

イネの自然免疫応答における RACK1 の機能解析

中島 綾子

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科・植物分子遺伝学講座

(島本 功 教授)

平成 20 年 11 月 4 日提出

推薦教員	植物分子遺伝学講座 島本 功 教授		
氏名	中島 綾子	提出	平成 20 年 11 月 4 日
題目	イネの自然免疫応答における RACK1 の機能解析		
<p>要旨</p> <p>低分子量 G タンパク質は活性型(GTP 型), 不活性型(GDP 型)の 2 つの構造をとることで, 動植物共通してさまざまなシグナル伝達の分子スイッチとして機能している。植物には Rho ファミリーに相当する Rac/Rop ファミリーが存在する。これまでに Rac/Rop ファミリーは, 花粉管の伸長, 細胞分化及びストレス応答等で機能していることが報告されており, イネでは 7 遺伝子, シロイヌナズナでは 11 遺伝子から成っている。</p> <p>植物の自然免疫応答における Rac/Rop ファミリーの働きは, イネ, オオムギを用いて研究されている。我々の研究室では, これまでにイネの OsRac1 が抵抗性遺伝子を介するいもち病や白葉枯病に対する抵抗性反応や, アセチルキトオリゴ糖やスフィンゴ脂質エリシターによって誘導される自然免疫応答に機能していることを明らかにしている。</p> <p>植物は病原体の侵入を認識すると, NADPH オキシダーゼによって一過的な活性酸素種の生成を引き起こす。これまでに我々は NADPH オキシダーゼとして機能している <i>rboh</i> をイネからクローニングし, Rboh の N 末端と活性型 OsRac1 が直接相互作用することを明らかにした。また, OsRac1 がイネの自然免疫応答において複合体を形成し, この複合体中には植物の病害抵抗性における主要な因子として知られている RAR1, HSP90 及び HSP70 を含んでいることを報告した。</p> <p>本研究では, イネの自然免疫応答に関わる OsRac1 を中心とした複合体の構成成分を明らかにするため, プロテーム解析の手法を用いた。OsRac1 アフィニティークロマトグラフィーと質量分析の結果から OsRac1 と相互作用するタンパク質として 5 つの NB-LRR 型タンパク質, stress-inducible protein 1(STI1)</p>			

及び RACK1 (Receptor for Activated C-Kinase 1)を同定した。NB-LRR 型タンパク質は抵抗性遺伝子産物の主要なクラスでシロイヌナズナには約 150, イネには約 600 存在する。STI1 は, 哺乳類では Hop として知られており HSP90 や HSP70 のコシャペロンとして機能し, 3 つの tetratricopeptide repeat (TPR) domains をもっている。RACK1 は動物では多くのシグナル伝達でさまざまなタンパク質と相互作用することがわかっている。RACK1 の構造はトリプトファン, アスパラギン酸が約 40 アミノ酸配列ごとに現れ(WD リピートドメイン), β シート配列を 7 回持っている。その構造解析の結果からスキヤフォールド(足場)タンパク質であると考えられている。また, 酵母や動物では 80S リボソームと相互作用し, 翻訳制御に関わっていることが報告され, シロイヌナズナにおいても細胞質リボソームに相互作用することがわかっている。これらのことから真核生物において RACK1 は, さまざまな機能を有していると考えられる。

私は RACK1 がイネの自然免疫応答にどのように関わっているのかを明らかにするため機能解析を行った。イネには *RACK1A*, *RACK1B* の 2 つの遺伝子が存在し, 質量分析によって同定されたタンパク質は *RACK1A* であった。RACK1 は 7 つの WD40 リピートドメイン(WD1~7)を有し, 活性型 OsRac1 は *RACK1A* の WD1 及び WD2 ドメインを介して直接相互作用することがわかった。また, イネの培養細胞を用いた共免疫沈降によって恒常的活性型 OsRac1 複合体に *RACK1A* が存在することを明らかにした。OsRac1 は遺伝子発現及び転写後制御の両方において *RACK1A* を正に制御していることがわかった。また, *RACK1A* の遺伝子発現はエリシター, アブシジン酸, ジャスモン酸及びオーキシシンによっても誘導され, *RACK1A* は植物免疫応答だけでなく, 植物ホルモンに対する応答においても機能していると考えられた。*RACK1A* の過剰発現体および発現抑制体を用いた解析から, *RACK1A* は活性酸素種の生成及びイネいもち病菌に対する抵抗性に機能していることがわかった。実際, *RACK1A* は Rboh の N 末端領域に結合することから, *RACK1A* は直接的な相互作用により Rboh の活性を制御していると考えられる。さらに, *RACK1A* は OsRac1 複合体の構成因子として同定された植物免疫応答の分子シャペロンである RAR1 や SGT1 と相互作用することが示された。本研究の結果から *RACK1A* は, OsRac1 複合体中で防御応答の主要なタンパク質と相互作用し, イネの自然免疫応答に関わっていることが明らかとなった。

