼをコードしていることに注目した。RLCK は、受容体様プロテインキナーゼ (Receptor-Like protein Kinase: RLK) と相同性の高いキナーゼドメインをもつ一方で、細胞外ドメインや膜貫通ドメインはもたない細胞質基質タンパク質のファミリーである。モデル植物のシロイヌナズナ等で、微生物関連分子パターン (microbe-associated molecular pattern: MAMP) の認識から初期の防御応答の誘導までの細胞内防御応答シグナル伝達を担う RLCK サブファミリーVII タンパク質の報告がある。そこで、*BSR1* がイネの本来有する初期の防御応答 (オキシダティブバーストと呼ばれ

る急激な活性酸素種産生、防御関連遺伝子の発現上昇)の誘導に寄与するかどうかを調べた。逆遺伝学的解析のために、CRISPR/Cas9 システムを利用して *BSR1* ノックアウト系統を作出した。*BSR1* ノックアウト系統から誘導したカルスからイネ懸濁培養細胞を調製し、キチン (糸状菌細胞壁構成多糖) やペプチドグリカン (細菌細胞壁成分)、リポ多糖 (LPS; グラム陰性細菌外膜成分) といった代表的な MAMP で処理した。MAMP 処理下において、野生型細胞ではオキシダティブバーストが誘導されて培養系の過酸化水素濃度が上昇したのと対照的に、*BSR1* ノックアウト懸濁培養細胞の培養系ではわずかにしか上昇しなかった。さらに、MAMP 認識後に発現が誘導される防御関連遺伝子の転写産物を定量したところ、*BSR1* ノックアウトがこれらの遺伝子の発現上昇を抑制することが明らかになった。これらの結果は MAMP 認識後の防御応答の誘導に *BSR1* が寄与することを示している。これまでの知見と合わせ、*BSR1* が MAMP 受容体下流の細胞内シグナル伝達経路を構成することが示唆された。

*BSR1* が MAMP 応答性の防御応答に寄与することから、*BSR1* 過剰発現時の複合病害抵抗性は MAMP 応答が野生型より強く活性化されることで生じるのではないかと仮定した。この仮説の検証のために、*BSR1* 過剰発現 (*BSR1*-OX) 系統由来の懸濁培養細胞の MAMP 応答を解析した。その結果、*BSR1*-OX 懸濁培養細胞は MAMP エリシター処理下で野生型と比較して約 2 倍の濃度の過酸化水素を産生した。この条件において防御関連遺伝子発現もまた亢進した。懸濁培養細胞よりも自然界に近い状態で解析することを目的に、葉身からリーフストリップを作製した。*BSR1*-OX 系統のリーフストリップは、MAMPs に応答して野生型より顕著に高い濃度の過酸化水素を産生した。これらの結果から、*BSR1* 過剰発現はイネの MAMP 応答を亢進させることが明らかになった。

イネいもち病菌のような植物病原体は、活性酸素種を分解する酵素によって

宿主のオキシダティブバーストを抑制することが知られている。このような状況下においても *BSR1-OX* 系統と野生型系統の間でオキシダティブバーストに差があるのかどうかを調べるために、リーフストリップとイネいもち病菌分生子を共培養した状態で過酸化水素濃度を定量する実験系を設計した。コントロール系統の共培養系で過酸化水素濃度が上昇しなかったのに対し、過剰発現系統のものでは有意な濃度上昇が認められた。宿主に由来する活性酸素種を分解することが病原性に必要であるという知見と合わせ、*BSR1* 過剰発現による複合抵抗性の原因は、病原体が分解しきれないほどに過剰産生された活性酸素種であることが示唆された。

本研究は、*BSR1* をオキシダティブバーストのような初期の防御応答を正に制御する因子として位置づけた。さらに、培養細胞や葉身を用いた解析によって、*BSR1* 過剰発現が MAMP 応答を亢進させることを明らかにした。これらの結果より、*BSR1-OX* イネにおいて、様々な MAMP 認識の下流で *BSR1* が防御応答を過剰活性化することで複合病害抵抗性をもたらすというモデルを提唱するに至った。

## 略語表

2,4-D	2,4-dichlorophenoxyacetic acid
BCCD	biotin carboxyl carrier protein domain
CE	chitin elicitor
cfu	colony forming unit
CRISPR	clustered regularly interspaced short palindromic repeat
DAMP	damage-associated molecular pattern
DSB	double-strand break
DP	diterpenoid phytoalexin
FACs	fatty acid-amino acid conjugates
FOX	full-length cDNA overexpressor
GN8	chitin octamer
gRNA	guide RNA
HAMP	Herbivore-Associated Molecular Pattern
HPB tag	HA-PreScission protease site-BCCD tag
KO	knockout
LPS	lipopolysaccharide
MAMP	microbe-associated molecular pattern
MAPK	mitogen-activated protein kinase
OD	optical density
OS	oral secretion
OX	overexpression
PAM	protospacer adjacent motif
PAMP	pathogen-associated molecular pattern
PGN	peptidoglycan
PRR	pattern recognition receptor
PTI	pattern-triggered immunity
qRT-PCR	quantitative reverse transcription PCR
RLP	receptor-like protein
RLK	receptor-like kinase
RLCK	receptor-like cytoplasmic kinase
ROS	reactive oxygen species
SD	standard deviation
WT	wild-type

## 目次

論文要旨 .....	1
第 1 章 序論.....	7
第 2 章 イネの本来有する防御応答への BSR1 の寄与の検証 .....	11
2-1. 方法.....	13
2-1-1. 材料.....	13
2-1-2. CRISPR/Cas9 システムによる変異導入と変異の解析 .....	14
2-1-3. イネ懸濁培養細胞における ROS 定量.....	14
2-1-4. Quantitative Reverse Transcription (qRT)-PCR による発現解析	16
2-2. 結果.....	17
2-2-1. <i>BSR1</i> -KO 系統の作出.....	17
2-2-2. BSR1 はキチン認識後の ROS バーストの誘導に寄与する.....	19
2-2-3. BSR1 は防御関連遺伝子発現を正に制御する .....	21
2-2-4. BSR1 は様々な MAMP に対する応答に寄与する .....	23
2-3. 考察.....	28
第 3 章 <i>BSR1</i> 過剰発現が賦与する抵抗性の解析 .....	32
3-1. 方法.....	33
3-1-1. 材料.....	33
3-1-2. クローニングと過剰発現植物の作出.....	33
3-1-3. 病害抵抗性検定 .....	35
3-1-4. ウェスタン解析 .....	36
3-1-5. <i>BSR1</i> 相同遺伝子の探索 .....	37
3-1-6. リーフストリップを用いた ROS 定量.....	37
3-2. 結果.....	38
3-2-1. BSR1 パラログの過剰発現は病害抵抗性を向上させない .....	38
3-2-2. シロイヌナズナ BSR1 オルソログは病害抵抗性を賦与しない .....	43
3-2-3. タグ化 <i>BSR1</i> 過剰発現系統の作出 .....	45
3-2-4. <i>BSR1</i> 過剰発現は MAMPs 応答性 ROS バーストを亢進させる.....	47
3-2-5. <i>BSR1</i> 過剰発現は植物体においても MAMP 応答を促進する.....	55
3-2-6. ROS 過剰産生は病原体による ROS 分解活性を凌駕する .....	57
3-3. 考察.....	60
第 4 章 BSR1 が関わる昆虫認識機構の解析 .....	66
4-1. 方法.....	68
4-1-1. 材料としたイネ .....	68
4-1-2. OS 調製と懸濁培養細胞の処理 .....	68

4-2. 結果.....	69
4-2-1. BSR1 はイネの本来有する OS 応答に寄与する .....	69
4-2-2. OsCERK1 が OS 応答に寄与する.....	72
4-2-3. OsCERK1-CEBiP キチン受容体複合体が OS を認識する .....	75
4-2-4. OS 中のエリシターの実体はキチンである .....	77
4-3. 考察.....	80
<b>第5章 総括</b> .....	<b>83</b>
本論文で使用したオリゴヌクレオチドの配列.....	86
参考文献.....	88
謝辞.....	99

## 第1章 序論

自然界では病原細菌や病原糸状菌（真菌類）、害虫といった様々な生物が植物を攻撃する。植物は、外敵の接近に応答して抵抗性機構を活性化することで身を守る。外敵となりうる生物に広く保存されている構造の分子を植物が認識することが抵抗性機構発動の引き金となることがよく知られている。こういった分子は、微生物／病原体関連分子パターン（Microbe/Pathogen-Associated Molecular Pattern: MAMP/PAMP）や植食性昆虫関連分子パターン（Herbivore-Associated Molecular Pattern: HAMP）等と総称される。糸状菌や細菌に由来する MAMP の実体や認識機構について研究が進んでいる。糸状菌細胞壁構成多糖であるキチン、細菌細胞壁構成成分であるペプチドグリカン、グラム陰性細菌外膜構成成分であるリポ多糖（lipopolysaccharide: LPS）、細菌ベータ毛タンパク質フラジェリン、原核型リボソーム翻訳伸長因子（Elongation Factor-Tu: EF-Tu）などが代表的な MAMP である（Boller and Felix, 2009）。植物は、細胞膜貫通型タンパク質によって構成されるパターン認識受容体複合体によって直接に MAMP を認識する（Monaghan and Zipfel, 2012）。

主要作物の一つであり、単子葉植物のモデル生物でもあるイネ *Oryza sativa* においても、MAMP 応答機構の研究が進められてきた。特に、細胞膜上に存在する LysM 型受容体様プロテインキナーゼ rice Chitin Elicitor Receptor Kinase 1 (OsCERK1) を中心とした認識システムがよく研究されている。OsCERK1 は受容体様タンパク質 Chitin Elicitor Binding Protein (CEBiP) との複合体としてキチンオリゴマーを認識する（Kaku *et al.* 2006; Shimizu *et al.* 2010; Kouzai *et al.* 2014a, b）。また LysM-Containing Protein 4/6 (LYK4/6) と相互作用してペプチドグリカンを認識する（Ao *et al.* 2014）。さらに、LPS 認識に寄与する受容体または共受容体（co-receptor）としてもはたらく（Desaki *et al.* 2017）。こ



これらのことは、OsCERK1のような中心的な共受容体は様々なMAMP認識シグナルが集約されるハブレセプターとして機能することを示す。リガンドを結合したパターン認識受容体複合体は細胞質内のシグナル伝達経路を介して、様々な防御応答を起こすことで pattern-triggered immunity (PTI) と呼ばれる病害抵抗性を発動する。パターン認識受容体が有する細胞質内プロテインキナーゼドメインからのリン酸化シグナリングが ROS (reactive oxygen species, 活性酸素種) バーストや mitogen-activated protein kinase (MAPK) カスケードの活性化、それに続く防御関連遺伝子の発現上昇といった初期の防御応答を引き起こす (Macho and Zipfel, 2014; Kawasaki *et al.* 2017)。ROS バーストは、植物の NADPH オキシダーゼである Respiratory Burst Oxidase Homolog (RBOH) タンパク質が急激かつ大量に ROS を産生することで引き起こされる植物に広く保存された防御応答である (Waszczak *et al.* 2018)。過酸化水素 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 等の状態で放出された ROS は様々な機能を果たして PTI に寄与する。例えば、直接に病原体を傷害する、リグニンの合成や細胞壁成分の架橋によって植物細胞壁を強化するといった機能をもつ (Bradley *et al.* 1992; Peng and Kuc, 1992; Chen and Schopfer, 1999; Lu and Higgins, 1999)。さらに、ROS バーストに伴って放出された H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> は、防御関連遺伝子の発現やファイトアレキシン生合成、プログラム細胞死を制御するシグナル分子として機能する (Wrzaczek *et al.* 2013; Waszczak *et al.* 2018)。自然界で植物病原性を示す微生物は、エフェクタータンパク質を分泌して PTI シグナリングを妨害する、MAMP 分子上に認識されないような構造的多様性を獲得するといった戦略をとることで PTI の発動を回避して感染に成功していると考えられている (Jones and Dangl, 2006)。

植物本来の抵抗性を打破することができる生物がもたらす病虫害は、農業生産を常に脅かしている。安定的で十分な農業生産を目指し、病害防除方法の研究

が行われてきた。遺伝子操作によって病害抵抗性の高い系統を作出するという観点から、植物免疫機構を強化できる遺伝子の探索が行われた。*Broad-Spectrum Resistance 1 (BSR1; OsRLCK278)* は過剰発現時に特徴的な病害防除効果をもたらす、receptor-like cytoplasmic kinase (RLCK) ファミリーに属するイネ遺伝子である。この遺伝子は、当研究グループが以前行った rice Full-length cDNA OverExpressor (FOX) *Arabidopsis* 系統を用いた細菌病・糸状菌病抵抗性スクリーニングにおいて単離された (Kondou *et al.* 2009; Dubouzet *et al.* 2011)。このスクリーニングにおいて、35S カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) プロモーター下で *BSR1* を過剰発現するシロイヌナズナ *Arabidopsis thaliana* はアブラナ科野菜類炭疽病菌 *Colletotrichum higginsianum* とトマト斑葉細菌病菌 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 に対する強力な抵抗性を示した。イネにおいて、*BSR1* の過剰発現は少なくとも 4 種のイネ病原体 (イネいもち病菌 *Pyricularia oryzae*、イネごま葉枯病菌 *Cochliobolus miyabeanus*、イネ白葉枯病菌 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*、イネもみ枯細菌病菌 *Burkholderia glumae*) に対する強力な複合抵抗性を賦与した (Dubouzet *et al.* 2011; Maeda *et al.* 2016)。これらの形質転換イネ・シロイヌナズナで顕著な生育不良は現れなかったが、イネにおいては発芽率の低下がみられた (Dubouzet *et al.* 2011)。数ある RLCK のうちで、過剰発現時にこれほど強力かつ広域の複合病害抵抗性を賦与するものは *BSR1* をおいて他になく、この複合病害抵抗性の活用が病害の脅威に対する新しい解決方策になると期待されている。遺伝子組換え作物開発に利用するためには病害抵抗性賦与メカニズムを明らかにすることが必須であるが、植物免疫において *BSR1* の果たす役割は明らかになっていなかった。

本論文では、イネが外敵に応答する際に *BSR1* がどのように作用するのかを

明らかにすることを目的として研究を進めた。はじめに **BSR1** が野生型イネにおいて **PTI** 誘導機構に寄与するかどうか調べるために、*BSR1* ノックアウト (-**KO**) イネを作出して防御応答を定量した実験について第 2 章にまとめた。第 3 章の実験では、*BSR1* の過剰発現が **MAMP** 認識後の防御応答を亢進させる可能性を考え、過剰発現イネの防御応答の定量を試みた。第 4 章では、イネ食害昆虫に対する防御応答に **BSR1** が関わることを見出した。さらに、害虫認識機構において **BSR1** の関わるシグナル伝達経路を同定し、昆虫由来エリシターの実体の同定に迫った。

## 第2章 イネの本来有する防御応答への BSR1 の寄与の検証

先行研究において、*BSR1* ノックダウンは糸状菌病と細菌病に対する抵抗性を低下させた (Sugano *et al.* 2018)。このことは、*BSR1* が過剰発現時に限らずイネが本来有する植物免疫機構においても何らかの役割を果たしていることを示している。*BSR1* は *RLCK* サブファミリーVII に属するプロテインキナーゼをコードしている。*RLCK* は、受容体様プロテインキナーゼと相同性の高いプロテインキナーゼドメインを含み、しかし膜貫通ドメインを含まない細胞質基質タンパク質として特徴づけられる。*RLCK* ファミリーは多数の遺伝子を含む巨大ファミリーとして知られており、シロイヌナズナとイネは *RLCK* をコードする遺伝子をそれぞれ 147 個、379 個もつ (Shiu *et al.* 2001; Vij *et al.* 2008)。*RLCK* は構造によって 17 のサブファミリーに分類される。

最近、特にサブファミリーVII に属するいくつかの *RLCK* について、MAMP 認識から PTI の発動までの間の細胞内リン酸化シグナリングを担うという報告がなされている (Liang and Zhou, 2018)。シロイヌナズナにおいて、*RLCK* サブファミリーVII に属する *BIK1* は、受容体様プロテインキナーゼ *BAK1* を含むパターン認識受容体複合体によってリガンド結合依存的にリン酸化される (Lu *et al.* 2010; Zhang *et al.* 2010)。リン酸化された *BIK1* は、防御応答において ROS 産生を担う *RBOHD* を直接リン酸化して活性化し、ROS バーストを引き起こす (Li *et al.* 2014; Kadota *et al.* 2014)。イネにおいて、*BIK1* のオルソログ *OsRLCK176* は *OsCERK1* と相互作用し、キチン・ペプチドグリカン認識シグナリングに寄与する (Ao *et al.* 2014)。*OsRLCK176* と近縁な *OsRLCK57*、*OsRLCK107*、*OsRLCK118* もまた似た機能を有する (Li *et al.* 2017)。*OsRLCK118* は *OsRBOHB* を直接リン酸化することで、イネの ROS バーストに寄与する (Fan *et al.* 2018)。*OsRLCK185* は *OsCERK1* や *MAPK* キナーゼ

キナーゼと相互作用し、キチン応答においてパターン認識受容体と MAPK カスケードを連絡する機能をもつ (Wang *et al.* 2017; Yamada *et al.* 2017)。これらの知見を合わせて、BSR1 が PTI シグナリングに寄与するという仮説を立てた。

イネの本来有する病害抵抗性機構への BSR1 の寄与を検証するために、逆遺伝学的な解析を行った。植物における遺伝子の高効率なノックアウト法として、CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeat/CRISPR-associated protein 9) システムが注目されている。CRISPR/Cas9 システムは細菌の適応免疫系として発見されたエンドヌクレアーゼ機構である。in vivo で任意配列の DNA に二本鎖切断 (double-strand break: DSB) を誘導して変異を導入できるという有用な性質を有し、そのために必要な操作の簡便さもあってゲノム編集技術として応用されている (Jinek *et al.* 2012)。その有用性は相同組換え法の適用が困難である植物において特に大きく、モデル植物であるイネにおいても手法が確立された (Mikami *et al.* 2015)。本研究では、BSR1 をノックアウトする手法として、CRISPR/Cas9 システムを採用した。

CRISPR/Cas9 システムを用いる場合には、オフターゲット変異について考える必要がある。PAM 配列から 10-12 塩基以上遠位の領域では数塩基のミスマッチが許容されることが報告されるなど (Fu *et al.* 2013)、CRISPR/Cas9 システムの特異性は高くないことが明らかになっている。オフターゲット変異が起きることはイネにおいても確認されている (Endo *et al.* 2015)。本研究では、ノックアウトする遺伝子につき複数の標的配列を設計して独立に BSR1-KO 体を取得することでオフターゲットの影響を避けることとした。

## 2-1. 方法

### 2-1-1. 材料

野生型イネ系統として日本晴 (*O. sativa* L. cv. Nipponbare) を用いた。土に植えるイネ種子は、もみ殻をむいた後、種子滅菌液 [50% (v/v) 次亜塩素酸ナトリウム, Tween20少量] 中で 20 min 穏やかに振とうして表面殺菌した。その後、発芽誘導のために 1/2 MS 固体培地 [1/2 濃度 ムラシゲ・スクーグ培地用混合塩類 (Wako), 3%スクロース、0.4%ゲランガム (Wako)] 上で 28°C、暗所下に 3 日間おいた。さらに 28°C、16 h 日長下に 4 日間おき、土に移して温室 (自然日長) においた。遺伝子組換えイネの選抜のために必要な場合は、1/2 MS 固体培地に 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  ハイグロマイシン B を添加した。

イネカルスを誘導するための種子は、もみ殻をむいた後、カルス用種子滅菌液 [50% (v/v) 次亜塩素酸ナトリウム] 中で 20 min 穏やかに振とうする操作を 2 回行って表面殺菌した。その後、0.4%ゲランガム含有 N6D 培地 (1 × Chu N6 Medium Salt Mixture, 1× Chu N6 vitamin solution, 3.0% sucrose, 0.03% Casamino acid, 0.28% proline, 0.4% gellan gum, 2 mg/L 2,4-dichlorophenoxyacetic acid: 2,4-D: pH 5.8) 上で 3 週間程度培養することでカルスを誘導した (Toki *et al.* 2006)。カルスは 2 週間ごとに新たな N6D 培地に植え継いだ。

抵抗性検定とエリシター調製のために、イネいもち病菌日本晴病原性株として Kyu89-246 株 (MAFF101506, race 003.0) を用いた。イネ白葉枯病菌として T7174 株 (MAFF 311018, race I) を用いた。微生物の培養と接種は、既に報告されている方法に従って行った (Maeda *et al.* 2017; Dubouzet *et al.* 2011)。

### 2-1-2. CRISPR/Cas9 システムによる変異導入と変異の解析

標的配列は、CRISPR-P (Lei *et al.* 2014, <http://cbi.hzau.edu.cn/crispr/>) を参考にして設計した。*BSR1* 中でオフターゲットリスクが低い配列として CRISPR-P より出力された候補から、エキソン 1 の 5'末端付近で塩基配列が重複しないものを 3 通り選択した。イネに CRISPR/Cas9 システムを導入するために、pU6gRNA と pZH\_gYSA\_MM Cas9 のベクター系 (Mikami *et al.* 2015) を用いた。バイナリーベクター pZH\_gYSA\_MM Cas9 をアグロバクテリウム *Rhizobium radiobacter* に導入し、イネの形質転換を行った。形質転換操作は、既に報告されているアグロバクテリウムによるイネカルス迅速形質転換法 (Toki *et al.* 2006) に従って行った。CRISPR/Cas9 システムによる変異は、再生した植物体から抽出したゲノム DNA 内の標的配列周辺のシーケンシング (BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, 3130xl Genetic Analyzer; Applied Biosystems) を行って解読した。T<sub>2</sub> 世代において、リアルタイム PCR によってイネ遺伝子 *Eukaryotic Elongation Factor 1α (eEF1α)* 内在性コントロールに対する外来遺伝子 *Cas9* の相対コピー数を定量するジェノタイピングを行い、外来遺伝子群を分離によって失った個体を得られたもの (*bsr1-1#13*, *bsr1-2#16*, *bsr1-8#5*) を実験に用いた。

### 2-1-3. イネ懸濁培養細胞における ROS 定量

イネ懸濁培養細胞 (rice suspension-cultured cells) は既に報告されている以下の方法によって調製した (Nojiri *et al.* 1996; Kouzai *et al.* 2014a)。ただし、液体培養のために改変 N6 液体培地 [30 g l<sup>-1</sup> sucrose; 4.1 mg l<sup>-1</sup> N6 salt (Wako); 2 mg l<sup>-1</sup> glycine; 0.5 mg l<sup>-1</sup> nicotinic acid; 0.5 mg l<sup>-1</sup> pyridoxine HCl; 1 mg l<sup>-1</sup> thiamine HCl; 100 mg l<sup>-1</sup> myo-inositol; 1 mg l<sup>-1</sup> 2,4-D; 23.4 mg l<sup>-1</sup>

MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O; pH 5.8] を用いた (Kanda *et al.*, 2017)。各系統の種子から誘導したカルスを改変 N6D 液体培地 30 mL に移して暗所で無菌的に一晩振とう培養 (28°C, 120 rpm) した。1 mm × 1 mm のメッシュで裏ごしして適当な大きさにし、液体培地中に分散させた。新たな改変 N6D 液体培地 30 mL 中で 3 日間無菌的に振とう培養したものを懸濁培養細胞として実験に用いた。培養細胞 100 mg を蓋に穴をあけた 2 mL マイクロチューブに分注し、改変 N6D 液体培地 1 mL を加えた。このチューブを一晩前培養 (28°C, 750 rpm) した。その後、培地を除いて新たな改変 N6D 液体培地を加えた。2 時間程度培養 (28°C, 750 rpm) したあと、エリクター処理を行った。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> は、フェリシアン化カリウム (ヘキサシアノ鉄 (III) 酸カリウム) 触媒下のルミノールアッセイ (Schwacke and Hager, 1992) によって化学発光として定量 (TD20/20 Luminometer: Turner Designs) した。

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 定量実験のために、懸濁培養細胞 100 mg が 10 µg ml<sup>-1</sup> ペプチドグリカン (peptidoglycan from *Bacillus subtilis*; Sigma-Aldrich)、50 µg ml<sup>-1</sup> LPS (LPS from *P. aeruginosa* 10 purified by phenol extraction; Sigma-Aldrich)、100 nM キチン六量体 (*N*-acetylchitohexaose, chitin elicitor: CE, 西澤博士より分与)、100 nM フラジェリン (*P. aeruginosa*, 西澤博士より分与)、イネいもち病菌 (2.2 × 10<sup>4</sup> conidia mL<sup>-1</sup>) およびイネ白葉枯病菌 (OD<sub>600</sub> = 0.3) のオートクレーブ菌体成分で処理された。イネいもち病菌オートクレーブ菌体は、血球計算盤を用いて分生子濃度を測定した分生子懸濁液をオートクレーブして調製した。イネ白葉枯病菌オートクレーブ菌体は、光学密度を測定した細胞懸濁液をオートクレーブして調製した。



#### 2-1-4. Quantitative Reverse Transcription (qRT)-PCR による発現解析

MAMP 処理 3 h 時点のイネ懸濁培養細胞を液体窒素で凍結し、セパゾール RNA I Super G (ナカライ) によって RNA を抽出した。この RNA を鋳型として Rever Tra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Removor Kit (TOYOBO) を用いて cDNA を合成し、リアルタイム PCR (KAPA SYBR Fast qPCR キット, 日本ジェネティクス; Thermal Cycler Dyce TP800, タカラバイオ) を行って目的遺伝子の転写産物量を測定した。発現レベルは、ハウスキーピング遺伝子 *Rice Ubiquitin1* (*RUBQ1*; Os06g0681400) を内在性コントロールとした「comparative  $C_T$  ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) method」によって解析した (Jiang *et al.* 2010; Livak *et al.* 2001)。qRT-PCR に用いたプライマーの配列は Table 1 に示した。

## 2-2. 結果

### 2-2-1. *BSR1*-KO 系統の作出

初めに、CRISPR/Cas9 システムを利用して *BSR1*-KO イネを作出した。*BSR1* オープンリーディングフレーム上に 3 パターンのターゲット配列 (*BSR1*-target 1, *BSR1*-target 2, *BSR1*-target 8; Figure 1 and Table 3) を設計した。これらを標的とする CRISPR/Cas9 システムを日本晴イネに導入し、ターゲット配列につき 30 個体以上の形質転換体を独立に得た。形質転換体のゲノム DNA を抽出し、ターゲット配列周辺のゲノム領域のシーケンシングを行った。その結果、3 パターンのターゲット配列の全てについて予定されていた部位への挿入欠失変異が認められた。CRISPR/Cas9 システムによる 3 パターンの標的配列 (*BSR1*-target 1, *BSR1*-target 2, *BSR1*-target 8) への変異導入効率 (何らかの変異が導入された個体数/解析した個体数) は、それぞれ 82.5%、95.0%、100%であった。その中から、フレームシフトを起こす挿入欠失変異をバイアレリックにもつ形質転換体、すなわち *BSR1*-KO 体をターゲット配列ごとに複数個体見出した (Table 1)。以降の実験では、ホモ型のフレームシフト変異をもつと推定された *bsr1-1#13*、*bsr1-2#16*、*bsr1-8#5* の系統をそれぞれ KO#1、KO#2、KO#8 として用いた。

KO#1、KO#2、KO#8 のフレームシフト変異型の転写産物の配列を解析したところ、N 末端の 2-18 アミノ酸を除いた *BSR1* アミノ酸配列がフレームシフトによって失われることがわかった。いずれの KO 系統でも、この異常タンパク質は開始コドンから 133 アミノ酸まで翻訳された後、終始コドンによって翻訳が終わると推定された。また、3 パターンのノックアウト系統において発現する 3 種類の異常タンパク質のアミノ酸配列について構造やドメインの存在の有無を解析 (プロテイン BLAST, PROSITE) したが、似た構造のタンパク質やド

メイン構造などは見出されなかった。以上より、これらの系統を *BSR1* がノックアウトされた系統として扱った。



**Figure 1.** Three target sites of CRISPR/Cas9-mediated DSB. 5'-untranslated region and coding region are shown in gray and black respectively with enclosed 20 nucleotides of target sequences and underlined PAM sequences. Arrowheads indicate CRISPR/Cas9-mediated DSB sites.