目次

1.序論	4
2.材料と方法	11
2-1 OsRac1 アフィニティークロマトグラフィー	11
2-1-1 イネ培養細胞調製とアフィニティークロマトグラフィー	11
2-1-2 電気泳動, 染色及び質量分析	12
2-1-3 質量分析によるタンパク質同定	12
2-2 酵母 two-hybrid 法	12
2-3 RNA 抽出とリアルタイム RT-PCR	13
2-4 コンストラクションとイネの形質転換体作出	13
2-5 キシレノールオレンジ反応による H ₂ O ₂ 測定法	14
2-6 親和性いもち病菌レース 007 の接種	14
2-7 メチルジャスモン酸, インドール-3-酢酸, アブシジン酸処理	15
2-8 Nitro blue tetrazolium (NBT)染色	15
2-9 イムノブロット解析	15
2-9-1 RACK1A 抗体の作製	15
2-9-2 免疫沈降法及びイムノブロット解析	15
3.結果	17
3-1. OsRac1 アフィニティークロマトグラフィーによる相互作用因子の同定	17
3-2. OsRac1 は RACK1A の WD リピートドメイン 1 及び 2 と相互作用する	18
3-3. RACK1A は CA-OsRac1 複合体中に存在する	19
3-4. イネの培養細胞中で RACK1A の遺伝子発現はスフィンゴ脂質エリシターや植物ホルモンによって誘導される	20
3-5. イネの培養細胞において RACK1A は活性酸素種の生成と防御遺伝子の発現に関わっている	20
3-6. RACK1A 過剰発現体はいもち病菌に対して抵抗性を示す	21
3-7. OsRac1-RNAi では RACK1A の遺伝子発現, タンパク質量や PBZ1 の遺伝子発現が低下している	22

3-8. RACK1A は RAR1 及び SGT1 と相互作用する	22
4. 考察	24
4-1. OsRac1 アフィニティクロマトグラフィー	24
4-2. 活性型 OsRac1 特異的に相互作用する RACK1A の機能	25
4-3. イネの自然免疫応答での RACK1 の機能	27
4-4. NB-LRR 型 R タンパク質, OsRac1 及び RACK1 との関係	28
4-5. OsRac1 によって RACK1A の発現は調節されている	29
4-6. 最後に	29
5. 謝辞	31
6. 参考文献	32
7. 表	43
8. 図	45
9. 参考資料 表, 図	56

1. 序論

植物は病原体(細菌, ウイルス, カビなど)の侵入を認識すると, 活性酸素種の生成や防御遺伝子の発現を誘導するなど防御能力があることがわかっており, 近年, 宿主側の一連の抵抗性反応のことは植物の自然免疫応答“plant innate immunity”(Zipfel and Felix, 2005; Chisholm *et al.*, 2006; Jones and Dangl, 2006)と呼ばれている。植物の自然免疫応答には 2 つの防御システムが存在すると考えられている。1 つは, 病原体の表層に存在する特有の分子パターン(pathogen-associated molecular patterns ; PAMPs)の認識によって誘導される(PAMP-triggered immunity ; PTI)と呼ばれる機構である。PAMPs は多くの関連病原体に共通し, 原核生物(細菌)の例では, 細菌の鞭毛を構成するフラジェリン(flagellin), グラム陰性菌のペプチドグリカンやリポ多糖(lipopolysaccharide ; LPS)などが相当する。フラジェリンの N 末端側に保存されているペプチド flg22 を処理すると, 宿主であるシロイヌナズナを受容体 FLS2 によって認識され, 約 1000 の遺伝子発現が誘導される(Zipfel *et al.*, 2004; Navarro *et al.*, 2004)。また, 同じく PAMP の 1 つである翻訳伸長因子(elongation factor2 ; EF2)の Tu ドメインからなる elf18(Kunze *et al.*, 2004)は受容体 EFR によって認識され, elf18 処理区では flg22 処理と非常に類似した遺伝子発現が認められた(Zipfel *et al.*, 2006)。このことから病原体に複数の PAMPs が存在する場合, そのなかのどれかが宿主側で認識されると共通のシグナル伝達が活性化され免疫反応が誘導されるものと考えられている。FLS2 と EFR は, 細胞膜に局在するロイシンリッチリピート受容体型タンパク質であり, これまで植物でみいだされている PAMPs の受容体は, 動物の先天性自然免疫に関わる受容体と類似した構造であることがわかっている(Zipfel and Felix, 2005; Chisholm *et al.*, 2006)。

2 つ目の免疫システムは, 病原体から生産されるエフェクターが引き金となって, そのエフェクターと植物の抵抗性遺伝子(resistance gene ; R)との相互作用によって特異的に誘導される(effector-triggered immunity ; ETI) (Chisholm *et al.*, 2006; Jones and Dangl, 2006)。この免疫システムは 1971 年に Flor が唱えた遺伝子対遺伝子説(gene-for-gene theory)が基本となっており(Flor, 1971), 植物の抵抗性遺伝子と対応する病原体の非病原性遺伝子(avirulence ; Avr)の組み合わせによって決定されることが考えられている。植物の R 遺伝子と対応する Avr 遺伝子が遭遇した場合, 過敏反応