**Table 1.** Representative mutations in transformants ( $T_0$  plants). Deletions and inserted nucleotides are shown in red.

	line	cleavage site sequence	frameshift
(target 1)	WT	-GGAGGTCGTCCAAGAGCAAGGAATCGTGGGGAGGCCGG-	
	<i>bsr1-1#7</i>	-GGAGGTCGTCCAAGAGCAAGGAAT-GTCGGGGAGGCCGG-	-1
	<i>bsr1-1#13</i> (KO#1)	-GGAGGTCGTCCAAGAGCAAGGAATCAGTCGGGGAGGCCGG-	+1
(target 2)	WT	-GCTTGCTTGCTGCAAGAAATGAGCTGCTGGGTTGGTTC-	
	<i>bsr1-2#16</i> (KO#2)	-GCTTGCTTGCTGCAAGAAATGAGCTGCTGGGTTGGTTC-	+1
	<i>bsr1-2#17</i>	-GCTTGCTTGCTGCAAGAAATGAGC-GCTGGGTTGGTTC-	-1
(target 8)	WT	-GAGCTGCTGGGTTGGTTCAAGAAGCGGAGGTCGTCAA-	
	<i>bsr1-8#2</i>	-GAGCTGCTGGGTTGGTTCAAGAAGCGGAGGTCGTCAA-	+1
	<i>bsr1-8#5</i> (KO#8)	-GAGCTGCTGGGTTGGTTCAAGAAGCGGAGGTCGTCAA-	+1

■ Sequence targeted by CRISPR/Cas9 system

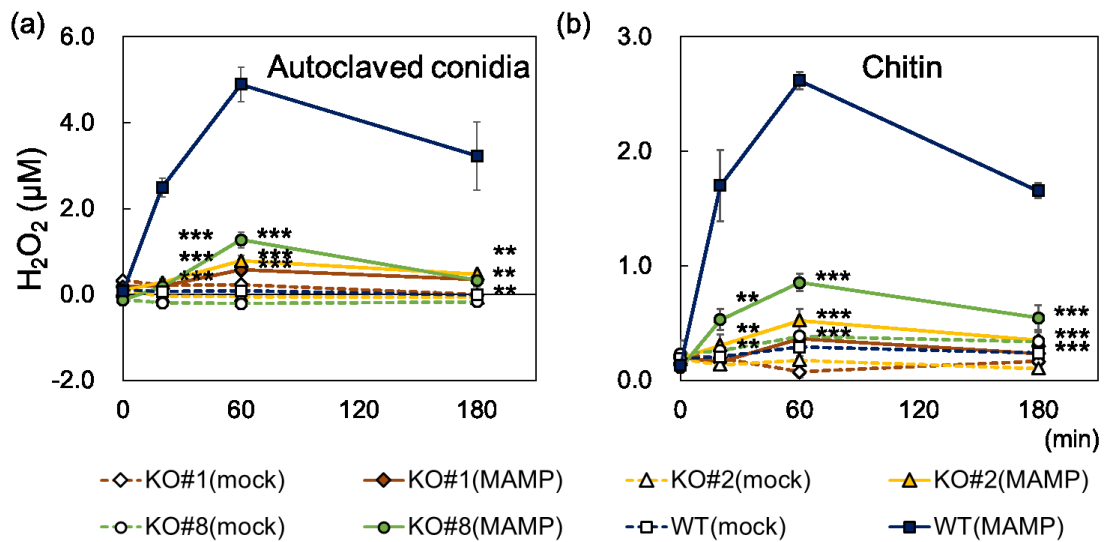
### 2-2-2. BSR1 はキチン認識後の ROS バーストの誘導に寄与する

BSR1 が MAMP 認識後の防御応答の誘導に寄与するかどうか調べるために、代表的なイネ病原糸状菌であるイネいもち病菌の菌体成分で処理した際の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 産生 (ROS バースト) を解析した。ここでは、感染能力等を失わせるためにオートクレーブしたイネいもち病菌分生子の抽出物で処理した。

*BSR1*-KO 系統 (KO#1, KO#2, KO#8) と野生型系統 (WT) の種子から誘導した懸濁培養細胞を処理したところ、野生型の細胞培養系の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 濃度が大きく上昇したのと対照的に、*BSR1*-KO 系統ではわずかにしか上昇しなかった (Figure 2a)。*BSR1* ノックアウトによって、処理後 60 min の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 産生は 74–88% 減少した。ただし、*BSR1*-KO 系統の ROS バーストが完全に失われることはなかった。処理後 60 min と 180 min で、*BSR1*-KO 系統の培養細胞はエリシター処理依存的にわずかながら有意 ( $p < 0.01$ , Student's *t*-test) な H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 濃度上昇を引き起こした。3 種類の *BSR1*-KO 系統は、それぞれ CRISPR/Cas9 システムの標的配列が異なるものである。これらの系統の形質が一致したことから、ROS バーストが抑制された原因はオフターゲット変異ではなく *BSR1* ノックアウトであると考えられる。よって、イネいもち病菌分生子に含まれる MAMP を認識したイネが ROS バーストを起こす過程に BSR1 が寄与することが明らかになった。

糸状菌細胞壁を構成する多糖であるキチンは、イネを含む多くの植物に認識され、防御応答を誘導する (Shibuya *et al.* 2001)。そこで、キチンで誘導される防御応答に BSR1 が関与する可能性を検討した。懸濁培養細胞をキチンエリシター (100 nM キチン六量体: N-acetylchitohexaose) で処理し、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 濃度を定量した。イネいもち病菌分生子成分の場合と同様に、KO 系統と野生型で顕著な違いがみられた (Figure 2b)。処理後 60 min において、培養細胞の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 産生

は *BSR1* ノックアウトによって 67–86%抑制された。顕著に抑制されたものの *BSR1*-KO 系統のキチン応答性は完全には失われず、処理後 60 min では各系統のコントロールと比較して有意 ( $p < 0.01$ , Student's *t*-test) な上昇が検出された。このことは、*BSR1* が担う役割には機能的冗長性があることを示している。以上より、*BSR1* がイネのキチン応答性 ROS バーストの誘導に寄与することが明らかになった。

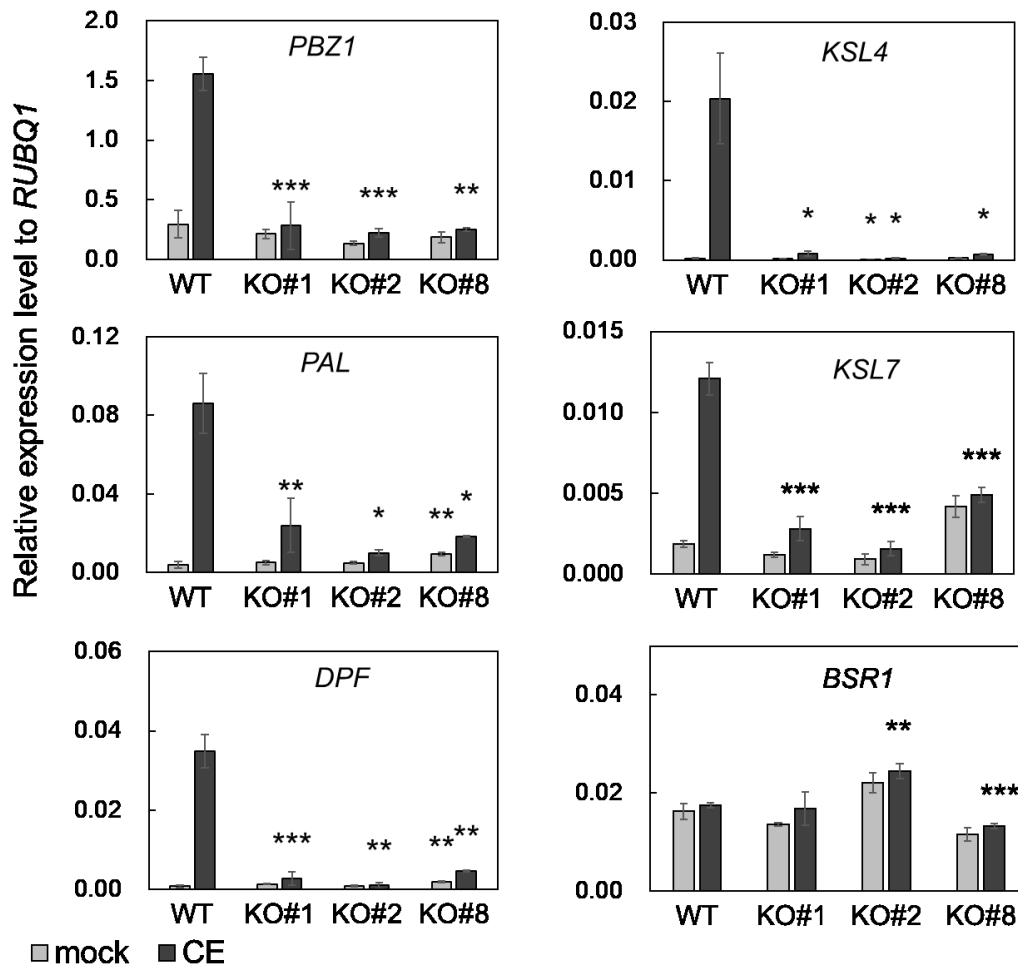


**Figure 2.** Knockouts of *BSR1* impaired H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in rice cell cultures treated with fungal MAMPs. Suspension-cultured cells were treated with  $2.2 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$  autoclaved conidia of the rice blast fungus (a) and 100 nM chitin oligomer (b). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations were measured before treatment and at 20, 60, and 180 min after treatment. Values are presented as the means  $\pm$  standard deviations of three biological replicates. Experiments were conducted three times with similar results. \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$  compared with WT (Student's *t*-test). KO, knockout; WT, wild-type.

### 2-2-3. BSR1 は防御関連遺伝子発現を正に制御する

MAMP 認識後の防御応答として誘導されることが知られている防御関連遺伝子の発現上昇を解析した。キチン処理後 3 h の培養細胞における、内在性コントロール (*RUBQ1*) に対する防御関連遺伝子の転写産物量を定量した。ここでは、ジテルペン型ファイトアレキシン (DP) モミラクトン生合成遺伝子 *KAURENE SYNTHASE-LIKE 4 (KSL4)*、DP ファイトカサン生合成遺伝子 *KSL7*、DP 生合成鍵転写因子遺伝子 *DITERPENOID PHYTOALEXIN FACTOR (DPF)*、防御応答マーカー遺伝子 *PROBENAZOLE-INDUCIBLE PROTEIN 1 (PBZ1)*、フラボノイド型ファイトアレキシン・リグニン生合成遺伝子 *PHENYLALANINE AMMONIA-LYASE 1 (PAL1)* を用いた (Kouzai *et al.* 2014a; Yamamura *et al.* 2015)。これらの 5 遺伝子全てについて、*BSR1-KO* 培養細胞での発現誘導は野生型培養細胞と比べて著しく小さかった (Figure 3)。ROS バーストの結果と合わせて、*BSR1* はキチン認識を引き金とする防御応答の誘導において重要な機能を担っていることが明らかになった。

培養細胞における *BSR1* の発現を同様に定量した (Figure 3)。野生型と *BSR1-KO* 系統の間に顕著な差はみられず、CRISPR/Cas9 システムによるフレームシフト変異は転写量には影響しないことが確認された。また、野生型と *BSR1-KO* 系統の両方でコントロールと比較して有意な上昇は検出されず、*BSR1* にキチン応答性は認められなかった。



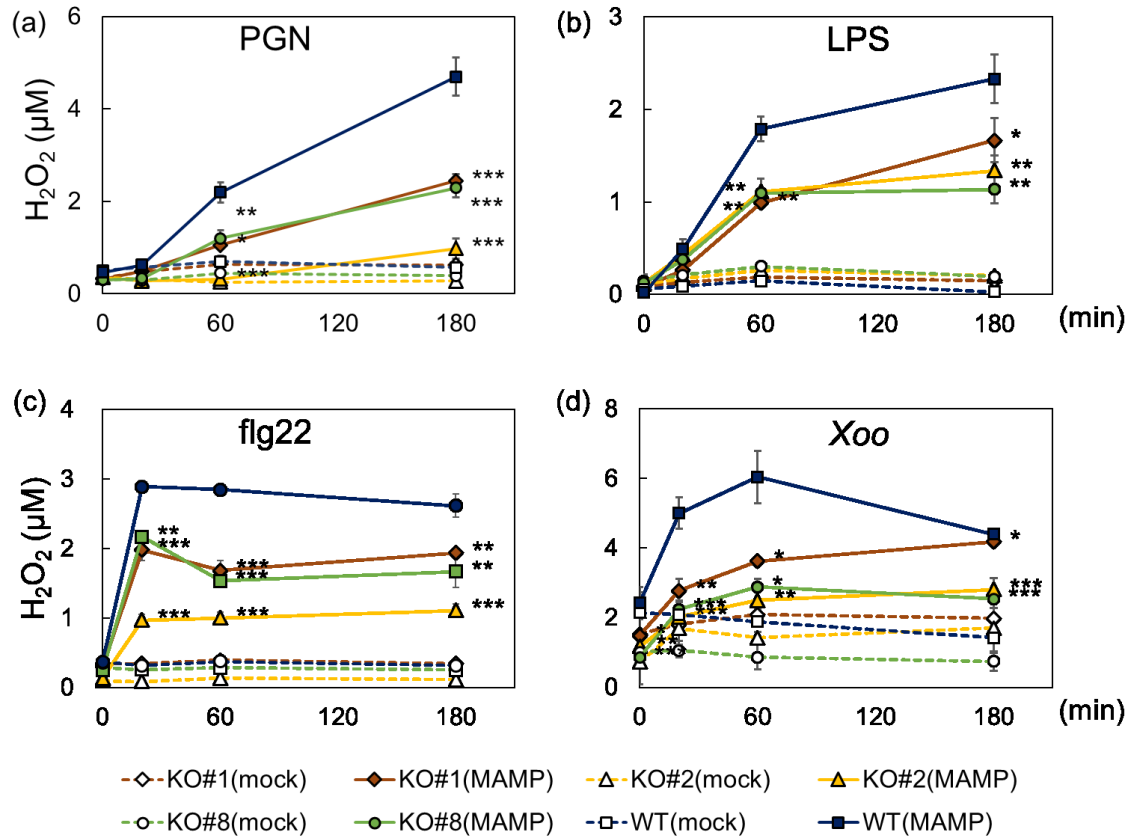
**Figure 3.** Chitin-induced transcriptional activation of defense-related genes were suppressed in *BSR1*-knockout suspension-cultured rice cells. The *PBZ1*, *PAL1*, *KSL4*, *KSL7*, *DPF*, and *BSR1* transcript levels at 3 h post treatment with chitin were normalized against the *RUBQ1* internal control levels. Values are presented as the means  $\pm$  standard deviations of three biological replicates. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , and \*\*\* $p < 0.001$  compared with WT (Student's  $t$ -test). CE, chitin elicitor; KO, knockout; WT, wild-type.

#### 2-2-4. BSR1 は様々な MAMP に対する応答に寄与する

キチン以外の様々な MAMP に対する応答にも BSR1 が寄与するかどうか調べるために、懸濁培養細胞を細菌由来の代表的な MAMP であるペプチドグリカン (細菌細胞壁成分)、LPS (グラム陰性細菌外膜成分)、flg22 (細菌べん毛タンパク質由来ペプチド) で処理した。BSR1 ノックアウトは、ペプチドグリカン処理で誘導される H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 産生を有意に抑制した (Figure 4a)。処理後 180 min において、BSR1-KO 培養細胞の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 産生量は、野生型のものと比較して 59–71% 低かった。同様に、BSR1-KO 培養細胞では LPS や flg22 処理に対する H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 産生量が野生型と比較してそれぞれ 38–45%、41–65% (処理後 60 min) 低下した (Figure 4b, c)。

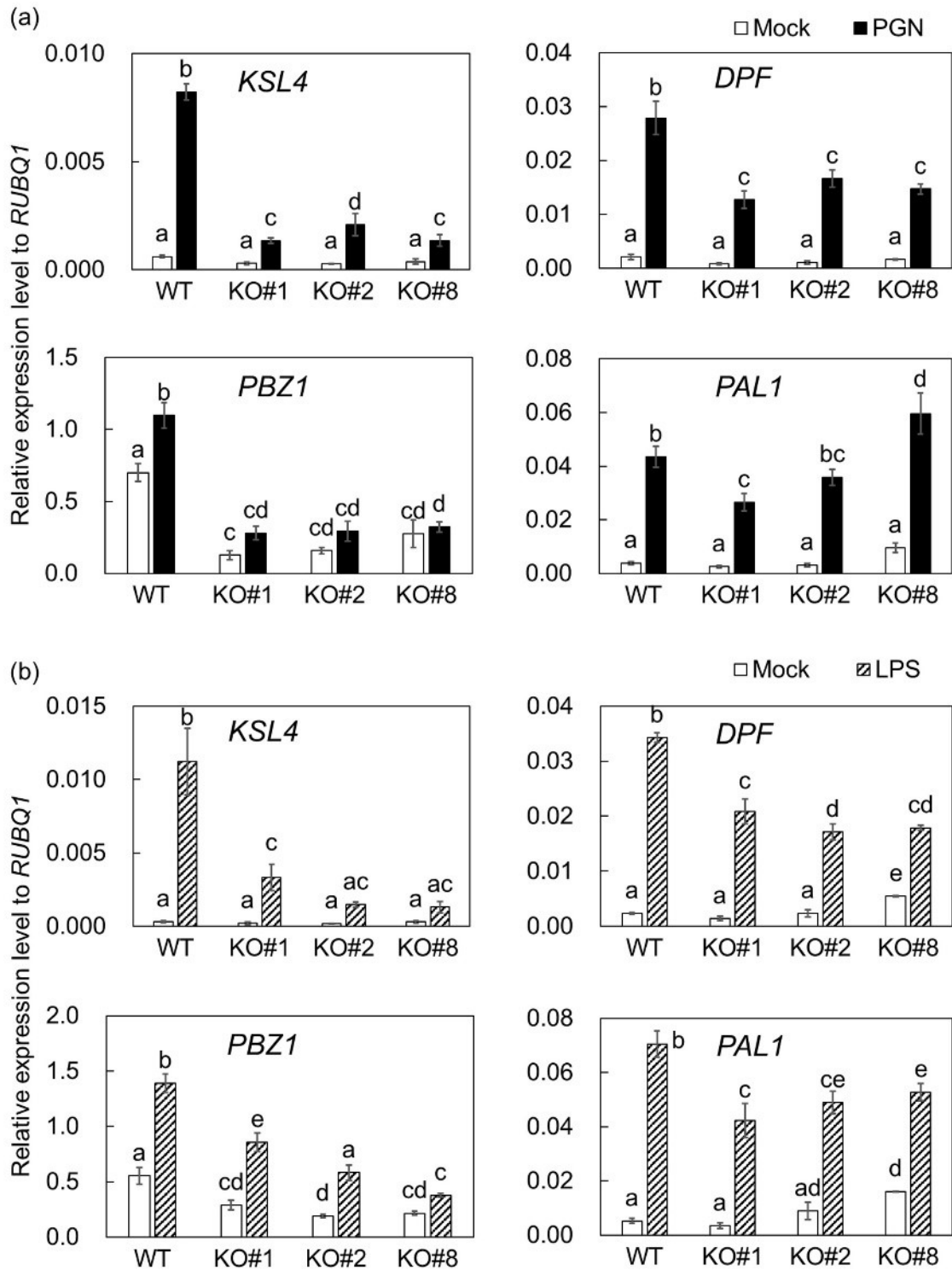
ここで用いたペプチドグリカン、LPS および flg22 はイネに対し病原性を示さない生物種に由来するものである。BSR1 がイネの病原細菌認識機構にも寄与することを支持するために、代表的なイネ病原細菌であるイネ白葉枯病菌のオートクレーブ菌体で処理した。イネ白葉枯病菌由来成分 (オートクレーブ前に測定した値にして OD<sub>600</sub> = 0.3 に相当する終濃度) 処理下で、BSR1-KO 培養細胞の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 産生は野生型より 39–58% 低かった (Figure 4d)。この結果は、イネ病原細菌由来の MAMP に対する応答においても BSR1 が重要であることを示している。





**Figure 4.** Knockouts of *BSR1*-impaired H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in rice cell cultures treated with bacterial MAMPs. Suspension-cultured cells were treated with 10 µg/mL peptidoglycan (a), 50 µg/mL LPS (b), 100 nM flg22 (c), and autoclaved suspension of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*; d). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations were measured before treatment and at 20, 60, and 180 min after treatment. Values are presented as the means ± standard deviations of three biological replicates. Experiments were conducted twice with similar results. \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01, and \*\*\**p* < 0.001 compared with WT (Student's *t*-test). PGN, peptidoglycan; LPS, lipopolysaccharide; KO, knockout; WT, wild-type.

ペプチドグリカンまたは LPS で 3 h 処理した培養細胞を用いて防御関連遺伝子 *KSL4*、*DPF*、*PBZ1*、*PAL* の発現を定量した。ペプチドグリカン処理下において、*BSR1* ノックアウトは *KSL4*、*DPF*、*PBZ1* の発現誘導を有意に抑制した (Figure 5a)。ただし、*PAL* については転写産物レベルの有意な低下は検出されなかった。LPS 処理下では、*BSR1* ノックアウトによる *KSL4* と *DPF* の発現誘導の抑制がみられた (Figure 5b)。有意な低下が検出される回もあったものの、*PBZ1* と *PAL* に対する有意な抑制は再現性よく検出されることはなかった。ROS 定量実験の結果と合わせて、*BSR1* がペプチドグリカンや LPS といった細菌性 MAMP を認識した後の防御応答の誘導にも寄与することが明らかになった。



**Figure 5.** MAMP-induced transcriptional activation of defense-related genes were suppressed in *BSR1*-knockout suspension-cultured rice cells. The *PBZ1*, *PAL1*, *KSL4*, and *DPF* transcript levels at 3 h post treatment with peptidoglycan (**a**) and LPS (**b**) were normalized against the *RUBQ1* internal control levels. Values are presented as the means  $\pm$  standard deviations of three biological replicates. Experiments were conducted twice with similar results. Different letters indicate significant differences (Tukey's test;  $p < 0.05$ ). PGN, peptidoglycan; LPS, lipopolysaccharide; KO, knockout; WT, wild-type.

### 2-3. 考察

BSR1 についての先行研究において、過剰発現イネやノックダウンイネを用いた糸状菌病・細菌病抵抗性への BSR1 の寄与の解析が行われてきた。BSR1 をノックダウンしたイネでは糸状菌病と細菌病に対する感受性が高まることから、BSR1 がイネの本来有する病害抵抗性機構に寄与することが示されていた (Sugano *et al.* 2018)。逆に、BSR1 の過剰発現は病原体のレースによらない糸状菌病・細菌病への複合病害抵抗性を生じる (Dobouzet *et al.* 2011; Maeda *et al.* 2017)。このことは、植物免疫機構のうち広い範囲の病原体を認識して活性化部分、すなわち PTI 機構に BSR1 が関与することを示唆していた。

第 2 章では、BSR1 が本来の機能として MAMP 認識後の代表的な防御応答 (ROS バーストと防御関連遺伝子発現) の誘導に寄与するかどうかを解析した。BSR1-KO 懸濁培養細胞は、キチン、ペプチドグリカン、LPS、flg22 といった様々な MAMP の処理下で野生型より低い濃度の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を産生した (Figures 2 and 4)。さらに、BSR1 ノックアウトは、キチン等の MAMP で誘導される防御関連遺伝子発現を抑制した (Figures 3 and 5)。防御応答が抑制される形質は各々別のターゲット配列にフレームシフト変異を導入した 3 系統で共通していた。ノックアウト体作出に用いた CRISPR/Cas9 システムはオフターゲット変異を生じる可能性が報告されているが (Fu *et al.* 2013; Endo *et al.* 2015)、オフターゲット効果は異なる配列を標的とする CRISPR/Cas9 システムの間で共通する可能性は極めて低い。したがって、作出した BSR1-KO 系統に共通してみられた防御応答の抑制の原因は、BSR1 ノックアウトであると考えられる。以上より、イネが MAMP を認識して発動する ROS バーストや防御関連遺伝子発現といった防御応答の誘導に、BSR1 が大きく寄与することを明らかにした。

イネは受容体様プロテインキナーゼ OsCERK1 と受容体様タンパク質 CEBiP

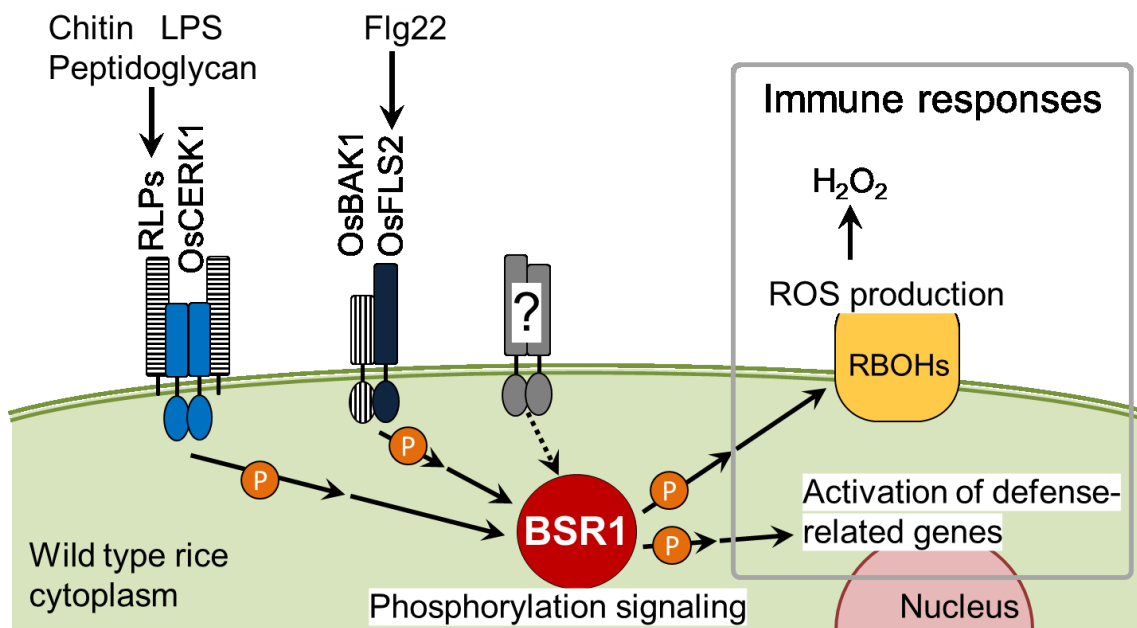
が形成する細胞膜上の受容体複合体によってキチンを認識する (Shimizu *et al.* 2010)。また、OsCERK1 を介さないキチン認識経路はないとされている (Kouzai *et al.* 2014a, b)。BSR1 がキチン応答性に寄与したことから、BSR1 は MAMP 認識シグナル伝達経路における OsCERK1 の下流因子と位置づけられる。OsCERK1 は多糖性 MAMP の認識に広く関与することが知られており、ペプチドグリカンや LPS に対する応答性にも大きく寄与する (Ao *et al.* 2014; Desaki *et al.* 2018)。キチンと同様にペプチドグリカンや LPS を認識した OsCERK1 複合体が直接または間接に BSR1 にシグナルを送り、BSR1 の機能を制御すると考えられる。一方で、ペプチド性 MAMP である flg22 は OsFLS2 や OsBAK1 を含む受容体複合体によって認識され、OsCERK1 はイネの flg22 応答性に寄与しない (Wang *et al.* 2015; Kouzai *et al.* 2014a)。このことは、BSR1 が少なくとも二つの受容体 (OsCERK1 を含む受容体複合体と OsBAK1 を含む受容体複合体) から認識シグナルを受け取ってさらに下流の防御応答を制御することを示している (Figure 6)。BSR1 のプロテインキナーゼドメインがリン酸化活性を有することが確認されており (Sugano *et al.* 2018)、BSR1 が複数のパターン認識受容体の下流のリン酸化シグナル伝達に寄与することが示唆された。

KO 培養細胞を用いた防御関連遺伝子の発現解析実験を通じて、mock 処理条件の *PBZ1* の発現量が野生型培養細胞よりも *BSR1*-KO 培養細胞で低いという結果が得られた (Figure 5a, b)。このことは、懸濁培養細胞化や振とう培養といった操作に伴うストレスが *PBZ1* 発現を弱く誘導しており、BSR1 がそれに関与していることを示唆している。

*BSR1* ノックアウトは MAMP に対する防御応答を完全には失わせなかった (Figures 2–5)。このことは、BSR1 と機能的に冗長な他の因子の存在を示して

いる。本論文の内容の発表 (Kanda *et al.* 2017) 以前には、イネ RLCK ノックダウン実験の報告はあったものの、ノックアウトして防御応答を解析した報告はなかった。Figures 2–5 の結果によって、防御応答の誘導におけるイネ RLCK の機能に冗長性があることが初めてノックアウト実験によって示された。BSR1 は RLCK サブファミリーVII に分類されるプロテインキナーゼをコードしている。A. thaliana において、RLCK-VII メンバーは互いに高度な機能的冗長性をもって働く (Rao *et al.* 2018)。イネにおいて、PTI に寄与する RLCK-VII メンバーの報告は数多く存在する (Liang and Zhou, 2018)。OsRLCK57, OsRLCK107, OsRLCK118, OsRLCK176, OsRLCK185 は、キチン・ペプチドグリカン応答性の防御応答を正に制御する (Yamaguchi *et al.* 2013; Ao *et al.* 2014; Li *et al.* 2017)。イネにおいて LPS 認識後の ROS バーストの誘導を担う RLCK の報告は他になく本研究が初である。とはいえ、LPS 受容体/共受容体として機能する OsCERK1 と相互作用する OsRLCK185 や OsRLCK176 が LPS シグナリングにも関わるかもしれない。こういったイネ RLCK-VII メンバーが BSR1 と機能的冗長的に働くと考えられる。

結論として、第 2 章では機能が明らかにならなかった RLCK タンパク質 BSR1 を野生型イネの MAMP 応答機構を構成する因子と位置づけた (Figure 6)。これまでの知見と合わせて、BSR1 が MAMP 認識から初期の防御応答の発動までの間の PTI シグナリングを担うことが示唆された。



**Figure 6.** Proposed model in which BSR1 regulates defense responses, such as ROS bursts, after the perception of MAMPs in wild-type rice. LPS, lipopolysaccharide; RLPs, receptor-like proteins; P, phosphorylation signaling; ROS, reactive oxygen species.



### 第 3 章 *BSR1* 過剰発現が賦与する抵抗性の解析

*BSR1* は、イネ完全長 cDNA を無作為に過剰発現させた約 20000 系統の形質転換シロイヌナズナ (rice FOX *Arabidopsis* lines) に対する病害抵抗性スクリーニングにおいて、強い抵抗性を与える遺伝子の一つとして単離された (Dubouzet *et al.* 2011)。このスクリーニングにおいて他の *RLCK* は病害抵抗性遺伝子としては見出されなかった。また、*RLCK* の機能を解析した報告は数多く存在する一方で、過剰発現時に強力な病害抵抗性を賦与するという報告は *BSR1* 以外にない (Liang and Zhou, 2018)。これらのことは、*BSR1* のように過剰発現時に (転写活性の強い構成的プロモーター下で発現させた場合に) 病害抵抗性を顕著に向上させる *RLCK* は極めて稀であることを示唆している。とはいえ、他の *RLCK* が同様の過剰発現操作を行った場合でも複合病害抵抗性を与えないという実験的な根拠は少なかった。第 3 章では、まず *BSR1* に近縁なイネ・シロイヌナズナホモログを過剰発現させて植物が本来有する病害抵抗性が向上するかどうかを調べることにした。

他に複合病害抵抗性を賦与する *RLCK* の報告がないため、どのようにして *BSR1* がそれを実現するのかについての手がかりはほとんどない。先行研究より、*BSR1* が過剰発現によってもたらす複合病害抵抗性はサリチル酸 (病害抵抗性に寄与する植物ホルモン) にほとんど依存しない (Sugano *et al.* 2018)。このことは、PTI のうちで植物ホルモンを介するような後期の段階ではなく、より早期に誘導される応答が重要であることを示唆している。第 2 章までの解析で、*BSR1* が MAMP を認識した野生型イネにおいて ROS バーストのような (認識後数十分までの間の) ごく初期の防御応答の誘導に関わることを示した。このことから、*BSR1* 過剰発現イネでは ROS バーストが通常より強く誘導される可能性を考えた。第 3 章では、*BSR1* 過剰発現が防御応答にどのような影響を与える

かを解析した。

### 3-1. 方法

#### 3-1-1. 材料

イネの抵抗性検定には、表面殺菌処理を行ってから発芽させた個体を用いた。発芽誘導のために、 $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ハイグロマイシン B 添加 1/2 MS 固体培地上で  $28^{\circ}\text{C}$ 、暗所下に 3 日間おいた。さらに  $28^{\circ}\text{C}$ 、16 h 日長下に 4 日間おき、土に移して温室（自然日長）においた。野生型シロイヌナズナとして Columbia (Col-0) 系統を用いた。シロイヌナズナ種子は、シロイヌナズナ用種子滅菌液 [10% (v/v) 次亜塩素酸ナトリウム, Tween20 少量] 中で 10 min 穏やかに振とうして表面殺菌した。その後、シロイヌナズナ用 1/2 MS 固体培地 [1/2 濃度 ムラシゲ・スカーグ培地用混合塩類, 1%スクロース, 8% phytigel (SIGMA)] 上で発芽させ、土に移して 8 h 日長下で無菌的に生育させた。遺伝子組換えシロイヌナズナの選抜のために必要な場合は、シロイヌナズナ用 1/2 MS 固体培地に  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ハイグロマイシン B を添加した。

#### 3-1-2. クローニングと過剰発現植物の作出

HA-PreScission-Biotin (HPB) タグ化タンパク質発現ベクター構築のために、pMDC32-HPB (Qi and Katagiri, 2009) 上の  $2 \times 35\text{S}$  カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) プロモーターをトウモロコシ *Ubiquitin-1* プロモーターで置き換えたプラスミド pMDC32-Mubi-HPB を用いた。pMDC32-Mubi-HPB は既に、以下のように構築されていた。pRiceFOX-GateA-*SG1* (Nakagawa *et al.* 2012) 上のトウモロコシ *Ubiquitin-1* プロモーターを HindIII と KpnI を用いて切り出した。この DNA 断片と HindIII と KpnI で切断した pMDC32-HPB と

をライゲーション処理することで、 $2 \times 35S$  CaMV プロモーターをトウモロコシ *Ubiquitin-1* プロモーターで置き換えた。

*BSR1* と  *$\beta$ -glucuronidase (GUS)* のオープンリーディングフレームを各々完全長 cDNA (AK070024) と pBI221 (AF502128) から PCR 増幅した。この PCR 産物を、Gateway LR Clonase II Plus Enzyme (Invitrogen) を用いて pMDC32-Mubi-HPB 上にクローニングし、HPB タグ化した *BSR1* と *GUS(BSR1-HPB, GUS-HPB)* を構築した。*BSR1-HPB* または *GUS-HPB* を含むバイナリーベクター pMDC32-Mubi-*BSR1-HPB/GUS-HPB* をアグロバクテリウム法によって日本晴イネカルスに導入した。*BSR1-HPB:OX17 (OX#17)*、*BSR1-HPB:OX39 (OX#39)*、*GUS-HPB:OX6 (GUS)* がそれぞれ 2 系統の *BSR1* 過剰発現系統とコントロール系統として用いられた。

Os06g0714900 (*BSR1-LIKE*) 過剰発現イネの作出のために、FAIS (国際科学振興財団) ライブラリーの完全長 cDNA (FAIS ライブラリー001-118-F01) を過剰発現ベクター pRiceFOX (Nakamura *et al.* 2007) の SfiI サイト上にクローニングした。このバイナリーベクターをアグロバクテリウム法によって日本晴イネカルスに導入した。

シロイヌナズナで過剰発現させる At5g47070 (*PBL19*) の完全長 cDNA として、Col-0 植物体から抽出した RNA を鋳型として PrimeScript RT reagent Kit (タカラバイオ) による逆転写反応によって合成した cDNA を用いた。この cDNA から PCR によって At5g47070 オープンリーディングフレームを増幅し、シロイヌナズナ過剰発現ベクター pBIG2113SF の 35S CaMV プロモーター下流に導入した。このバイナリーベクターベクターをアグロバクテリウム *R. radiobacter* GV3101 に導入し、先行研究に従ってフローラルディップ法によってシロイヌナズナの形質転換を行った (Dubouzet *et al.* 2011)。T<sub>1</sub> 種子を 10  $\mu$ g

mL<sup>-1</sup> ハイグロマイシン B 添加シロイヌナズナ用 1/2 MS 固体培地に播種し、形質転換を選抜した。

### 3-1-3. 病害抵抗性検定

微生物の培養と接種は、以下の既に報告されている方法に従って行った (Maeda *et al.* 2017; Dubouzet *et al.* 2011)。イネいもち病抵抗性検定のために、28 °C、自然日長の温室で生育させた 5.5–6.0 葉齢のイネを使用した。オートミール培地 (3% oatmeal, 0.5% sucrose, 1.6% bacto agar) 上で誘導したイネいもち病菌分生子を 0.01% Tween 20 水溶液中でかきとり、血球計算盤を用いて分生子濃度を測定した。分生子懸濁液を適当な濃度 ( $1.0\text{--}5.0 \times 10^5$  conidia mL<sup>-1</sup>) になるよう 0.01% Tween 20 水溶液で希釈した。抵抗性を検定するイネ 1 個体あたり分生子懸濁液 1 mL を噴霧し、湿度 100%、26 °C、暗所下に 20 h おいた。もとの温室に数日間おき、接種時に最も若かった葉と次に若かった葉に生じた病斑数を計数した。

イネごま葉枯病抵抗性検定のために、28 °C、自然日長の温室で生育させた 6.5–7.0 葉齢のイネを使用した。V8 培地 [20% V8 juice (Campbell soup company), 0.3% CaCO<sub>3</sub>, 1.5% bacto agar] 上で誘導した分生子を 0.01% Tween 20 水溶液中でかきとり、血球計算盤を用いて分生子濃度を測定した。分生子懸濁液を適当な濃度 ( $5.0 \times 10^3$  conidia mL<sup>-1</sup>) になるよう 0.01% Tween 20 水溶液で希釈した。イネ 1 個体あたり分生子懸濁液 2 mL を噴霧し、湿度 100%、26 °C、暗所下に 20 h おいた。もとの温室に 5 日間おき、第 7 葉に生じた病斑数を計数すると共に葉を撮影した。

イネ白葉枯病抵抗性検定のために、28 °C、自然日長の温室で生育させた発芽後 2 か月程度のイネを使用した。イネ白葉枯病菌を PSA 培地 (1% peptone, 1%

sucrose, 1.5% agar) からかきとり、ミリ Q 水に懸濁した。この細菌懸濁液を適当な濃度 ( $OD_{600} = 0.3$ ) となるように希釈した。各個体の最も若い葉 (top leaf) と次に若い葉 (second leaf) について、細菌懸濁液に浸漬したはさみで先端付近を切断した。さらに、切断面から 5 mm 程度までを細菌懸濁液に沈めた。湿度 100%、26 °C、暗所下に 20 h おいた。もとの温室に 2 週間程度おいた後、接種した葉について接種位置からの病斑長を測定すると共に撮影した。

シロイヌナズナのトマト斑葉細菌病菌 *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst*) に対する抵抗性検定のために、23 °C、9 h 日長で生育させた発芽後 5 週間の無菌的に生育させたシロイヌナズナを使用した。シロイヌナズナ植物体全体を接種液 ( $10^7$  cfu mL<sup>-1</sup> *Pst*, 0.05% Silwet L-77, 10 mM MgCl<sub>2</sub>) に 30 s 浸漬した。23 °C、暗所に 24 h 置いた後、もとの生育条件に戻した。さらに 2 日間おいた後、サンプリングとコロニーカウントを行って *Pst* の増殖を評価した。

#### 3-1-4. ウェスタン解析

ウェスタン解析用のタンパク質サンプルは、既に報告された方法に従って液体窒素中で凍結粉碎した葉身 50 mg から SDS-urea バッファー [8 M urea, 5% SDS, 0.1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 2% 2-mercaptoethanol, 1 mM Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 2 × complete inhibitor mix, EDTA-free (Roche), 40 mM Tris-HCl (pH 6.8)] 300 μL で抽出して調製した (Matsushita *et al.* 2013)。等量のサンプルを 10%アクリルアミドゲル上での SDS-PAGE で展開した。polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜上に転写された HPB タグ化タンパク質の染色には、抗 HA 抗体 (Anti-HA.11, Mouse-Mono 16B12; BAB) を用いた。その後 Amersham ECL Prime (GE ヘルスケア) で検出操作を行い、ルミノイメージアナライザーLAS-3000 (富士フイルム) を用い

て化学発光を撮影した。同時に、マーカーのバンドパターンを可視光下で撮影した。

### 3-1-5. *BSR1* 相同遺伝子の探索

*BSR1* (J023038G05) のアミノ酸配列は、KOME データベース (<http://cdna01.dna.affrc.go.jp/cDNA/>) より得た。この *BSR1* のアミノ酸配列と相同性の高いタンパク質をコードする遺伝子を National Center for Biotechnology Information (NCBI) の Protein BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) を用いて、イネとシロイヌナズナから探索した。

### 3-1-6. リーフストリップを用いた ROS 定量

リーフストリップを作製する材料として、GUS-HPB:OX 系統と *BSR1*-HPB:OX#17 系統の葉齢 6.0–6.5 の個体の 6 葉を用いた。幅 6 mm × 長さ 8 mm の葉片を約 0.5 mm の幅で細く切ってリーフストリップとした。1 ウェルにつき異なる個体由来の 2 葉片からリーフストリップを作製し、12-well プレートに入れた滅菌水 1 mL に浮かべた。このリーフストリップを 28°C、明所で 90 rpm で一晩振とう培養した。新たな滅菌水 1 mL におきかえた後同様に 1 h 培養し、測定に用いた。イネいもち病菌分生子を滅菌水中で培地からかき取り、キムワイプで濾した。通過した懸濁液中の分生子濃度を血球計算盤で測定した。目的の終濃度になる分生子懸濁液をリーフストリップを浮かべた水に添加し、28°C で同様に培養しながら水中の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 濃度をルミノール化学発光法によって測定した。測定は、添加前と添加後 60, 180, 300 min で行った。過剰発現培養細胞に対するキチン処理は、終濃度 10 nM で行った。

## 3-2. 結果

### 3-2-1. BSR1 パラログの過剰発現は病害抵抗性を向上させない

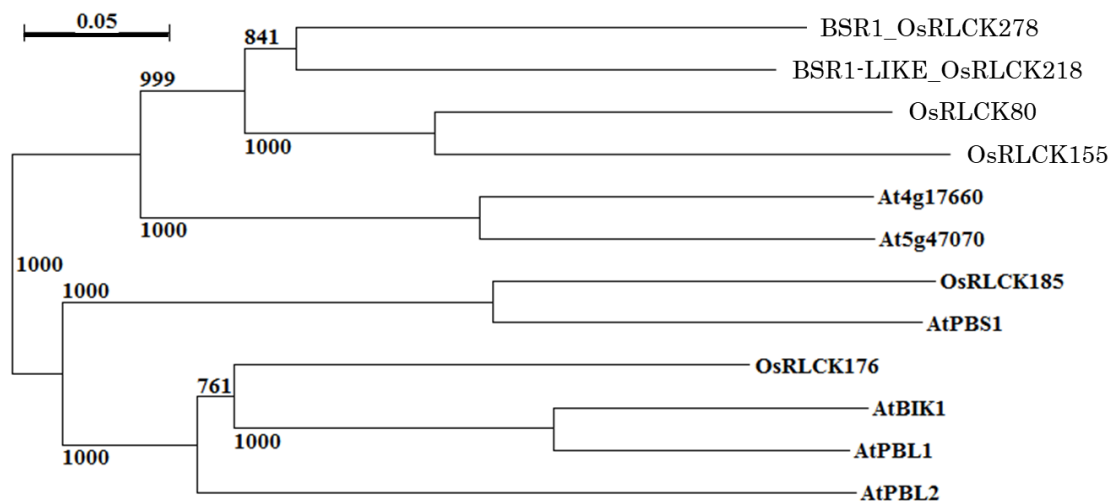
BSR1 以外の RLCK が抵抗性を賦与するかどうかを実験的に調べるために、BSR1 と相同性の高い RLCK を過剰発現させた。BSR1 とアミノ酸配列相同性が高いタンパク質をコードする遺伝子を相同性検索 (BLAST) によって探索した。その結果、イネにおいて最も BSR1 に似た RLCK をコードする遺伝子 Os06g0714900 (*OsRLCK218*, *BSR1-LIKE*) を見出した。この遺伝子は機能解析がなされていなかった。また、シロイヌナズナにおいて最も BSR1 に似た RLCK をコードする遺伝子 At5g47070 (*PBL19*; Dubouzet *et al.* 2011) を見出した。BSR1 と近縁なイネホモログ 3 遺伝子およびシロイヌナズナホモログ 2 遺伝子に、代表的な RLCK を加え、系統樹を作製した (Figure 7)。

イネとシロイヌナズナにおいて最も近縁と推定された上記 2 遺伝子の過剰発現体を作成し、既に *BSR1* 過剰発現が抵抗性を賦与する報告のある病害に対する抵抗性を検定した。

初めに、日本晴 (WT) を原品種として *BSR1-LIKE* 過剰発現イネ (*BSR1-LIKEox*) を複数系統作出した。WT 系統、*BSR1-LIKEox#2* 系統、*BSR1-LIKEox#13* 系統に加え、同じく pRiceFOX ベクターによって *BSR1* を過剰発現させた系統 (*BSR1ox#5*; Dubouzet *et al.* 2011) のイネを抵抗性検定に用いる場合と同様に生育させ、RNA を抽出した。qRT-PCR 行って *BSR1-LIKEox#2* 系統、*BSR1-LIKEox#13* 系統において *BSR1-LIKE* が過剰発現されていることを確認した (Figure 8a)。

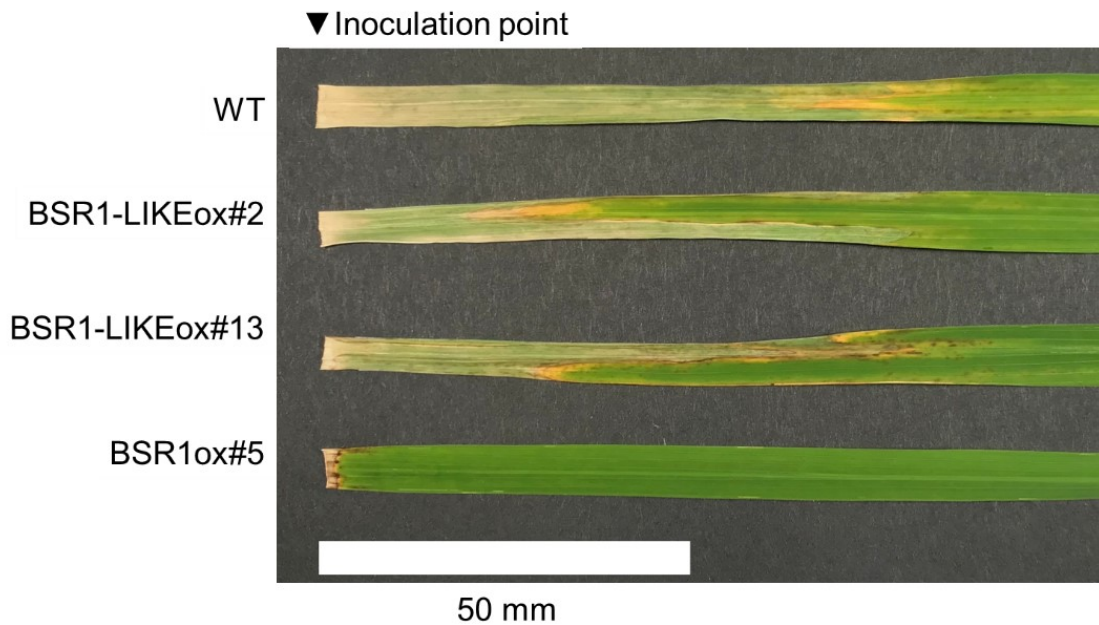
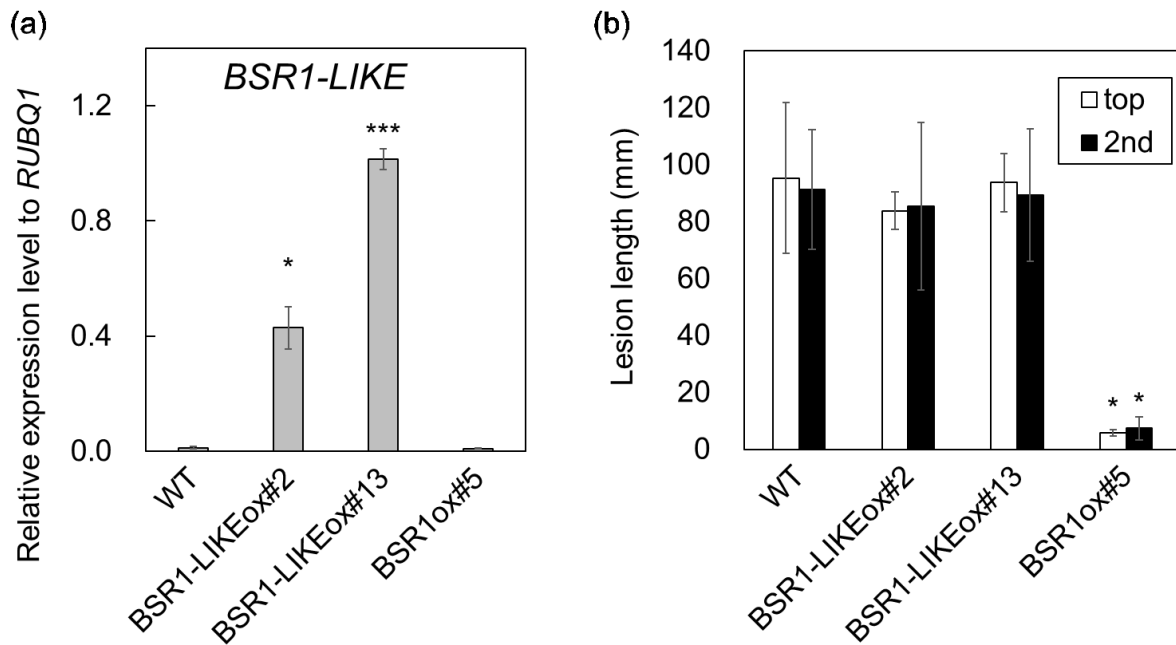
これらの系統のイネ白葉枯病 (細菌病) 抵抗性を解析した。各個体の最も若い葉と次に若い葉の先端付近に対してイネ白葉枯病菌を創傷部接種し、2 週間後の病斑長を測定した。イネ白葉枯病の病斑の進展は、*BSR1* 過剰発現系統上では日

本晴に比べて大きく抑制された (Figure 8b)。一方で、*BSR1-LIKE<sub>ox</sub>* は日本晴と同程度のイネ白葉枯病感受性を示した。この結果は、*BSR1-LIKE* の過剰発現は強力なイネ白葉枯病菌抵抗性を付与することはないことを示している。



**Figure 7.** Phylogenetic analysis of some representative RLCKs. Amino acid sequences of RLCKs shown in the tree were aligned by ClustalW 2.1 web tool. The phylogenetic tree was generated by the neighbor-joining method. The bar represents 0.05 amino acid substitutions per site. PBS1, AVRPPHB Susceptible1; BIK1, Botrytis-Induced Kinase 1; PBL1, PBS1-Like 1; PBL2, PBS1-Like 2 (Liang and Zhou, 2018).