(hypersensitive response ; HR)などが誘導され、病原体の侵入や拡大を阻止するため細胞死を伴うことが多い。

R 遺伝子として主要なクラスには NB-LRR 遺伝子が挙げられ、シロイヌナズナには約 150 (Meyers *et al.*, 2003), イネには約 600 存在する (Bai *et al.*, 2002)。この R 遺伝子のファミリーは一次構造上, ATP 結合サイト(nucleotide binding ; NB)があり, C 末端にロイシンリッチリピート(leucine-rich repeat ; LRR)をもつ。

R 遺伝子と非病原性遺伝子の関係を説明するために, 現在考えられているモデルとして, 主にガード説とリガンド-レセプター説が挙げられる。ガード説とは R タンパク質は病原性因子を直接認識するのではなく, 病原性因子からの攻撃の標的となる分子をモニターする (ガードする) ことにより, 病原性因子を間接的に認識するという考え方である。この考え方に基づく病原体の標的タンパク質として RIN4 が同定されている(Mackey, *et al.*, 2002; Mackey, *et al.*, 2003; Axtell, *et al.*, 2003)。シロイヌナズナの NB-LRR 型 R 遺伝子である *RPM1* と *RPS2* は, それぞれ病原細菌である *Pseudomonas syringae* 由来の非病原性遺伝子 *avrRpm1* もしくは *avrB* (*RPM1-avrRpm1/avrB*)と *avrRpt2* (*RPS2-avrRpt2*)とに対応する。酵母 two-hybrid 法を用いてシロイヌナズナの *RPM1* 結合タンパク質として RIN4 が同定され, 植物組織抽出液からの免疫沈降により, RIN4 は *RPM1* のみならず, *AvrRpm1*, *AvrB* とも植物細胞内で相互作用できることが示された(Mackey, *et al.*, 2002)。RIN4 を抑制することにより, *RPM1* 依存の抵抗性は失われた。*AvrRpm1* と *AvrB* は RIN4 のリン酸化を, *AvrRpt2* は RIN4 の喪失を引き起こすことから, *RPM1*, *RPS2* は RIN4 をモニターすることで, 間接的に病原性因子を認識していると考えられる。また, *AvrRpt2* はプロテアーゼとして RIN4 を切断することがわかっている(Coaker *et al.*, 2005)。

イネの NB-LRR 型 R 遺伝子 *Pi-ta* はいもち病菌の非病原性遺伝子 *AVR-Pita* に対応する R 遺伝子である。*Pi-ta* の C 末端のロイシンリッチドメインと *AVR-Pita* は直接相互作用することが報告されている(Jia *et al.*, 2000)。そのため, この組み合わせはリガンド-レセプター型といわれている。また, 結晶構造解析によりアマの R タンパク質 *L* とさび病非病原性タンパク質 *AvrL567* は直接相互作用することが示されている(Wang *et al.*, 2007)。

また, PAMPs によって誘導される自然免疫反応と R 遺伝子によって誘導される反応は宿主で標的となるタンパク質が同じである報告もあることから(Shirasu and Schulze-Lefert, 2003; Kim *et al.*, 2005), これら 2 つの防御システムには関連性がある

と考えられている。マイクロアレイ解析などから、PAMPs の認識によって誘導される自然免疫反応と R 遺伝子を介したシグナル伝達で活性化される遺伝子には大きな違いがないことが報告されている。例えば、シロイヌナズナに *flg22* を処理したときに誘導された遺伝子群は、トマトの R 遺伝子 *Cf9* を導入したタバコ培養細胞にトマト葉カビ病菌の非病原性遺伝子 *Avr9* を発現させた場合に誘導された遺伝子群と同じであったことが報告されている(Navarro *et al.*, 2004)。また、Jones と Dangl らは、植物の免疫システムを、PAMPs の認識段階から R 遺伝子を介する HR を伴う特異的な防御応答まで 4 つの段階に分けたジグザグモデルを提案している(Jones and Dangl, 2006)。第 1 段階は、病原体の PAMPs は宿主である植物側の受容体によって認識され、PAMP が引き金となる免疫システムが誘導され(PTI), それ以上のコロニー形成をとめる。第 2 段階は病原体が宿主へ病原性をもつ因子(エフェクター)の分散に成功し、PAMP が引き金となる免疫システム(PTI)を遅らせる、あるいは抑制することでエフェクターが引き金となる罹病性(effector-triggered susceptibility ; ETS)を引き起こす。第 3 段階はそのエフェクターが NB-LRR 型 R タンパク質の 1 つによって特異的に認識された場合は、エフェクターが引き金となる免疫システムが誘導される(ETI)。ETI はそのシグナル伝達を急速に加速し、PTI の反応を拡大することで HR を伴う強い抵抗性反応を誘導する。第 4 段階は、病原体側が第 3 段階で NB-LRR 型 R タンパク質に認識されない多様性をもつエフェクターあるいは全く異なる他のエフェクターを進化の過程で獲得することで ETI を抑制し、ETS を強めようとする場合である。その場合は、新たなエフェクターに対応する別の対立遺伝子産物 NB-LRR 型 R タンパク質によって認識され、ETI が誘導される。このジグザグモデルからも、病原体側のエフェクター、宿主の受容体認識機構それぞれは終わることなく自身の多様性を生み出しながら進化し続けてきたことが推測される。

これまでに R 遺伝子の下流で機能しているシグナル分子はいくつか単離されているが(Hammond-Kosack and Parker, 2003), その中で RAR1 (required for *Mla12* resistance)は遺伝学的手法によって同定された遺伝子である(Shirasu *et al.*, 1999; Tornero *et al.*, 2002; Muskett *et al.*, 2002)。また、その結合タンパク質として HSP90 (heat shock protein 90), SGT1 (suppressor of the G2 allele of *skp1*)が単離され、逆遺伝学的解析などによってさまざまな NB-LRR 型 R 遺伝子の下流で機能していることが明らかとなっている (Bieri *et al.*, 2004; Holt *et al.*, 2005; Azevedo *et al.*, 2006)。

植物には動物の低分子量 G タンパク質 Rho ファミリーに相当する Rac/Rop (Rho-related GTPase from plant)ファミリーが存在し、1993 年にエンドウからはじめて単離された(Yang *et al.*, 1993)。イネでは 7 遺伝子、シロイヌナズナでは 11 遺伝子から成っている(Yang, 2002; Miki *et al.*, 2005)。動物では 1980 年頃にかん遺伝子として発見された Ras 以来、類似した低分子量 G タンパク質が数多く見いだされ、さまざまな知見が得られている。Ras は酵母から哺乳動物までスーパーファミリーを形成しており、Ras, Rho, Rab, Arf の 4 つのサブファミリーと Ran に大別される (Takai *et al.*, 2001)。これに対して植物ではこれまで大きく 4 つのタイプが報告されており、Rho に類似した Rac/Rop ファミリー、そのほか Rab, Arf, 及び Ran ファミリーがある(Bischoff *et al.*, 1999)。また、注目すべき点は植物には Ras ファミリーが存在しないことである。低分子量 G タンパク質は、活性型(GTP 型)と不活性型(GDP 型)の 2 つの構造をとることにより、動植物に共通して、多様なシグナル伝達の分子スイッチとして機能している。動物での Rho ファミリーの機能は、主としてアクチン系細胞骨格の再編成に依存した細胞機能の制御である(VanAelst *et al.*, 1997)。また、Rho ファミリーの機能として転写因子を活性化し、遺伝子発現を制御することや、食細胞では Rac が NADPH オキシダーゼを活性化し、活性酸素種の生成を促進することが知られている。一方、植物の Rac/Rop ファミリーは、活性酸素種の生成、花粉管の極性伸長、細胞分化及びストレス応答などで機能していることが報告されている(Yang and Fu, 2007)。シロイヌナズナ Rop1At は花粉において特異的に強く発現することがわかっており、AtRac1/Rop3At と Rop5At は花粉だけでなく、それ以外の器官でも発現している(Li *et al.*, 1998)。また、AtRac3/Rop6At, AtRac5/Rop4At は根毛の極性伸長にかかわることが報告されており(Molendijk, *et al.*, 2001)、転写誘導系を用いた形質転換体の根毛における表現型は極性伸長を失い、先端が激しく膨張し形態異常となる。以上のことから植物の Rac/Rop ファミリーは、動物の低分子量 G タンパク質と同様にさまざまなシグナル伝達において分子スイッチとして機能していると考えられる。

1 アミノ酸変異により作成された恒常的に活性型である(constitutively active ; CA-) CA-AtRac4/CA-Rop2At 及びドミナントネガティブ型(dominant-negative ; DN-) DN-AtRac4/DN-Rop2At の過剰発現体では、アブシジン酸(ABA), オーキシシン(インドール-3-酢酸), 及びブラシノライドに対するホルモン応答が野生型と比較して部分的に異なる影響が示された(Li *et al.*, 2001)。また、DN-AtRac4/Rop2At 過剰発現体は非