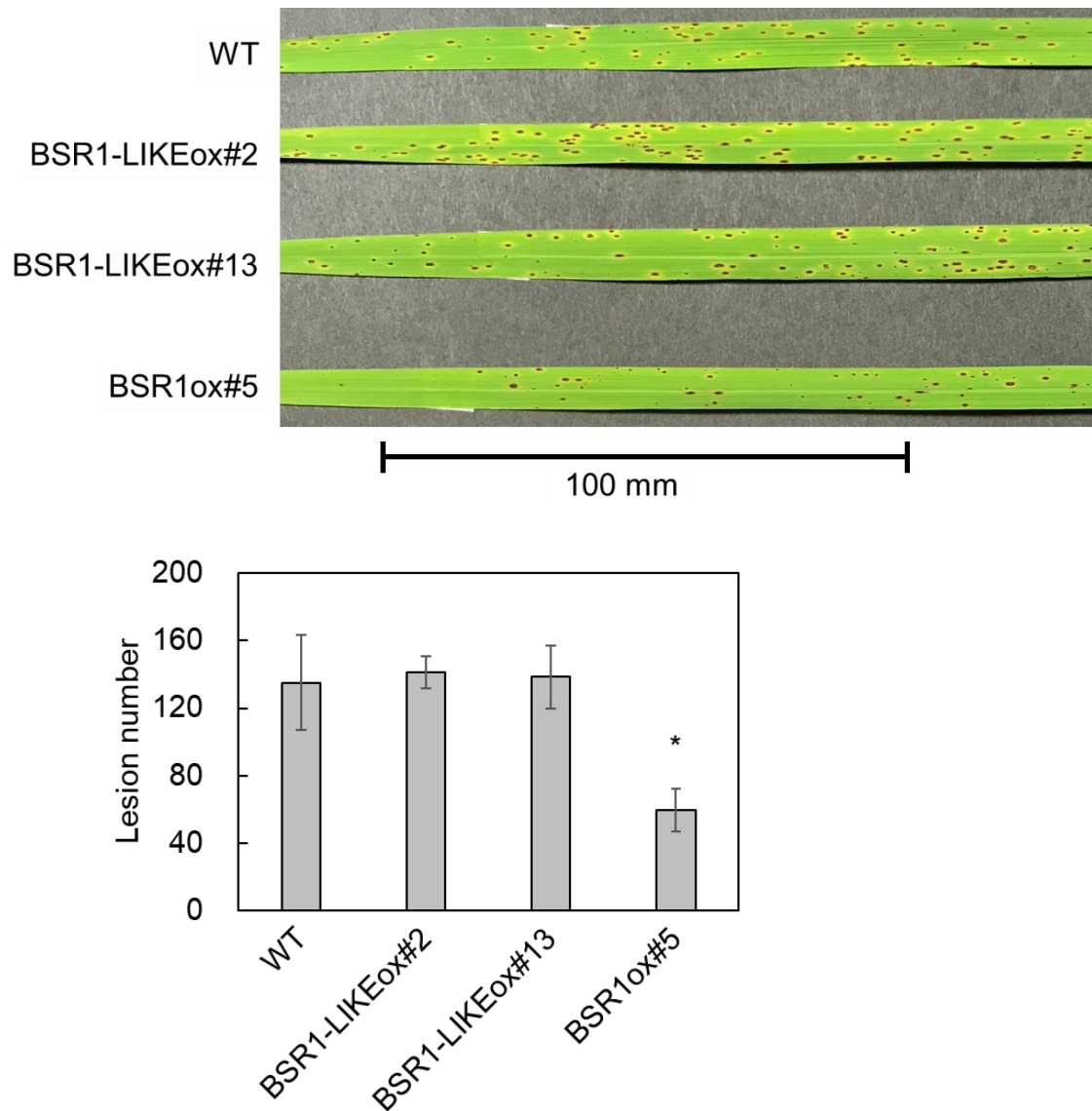




**Figure 8.** *BSR1-LIKE* overexpression did not confer resistance to *X. oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*). (a) Transcript levels of *BSR1-LIKE* in two overexpressing lines. The transcript levels were normalized against the *RUBQ1* internal control levels. Values are presented as the means  $\pm$  standard deviations of three biological replicates. \* $p < 0.05$  and \*\*\* $p < 0.001$  compared with WT (Student's *t*-test). (b) The top leaf and second leaf of *BSR1*- or *BSR1-LIKE*-overexpressing plants

were cut and inoculated with *Xoo* isolate T7174 (race I). Lesion length were measured 2 weeks after inoculation. Values are presented as the means  $\pm$  standard deviations (n = 6, 7, 11, and 3 for WT, *BSR1-LIKE*<sub>ox#2</sub>, *BSR1-LIKE*<sub>ox#13</sub>, and *BSR1*<sub>ox#5</sub>, respectively). Experiments were conducted twice with similar results. Asterisks indicate significant differences between the values of WT and those of other lines (Dunnett's test; \**p* < 0.05). WT, wild-type; ox, overexpressing line; top, top leaf; 2nd, second leaf.

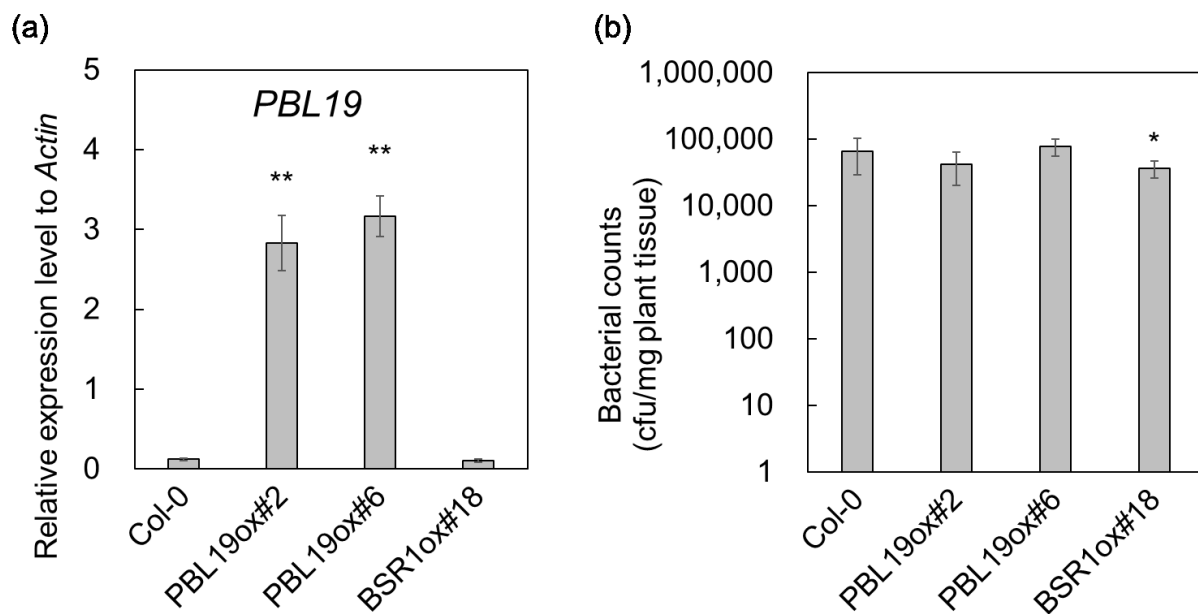
同じ系統を用いて噴霧接種によるイネごま葉枯病（糸状菌病）抵抗性検定を行った。接種時に最も若かった葉身に現れた罹病性病斑数をカウントした。*BSR1* 過剰発現が病斑形成を顕著に抑制したのに対して、*BSR1-LIKE* 過剰発現は有意な影響を与えなかった (Figure 9)。以上より、*BSR1-LIKE* は同じベクター系を用いて同様に過剰発現させた場合でも *BSR1* と異なり細菌病・糸状菌病に対する抵抗性を向上させないことが明らかになった。



**Figure 9.** *BSR1-LIKE* overexpression did not confer resistance to *C. miyabeanus*. *BSR1*- or *BSR1-LIKE*-overexpressing plants in 6.5–7.0 leaf-stage were inoculated with *C. miyabeanus*. Lesion numbers on seventh leaves were counted at 5 days after inoculation. Values are presented as the means  $\pm$  standard deviations (n = 9, 3, 5, and 5 for WT, *BSR1-LIKEox#2*, *BSR1-LIKEox#13*, and *BSR1ox#5*, respectively). Asterisks indicate significant differences between the values of WT and those of other lines (Dunnett's test; \* $p < 0.05$ ). WT, wild-type; ox, overexpressing line.

### 3-2-2. シロイヌナズナ *BSR1* オルソルグは病害抵抗性を賦与しない

シロイヌナズナにおいて *BSR1* と最も近縁であると推定された *PBL19* を野生型シロイヌナズナ Col-0 において過剰発現させた。*PBL19* 過剰発現系統と、既に作出されていた *BSR1* 過剰発現系統 (*BSR1ox#18*; Dubouzet *et al.* 2011) のトマト斑葉細菌病菌に対する抵抗性検定を行った。このとき、同様に生育させた個体から RNA を抽出し、検定に用いる *PBL19* 過剰発現シロイヌナズナ (*PBL19ox#2*, #6) において *PBL19* が正常に過剰発現されていることを確認した (Figure 10a)。無菌的に生育させた植物体全体を細菌懸濁液につけて接種し、3 日後にコロニーカウント法によって細菌の増殖を定量した。ただし、見かけ上は病徴がみられない条件で行った。先行研究と一致して、トマト斑葉細菌病菌の増殖は *BSR1* 過剰発現によって有意に抑制された (Figure 10b)。これに対して *PBL19* 過剰発現系統では野生型系統と同程度の増殖がみられた。したがって、*PBL19* を過剰発現させたとしても、*BSR1* ほど強力な病害抵抗性は生じないことが示唆された。イネとシロイヌナズナにおいて *BSR1* と最も近縁な *RLCK* をコードする遺伝子が *BSR1* と異なって病害抵抗性を向上させなかったことから、過剰発現時に強力な複合病害抵抗性を生じる性質は *BSR1* に特異的であることが強く示唆された。

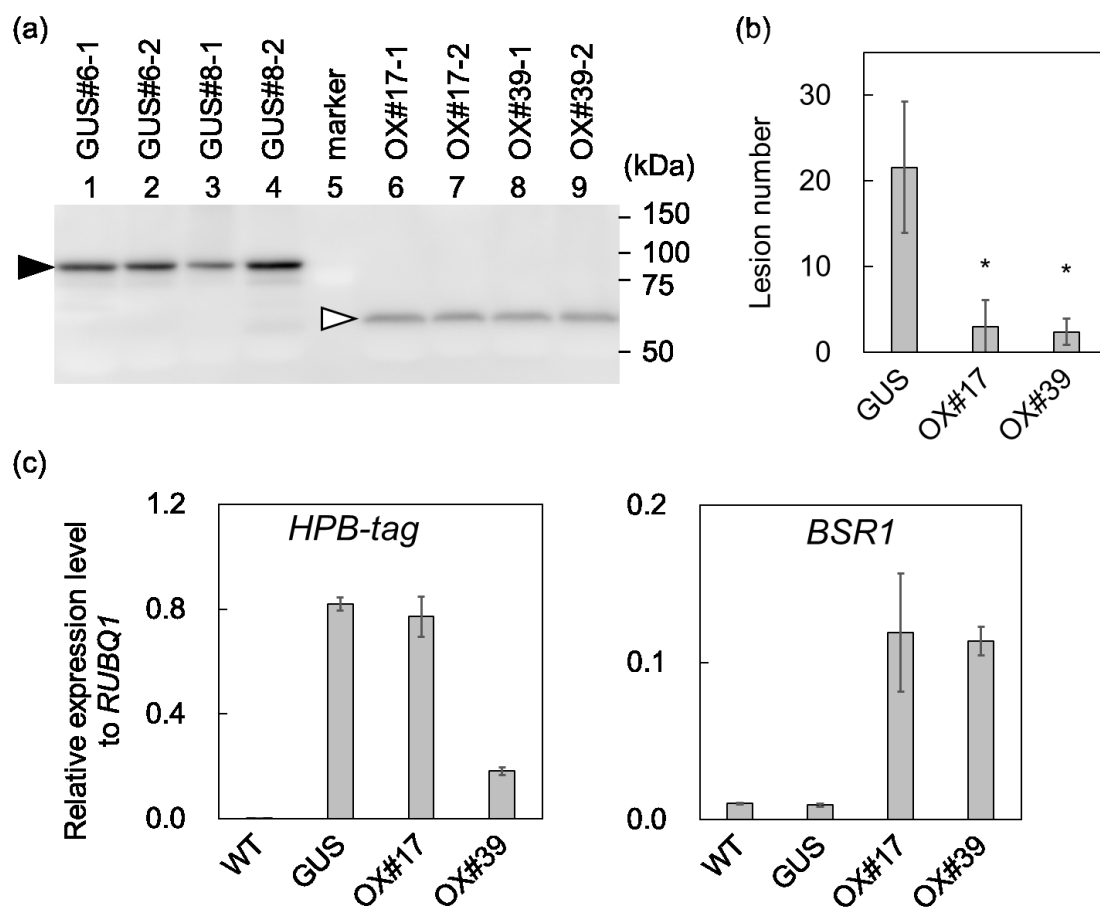


**Figure 10.** *PBL19* overexpression did not confer resistance to *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst*) in *A. thaliana*. (a) Transcript levels of *PBL19* in two overexpressing lines. The transcript levels were normalized against the *Actin2* internal control levels. Values are presented as the means  $\pm$  standard deviations of three biological replicates. \*\* $p < 0.01$  compared with Col-0 (Student's *t*-test). (b) Bacterial counts after *Pst* inoculation. Five-week old *BSR1*- or *PBL19*-overexpressing plants were inoculated with *Pst* by dipping in a bacterial suspension ( $10^7$  cfu mL<sup>-1</sup>). The numbers of bacteria in plant tissue were counted at 3 days after inoculation. Values are presented as the means  $\pm$  standard deviations ( $n = 7$ ). Asterisks indicate significant differences between the values of Col-0 and those of other lines (Dunnett's test; \* $p < 0.05$ ). cfu, colony forming unit; ox, overexpressing line.

### 3-2-3. タグ化 *BSR1* 過剰発現系統の作出

*BSR1* 過剰発現が防御応答に与える影響を解析するために、HPB タグ化した *BSR1* (*BSR1-HPB*) を過剰発現するイネを作出した。コントロール系統として、HPB タグ化した *GUS* (*GUS-HPB*) 過剰発現イネを作出した。導入した HPB タグ化タンパク質の正常な発現を、T<sub>1</sub> 個体でのウェスタン解析によって確認した (Figure 11a)。タグ化 *BSR1* が機能的であるかどうかを確認するために、*BSR1-HPB* および *GUS-HPB* の過剰発現イネのいもち病抵抗性を比較した (Figure 11b)。その結果、*BSR1-HPB* 過剰発現系統 (*BSR1-HPB-OX*) は *GUS-HPB* 過剰発現系統 (*GUS-HPB-OX*) より高いイネいもち病抵抗性を示した。このことは *BSR1-HPB* が機能的であることを示している。

第 2 章の実験と同様の方法で、*GUS-HPB-OX* と 2 系統の *BSR1-HPB-OX* から同時に懸濁培養細胞を誘導した。懸濁培養細胞から RNA 抽出し、*BSR1* コード領域上のプライマーセットと HPB タグ上のプライマーセットを用いた qRT-PCR 法を行って導入遺伝子の過剰発現を確認した (Figure 11c)。これらの培養細胞が以降の防御応答の解析実験に用いられた。



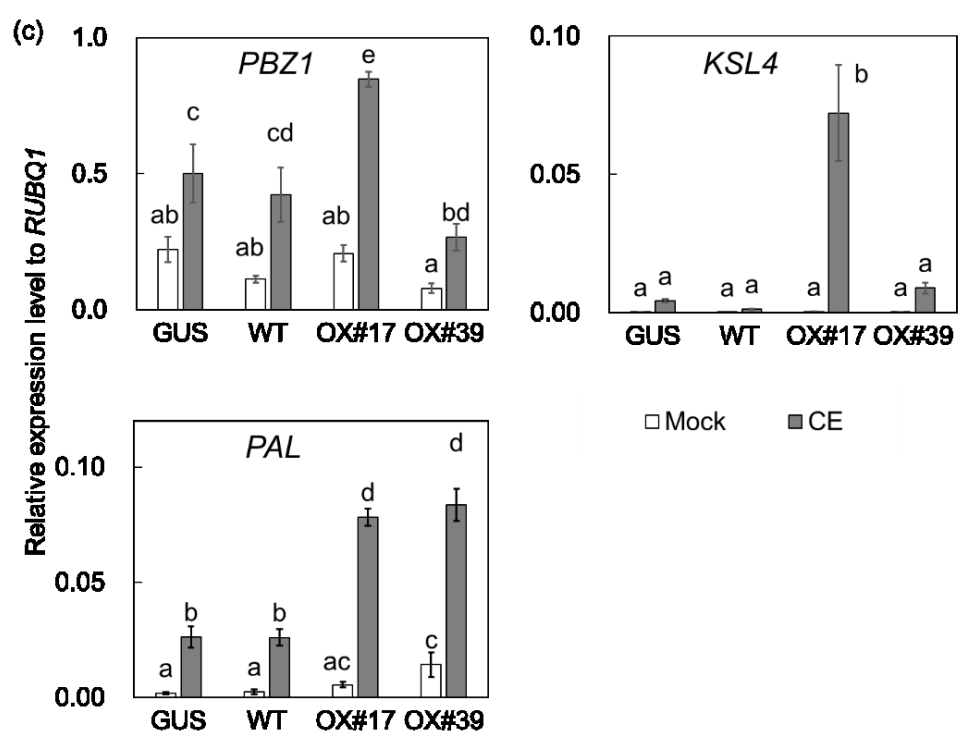
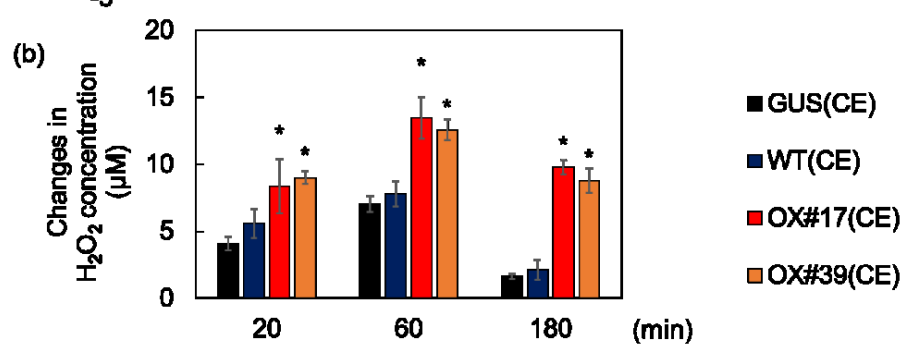
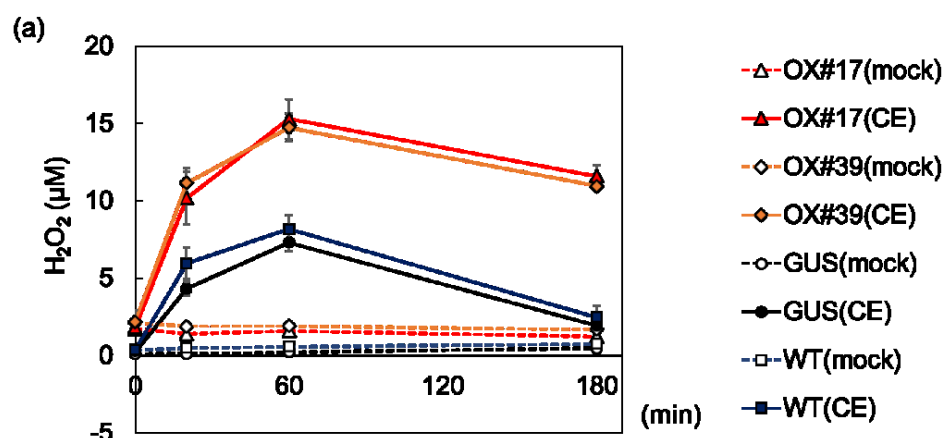
**Figure 11.** Preparation of rice lines overexpressing HPB-tagged proteins. (a) BSR1-HPB and GUS-HPB were detected at the predicted molecular sizes in western analyses of T<sub>1</sub> plants. Black arrowhead, GUS-HPB (81.9 kDa); White arrowhead, BSR1-HPB (58.2 kDa). (b) The overexpression of *BSR1-HPB* conferred resistance to rice blast.  $5.8 \times 10^5$  ml<sup>-1</sup> suspension of conidia was sprayed onto plants at the 5.5–6.0 leaf stage. The number of compatible lesions on the 6th leaf blades of each plant was calculated at 5 days after inoculation. Values are presented as the means  $\pm$  standard deviations (n = 5). Asterisks indicate significant differences between the values of wild-type and other lines (Dunnett's test; \* $p < 0.05$ ). (c) Transcript levels of HPB-tagged transgenes and *BSR1* in suspension-cultured rice cells as assessed by qRT-PCR. Transcript levels were normalized against the *RUBQ1* internal control levels. Values are presented as the means  $\pm$  standard deviations of three

biological replicates. OX, *BSR1-HPB* overexpressing line; GUS, *GUS-HPB* overexpressing line; WT, wild-type.

#### 3-2-4. *BSR1* 過剰発現は MAMPs 応答性 ROS バーストを亢進させる

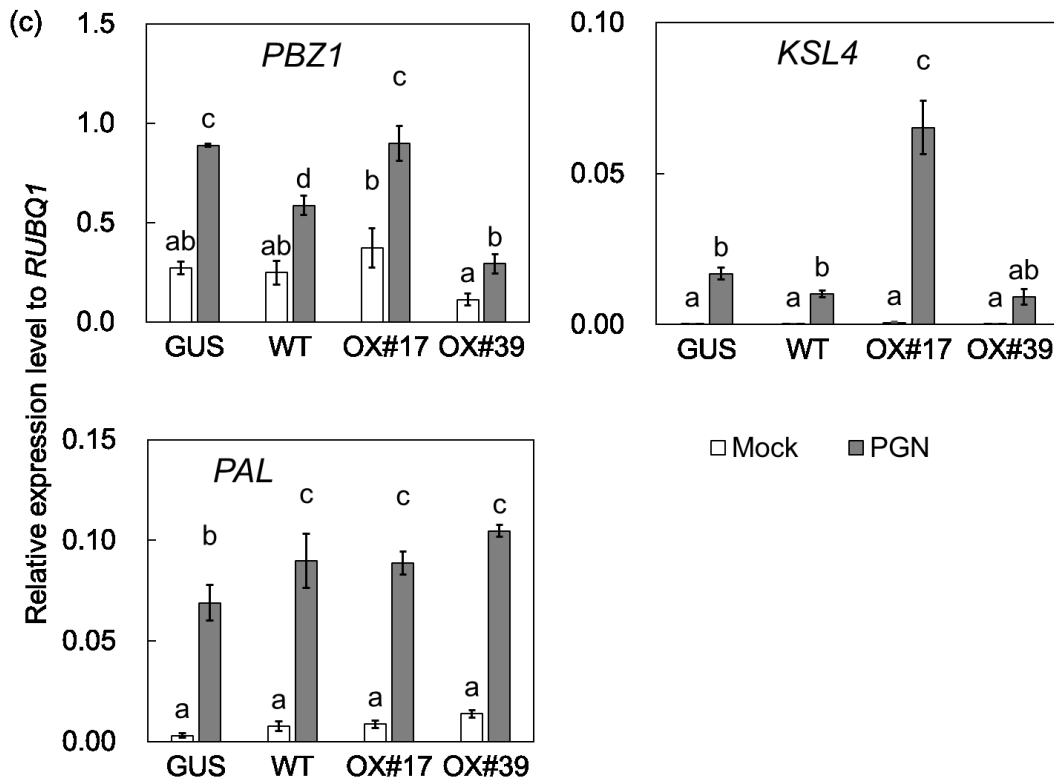
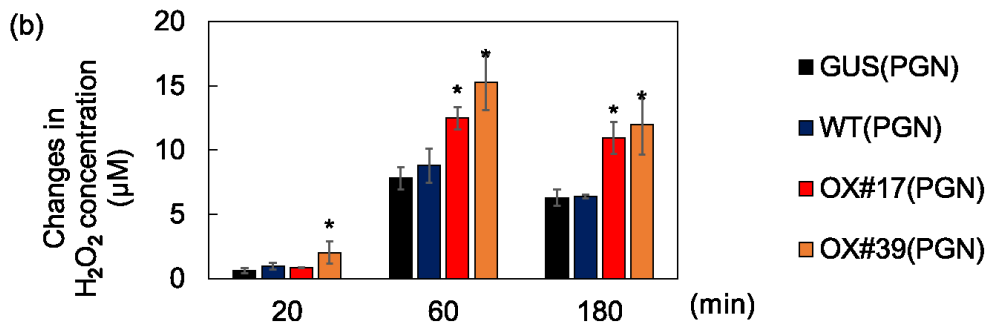
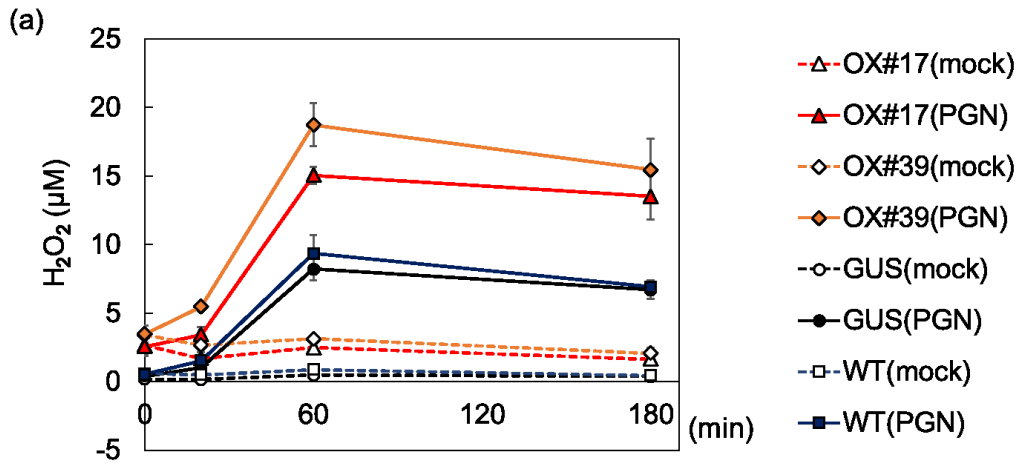
*BSR1* 過剰発現が初期の防御応答である ROS バーストに影響を与えるかどうか調べるために、懸濁培養細胞をキチンで処理した。キチン処理に応答して、2 系統の *BSR1-HPB* OX 培養細胞 (OX#17, OX#39) はコントロール系統 (GUS) と比べてより高い濃度の  $H_2O_2$  を産生した (Figure 12a)。処理後 60 min の時点で、OX 培養細胞の培養系内の  $H_2O_2$  濃度は、コントロール系統の 1.8–1.9 倍であった。また、MAMP 未処理の時点 (0 min) の  $H_2O_2$  濃度を比較すると、GUS 培養細胞より OX 培養細胞においてわずかに高かった (Figure 12a)。未処理時点の 2 系統の OX 培養細胞と GUS 培養細胞の間で比較したところ、その差は両系統について有意であった ( $p < 0.001$ , Student's *t*-test)。この結果を考えに入れて、サンプルごとに各時点で測定された  $H_2O_2$  濃度から未処理時点の  $H_2O_2$  濃度を引くことで、測定中に産生された分の  $H_2O_2$  濃度を算出した (Figure 12b)。この算出値において、2 系統の OX 培養細胞は GUS 培養細胞より多く  $H_2O_2$  を産生した。キチン処理 3 h 時点の防御関連遺伝子の転写産物レベルを定量したところ、*KSL4* と *PBZ1* では再現性のある有意差は認められなかった。一方で *BSR1* 過剰発現は *PAL1* のキチン応答性の転写活性化を亢進させた (Figure 12c)。



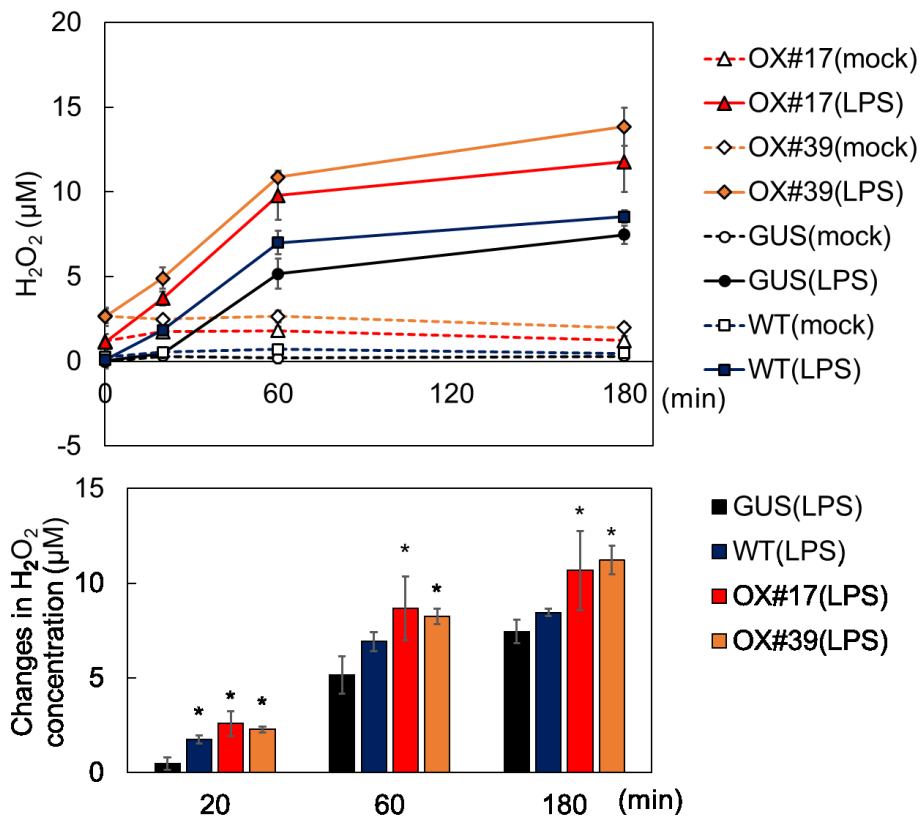


**Figure 12.** The overexpression of *BSR1-HPB* enhanced chitin-induced defense responses in suspension-cultured rice cells. Cells treated with chitin were analyzed for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production accompanying ROS bursts (**a**, **b**) and the transcript levels of defense-related genes (**c**). Values are presented as the means  $\pm$  standard deviations of three biological replicates. (**a**) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations were measured before treatment and at 20, 60, and 180 min after treatment. (**b**) The amount of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> that was produced in a culturing tube during the experiment was calculated by subtracting the concentration at 0 min from that at the indicated times. Experiments were conducted three times with similar results. Asterisks indicate significant differences between the values of GUS and those of other lines under the same conditions (Dunnett's test; \* $p < 0.05$ ). (**c**) The *PBZ1*, *PAL1*, and *KSL4* transcript levels were normalized against the *RUBQ1* internal control levels. Experiments were conducted twice with similar results. Different letters indicate significant differences (Tukey's test;  $p < 0.05$ ). CE, chitin elicitor; OX, *BSR1-HPB*-overexpressing line; GUS, *GUS-HPB*-overexpressing line; WT, wild-type.

続いて、キチン以外の MAMP を認識した際の防御応答もまた *BSR1* 過剰発現によって亢進するかどうか検証した。ペプチドグリカン (PGN) 処理下で、2 系統の OX 培養細胞はコントロール系統と比較してより急激に  $H_2O_2$  を産生した (Figure 13a, b)。60 min の時点で、OX 系統の細胞培養系の  $H_2O_2$  濃度は、コントロール系統の 1.6–2.0 倍であった。遺伝子発現解析を行ったところ、*BSR1* 過剰発現はペプチドグリカン処理 3 h 時点の *KSL4* と *PBZ1* の発現には再現性ある効果を示さなかったが、*PAL1* の転写活性化を亢進させた (Figure 13c)。OX 培養細胞は、LPS 処理下においても同様にコントロール系統より強い ROS バーストを起こした (Figure 14)。ここまでの *BSR1*-HPB と *GUS*-HPB の間の比較によって、*BSR1* 過剰発現が様々な MAMP に対する応答下で ROS バーストとそれに続く (少なくとも *PAL1* を含む) 防御関連遺伝子の転写活性化を亢進させることが明らかになった。

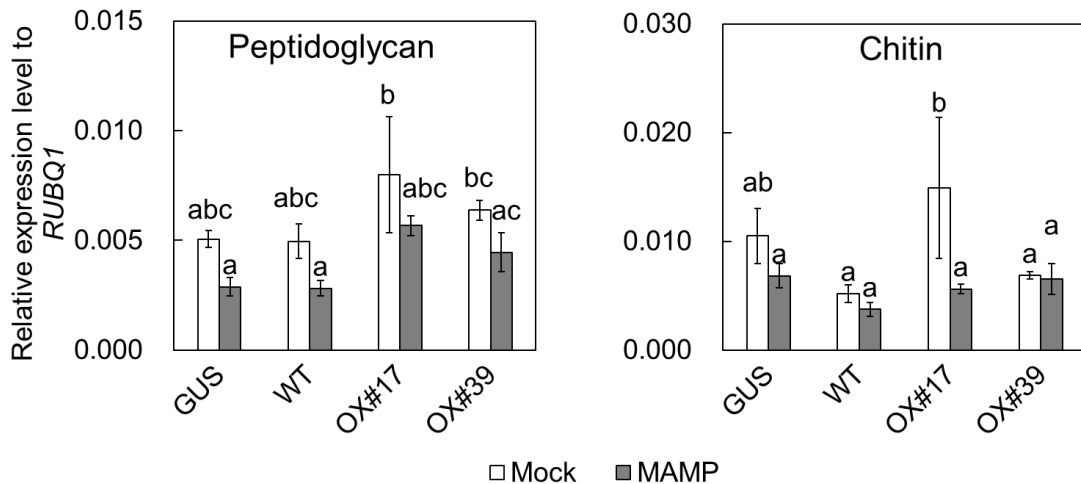


**Figure 13.** The overexpression of *BSR1-HPB* enhanced peptidoglycan-induced defense responses in suspension-cultured rice cells. Cells treated with peptidoglycan were analyzed for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production accompanying ROS bursts (**a, b**) and the transcript levels of defense-related genes (**c**). Values are presented as the means  $\pm$  standard deviations of three biological replicates. (**a**) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations were measured before treatment and at 20, 60, and 180 min after treatment. (**b**) The amount of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> that was produced in a culturing tube during the experiment was calculated by subtracting the concentration at 0 min from that at the indicated times. Experiments were conducted three times with similar results. Experiments were conducted three times with similar results. Asterisks indicate significant differences between the values of GUS and those of other lines under the same conditions (Dunnett's test; \* $p < 0.05$ ). (**c**) the *PBZ1*, *PAL1*, and *KSL4* transcript levels were normalized against the *RUBQ1* internal control levels. Experiments were conducted two times with similar results. Different letters indicate significant differences (Tukey's test;  $p < 0.05$ ). PGN, peptidoglycan; OX, *BSR1-HPB*-overexpressing line; GUS, *GUS-HPB*-overexpressing line; WT, wild-type.



**Figure 14.** The overexpression of *BSR1-HPB* enhanced LPS-induced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations were measured before treatment and at 20, 60, and 180 min after treatment (**upper panel**). The amount of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> that was produced in a culturing tube during the experiment was calculated by subtracting the concentration at 0 min from that at the indicated times (**lower panel**). Values are presented as the means  $\pm$  standard deviations of three biological replicates. Asterisks indicate significant differences between the values of GUS-HPB:OX and those of other lines under the same conditions (Dunnett's test; \* $p < 0.05$ ). LPS, lipopolysaccharide; OX, *BSR1-HPB*-overexpressing line; GUS, *GUS-HPB*-overexpressing line; WT, wild-type.

MAMP 未処理時点で BSR1-HPB:OX 細胞培養系でコントロール系統よりわずかながら高い濃度の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> が検出されるという結果は、どの実験でも共通していた (Figure 12–14)。その原因として、*BSR1* 過剰発現が MAMP 非依存的にイネ NADPH オキシダーゼの発現量を増加させる可能性を考えた。イネの防御応答において RLCK によって制御されると考えられている NADPH オキシダーゼをコードする *OsRBOHB* の転写産物レベルを定量したが、mock 処理下でコントロール培養細胞と OX 培養細胞の間に有意な差は認められなかった (Figure 15)。この結果は、過剰な BSR1 が RBOH タンパク質の恒常的な発現上昇をもたらすことはないことと、ROS が恒常的に産生された原因は他にあることを示唆している。

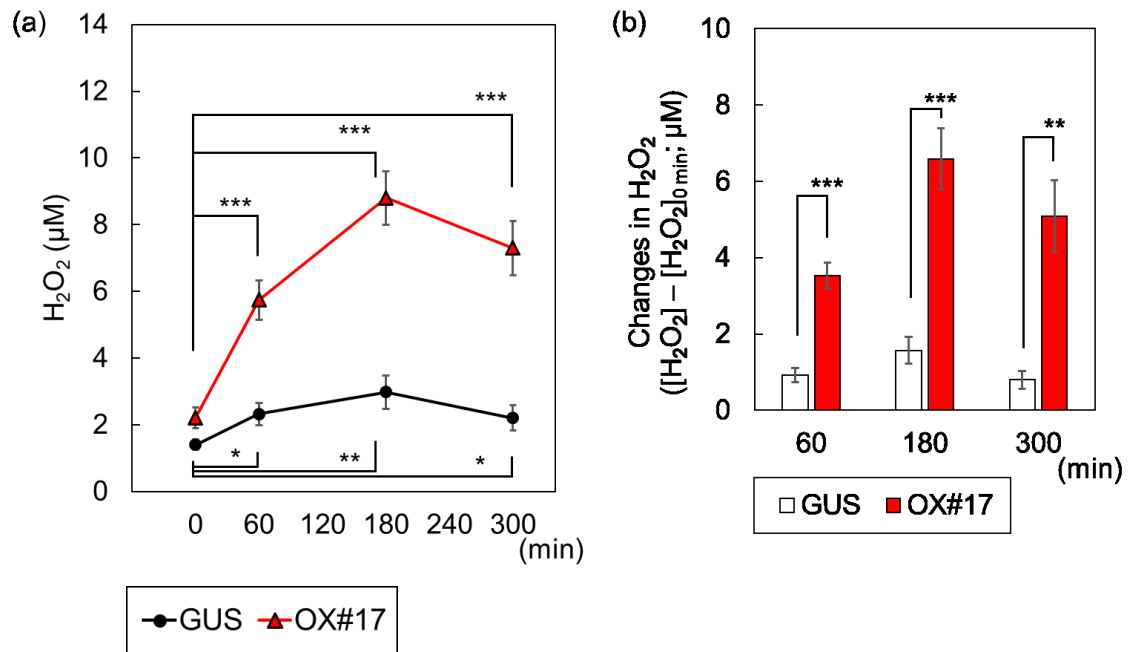


**Figure 15.** Transcript levels of *RBOHB* in *BSR1-HPB*-overexpressing suspension-cultured rice cells. The transcript levels at 3-h post treatment with peptidoglycan and chitin were normalized against the *RUBQ1* internal control levels. Values are presented as the means  $\pm$  standard deviations of three biological replicates. Different letters indicate significant differences (Tukey's test;  $p < 0.05$ ). OX, *BSR1-HPB*-overexpressing line; GUS, *GUS-HPB*-overexpressing line; WT, wild-type.

### 3-2-5. *BSR1* 過剰発現は植物体においても MAMP 応答を促進する

培養細胞で観察された結果と同様に、*BSR1* を過剰発現するイネ植物体が病原体の感染に対して通常より強い ROS バーストを起こすのではないかと考えた。まずイネの植物体において ROS バーストの亢進が起きるかどうか調べるために、細く切った葉身（リーフストリップ）を用いた ROS 定量実験を行った。リーフストリップを水に浮かべた状態で MAMP（オートクレーブしたイネいもち病菌分生子）で処理し、水中に放出された  $H_2O_2$  濃度を経時的に測定した。未処理の状態、*BSR1*-HPB:OX 系統のリーフストリップ培養系の  $H_2O_2$  濃度は、コントロール系統のものよりわずかながら有意に高かった (Figure 16a)。MAMP 処理後、どちらの系統でも有意な  $H_2O_2$  濃度の上昇が認められた。OX 系統由来のリーフストリップはコントロール系統と比較してはるかに高い濃度の  $H_2O_2$  を産生した。処理後 180 min の時点で、*BSR1*-HPB の過剰発現は  $H_2O_2$  産生を約 4.2 倍にまで増加させた (Figure 16b)。この結果は、培養細胞と同様に葉においても *BSR1* 過剰発現が MAMP 応答性の ROS バーストを亢進させることを示している。



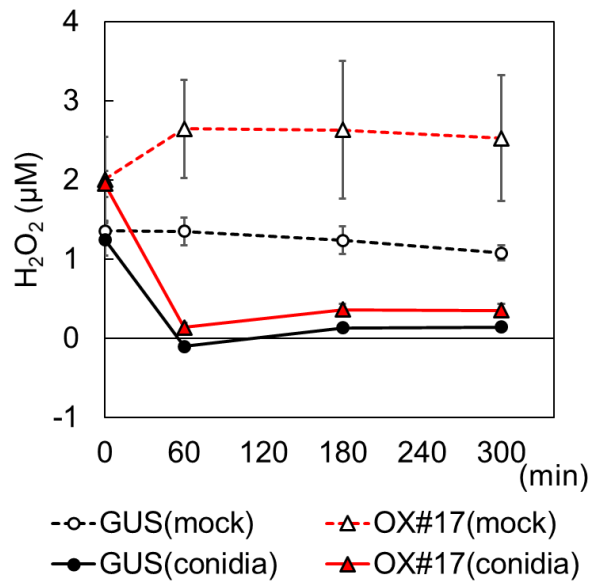


**Figure 16.** Rice leaf strips derived from *BSR1-HPB*-overexpressing plants caused an enhanced burst of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> when exposed to conidia of the compatible blast fungus. Leaf strips were cultivated with  $8 \times 10^4$  mL<sup>-1</sup> autoclaved conidia in wells of a 12-well plate. **(a)** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations before treatment and at 60, 180, and 300 min after treatment. Asterisks indicate significant differences between values at the untreated condition (0 min) and the values at the indicated times in the same line (Student's *t*-test; \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , and \*\*\*  $p < 0.001$ ). **(b)** Changes in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations between the untreated condition (0 min) and the indicated times. The values were calculated by subtracting the concentration at 0 min from those at the indicated times. Asterisks indicate significant differences between GUS leaf strips and OX#17 leaf strips (Student's *t*-test; \*\*  $p < 0.01$  and \*\*\*  $p < 0.001$ ). Values are presented as the means  $\pm$  standard deviations of three biological replicates. Experiments were conducted twice with similar results. OX#17, *BSR1-HPB*-overexpressing line #17; GUS, *GUS-HPB*-overexpressing line.

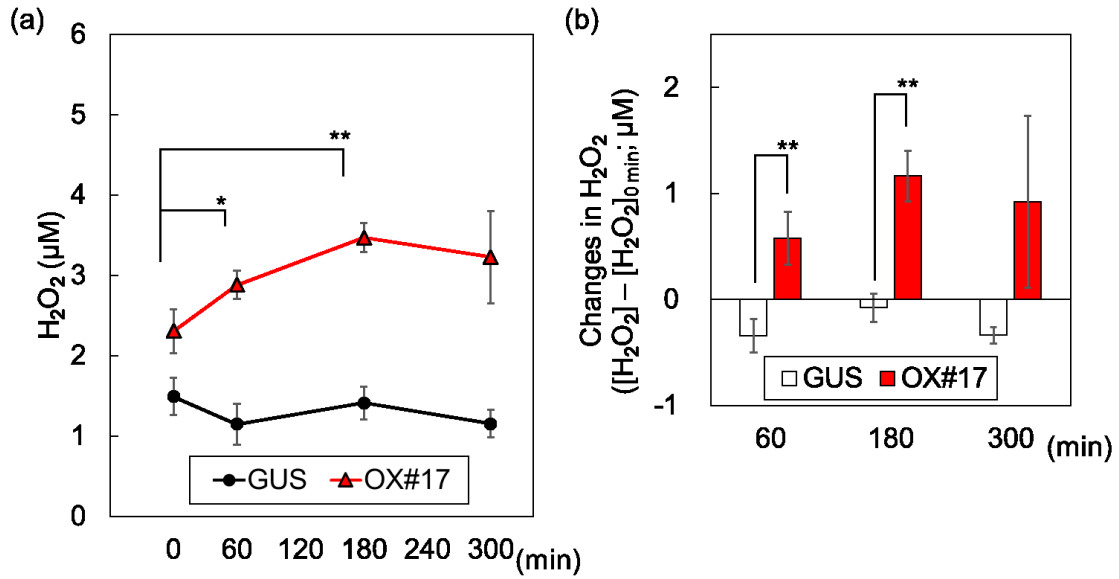
### 3-2-6. ROS 過剰産生は病原体による ROS 分解活性を凌駕する

イネいもち病菌のような植物病原体は ROS 分解酵素を分泌して植物由来 ROS を分解することで病原性を発揮する (Tanabe *et al.* 2011)。病原体の感染時の植物は、MAMP に加えてこのような防御応答を妨害するエフェクターにさらされる。植物-病原体相互作用において ROS の過剰産生の効果がどうなるかを可視化するために、リーフストリップと生きたイネいもち病菌分生子を共培養する実験を行った。初めに  $8 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$  のイネいもち病菌分生子をリーフストリップの培養系に添加して  $\text{H}_2\text{O}_2$  濃度を経時的に測定した。その結果、*BSR1-HPB* 過剰発現系統とコントロール系統の両方で  $\text{H}_2\text{O}_2$  濃度は mock 処理よりも低い値となった (Figure 17)。この結果は、イネいもち病菌が宿主由来 ROS 分解活性を有するという先行研究と一致している。

過剰な ROS 分解活性によって差が検出されにくくなることを避けるために、より低い濃度 ( $8 \times 10^3 \text{ conidia mL}^{-1}$ ) の分生子を用いて同様の共培養実験を行った。ただし、ROS 分解活性存在下での  $\text{H}_2\text{O}_2$  濃度を定量することになるため、mock 処理条件と共培養条件での値の比較等を行わなかった。共培養下において、コントロール系統のリーフストリップでは  $\text{H}_2\text{O}_2$  濃度の上昇は全く認められなかった (Figure 18a)。すなわち、この濃度の分生子が示す ROS 分解活性でも通常のレベルの MAMP 応答性 ROS バーストをほとんど完全に抑制した。その一方で、*BSR1* 過剰発現系統のリーフストリップの共培養系では、分生子処理後 180 min までの間に  $\text{H}_2\text{O}_2$  濃度が有意に上昇した。共培養開始後に産生された分の  $\text{H}_2\text{O}_2$  濃度を算出して OX 系統と GUS 系統で比較したところ、*BSR1* 過剰発現は  $\text{H}_2\text{O}_2$  産生を有意に亢進させた (Figure 18b)。以上より、*BSR1* 過剰発現イネは、イネいもち病菌の分解能力を超えうるほどの量の ROS を産生する能力をもつことが明らかになった。



**Figure 17.** Blast fungus conidial suspensions showed ROS-degrading activities. Leaf strips were treated with  $8 \times 10^4$  ml<sup>-1</sup> living conidia and sterile water in wells of a 12-well plate. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations in wells were measured before treatment and at 60, 180, and 300 min after treatment. Values are presented as the means  $\pm$  standard deviations of three biological replicates. Experiments were conducted two times with similar results. OX#17, *BSR1-HPB* overexpressing line #17; GUS, *GUS-HPB* overexpressing line.



**Figure 18.** Rice leaf strips derived from *BSR1-HPB*-overexpressing plants caused an enhanced burst of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> when exposed to conidia of the compatible blast fungus. Leaf strips were cultivated with  $8 \times 10^3$  mL<sup>-1</sup> autoclaved conidia in wells of a 12-well plate. **(a)** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations before treatment and at 60, 180, and 300 min after treatment. Asterisks indicate significant differences between values at the untreated condition (0 min) and the values at the indicated times in the same line (Student's *t*-test; \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , and \*\*\*  $p < 0.001$ ). **(b)** Changes in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations between the untreated condition (0 min) and the indicated times. The values were calculated by subtracting the concentration at 0 min from those at the indicated times. Asterisks indicate significant differences between GUS leaf strips and OX#17 leaf strips (Student's *t*-test; \*\*  $p < 0.01$  and \*\*\*  $p < 0.001$ ). Values are presented as the means  $\pm$  standard deviations of three biological replicates. Experiments were conducted twice with similar results. OX#17, *BSR1-HPB*-overexpressing line #17; GUS, *GUS-HPB*-overexpressing line.