常に小さいロゼット葉が形成され、花序の数が著しく増加していることが報告されているが、分子機構についてはわかっていない(Li *et al.*, 2001)。

我々はこれまでにイネ OsRac1 に注目し、植物の免疫応答における Rac/Rop ファミリーの機能について研究を行っている。CA-OsRac1 (G19V)を導入した形質転換体では、病原性いもち病菌に対して抵抗性を示した。これに対して DN-OsRac1 (T24N)を導入した形質転換体に非病原性いもち病菌を感染させたところ罹病性を示した。また、CA-OsRac1 導入イネでは、イネの抗菌物質であるモミラクトン A の蓄積が増加し、マーカーである防御遺伝子の発現に変化が見られ、OsRac1 がいもち病抵抗性において重要な働きをしていることが示された(Kawasaki *et al.*, 1999; Ono *et al.*, 2001)。さらに、OsRac1 は、白葉枯病に対する抵抗性反応や(Ono *et al.*, 2001; Suharsono *et al.*, 2002)、PAMPs として働くアセチルキトオリゴ糖やスフィンゴ脂質エリシター(sphingolipid elicitor ; SE)によって誘導される免疫応答にも機能していることがわかった(Ono *et al.*, 2001; Suharsono *et al.*, 2002)。

植物の防御反応では、NADPH オキシダーゼに依存した活性酸素種が生成され、下流への重要なシグナルとなっていることが知られている(Doke, 1983; Lamb and Dixon, 1997)。イネでは CA-OsRac1 が、NADPH オキシダーゼ活性に依存した活性酸素種の生成を誘導し、逆に DN- OsRac1 によって活性酸素種の生成が抑制された(Kawasaki *et al.*, 1999; Ono *et al.*, 2001; Suharsono *et al.*, 2002)。このことから、OsRac1 は NADPH オキシダーゼを介して活性酸素の生成を制御していると考えられた。実際、植物の NADPH オキシダーゼである *rboh* (for *respiratory burst oxidase homolog*)をイネからクローニングし、Rboh と Rac の相互作用を解析したところ、OsRac1 は Rboh の N 末端領域に直接相互作用し、その酵素活性を制御していることが明らかとなった(Wong *et al.*, 2007)。さらに、Rboh の N 末端には 2 つのカルシウムイオン結合 EF-hand モチーフが存在しているが、蛍光共鳴エネルギー移動 (fluorescence resonance energy transfer ; FRET)法を用いた Rboh と OsRac1 の相互作用の解析から、カルシウムイオン濃度によって Rboh と Rac との相互作用が変化することがわかった(Wong *et al.*, 2007)。

また、我々の研究室ではヘテロ三量体 G タンパク質サブユニット G α 遺伝子の変異体 *dwarf1* (*d1*)の解析から、PAMP であるスフィンゴ脂質エリシターに対する初期過程で G α が関わっていることも明らかにしている(Suharsono *et al.*, 2002)。オオムギの RacB はうどんこ病菌に対して罹病性を示す場合に活性化され、ネガティブレ

ギュレーターとして働くと考えられている(Shultheiss *et al.*, 2002, 2003)。このように低分子量 G タンパク質 Rac/Rop ファミリーは活性酸素種の生成, 花粉管の極性伸長などに関わっており, オオムギの RacB のようにネガティブレギュレーターとして働いている因子もあることからさまざまなシグナル伝達において Rac/Rop ファミリーの機能分化が示唆されている。

これまでの耐病性分子機構の解析は, 主にシロイヌナズナを用いた遺伝学的アプローチによって得られた数々の変異体とその原因遺伝子の同定により明らかにされてきた。しかしながら, それぞれのタンパク質の生化学的解析, タンパク質間相互作用及びタンパク質の修飾などによる活性の制御についてはまだほとんど明らかにされていない。我々はプロテオーム解析から, スフィンゴ脂質エリシターによって誘導される主要なタンパク質が OsRac1 によって制御されていることを明らかにした(Fujiwara *et al.*, 2006)。また, OsRac1 がイネの免疫応答において複合体を形成し, この複合体中には, 植物の防御応答での主要な因子である RAR1, HSP90 及び HSP70 を含んでいることを明らかにした(Thao *et al.*, 2007)。

そこで, 私は, イネの自然免疫応答に関わる OsRac1 を中心とした複合体の構成成分を明らかにするため, 生化学的手法により OsRac1 と結合するタンパク質の同定及びその機能解析を行った。OsRac1 アフィニティークロマトグラフィーにより, 相互作用するタンパク質として 21 個のタンパク質を同定したが, その中には, 5 つの NB-LRR 型タンパク質, stress-inducible protein 1 (STI1) 及び RACK1(for Receptor for Activated C-Kinase 1)が含まれていた。STI1 は, 哺乳類では Hop として知られており HSP90 や HSP70 のコシャペロンとして機能し(Pratt and Toft, 2003), 3 つの tetratricopeptide repeat (TPR) domains をもっている(Smith, 2004)。RACK1 は動物では多くの分子活性に機能し, シグナル伝達に関与するさまざまなタンパク質と相互作用することがわかっている(Scechtman and Mochly-Rose, 2001; Yaka *et al.*, 2002; Patterson *et al.*, 2004; Lopez-Bergami *et al.*, 2005)。RACK1 はトリプトファン, アスパラギン酸が約 40 アミノ酸配列ごとに現れる WD40 リピートドメインによって構成される β シート配列を 7 回持つ構造をしており(McCahill *et al.*, 2002), スキヤフォールド(足場)タンパク質であると考えられている。これまでに, 酵母や動物では 80S リボソームと相互作用し, 翻訳制御に関与していることが報告され(Link *et al.*, 1999; Ceci *et al.*, 2003; Sengupta *et al.*, 2004), シロイヌナズナにおいても細胞質リボソームに相互作用することがわかっている(Chang *et al.*, 2005; Giavalisco *et al.*,

2005)。これらのことから真核生物において RACK1 は、さまざまな機能を有していると考えられる。

私は RACK1 に注目し、イネの免疫応答にどのように関わっているのかを明らかにするため機能解析を行った。イネには *RACK1A*, *RACK1B* の 2 つの *RACK1* 遺伝子が存在するが、アフィニティークロマトグラフィーによって同定されたのは、*RACK1A* タンパク質のみであった。酵母 two-hybrid 法によって *RACK1A* 及び *RACK1B* それぞれ CA-OsRac1 と相互作用することが示されたが、*RACK1A* は *RACK1B* に比べ、CA-OsRac1 との相互作用が強いことがわかったため、*RACK1A* を中心に解析を行った。

RACK1 は WD1~7 の 7 つの WD40 リピートドメインを有し CA-OsRac1 は WD1 及び WD2 ドメインと相互作用することがわかった。また、イネの培養細胞を用いた共免疫沈降によって CA-OsRac1 複合体中に *RACK1A* が存在することを明らかにした。さらに、*RACK1A* を過剰発現あるいは発現抑制した形質転換イネ及び培養細胞の解析により、*RACK1A* は活性酸素の生成及びいもち病抵抗性反応の誘導を正に制御していることがわかった。また、*RACK1A* は酵母 two-hybrid 法によって Rboh の N 末端、RAR1 及び SGT1 と相互作用することが示されたことから、*RACK1A* は、OsRac1 複合体中で防御応答の主要なタンパク質と相互作用し、イネの免疫応答に関わっていることが明らかとなった。

2. 材料と方法

2-1 OsRac1 アフィニティークロマトグラフィー

2-1-1 イネ培養細胞調製とアフィニティークロマトグラフィー

いもち病菌に対する R 遺伝子 *Pi-a* をもつジャポニカイネ金南風培養細胞を用いた(Takahashi *et al.*, 1999)。培養後 3 日目に約 400 g の培養細胞を回収し、 -80°C に保存した。

POLYSTRON ホモジナイザーによってイネ培養細胞に TEDM buffer (25 mM Tris/HCl pH 8.0, 5 mM EGTA, 1 mM DTT, 10 mM MgCl_2 , 10% Sucrose, 1 $\mu\text{g/ml}$ Leupeptin) を加えて破碎し、四重ガーゼに通した。6,000 $\times g$, 30 分, 4°C で遠心後、100,000 $\times g$, 60 分, 4°C で遠心し、上精を細胞質画分とし、0~50%の硫酸分画を行うことでタンパク質を濃縮し、アフィニティークロマトグラフィーに使用した。

OsRac1 は、GST 融合タンパク質発現用のプラスミドベクターである pGEX-4T-1(Amersham Biosciences)に挿入したものを使用した(Kawasaki *et al.*, 1999)。GST-OsRac1 タンパク質を 1 mM IPTG(Wako)により大腸菌内で発現誘導させた後、遠心によって大腸菌を回収し、TEDM buffer(20 mM Tris/HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 5 mM MgCl_2 , 10% Sucrose, 10 $\mu\text{g/ml}$ Leupeptin)に懸濁した。ソニケーションにより細胞を破碎し、5500 rpm, 10 分間遠心し(BECKMAN Avanti J-25), タンパク質を抽出した。Glutathion sepharose 4B(Amersham Biosciences)カラムを用いて一晚ビーズとインキュベートさせることにより GST-OsRac1 をビーズに吸着させ、10 mM 還元型グルタチオンを添加して、GST-OsRac1 タンパク質を溶出した。還元型グルタチオンを除去するために TEDM buffer(20 mM Tris/HCl pH 7.5, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 5 mM MgCl_2)で一晩透析した(Spectra/Por, MWCO3500)。10 pmol の融合タンパク質を用いて GTP 結合活性を有しているかを確認した(Kikuchi *et al.*, 1995)。その後、1 時間、 30°C , TEDM buffer(20 mM Tris/HCl at pH 7.5, 19 mM EDTA, 1 mM DTT, 5 mM MgCl_2)で GDP βS (Roche)及び GTP γS (SIGMA)をそれぞれ GST-OsRac1 に結合させた。5 nmol の GST-OsRac1 タンパク質を Glutathion sepharose 4B ビーズに 1 時間吸着させ、GST-OsRac1 タンパク質-Sepharose 結合体カラムを作製した。

細胞質画分における非特異的タンパク質を除去するために、細胞質画分にグルタチオンビーズ少量を加えて、1 時間インキュベートした。その後、再び 100,000 $\times g$, 60 分, 4°C で遠心し、上精タンパク質 1 mg を GDP βS -GST, GTP γS -GST-