### 3-3. 考察

*BSR1* のように過剰発現時に複合病害抵抗性を賦与する RLCK 遺伝子は稀であると考えられてはいたが、実験的な根拠は少なかった。第 3 章では、まず *BSR1* に近縁なイネ・シロイヌナズナ RLCK の過剰発現が病害抵抗性に与える影響を解析した。*BSR1* の過剰発現はイネ白葉枯病菌 *X. oryzae* pv. *oryzae* とイネごま葉枯病菌 *C. miyabeanus* に対して顕著な抵抗性を示した。その一方で、*BSR1* に最も近縁な RLCK をコードする *BSR1-LIKE* の過剰発現は抵抗性を向上させなかった (Figures 8 and 9)。さらに、シロイヌナズナにおいて最も *BSR1* に近縁な RLCK をコードする *PBL19* の過剰発現もまた、*BSR1* と異なって *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 抵抗性を向上させなかった (Figure 10)。これらの結果は、高い転写活性をもつ構成的プロモーター下で過剰発現させた場合に複合抵抗性を賦与する性質は *BSR1* に特異的であることを示唆している。

最近、シロイヌナズナにおける *A. thaliana* RLCK である *BIK1* の過剰発現は病原性の糸状菌に対する抵抗性を向上させず、その一方で PTI シグナリングのネガティブレギュレーション機構として働くユビキチン-プロテアソーム系を構成する因子の欠損が *BIK1* 蓄積と病害抵抗性の向上を引き起こすことが報告された (Wang *et al.* 2018)。*BIK1* の分解を促進することで機能を負に制御する E3 ユビキチンリガーゼのオルソログはイネにも保存されている (Monaghan, 2018)。もしかすると、*BSR1* はこういった RLCK ネガティブレギュレーション機構による分解・機能抑制を受けにくく、そのために他の RLCK と異なって過剰発現によって十分量蓄積して病害抵抗性を向上させることができるのかもしれない。本研究においては RLCK を過剰発現させる方法は揃えたものの、形質転換系統においてタンパク質が同レベルまで蓄積するかどうかは定量していない。病害抵抗性を向上させるかどうかの違いが、タンパク質の蓄積のしやすさに

起因するのか、タンパク質の機能分化に起因するのかという点についてはさらなる解析が必要である。

*BSR1* 過剰発現イネで病害抵抗性が生じる過程で何が起きているのかを明らかにするために、*BSR1-HPB* 過剰発現と *GUS-HPB* 過剰発現が MAMP で誘導される防御応答に与える影響を解析した。MAMP 未処理の時点で、OX 系統に由来する培養細胞またはリーフストリップの培養系内の  $H_2O_2$  濃度はコントロール系統よりわずかに高かった (Figures 12 – 14)。何がこの  $H_2O_2$  産生を誘導していたかは不明である。過剰発現された *BSR1* が細胞内で自己リン酸化等を介して活性化し、下流因子 (NADPH オキシダーゼ) を弱く活性化するのかもしれない。あるいは、細胞培養系の振とう培養に伴う衝突やリーフストリップ作製過程での切断といったストレスに対して、OX 系統がより鋭敏に応答した可能性も考えられる。したがって、無傷の植物体の状態でも ROS の濃度に差があるかどうかは明らかではない。

キチン、ペプチドグリカン、LPS 処理下において、OX 培養細胞はコントロールより高い濃度の  $H_2O_2$  を産生した (Figures 12 – 14)。また、*BSR1* 過剰発現は防御関連遺伝子 (*PAL1*) の MAMP 応答性の転写活性化を亢進させた (Figures 12c and 13c)。ただし、2 系統の *BSR1* 過剰発現系統 OX#17、OX#39 の間で、*PBZ1* と *KSL4* の転写産物レベルに違いがあった。OX#39 における *PBZ1* の発現レベルが MAMP 処理条件下だけでなく mock 処理条件下でもコントロール系統よりも低いことから、OX#39 が防御関連遺伝子の発現上昇が起きにくくなるような変異を有する可能性が考えられる。あるいは、イネ懸濁培養細胞を調製する段階では細胞密度などの細胞周囲の環境を厳密にそろえることはできないため、その違いが影響した可能性も考えられる。OX#39 培養細胞がストレスを受けた結果として内在性コントロールとして用いた *RUBQ1* 転写産物

のレベルが上昇していれば、防御関連遺伝子の見かけの発現量が低くなることは考えられる。リーフストリップを用いた ROS 定量実験においても、培養細胞の結果と一致して、*BSR1* を過剰発現する葉身はコントロール系統と比較して著しく強い MAMP 応答性 ROS バーストを起こした (Figure 16)。以上より、*BSR1* 過剰発現が MAMP 認識後のイネの防御応答を亢進させることが明らかになった。

*BSR1* が ROS バーストを亢進させる機構として、*BSR1* タンパク質の過剰な蓄積自体がイネにストレスを与えた結果、ROS がより多く産生されたという可能性も完全に否定することはできない。しかし、*BSR1* ノックアウトが防御応答を低下させるという結果 (第 2 章, Figures 2–5) より、*BSR1* が本来の機能として ROS バーストを正に制御することが示された。このこと考え合わせると、ROS バーストの亢進は *BSR1* 蓄積がストレスとなって起きたというよりも、*BSR1* の本来の機能が増幅されたことで RBOH タンパク質が過剰に活性化した結果であると考えられる。

*BSR1* と同じく RLCK サブファミリーVII に属するイネの OsRLCK118 やシロイヌナズナの BIK1 は、防御応答において ROS 産生を担う RBOH タンパク質を直接的に正に制御する (Kadota *et al.* 2014; Li *et al.* 2014; Fan *et al.* 2018)。過剰な *BSR1* が RBOH タンパク質を直接または何らかの因子を介して過剰に活性化することで、ROS バーストの亢進を引き起こしているのかもしれない。ただし、シロイヌナズナにおける *BIK1* の過剰発現が *flg22* に応答した ROS バーストを亢進させるという報告がある一方で (Monaghan *et al.* 2014)、*flg22* 処理下での ROS 産生量に顕著な影響を示さないという報告もある (Zhang *et al.* 2010)。イネにおいては *BSR1* 以外に過剰発現時に ROS バーストを亢進させる RLCK の報告はない。とはいえ、過剰発現時に *BSR1* がどのような経路で

NADPH オキシダーゼ活性を亢進させるか、他の RLCK と比較してどの程度強く ROS バーストを亢進させるのかといったことを論じるにはさらなる解析が必要である。

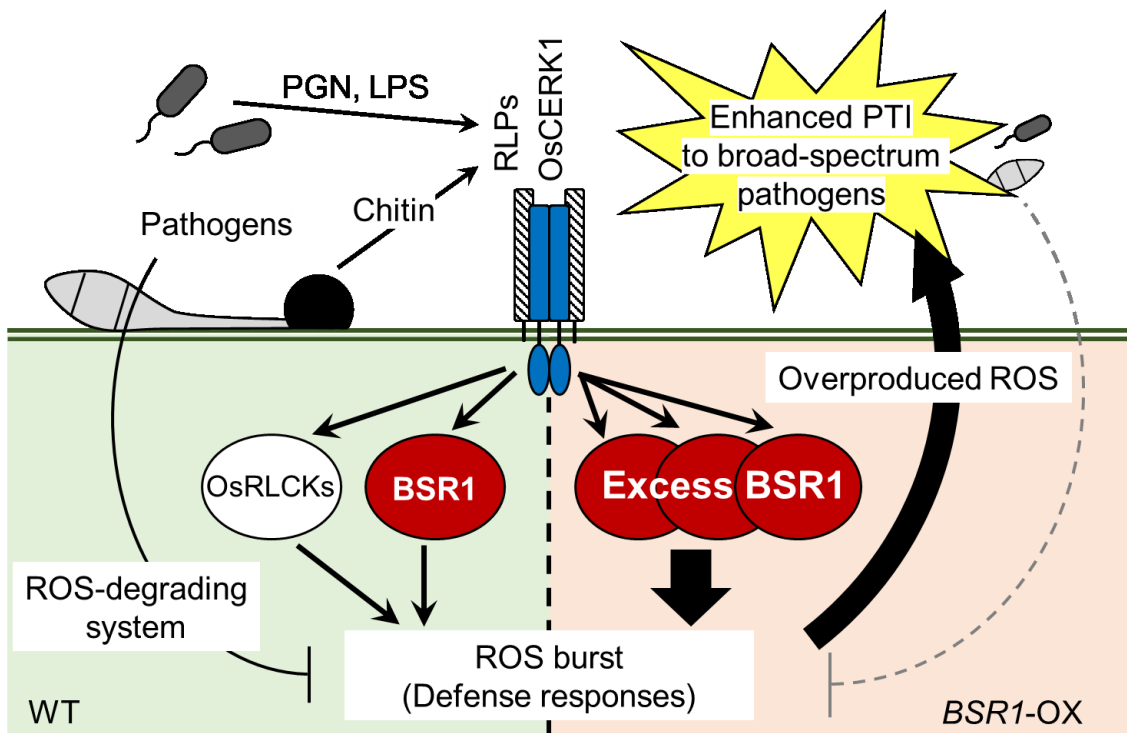
イネいもち病菌病原性株の生きた分生子とイネ葉身を共培養した状態での経時的な ROS 定量実験が、イネ葉身による ROS 産生と病原体による ROS 分解の間の拮抗関係を可視化することを可能にした。8 × 10<sup>3</sup> mL<sup>-1</sup> 分生子との共培養は、コントロール系統のリーフストリップに検出可能なレベルの ROS バーストを誘導しなかった (Figure 18)。これは、先行研究 (Tanabe *et al.* 2011) で報告されているイネいもち病菌によって分生子懸濁液上清中に分泌される Catarase-Peroxidase B (CPXB) に依存するカタラーゼ活性がイネの MAMP 応答を抑制した結果と説明できる。同じ条件において、*BSR1* 過剰発現はイネ葉身に顕著な ROS バーストを起こさせた。このことは、*BSR1* 過剰発現イネはイネいもち病菌が有する細胞外 ROS 分解システムでは分解しきれないレベルの H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を産生することを示す。さらに、第 2 章から第 3 章までの実験で、糸状菌性 MAMP であるキチンと同様に細菌性 MAMP であるペプチドグリカンや LPS に対する防御応答にも *BSR1* が関与することを示した。したがって、イネ白葉枯病菌のような病原細菌の感染時にも同様の現象が起きることが強く示唆される。

植物-微生物 (宿主-病原体) 相互作用において、宿主由来 ROS は微生物に対する傷害手段や拡散性のセカンドメッセンジャーとして機能し、病害抵抗性に寄与する (Wrzaczek *et al.* 2013; Waszczak *et al.* 2018)。実際に、宿主由来 ROS を分解することが病原性を発揮するのに必要であるという報告が蓄積している。Molina らは、トウモロコシ *Zea mays* を材料として植物病原体が PTI を打破して感染するためには宿主由来 ROS の分解が必要であることを報告した



(Molina *et al.* 2007)。トウモロコシ病原糸状菌であるトウモロコシ黒穂病菌 *Ustilago maydis* において H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 耐性に寄与する遺伝子 *YAP* の欠失は病原性を顕著に減少させる。イネ病原糸状菌であるイネいもち病菌は感染時にカタラーゼ-ペルオキシダーゼ CPXB を分泌して周囲の ROS を分解する (Tanabe *et al.* 2009; Tanabe *et al.* 2011)。イネいもち病菌においてグルタチオン-チオレドキシン抗酸化システム (glutathione and thioredoxin antioxidation system) を構成する酵素は ROS 耐性に寄与すると同時に、病原性にも必要である (Huang *et al.* 2011; Fernandez *et al.* 2014)。イネいもち病菌において、*DES1* や *SIR2* (それぞれ細胞外ペルオキシダーゼの発現を制御する転写因子と superoxide dismutase をコードする) を欠失した変異株は、イネに宿主由来 ROS の蓄積と防御関連遺伝子発現を含む防御応答を引き起こし、病原性を示さない (Chi *et al.* 2009; Fernandez *et al.* 2014)。今回設計した共培養系においてイネいもち病菌は *BSR1* 過剰発現を介して過剰産生された宿主由来 ROS を完全には分解できず、そしてそのために過剰発現イネに対して病原性を発揮できなかったと考えられる (Figure 19)。第 3 章の成果によって、宿主-病原体相互作用において ROS の産生と分解のバランスが PTI にとって決定的に重要であることを裏付けた。

結論として、*BSR1* 過剰発現が MAMP 認識後に誘導される防御応答を亢進させることを明らかにした。さらに、通常 ROS 濃度が上昇しないようなイネ-病原微生物共培養の条件でも、*BSR1* 過剰発現イネは ROS バーストを起こすことを示唆した。以上より、*BSR1* 過剰発現植物では過剰産生された ROS が複合病害抵抗性をもたらすというモデルを提唱した (Figure 19)。



**Figure 19.** Proposed model in which BSR1 regulates defense responses, such as oxidative bursts, after the perception of MAMPs in wild-type (**left**) and *BSR1*-overexpressing rice lines (**right**). PGN, peptidoglycan; LPS, lipopolysaccharide; RLPs, receptor-like proteins; ROS, reactive oxygen species; PTI, pattern-triggered immunity; BSR1-OX, *BSR1*-overexpressing plant; WT, wild-type.

## 第4章 BSR1 が関わる昆虫認識機構の解析

植物が外敵を認識して防御応答を発動する機構を論じるにあたって、キチンやフラジェリンといった微生物由来の MAMP に応答するための分子メカニズムがよく研究されてきた。しかし、自然界においては微生物だけではなく、植食性昆虫などの後生動物も食害というかたちで植物を攻撃する。食害においては、捕食者の口腔分泌物や摂食されることで破壊された植物組織の断片が植物側の創傷部に付着する。こういった分子群もまた植物によって認識され、防御応答を誘導することが知られている。植食性昆虫に由来するエリシターを植食性昆虫関連分子パターン (herbivore-associated molecular pattern: HAMP)、破壊された植物組織に由来するものを傷害関連分子パターン (damage-associated molecular pattern: DAMP) と総称する。

植食性昆虫等に由来する HAMP を認識する機構の研究において、鱗翅目 (チョウ目) 昆虫の幼虫の口腔分泌物 (oral secretion: OS) がしばしば用いられる。OS は幼虫の消化管内容物を口から吸い出して得られる混合物である。これまでに、植物の防御応答の引き金となる様々な HAMP が OS から単離されている (Erb and Reymond, 2019)。鱗翅目昆虫の幼虫が広く消化管内に有する fatty acid-amino acid conjugates (FACs) はナス、タバコ、トウモロコシといった様々な植物に防御応答を誘導する (Acevedo *et al.* 2015; Stahl *et al.* 2018)。FACs は幼虫の窒素同化の過程で中腸において生合成される化合物である (Yoshinaga *et al.* 2008)。酵素活性が防御応答を誘導する場合もあり、トマトは鱗翅目昆虫幼虫の唾液に含まれる glucose oxidase (GOX) 活性にさらされることで防御応答を起こす (Louis *et al.* 2013)。このように、植物に認識される HAMP の分子実体の情報は蓄積されつつある。しかし、その認識機構については未解明な部分が多く、HAMP とそれを認識する受容体の組み合わせが同定された例はな

かった。

イネにおいても、イネ食害昆虫の OS を用いた解析が行われてきた。ムギ、トウモロコシ、イネといったイネ科植物を広く食害するクサシロキヨトウ (*Mythimna loreyi*) の OS もまた FACs といった HAMP を含み、イネに ROS バーストや二次代謝産物生合成といった防御応答を誘導する (Shinya *et al.* 2016; Shinya *et al.* 2018)。OS で誘導される応答が MAMP 応答と似ていることに注目し、これらの応答が共通のシグナリング経路で誘導されている可能性を想起した。そこで、様々な MAMP に対する応答を制御する BSR1 が、OS 応答にも寄与するかどうかを調べることにした。

## 4-1. 方法

### 4-1-1. 材料としたイネ

*BSR1*-KO 系統として、第 2 章で作出した *bsr1-1#13* (KO#1)、*bsr1-2#16* (KO#2)、*bsr1-8#5* (KO#8) を用いた (Kanda *et al.* 2017)。*BSR1*-KO 系統と比較するための野生型系統として、その原品種である日本晴を用いた。

*OsCERK1* ノックアウト系統 (*OsCERK1*-KO) として、二回相同組換えによって *OsCERK1* が破壊されている KO#53 イネ (Kouzai *et al.* 2014a) を用いた。*CEBiP* ノックアウト (*CEBiP*-KO) 系統として、二回相同組換えによって *CEBiP* が破壊されている KO#169 イネ (Kouzai *et al.* 2014b) を用いた。これらの系統と比較する野生型系統として、その原品種である日本晴 BL2 号を用いた。

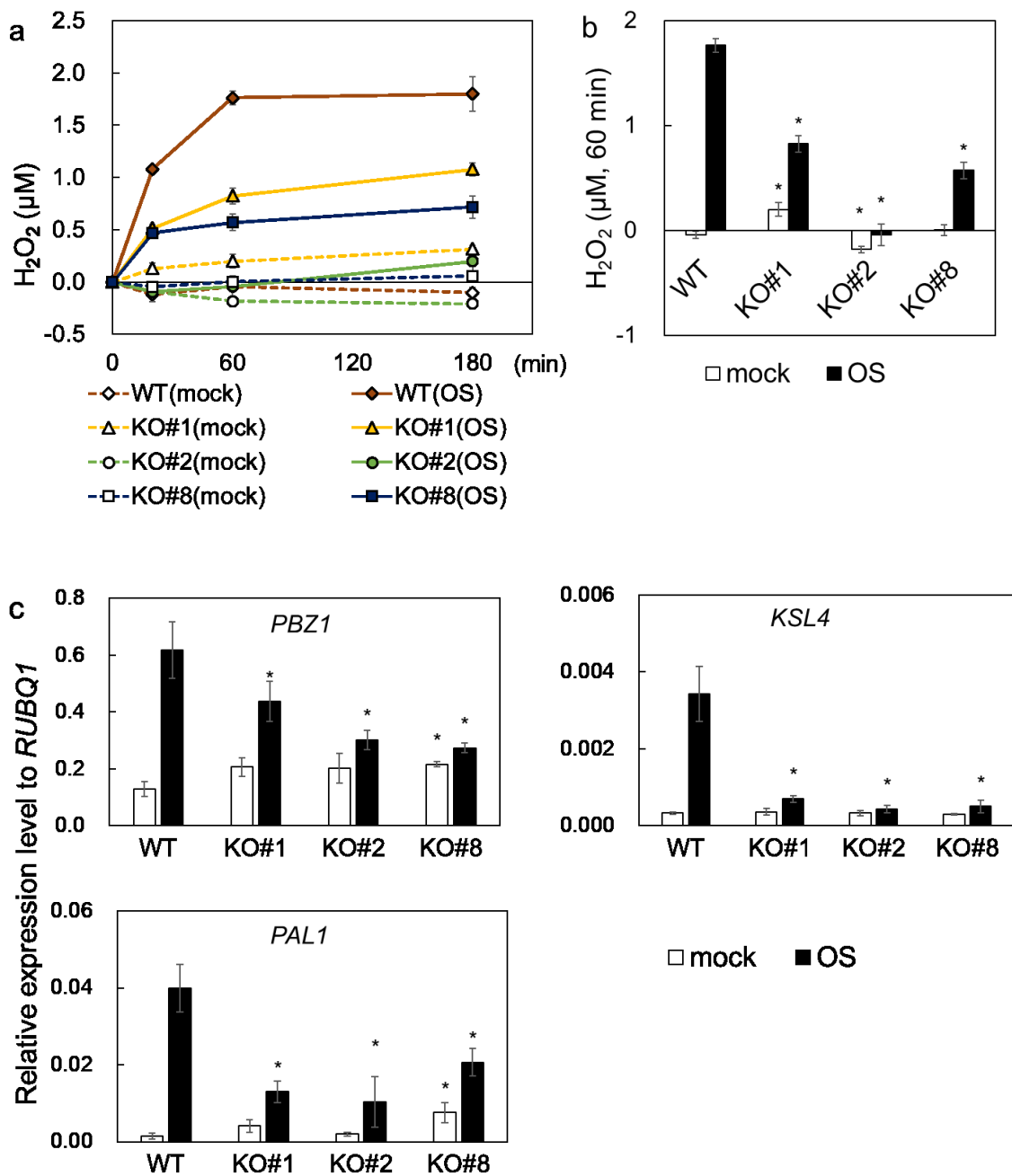
### 4-1-2. OS 調製と懸濁培養細胞の処理

処理に用いる OS の調製は以下の既に報告された方法に従って行われた (Shinya *et al.* 2016)。イネの葉を餌として飼育された複数の個体から OS を吸い出した。OS の遠心分離 (14000 × g) 操作を行い、得られた上清を処理に用いた。懸濁培養細胞実験において、OS は 500 倍希釈濃度となるように添加した。Extracellular Protein 6 (Ecp6) サンプル (Jonge *et al.* 2010) は終濃度 30 nM、キチン八量体は終濃度 1 nM の濃度で処理した。昆虫の飼育から OS 調製までの操作と、Ecp6 サンプルの分与は岡山大学 新屋友規 准教授に依頼した。

## 4-2. 結果

### 4-2-1. BSR1 はイネの本来有する OS 応答に寄与する

第 2 章で作製した三つの独立した *BSR1*-KO 系統 KO#1、KO#2、KO#8 および野生型系統の種子から懸濁培養細胞を誘導した。クサシロキヨトウから調製した OS で処理し、経時的に培地中の  $H_2O_2$  濃度を定量した。その結果、*BSR1* ノックアウトが、イネが OS を認識して起こす ROS バースト ( $H_2O_2$  産生) を抑制することがわかった (Figure 20a)。処理後 60 min における  $H_2O_2$  濃度を抜き出して比較したところ、どの系統についてもその差は有意であった (Figure 20b)。同様に処理した培養細胞を 3 h 時点でサンプリングし、qRT-PCR を行って防御関連遺伝子の発現を定量した。*PBZ1*、*PAL1*、*KSL4* について解析したところ、*BSR1* が OS 応答におけるこれらの遺伝子の正の発現調節に寄与することが示された (Figure 20c)。以上より、野生型イネが OS を認識した後の防御応答の誘導に *BSR1* が寄与することが明らかになった。OS 応答を制御する *RLCK* は全ての植物を通じてこれまで報告されていなかった。すなわち、この結果によって害虫 (OS) に対する防御応答の誘導が MAMP 応答と同様に *RLCK* によって制御されるということが示された。



**Figure 20.** Knockouts of *BSR1* impaired defense responses in rice cell cultures treated with *Mythimna loreyi* OS. Suspension-cultured cells were treated with OS (500-fold dilution). (a) A time course of the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in cell cultures. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations were measured before treatment and at 20, 60, and 180 min after treatment. (b) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulations captured at 60 min after treatment. (c) Transcriptional activation of defense-related genes in suspension-

cultured rice cells. The *PBZ1*, *PAL1*, and *KSL4* transcript levels at 3 h after treatment with OS were normalized against the *RUBQ1* internal control levels. Asterisks indicate significant differences between the values of WT and those of other lines (Dunnett's test; \* $p < 0.05$ ). Values are presented as the means  $\pm$  standard deviations of three biological replicates. Experiments were conducted twice with similar results. OS, oral secretion; KO, *BSR1*-knockout; WT, wild-type (*Nipponbare*).