OsRac1 カラム, 及びコントロールとして GST カラム, それぞれ 3 つのカラムに通した。その後, 0, 200, 500 mM NaCl を含む TEDM buffer (20 mM Tris/HCl at pH 7.5, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 5 mM MgCl₂) で 3 回ずつフラクションを回収した。最も強く結合していると考えられる 500 mM NaCl を含む TEDM buffer で回収したフラクションをその後の解析に使用した(図 1-A)。

2-1-2 電気泳動, 染色及び質量分析

6%ゲル, 12%ゲルを作製し, SDS-PAGE 電気泳動によってタンパク質を分離し, 銀染色(第一化学)によってバンドを検出した(図 1-B)。その後, 同じサンプルを 10%ゲル SDS-PAGE 電気泳動を行った。その後, ネガティブ染色(Wako)によってバンドを検出し, その後の質量分析のサンプルとした。

2-1-3 質量分析によるタンパク質同定

検出したバンドを切り出し, トリプシン消化酵素(Roche)を用いて処理した(Fujiwara *et al.*, 2006)。Micromass Q-ToF Ultima mass spectrometer (Waters)及び LCQ Deca IONTRAP mass spectrometer (Thermo Electron)を用いて MS/MS 質量分析結果を得た (Fujiwara *et al.*, 2006)。

The National Center for Biotechnology Information(NCBI)及び RiceGAAS(20030114, NIAS Japan のデータベースを用いて得られた MS/MS データを Mascot parameters につけ(Fujiwara *et al.*, 2006), タンパク質を同定した(表 1)。

2-2 酵母 two-hybrid 法

・ *Saccharomyces cerevisiae* L40 株 ; レポーター遺伝子はヒスチジン合成酵素遺伝子 (*HIS3*)と β -ガラクトシダーゼ遺伝子(*lacZ*)である。 *URA3* マーカーを有しているためウラシル非要求性(SC-U)で選抜可能である。

使用したベクター

・ Bait ; pBTM116 ベクター *TRP1* マーカーをもっているためトリプトファン非要求性(SC-W)により選抜可能である。

・ Prey ; pVP16 ベクター *LEU2* マーカーをもっているためロイシン非要求性(SC-L)により選抜可能である。

Bait に使用した CA-OsRac1(accession number ; AB029508), CA-Rac2(accession

number ; AB029509), 3(accession number ; AB029510), 4(accession number ; AK061102), 5(accession number ; AK067504), 6(accession number ; AK100842), 7(accession number ; AK058414)及び DN-OsRac1 コンストラクションは報告した論文のベクターを使用した(Kawasaki *et al.*, 2006; Wong *et al.*, 2007)。Bait 及び Prey ベクターそれぞれに RACK1A(accession number ; D38231) 及び RACK1B(accession number ; AK121567)の全長, RACK1A のドメイン WD1-2, WD 3-7, WD 1 のみ, 及び WD 2 のみを挿入した。Prey ベクターに OsSGT1 (accession number ; AAF18438), OsRAR1 (accession number ; accession number ; AK111881), 及びオオムギ HvHSP90 (accession number ; AY325266) (Takahashi *et al.*, 2003) を挿入した。*Saccharomyces cerevisiae* L40 株に, 作成した Bait, Prey ベクターを Frozen-EZ Yeast Transformation II(ZYMO RESEARCH)を用いて形質転換した。SC-LWU 選択培地で 30°C, 3-5 日間培養し, その後 SC-LWU 選択液体培地で 30°C, 一晚培養した。吸光度 0.5-0.8 に揃え, 4 µl を SC-LWU, SC-LWUH,SC-LWUH+ 3-アミノ-1H-1, 2, 4-トリアゾール(3-AT)選択培地にドットプロットした。結果は 30°C で 5 日間培養したものを結果として示す。

2-3 RNA 抽出とリアルタイム RT-PCR

Total RNA 抽出には EASY Prep RNA (TAKARA)を用い, その方法に準じた。DNase I (Invitrogen)により, genomic DNA を除去後, 1 µg Total RNA から Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen)により cDNA を合成した。1 µl cDNA をテンプレートに, 5 µl SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystems), 0.5 µl の特異的プライマーを使用し, 滅菌水を加え, 20 µl でリアルタイム RT-PCR を行った。ABI PRISM 7000 sequence detection system を用いてデータ解析を行った(Miki and Shimamoto. 2004)。使用したプライマーは表 2 に示した。

2-4 コンストラクションとイネの形質転換体作出

表 2 に示したプライマーを用いて RACK1A cDNA をテンプレートとして増幅した後, pENTR/D-TOPO cloning vector (Invitrogen)にサブクローニングを行った。その後, p2K-1 vector に LR clonase 反応によって導入した。RACK1A の発現は, Maize *Ubg1* promoter により過剰発現される (Christensen *et al.*, 1992)。RACK1A RNAi コンストラクションは表 2 に示したプライマーを用い, 終止コドンの上流 73

bp から 3' UTR 領域 255 bp までの断片 328 bp を増幅し、pANDA vector に導入した (Miki and Shimamoto, 2004)。その後、イネのカルスを用いてアグロバクテリウムによる形質転換体の作出を行った (Hiei *et al.*, 1994)。