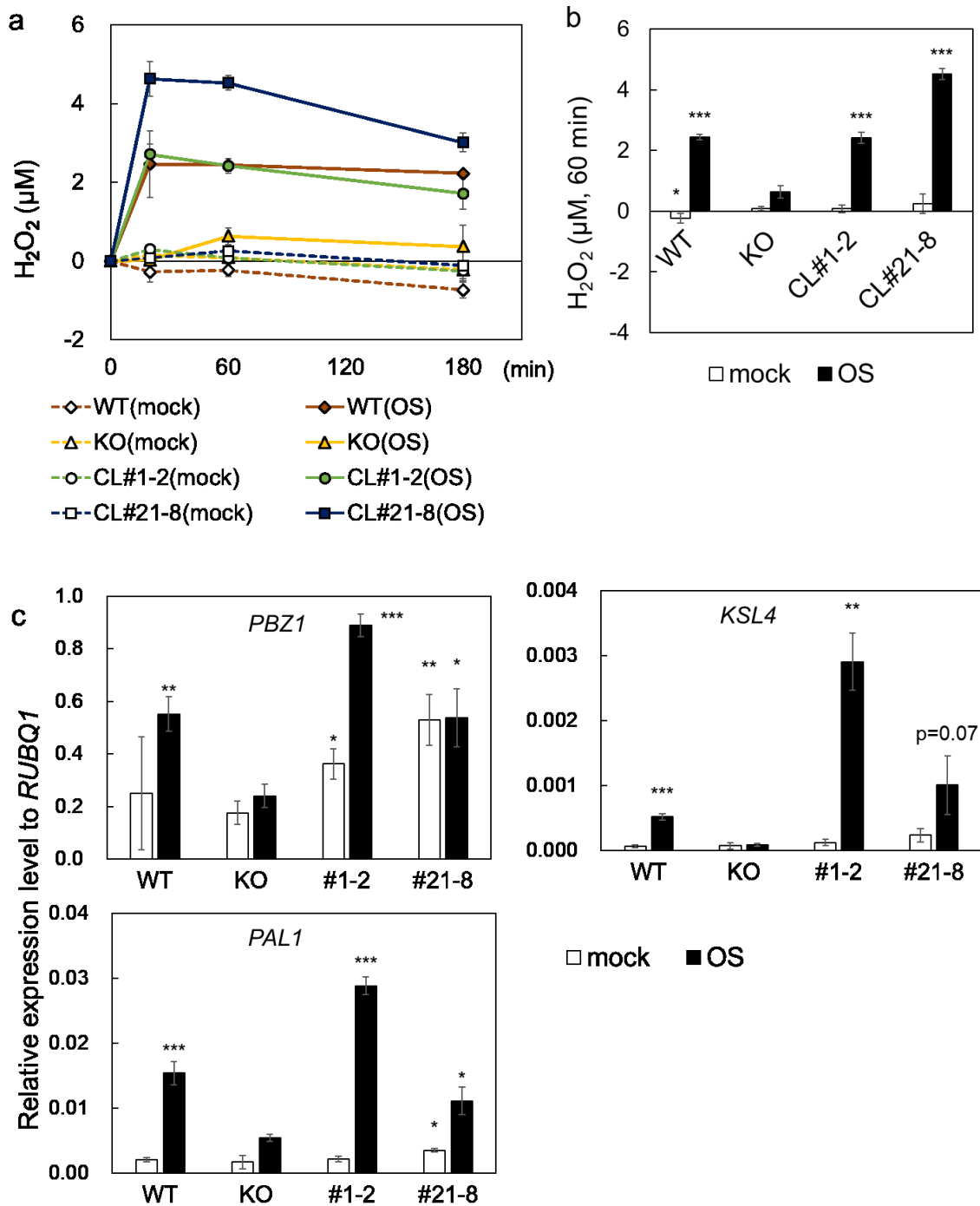


#### 4-2-2. OsCERK1 が OS 応答に寄与する

OS 応答において BSR1 の上流で認識される HAMP 分子の実体を同定することを目的として、BSR1 の上流受容体の解析を行った。OsCERK1 は第 2 章の実験 (Kanda *et al.* 2017; Kanda *et al.* 2019) から、PTI シグナリングにおいて BSR1 の上流と位置づけられた細胞膜型受容体様プロテインキナーゼである。また、キチン、ペプチドグリカン、LPS といった様々な多糖性エリシターの認識に広く関わることが報告されている (Kouzai *et al.* 2014a; Ao *et al.* 2014; Desaki *et al.* 2018)。これらのことから、OsCERK1 が構成する受容体複合体が BSR1 の上流で OS 中の HAMP の認識にも関わる可能性を想起した。

OsCERK1 が OS に含まれる HAMP の認識に関わる可能性を検証するために、その欠失や相補が OS 応答に与える影響を解析した。ここでは、既に作出されていた *OsCERK1* ノックアウト系統 (*OsCERK1-KO*) および *OsCERK1-KO* 系統に *OsCERK1* を導入した相補系統 (Complementary line: CL#1, CL#21) を用いた (Kouzai *et al.* 2014a)。

これらの系統から懸濁培養細胞を誘導し、OS 応答を解析した。野生型培養細胞では先行研究 (Shinya *et al.* 2016) の通り激しい H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 産生 (ROS バースト) が誘導された。これと比較して、*OsCERK1-KO* 培養細胞は著しく低い濃度の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を産生した (Figure 21a, b)。ただし、応答性は完全には失われなかった。さらに、二つの独立した相補系統では OS 応答性の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 産生が野生型と同程度またはそれ以上のレベルまで回復した。OS 処理 3 h 時点での防御関連遺伝子の転写産物レベルの上昇もまた、*OsCERK1* のノックアウトによって抑制され、相補によって回復した (Figure 21c)。これらの結果は OsCERK1 が OS 中の HAMP に対する応答に中心的に寄与することを示しており、OsCERK1 が HAMP 受容体/共受容体として機能することが強く示唆された。



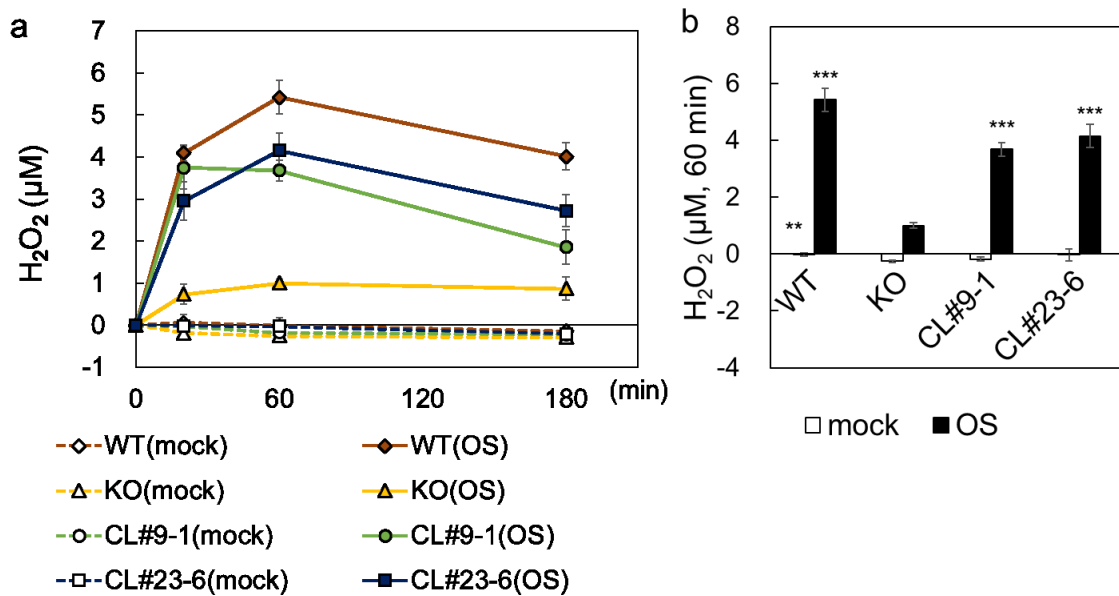
**Figure 21.** OsCERK1 contributes to the perception of *Mythimna loreyi* OS in rice cell cultures. Suspension-cultured cells were treated with OS (500-fold dilution). **(a)** A time course of the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in cell cultures. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations were measured before treatment and at 20, 60, and 180 min after treatment. **(b)** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulations captured at 60 min after treatment. \*\**p* < 0.01 and \*\*\**p* < 0.001

compared with KO (Student's *t*-test). (c) Transcriptional activation of defense-related genes in suspension-cultured rice cells. The *PBZ1*, *PAL1*, and *KSL4* transcript levels at 3 h after treatment with OS were normalized against the *RUBQ1* internal control levels. \*\**p* < 0.01 and \*\*\**p* < 0.001 compared with KO (Student's *t*-test). Values are presented as the means ± standard deviations of three biological replicates. Experiments were conducted twice with similar results. OS, oral secretion; KO, *OsCERK1*-knockout; CL, *OsCERK1*-complementary line; WT, wild-type (*Nipponbare* BL2).

#### 4-2-3. OsCERK1-CEBiP キチン受容体複合体が OS を認識する

OsCERK1 は多糖性リガンドの受容体複合体を構成するとされていることから、OS のエリシター活性の大部分が何らかの多糖に起因することが予想された。ここで、昆虫の外骨格が N-アセチルグルコサミンからなる多糖であるキチンで構成されていることに着目した。キチンは、HAMP として報告されたことはないものの、MAMP として植物の防御応答を誘導することはよく知られていた。そこで、昆虫組織から脱落したキチンが OS 中に存在し、PTI 誘導活性を示すのではないかという仮説を立てた。その検証として、OsCERK1 とヘテロ複合体を形成してキチン受容体を構成する CEBiP について解析することとした。

ここでは、既に作出されていた *CEBiP* ノックアウト (*CEBiP-KO*) 系統および *CEBiP-KO* 系統に *CEBiP* を導入した相補系統 (CL#9, CL#23) を用いた (Kouzai *et al.* 2014b)。これらの系統から誘導した懸濁培養細胞を用いて ROS バーストを定量したところ、OS 応答性の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 産生は *CEBiP* ノックアウトによって抑制され、*CEBiP* 遺伝子の相補によって回復した (Figure 22)。ただし、キチン応答が *CEBiP-KO* 培養細胞で完全に失われることはなかった。以上より、OS 中のエリシターの認識に OsCERK1 と CEBiP が (おそらく受容体複合体として) 寄与することが明らかになった。同時に、CEBiP がその認識に大きく寄与したことから、イネが OS を認識する際は HAMP として主にキチンを認識していることが示唆された。

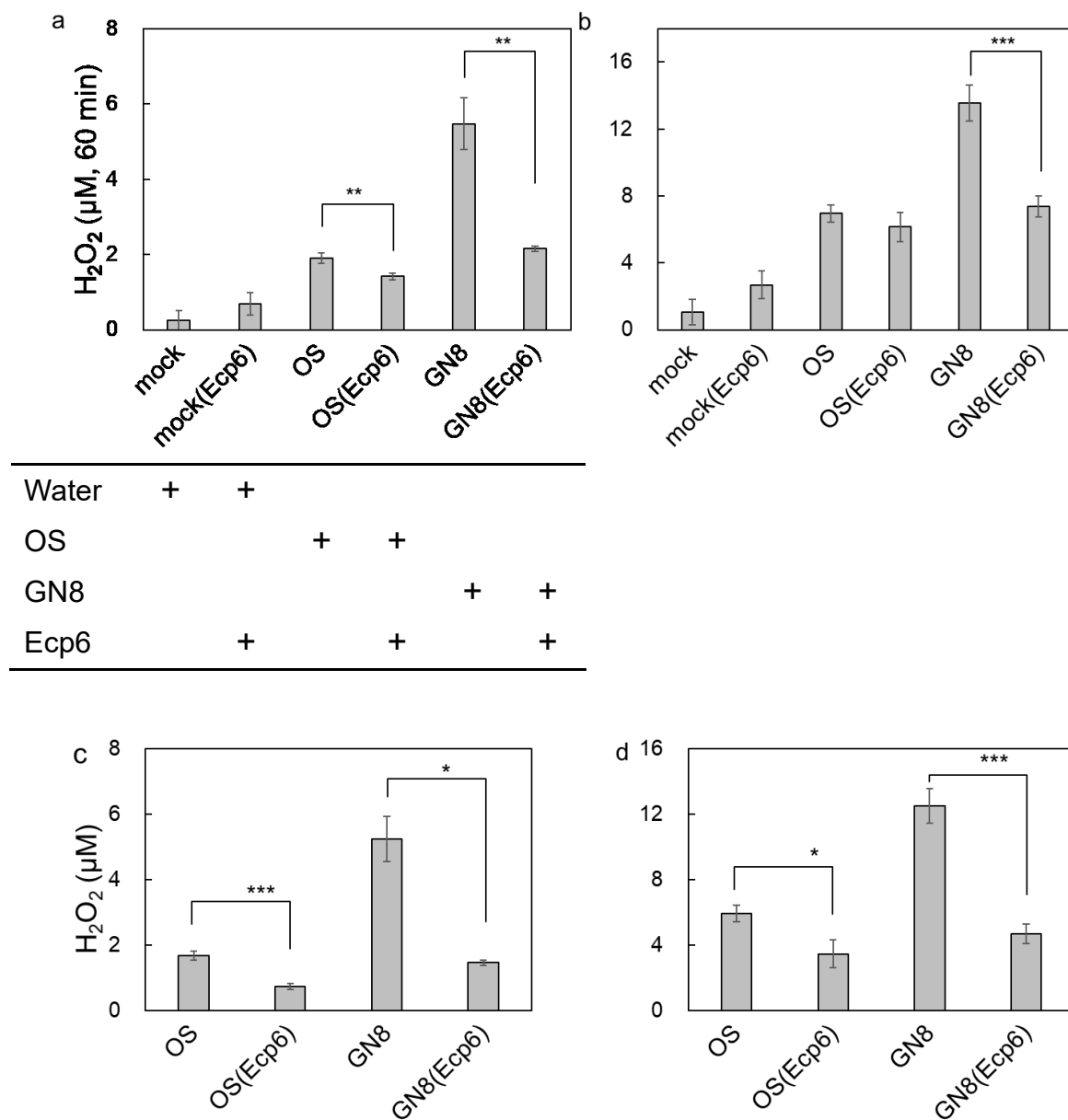


**Figure 22.** CEBiP recognized *Mythimna loreyi* OS in rice cell cultures. Suspension-cultured cells were treated with OS (500-fold dilution). (a) A time course of the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in cell cultures. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations were measured before treatment and at 20, 60, and 180 min after treatment. (b) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulations captured at 60 min after treatment. \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$  compared with KO (Student's  $t$ -test). Values are presented as the means  $\pm$  standard deviations of three biological replicates. Experiments were conducted twice with similar results. OS, oral secretion; KO, *CEBiP*-knockout; CL, *CEBiP*-complementary line; WT, wild-type (*Nipponbare* BL2).

#### 4-2-4. OS 中のエリシターの実体はキチンである

OS 中の OsCERK1-CEBiP 受容体複合体によって認識されると考えられた OS 中の HAMP がキチンであるかどうか検証する実験を行った。ここでは植物のキチン認識を阻害する LysM 型エフェクタータンパク質 Ecp6 を用いた。Ecp6 は病原糸状菌であるトマト葉かび病菌 *Cladosporium fulvum* から単離されたエフェクターであり、キチン結合ドメインである LysM ドメインを有する (Jonge *et al.* 2010)。Ecp6 共処理はキチン応答性の PTI を特異的に抑制することが報告されている。HAMP と Ecp6 を共処理した際にエリシター活性が低下するかどうかを調べ、HAMP 中にキチンが含まれるかどうか判断することを試みた。

野生型イネ懸濁培養細胞を水 (mock)、OS、キチン八量体 (GN8) で処理し、ROS バーストの誘導性が Ecp6 に影響されるかどうかを解析した (Figure 23)。報告されていた通り、1 nM キチン八量体による ROS バースト誘導は Ecp6 共処理によって再現性良く有意に減少した (Figure 23a, b)。一方、OS 処理下の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 濃度で比較すると、2 回の試行とも Ecp6 共処理が ROS バーストを抑制する傾向にあった。しかし、1 回目の実験ではその差に有意性が認められた (Figure 23a) もの、2 回目の実験では有意性については再現されなかった (Figure 23b)。ただし、mock 条件と mock (Ecp6) 条件で比較すると、Ecp6 サンプルは単体でも H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 産生を誘導する傾向を 2 回の試行で共通して示した。そこで、Ecp6 サンプル自体に起因する H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 産生誘導活性の分を考慮して、各々 mock 処理または mock (Ecp6) 処理時の平均値を引いた値を算出して比較を行った (Figure 23c, d)。この比較により、OS 処理に応答した H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 産生の誘導は Ecp6 共処理によって有意に低下することが示された。この結果は、OS 中のキチンがイネによって認識され、防御応答の引き金となっていることを強く示唆している。



**Figure 23.** Ecp6 inhibited ROS production against *Mythimna loreyi* OS in rice cell cultures. Wild-type (*Nipponbare* BL2) suspension-cultured cells were treated with water (mock), OS (500-fold dilution), or 1 nM chitin octamer with/without Ecp6. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations were measured before treatment and at 60 min after treatment. **(a, b)** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> productions elicited by the co-treatment in cell cultures at 60 min after treatment. **(c, d)** The comparison between OS/chitin-elicited H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production under (co-)treatment with and without Ecp6.

Values were calculated by subtracting the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> level in mock-treated conditions from that in elicitor-treated conditions. Values are presented as the means ± standard deviations of three biological replicates. Experiments were conducted twice (a and c, first time; b and d, second time). \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$  (Student's  $t$ -test). OS, oral secretion; GN8, chitin octamer.



### 4-3. 考察

第3章では、BSR1が関わるPTIシグナリング経路が本来の機能としてイネの植食性昆虫認識機構に関わるかどうかを解析した。*BSR1*ノックアウトは、クサシロキョトウ幼虫OSで処理されたイネが起こすROSバーストと防御関連遺伝子の発現上昇を抑制した (Figure 20)。この結果は、昆虫を認識したイネが起こす防御応答の誘導にBSR1が寄与することを示している。

BSR1が応答に寄与したという結果を手掛かりとして、シグナリング経路においてBSR1の上流でOSを認識する受容体の同定を進めた。第2章のMAMP応答解析によってPTIシグナリングにおいてBSR1の上流に位置づけられたOsCERK1やCEBiPを解析した。ノックアウト系統や相補系統を用いた実験より、OsCERK1やCEBiPがOS認識に大きく寄与することが明らかになった (Figures 21 and 22)。MAMP応答においてこれらの二者はヘテロ受容体複合体を構成して、リガンド依存的にPTIシグナリングの起点となる (Shimizu *et al.* 2010)。以上の結果より、CEBiP-OsCERK1受容体複合体を昆虫認識システムの構成因子として新たに位置付けた。

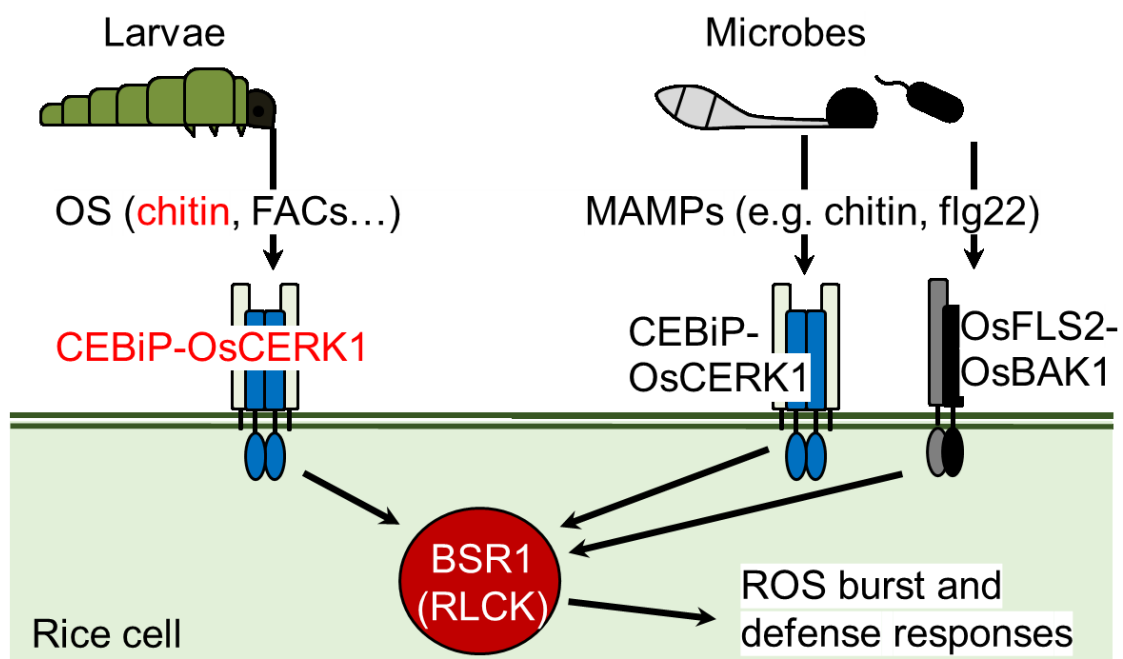
特にCEBiPがキチンを主に認識する受容体様タンパク質として知られていることから (Kaku *et al.* 2006; Kouzai *et al.* 2014b)、OS中にイネの防御応答の引き金となるのに十分な濃度のキチンが存在することが示唆された。植物のキチン認識を特異的に阻害するエフェクタータンパク質Ecp6との共処理は、OSの防御応答誘導活性を有意に低下させた (Figure 23c, d)。ただし、Ecp6サンプル自体のエリシター活性によって影響が検出できなくなる程度であったように、純粋なキチン八量体に対するEcp6の効果ほど強く抑制されることはなかった (Figure a, b)。このことは、OS中にキチン以外のエリシターが含まれていたためと説明できる。その根拠として、イネのキチン応答性がOsCERK1に完

全に依存する (Kouzai *et al.* 2014a, b) にも拘らず、OS 処理が *OsCERK1-KO* 培養細胞にわずかながら  $H_2O_2$  産生を誘導したことが挙げられる (Figure 21a)。このことは、OS 中に *OsCERK1* とは別の経路で認識されるキチン以外のエリシターが含まれていたことを示す。キチン以外のエリシターは *Ecp6* の影響を受けないため、混合物である OS と比べて純粋なキチンの方がより強く *Eco6* による阻害活性を受けたと考えられる。以上より、鱗翅目昆虫幼虫の OS が示すエリシター活性の大部分がキチンに由来することが強く示唆された。

昆虫において外界に露出しておりかつキチンで構成されている組織として、外骨格や囿食膜がある。外骨格のうち葉を噛む部分である顎の先端 (歯: *incisor*) が OS 中のキチンの起源としての可能性が高い。鱗翅目昆虫幼虫や直翅目 (バッタ目) 昆虫といった葉を噛んで摂食する昆虫では、歯が大きく摩耗することが知られている (Bernays, 1991)。実際に、イネを食害する鱗翅目昆虫であるニカメイチュウ (別名: ニカメイガ) *Chilo suppressalis* の幼虫の歯が摂食過程で摩耗し、脱皮直後と比較して顕著に短くなることが観察されている (Djamin and Pathak, 1967)。鱗翅目昆虫を含めたほとんどの昆虫は、消化管内容物と腸管上皮を隔てるように存在する囿食膜と呼ばれるチューブ状構造を腸管内に有する (Hegedus *et al.* 2009)。囿食膜は、中腸上皮から分泌されるキチンポリマーと、それを足場として蓄積したタンパク質や代謝産物によって形成される。消化管内容物は囿食膜に包まれたまま腸管内を移動し、そのまま糞として排泄される。このようにキチンを含む外界に露出した構造が昆虫に広く保存されており、それらが昆虫の通常の活動を通じて脱落することはよく知られていた。こういったキチンと植物の防御応答を結び付けた報告はこれまでなかったが、第 4 章の実験によって植物が認識できるようなオリゴマー態のキチンが HAMP となる濃度で OS 中に存在することが強く示唆された。ただし、摂食から排泄までの期

間が短いため腸管内で増殖することは考えにくいものの、腸管内共生真菌に由来するという可能性も否定できない。

結論として、BSR1、OsCERK1、CEBiP がイネ食害昆虫由来の OS に対する応答にも寄与することを示した。このことを手掛かりとした解析によって、イネが OS 中のキチンを HAMP として受容して食害昆虫を認識するというモデルを提唱した (Figure 24)。



**Figure 24.** Proposed model in which BSR1, CEBiP, and OsCERK1 contribute to the perception of chitin in OS. OS, oral secretion; FACs, fatty acid-amino acid conjugates; MAMPs, microbe-associated molecular patterns; ROS, reactive oxygen species; WT, wild-type.

## 第5章 総括

本研究によって、**BSR1** が本来の機能として病原体認識から早期の防御応答の発動までの間の PTI シグナリングを担うことが示された。さらに、*BSR1* 過剰発現が MAMP 認識後の防御応答を亢進させること、ROS バーストの亢進は病原体による妨害を凌駕しうるほどに強いことを明らかにした。これらの結果から、*BSR1* 過剰発現植物では過剰産生された ROS が複合病害抵抗性をもたらすというモデルを提唱した (Figure 19)。

*BSR1* は、過剰発現時に顕著な生育不良を起こすことなく強力な複合病害抵抗性を賦与するという有用な性質をもつ (Dubouzet *et al.* 2011; Maeda *et al.* 2016)。これまで、病害抵抗性のメカニズムが未知であったことが *BSR1* の農業応用のボトルネックとなっていた。本研究がこの複合病害抵抗性がイネの本来有する植物免疫の亢進によるものであると説明する実験的根拠を与えたことは、*BSR1* を活用する研究を大いに促進するはずである。今後の展開として、*BSR1* 過剰発現イネの隔離圃場における病害抵抗性の評価といった、温室外での形質を評価する計画が進行しつつある。

*BSR1* の作動機構に残された最大の疑問は、過剰発現時に病害抵抗性を賦与するものとししないものとの差は何に起因するのかという点である。今日までに、*BSR1* と同様に MAMP を認識した受容体の下流で PTI シグナリングを担う RLCK は多数報告されている (Li *et al.* 2014; Kadota *et al.* 2014; Ao *et al.* 2014; Li *et al.* 2017; Wang *et al.* 2017; Yamada *et al.* 2017; Fan *et al.* 2018)。しかし、植物体において過剰発現された RLCK が親和性の病原体に対する強力な抵抗性をもたらしたという報告は *BSR1* をおいて他になく、本研究で *BSR1* ホモログを過剰発現させた場合にも抵抗性は向上しなかった。このことは過剰

発現によって機能を増幅できる RLCK (BSR1) とそうでない RLCK (その他の RLCK) があることを示している。

こういった違いをもたらす原因として、BSR1 がこれまで RLCK と紐づけられてない特殊な下流因子を制御している可能性が考えられる。しかし、RLCK サブファミリーVII においては、近縁な RLCK パラログ同士が下流因子を制御する際に冗長的に機能することが知られている (Kadota *et al.* 2014; Rao *et al.* 2018)。また、RLCK オルソログ間で機能が保存されている例も報告されている (Yamada *et al.* 2017; Kawasaki *et al.*, 2017; Fan *et al.* 2018)。これに対し、過剰発現時の形質で比較する限り、BSR1 の機能はイネやシロイヌナズナにおける最も近縁なホモログにさえ保存されていないようである (Figures 8–10)。こういった RLCK ホモログについての知見に基づいて考える限り、下流因子の特殊性に起因するという可能性は低い。他の仮説として、BSR1 だけに特異的に存在する塩基置換やアミノ酸置換などが mRNA やタンパク質の過剰な蓄積に適した何らかの性質を与えている可能性が考えられる。これは、機能 (上流・下流因子やリン酸化活性) は同様であっても、過剰発現時にタンパク質が十分に蓄積するものとししないものがあるという仮説である。例えば、BSR1 タンパク質は過剰蓄積して防御応答の亢進と抵抗性の向上を引き起こすが、BSR1-LIKE タンパク質は蓄積しにくいことで抵抗性を向上させないのかもしれない。こういった違いについてより厳密に議論するためには、*in vitro* の mRNA やタンパク質の蓄積量を複数の RLCK 間で比較するような解析が必要である。

第 4 章では BSR1 がイネ食害昆虫由来の OS に対する応答にも寄与することを見出した。さらに進んで、OsCERK1 と CEBiP が微生物に加えて昆虫をも認識する受容体であると位置づけた。CERK1 オルソログと受容体様タンパク

質が構成するパターン認識受容体複合体を中心としたキチン認識システムは広く保存されている (Kawasaki *et al.* 2017)。これまで、この認識システムの微生物 (病害) に対する植物免疫機構としての意義が論じられてきた。本研究は、キチン応答が害虫認識システムとしての側面を有する可能性を提唱した。ただし、本研究が見出した CEBiP、OsCERK1、BSR1 が構成する OS (昆虫) 認識経路が自然界における植物-害虫相互作用に寄与しているという実験的根拠はない。この OS 認識経路が害虫認識システムとして機能しているというためには、害虫がイネを摂食した際の応答への寄与の検証や、ノックアウトシステムでの耐虫性検定といったさらなる解析が必要である。

本研究によって、BSR1 が耐虫性遺伝子としても機能する可能性が示唆された。BSR1 は MAMP 応答性 ROS バーストを制御し、かつ過剰発現時に微生物に対する抵抗性を与える。BSR1 が HAMP 応答性 ROS バーストにも同様に寄与するということから、*BSR1* 過剰発現が植物に虫害抵抗性をも与える可能性が想像される。今後の解析によって、耐虫性遺伝子としての有用性が見出されるかもしれない。

本論文で使用したオリゴヌクレオチドの配列

Table 2. List of primers used for qRT-PCR.

gene	primer sequence
<i>BSR1</i>	AGGTGAGGTTGCACTCTGCT CCAAGAATCCACCAACTCGT
<i>BSR1</i> (ORF)	CCGGGACTTCAAAGCATCTAAC TGTTGGTCCCTCCCTTGCT
<i>BSR1-LIKE</i>	TCGAGAGGGTGCTCCAGAT CACTGGTTGACCGTCGTTG
<i>HPB tag</i>	GCTCCGAAACATCATCACACC TGCTCCATCTTCATTGCCTCT
<i>PBZ1</i>	CCGGCTTGGTCGACGACATT CCGACTTTAGGACATGACTT
<i>PAL1</i>	GCTATCAACGAAGGCAAGCAC GCCTCCACACTCCACTGTTATTC
<i>DPF</i>	CGTGCAAACCTAACATTACA GGCACCTCCCTTTTTCTTCTT
<i>KSL4</i>	GTATTTTCATGGGACAAAATCTCTGG CCATCCTTGCATTCCCTCTC
<i>KSL7</i>	TCTACTACCAGACCGACGGATTC GAGTTGAAGTGGCTCGTTGATG
<i>RBOHB</i>	TCGGTGTGTTCTACTGTGGTGAG CTTGTGTTTGTCTTGTGGGTGAA
<i>RUBQ1</i>	GGAGCTGCTGCTGTTCTAGG TTCAGACACCATCAAACCAGA
<i>Cas9</i>	CCGTTACACAAGGCGTAAGAATAGA TCCAGACGGTGAAAGAAGGAA
<i>eEF1a</i>	CAACCCTGACAAGATTCCCT AGTCAAGGTTGGTGGACCTC
<i>PBL19</i>	GGCTACGACTACGACCAAGGA CCTCTGACACTAACCCCTCTCAA
<i>Actin2</i>	CACTTGTGTGTGACAAACTCTCTGG GGGACTAAAACGCAAAACGAAA

Table 3. List of oligonucleotides cloned into gRNA for CRISPR/Cas9 system.

Target	Sequence
<i>BSR1</i> -target1	gttgTCCAAGAGCAAGGAATCGTC aaacGACGATTCCTTGCTCTTGGA
<i>BSR1</i> -target2	gttgGCTGCAAGAAATGAGCTGCT aaacAGCAGCTCATTTCCTGCAGC
<i>BSR1</i> -target8	gttgTGGGTTGGTTCAAGAAGCGG aaacCCGCTTCTTGAACCAACCCA



## 参考文献

- Acevedo F, Rivera-Vega L, Chung S, Ray S, Felton G. 2015.** Cues from Chewing Insects - The Intersection of DAMPs, HAMPs, MAMPs and Effectors. *Current Opinion in Plant Biology* **26**: 80-86.
- Ao Y, Li Z, Feng D, Xiong F, Liu J, Li J, Wang M, Wang J, Liu B, Wang H. 2014.** OsCERK1 and OsRLCK176 Play Important Roles in Peptidoglycan and Chitin Signaling in Rice Innate Immunity. *Plant Journal* **80**(6): 1072-1084.
- Bernays E. 1991.** Evolution of Insect Morphology in Relation to Plants. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **333**(1267): 257-264.
- Boller T, Felix G. 2009.** A Renaissance of Elicitors: Perception of Microbe-Associated Molecular Patterns and Danger Signals by Pattern-Recognition Receptors. *Annual Review of Plant Biology* **60**: 379-406.
- Bradley D, Kjellbom P, Lamb C. 1992.** Elicitor-induced and Wound-induced Oxidative Cross-linking of a Proline-rich Plant-cell Wall Protein – A Novel, Rapid Defense Response. *Cell* **70**(1): 21-30.
- Chen S, Schopfer P. 1999.** Hydroxyl-radical Production in Physiological Reactions - A Novel Function of Peroxidase. *European Journal of Biochemistry* **260**(3): 726-735.
- Chi M, Park S, Kim S, Lee Y. 2009.** A Novel Pathogenicity Gene Is Required in the Rice Blast Fungus to Suppress the Basal Defenses of the Host. *Plos Pathogens* **5**(4).

de Jonge R, van Esse H, Kombrink A, Shinya T, Desaki Y, Bours R, van der Krol S, Shibuya N, Joosten M, Thomma B. 2010. Conserved Fungal LysM Effector Ecp6 Prevents Chitin-Triggered Immunity in Plants. *Science* **329**(5994): 953-955.

Desaki Y, Kouzai Y, Ninomiya Y, Iwase R, Shimizu Y, Seko K, Molinaro A, Minami E, Shibuya N, Kaku H, et al. 2018. OsCERK1 Plays a Crucial Role in the Lipopolysaccharide-induced Immune Response of Rice. *New Phytologist* **217**(3): 1042-1049.

Djamin A, Pathak M. 1967. Role of Silica in Resistance to Asiatic Rice Borer *Chilo Suppressalis* (Walker) in Rice Varieties. *Journal of Economic Entomology* **60**(2): 347-&.

Dubouzet J, Maeda S, Sugano S, Ohtake M, Hayashi N, Ichikawa T, Kondou Y, Kuroda H, Horii Y, Matsui M, et al. 2011. Screening for Resistance against *Pseudomonas syringae* in Rice-FOX *Arabidopsis* Lines Identified a Putative Receptor-like Cytoplasmic Kinase Gene that Confers Resistance to Major Bacterial and Fungal Pathogens in *Arabidopsis* and Rice. *Plant Biotechnology Journal* **9**(4): 466-485.

Endo M, Mikami M, Toki S. 2015. Multigene Knockout Utilizing Off-target Mutations of the CRISPR/Cas9 System in Rice. *Plant Cell Physiol* **56**(1): 41-47.

Erb M, Reymond P, Merchant S. 2019. Molecular Interactions Between Plants and Insect Herbivores. *Annual Review of Plant Biology, Vol 70* **70**: 527-557.

- Fan J, Bai P, Ning Y, Wang J, Shi X, Xiong Y, Zhang K, He F, Zhang C, Wang R, et al. 2018.** The Monocot-Specific Receptor-like Kinase SDS2 Controls Cell Death and Immunity in Rice. *Cell Host & Microbe* **23**(4): 498-510.
- Fernandez J, Marroquin-Guzman M, Nandakumar R, Shijo S, Cornwell K, Li G, Wilson R. 2014.** Plant Defence Suppression is Mediated by a Fungal Sirtuin during Rice Infection by *Magnaporthe oryzae*. *Molecular Microbiology* **94**(1): 70-88.
- Fernandez J, Wilson R. 2014.** Characterizing Roles for the Glutathione Reductase, Thioredoxin Reductase and Thioredoxin Peroxidase- Encoding Genes of *Magnaporthe oryzae* during Rice Blast Disease. *Plos One* **9**(1): e87300.
- Fu Y, Foden JA, Khayter C, Maeder ML, Reyon D, Joung JK, Sander JD. 2013.** High-frequency Off-target Mutagenesis Induced by CRISPR-Cas Nucleases in Human Cells. *Nature Biotechnology* **31**(9): 822-826.
- Hegedus D, Erlandson M, Gillott C, Toprak U. 2009.** New Insights into Peritrophic Matrix Synthesis, Architecture, and Function. *Annual Review of Entomology* **54**: 285-302.
- Huang K, Czymmek K, Caplan J, Sweigard J, Donofrio N. 2011.** HYR1-Mediated Detoxification of Reactive Oxygen Species Is Required for Full Virulence in the Rice Blast Fungus. *Plos Pathogens* **7**(4): e1001335.

- Jiang C, Shimono M, Sugano S, Kojima M, Yazawa K, Yoshida R, Inoue H, Hayashi N, Sakakibara H, Takatsuji H. 2010.** Abscisic Acid Interacts Antagonistically with Salicylic Acid Signaling Pathway in Rice-*Magnaporthe grisea* Interaction. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **23**(6): 791-798.
- Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna J, Charpentier E. 2012.** A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science* **337**(6096): 816-821.
- Jones J, Dangl J. 2006.** The Plant Immune System. *Nature* **444**(7117): 323-329.
- Kadota Y, Sklenar J, Derbyshire P, Stransfeld L, Asai S, Ntoukakis V, Jones J, Shirasu K, Menke F, Jones A, et al. 2014.** Direct Regulation of the NADPH Oxidase RBOHD by the PRR-Associated Kinase BIK1 during Plant Immunity. *Molecular Cell* **54**(1): 43-55.
- Kaku H, Nishizawa Y, Ishii-Minami N, Akimoto-Tomiyama C, Dohmae N, Takio K, Minami E, Shibuya N. 2006.** Plant Cells Recognize Chitin Fragments for Defense Signaling through a Plasma Membrane Receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**(29): 11086-11091.
- Kanda Y, Nakagawa H, Nishizawa Y, Kamakura T, Mori M. 2019.** Broad-Spectrum Disease Resistance Conferred by the Overexpression of Rice RLCK BSR1 Results from an Enhanced Immune Response to Multiple MAMPs. *International Journal of Molecular Sciences* **20**(22): 5523.

- Kanda Y, Yokotani N, Maeda S, Nishizawa Y, Kamakura T, Mori M. 2017.** The Receptor-like Cytoplasmic Kinase BSR1 Mediates Chitin-induced Defense Signaling in Rice Cells. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **81(8)**: 1497-1502.
- Kawasaki T, Yamada K, Yoshimura S, Yamaguchi K. 2017.** Chitin Receptor-Mediated Activation of MAP Kinases and ROS Production in Rice and *Arabidopsis*. *Plant Signaling & Behavior* **12(9)**: e1361076.
- Kondou Y, Higuchi M, Takahashi S, Sakurai T, Ichikawa T, Kuroda H, Yoshizumi T, Tsumoto Y, Horii Y, Kawashima M, et al. 2009.** Systematic Approaches to Using the FOX Hunting System to Identify Useful Rice Genes. *Plant Journal* **57(5)**: 883-894.
- Kouzai Y, Mochizuki S, Nakajima K, Desaki Y, Hayafune M, Miyazaki H, Yokotani N, Ozawa K, Minami E, Kaku H, et al. 2014a.** Targeted Gene Disruption of OsCERK1 Reveals Its Indispensable Role in Chitin Perception and Involvement in the Peptidoglycan Response and Immunity in Rice. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **27(9)**: 975-982.
- Kouzai Y, Nakajima K, Hayafune M, Ozawa K, Kaku H, Shibuya N, Minami E, Nishizawa Y. 2014b.** CEBiP is the Major Chitin Oligomer-binding Protein in Rice and Plays a Main Role in the Perception of Chitin Oligomers. *Plant Molecular Biology* **84(4-5)**: 519-528.
- Lei Y, Lu L, Liu HY, Li S, Xing F, Chen LL. 2014.** CRISPR-P: A Web Tool for Synthetic Single-guide RNA Design of CRISPR-system in Plants. *Molecular Plant* **7(9)**: 1494-1496.

- Li L, Li M, Yu L, Zhou Z, Liang X, Liu Z, Cai G, Gao L, Zhang X, Wang Y, et al. 2014.** The FLS2-Associated Kinase BIK1 Directly Phosphorylates the NADPH Oxidase RbohD to Control Plant Immunity. *Cell Host & Microbe* **15**(3): 329-338.
- Li Z, Ao Y, Feng D, Liu J, Wang J, Wang H, Liu B. 2017.** OsRLCK 57, OsRLCK107 and OsRLCK118 Positively Regulate Chitin- and PGN-Induced Immunity in Rice. *Rice* **10**: 6.
- Liang X, Zhou J, Merchant S. 2018.** Receptor-Like Cytoplasmic Kinases: Central Players in Plant Receptor Kinase-Mediated Signaling. *Annual Review of Plant Biology, Vol 69* **69**: 267-299.
- Livak K, Schmittgen T. 2001.** Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-time Quantitative PCR and the  $C_T$  ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) Method. *Methods* **25**(4): 402-408.
- Louis J, Peiffer M, Ray S, Luthe D, Felton G. 2013.** Host-specific Salivary Elicitor(s) of European Corn Borer Induce Defenses in Tomato and Maize. *New Phytologist* **199**(1): 66-73.
- Lu D, Wu S, Gao X, Zhang Y, Shan L, He P. 2010.** A Receptor-like Cytoplasmic Kinase, BIK1, Associates with a Flagellin Receptor Complex to Initiate Plant Innate Immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**(1): 496-501.
- Lu H, Higgins V. 1999.** The Effect of Hydrogen Peroxide on the Viability of Tomato Cells and of the Fungal Pathogen *Cladosporium fulvum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **54**(5-6): 131-143.

- Macho A, Zipfel C. 2014.** Plant PRRs and the Activation of Innate Immune Signaling. *Molecular Cell* **54**(2): 263-272.
- Maeda S, Hayashi N, Sasaya T, Mori M. 2016.** Overexpression of BSR1 Confers Broad-spectrum Resistance against Two Bacterial Diseases and Two Major Fungal Diseases in Rice. *Breeding Science* **66**(3): 396-406.
- Matsushita A, Inoue H, Goto S, Nakayama A, Sugano S, Hayashi N, Takatsuji H. 2013.** Nuclear Ubiquitin Proteasome Degradation Affects WRKY45 Function in the Rice Defense Program. *Plant Journal* **73**(2): 302-313.
- Mikami M, Toki S, Endo M. 2015.** Comparison of CRISPR/Cas9 Expression Constructs for Efficient Targeted Mutagenesis in Rice. *Plant Molecular Biology* **88**(6): 561-572.
- Molina L, Kahmann R. 2007.** An *Ustilago maydis* Gene Involved in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Detoxification is Required for Virulence. *Plant Cell* **19**(7): 2293-2309.
- Monaghan J. 2018.** Conserved Degradation of Orthologous RLCKs Regulates Immune Homeostasis. *Trends in Plant Science* **23**(7): 554-557.
- Monaghan J, Matschi S, Shorinola O, Rovenich H, Matei A, Segonzac C, Malinovsky F, Rathjen J, MacLean D, Romeis T, et al. 2014.** The Calcium-Dependent Protein Kinase CPK28 Buffers Plant Immunity and Regulates BIK1 Turnover. *Cell Host & Microbe* **16**(5): 605-615.
- Monaghan J, Zipfel C. 2012.** Plant Pattern Recognition Receptor Complexes at the Plasma Membrane. *Current Opinion in Plant Biology* **15**(4): 349-357.

- Nakagawa H, Tanaka A, Tanabata T, Ohtake M, Fujioka S, Nakamura H, Ichikawa H, Mori M. 2012.** SHORT GRAIN1 Decreases Organ Elongation and Brassinosteroid Response in Rice. *Plant Physiology* **158**(3): 1208-1219.
- Nakamura H, Hakata M, Amano K, Miyao A, Toki N, Kajikawa M, Pang J, Higashi N, Ando S, Toki S, et al. 2007.** A Genome-Wide Gain-of-Function Analysis of Rice Genes Using the FOX-hunting System. *Plant Molecular Biology* **65**(4): 357-371.
- Nojiri H, Sugimori M, Yamane H, Nishimura Y, Yamada A, Shibuya N, Kodama O, Murofushi N, Omori T. 1996.** Involvement of Jasmonic Acid in Elicitor-Induced Phytoalexin Production in Suspension-Cultured Rice Cells. *Plant Physiol* **110**(2): 387-392.
- PENG M, KUC J. 1992.** Peroxidase-generated Hydrogen-peroxide as a Source of Antifungal Activity In vitro and on Tobacco Leaf-disks. *Phytopathology* **82**(6): 696-699.
- Qi Y, Katagiri F. 2009.** Purification of Low-abundance *Arabidopsis* Plasma-membrane Protein Complexes and Identification of Candidate Components. *Plant Journal* **57**(5): 932-944.
- Rao S, Zhou Z, Miao P, Bi G, Hu M, Wu Y, Feng F, Zhang X, Zhou J. 2018.** Roles of Receptor-Like Cytoplasmic Kinase VII Members in Pattern-Triggered Immune Signaling. *Plant Physiology* **177**(4): 1679-1690.
- Schwacke R, Hager A. 1992.** Fungal Elicitors Induce a Transient Release of Active Oxygen Species from Cultured Spruce Cells that is Dependent on Ca<sup>2+</sup> and Protein-kinase Activity. *Planta* **187**(1): 136-141.



- Shibuya N, Minami E. 2001.** Oligosaccharide Signalling for Defence Responses in Plant. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **59**(5): 223-233.
- Shimizu T, Nakano T, Takamizawa D, Desaki Y, Ishii-Minami N, Nishizawa Y, Minami E, Okada K, Yamane H, Kaku H, et al. 2010.** Two LysM Receptor Molecules, CEBiP and OsCERK1, Cooperatively Regulate Chitin Elicitor Signaling in Rice. *Plant Journal* **64**(2): 204-214.
- Shinya T, Hojo Y, Desaki Y, Christeller J, Okada K, Shibuya N, Galis I. 2016.** Modulation of Plant Defense Responses to Herbivores by Simultaneous Recognition of Different Herbivore-associated Elicitors in Rice. *Scientific Reports* **6**: 32537.
- Shinya T, Yasuda S, Hyodo K, Tani R, Hojo Y, Fujiwara Y, Hiruma K, Ishizaki T, Fujita Y, Saijo Y, et al. 2018.** Integration of Danger Peptide Signals with Herbivore-associated Molecular Pattern Signaling Amplifies Anti-herbivore Defense Responses in Rice. *Plant Journal* **94**(4): 626-637.
- Shiu S, Karlowski W, Pan R, Tzeng Y, Mayer K, Li W. 2004.** Comparative Analysis of the Receptor-like Kinase Family in *Arabidopsis* and Rice. *Plant Cell* **16**(5): 1220-1234.
- Stahl E, Hilfiker O, Reymond P. 2018.** Plant-arthropod Interactions: Who is the Winner? *Plant Journal* **93**(4): 703-728.
- Sugano S, Maeda S, Hayashi N, Kajiwara H, Inoue H, Jiang C, Takatsuji H, Mori M. 2018.** Tyrosine Phosphorylation of a Receptor-like Cytoplasmic Kinase, BSR1, Plays a Crucial Role in Resistance to Multiple Pathogens in Rice. *Plant Journal* **96**(6): 1137-1147.

- Tanabe S, Ishii-Minami N, Saitoh K, Otake Y, Kaku H, Shibuya N, Nishizawa Y, Minami E. 2011.** The Role of Catalase-Peroxidase Secreted by *Magnaporthe oryzae* During Early Infection of Rice Cells. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **24**(2): 163-171.
- Tanabe S, Nishizawa Y, Minami E. 2009.** Effects of Catalase on the Accumulation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Rice Cells Inoculated with Rice Blast Fungus, *Magnaporthe oryzae*. *Physiologia Plantarum* **137**(2): 148-154.
- Toki S, Hara N, Ono K, Onodera H, Tagiri A, Oka S, Tanaka H. 2006.** Early Infection of Scutellum Tissue with *Agrobacterium* Allows High-speed Transformation of Rice. *Plant Journal* **47**(6): 969-976.
- Vij S, Giri J, Dansana P, Kapoor S, Tyagi A. 2008.** The Receptor-like Cytoplasmic Kinase (OsRLCK) Gene Family in Rice: Organization, Phylogenetic Relationship, and Expression during Development and Stress. *Molecular Plant* **1**(5): 732-750.
- Wang C, Wang G, Zhang C, Zhu P, Dai H, Yu N, He Z, Xu L, Wang E. 2017.** OsCERK1-Mediated Chitin Perception and Immune Signaling Requires Receptor-like Cytoplasmic Kinase 185 to Activate an MAPK Cascade in Rice. *Molecular Plant* **10**(4): 619-633.
- Wang J, Grubb L, Wang J, Liang X, Li L, Gao C, Ma M, Feng F, Li M, Zhang X, et al. 2018.** A Regulatory Module Controlling Homeostasis of a Plant Immune Kinase. *Molecular Cell* **69**(3): 493-504.
- Waszczak C, Carmody M, Kangasjarvi J, Merchant S. 2018.** Reactive Oxygen Species in Plant Signaling. *Annual Review of Plant Biology*, Vol **69** **69**: 209-236.

- Wrzaczek M, Brosche M, Kangasjarvi J. 2013.** ROS Signaling Loops - Production, Perception, Regulation. *Current Opinion in Plant Biology* **16(5): 575-582.**
- Yamada K, Yamaguchi K, Yoshimura S, Terauchi A, Kawasaki T. 2017.** Conservation of Chitin-Induced MAPK Signaling Pathways in Rice and *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology* **58(6): 993-1002.**
- Yamaguchi K, Yamada K, Ishikawa K, Yoshimura S, Hayashi N, Uchihashi K, Ishihama N, Kishi-Kaboshi M, Takahashi A, Tsuge S, et al. 2013.** A Receptor-like Cytoplasmic Kinase Targeted by a Plant Pathogen Effector Is Directly Phosphorylated by the Chitin Receptor and Mediates Rice Immunity. *Cell Host & Microbe* **13(3): 347-357.**
- Yamamura C, Mizutani E, Okada K, Nakagawa H, Fukushima S, Tanaka A, Maeda S, Kamakura T, Yamane H, Takatsuji H, et al. 2015.** Diterpenoid Phytoalexin Factor, a bHLH Transcription Factor, Plays a Central Role in the Biosynthesis of Diterpenoid Phytoalexins in Rice. *Plant Journal* **84(6): 1100-1113.**
- Yoshinaga N, Aboshi T, Abe H, Nishida R, Alborn H, Tumlinson J, Mori N. 2008.** Active Role of Fatty Acid Amino Acid Conjugates in Nitrogen Metabolism in *Spodoptera litura* Larvae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105(46): 18058-18063.**
- Zhang J, Li W, Xiang T, Liu Z, Laluk K, Ding X, Zou Y, Gao M, Zhang X, Chen S, et al. 2010.** Receptor-like Cytoplasmic Kinases Integrate Signaling from Multiple Plant Immune Receptors and Are Targeted by a *Pseudomonas syringae* Effector. *Cell Host & Microbe* **7(4): 290-301.**

## 謝辞

本研究を進めるにあたり、手厚いご指導を頂いた森昌樹客員教授（東京理科大学 理工学研究科 応用生物学専攻／農研機構 生物機能利用研究部門 植物機能制御ユニット）と 鎌倉高志教授（東京理科大学 理工学研究科 応用生物学専攻）に感謝いたします。

本論文の審査にあたって数々のご意見・ご助言・ご指摘をいただいた松永幸大教授（東京理科大学 理工学部 応用生物科学科）、島田浩章教授（東京理科大学 基礎工学部 生物工学科）、早瀬仁則教授（東京理科大学 理工学部 機械工学科）に感謝いたします。

CRISPR/Cas9 システム用ベクターを分けて頂いた遠藤真咲博士（農研機構 生物機能利用研究部門 先進作物ゲノム改変ユニット）に感謝いたします。昆虫由来サンプルの提供をいただき、イネの食害応答の研究についてご指導いただいた新屋友規准教授（岡山大学 資源植物科学研究所 植物・昆虫間相互作用グループ）に感謝いたします。タグ化タンパク質発現のためのベクターを分けて頂いた片桐文章教授（Department of Plant Biology, Microbial and Plant Genomics Institute, University of Minnesota）に感謝いたします。リーフストリップを用いた ROS 定量法についてアドバイスと機器の提供をいただいた渋谷直人博士（明治大学 農学部 生命科学科）と出崎能丈博士（東京理科大学 基礎工学部生物工学科）に感謝いたします。

培養細胞実験において多くの助力をいただいた南栄一博士、西澤洋子博士、横谷尚起博士（農研機構 生物機能利用研究部門）に感謝いたします。イネとシロイヌナズナの病原体の扱いについてご指導頂いた前田哲博士（農研機構 生物機能利用研究部門 植物機能制御ユニット）に感謝いたします。ウェスタン解析

についてご助言をいただいた菅野正治博士（農研機構 生物機能利用研究部門 植物機能制御ユニット）に感謝いたします。

本研究を支えて頂いた植物機能制御ユニット 森研究室の梅田千代子さん、仙波富子さん、石崎ロイスさん、山崎百佳さんならびに生物機能利用研究部門の皆様感謝いたします。様々な助言を頂いた山村千紘修士、ならびに鎌倉研究室の皆様感謝いたします。

2020年3月

神田恭和