2-5 キシレノールオレンジ反応による H₂O₂ 測定法

培養細胞を新しい R2S 培地で培養してから 3 日目に正確に 0.4 g を秤量し IWAKI 35 mm dish に移し、2 ml の新しい R2S 培地を入れた。その後 30°C で一晚培養した。2 ml の新しい R2S 培地中に最終濃度 10 µg/ml になるようにいもち病菌から抽出したスフィンゴ脂質エリシター (Koga *et al.*, 1998; Umemura *et al.*, 2002) を添加し、3 時間後に培地を抽出し、キシレノールオレンジ反応を行った。0.25 mM FeSO₄, 0.25 mM (NH₄SO₄), 25 mM H₂SO₄, 12.5 µM Xylenol orange, 10 mM Sorbitol の反応緩衝液 1 ml に 100 µl の抽出培地を入れ 2 時間室温で反応させた。その後、吸光度 570 nm で測定した (Wong *et al.*, 2004)。

2-6 親和性いもち病菌レース 007 の接種

使用したいもち病菌 (*Magnaprthe grisea*) strain 2403-1 (race 007) は金南風品種に対して病原性である。いもち病菌は V8 agar 培地 (100 ml/l V8 juice, 5 g/l Sucrose, 1 g/l Soluble starch, 1 g/l Yeast extract, 16 g/l), 約一週間 23°C, 暗所で培養し、オートミール培地 (30g/l Oatmeal, 5g/l Sucrose, 16g/l agar) で再び約一週間 23°C, 暗所で培養した。培地上に滅菌水を加え、乾熱滅菌した筆で全体をよくなぞり、菌糸を切断した。その後、約 3 日間 UV 照射し、孢子誘導を行った。滅菌水を加え、筆で孢子を回収し、濃度測定を行った。1x10⁶ spores/ml に調製し、終濃度 0.2% になるように CarboxyMethylCellulose (CMC) を加えた。

長日条件で育てた播種後 30 日目の植物体に接種した。導入遺伝子を確認した独立した 8 系統の T1 形質転換イネの第 4 葉、第 5 葉それぞれ 4 カ所、合計 8 カ所に直径約 1 mm のパンチを行った。それらのポイントに 10 µl ずついもち菌を添加した (n=8)。湿度 90% 以上、23°C で 1~2 日間暗所に置き、その後は 28~30°C の長日条件下に置いた。接種 10 日後の病斑の写真及び病斑の長さを測定した。そのうち 4 系統に関してデータを示した。

2-7 メチルジャスモン酸(MeJA), インドール-3-酢酸(IAA), アブシジン酸(ABA)処理

エリシター処理時と同様に 0.4 g の野性型培養細胞を一晩 2 ml R2S 培地で静置培養し, その後新しい R2S 培地に入れ替える際に 50 μ M Methyl Jasmonate (Wako), 20 μ M Indole-3-Acetic acid (SIGMA), 及び 20 μ M Abscisic acid (SIGMA) 試薬を添加した。その後, 0, 1, 3, 6, 9 時間後に培養細胞を回収し, 液体窒素で凍結した。これらのサンプルから total RNA を抽出後, リアルタイム RT-PCR を行った。コントロールはそれぞれ MeJA, IAA 処理には滅菌水, ABA 処理にはメタノールを R2S 培地に等量添加し同様の作業を行った。

2-8 Nitro blue tetrazolium (NBT)染色

滅菌水を用い, 最終濃度 0.1% の 4-Nitroblue tetrazolium chloride (Boehringer Mannheim) 溶液を準備し, 播種後 5 日目のイネを一晩浸透させた。

2-9 イムノブロット解析

2-9-1 RACK1A 抗体の作製

pET15b (Novagen) vector を使用し, His タグ融合 RACK1A 組み換えタンパク質を大腸菌(BL21)に形質転換し, 1 mM IPTG を添加し, 30°C で 4 時間誘導した。HiTrap chelating HP column (Amersham Biosciences) を用いて精製した。RACK1A タンパク質はウサギの抗原として使用した。pGEX-4T-1 vector (Amersham Biosciences) を使用し, 作製した GST 融合 RACK1A 組み換えタンパク質は, 抗体精製に使用した。GST-RACK1A タンパク質を PVDF メンブレン(MILLIPORE Immobilon) にハイブリし, 10 ml のウサギ血清を 25°C で 4 時間インキュベートした。5 回, Tris-buffer (137mM NaCl, 2.68 mM KCl, 25 mM Tris, pH7.4) でメンブレンを洗浄し, 2 ml の pH 2.5~3.0 溶出液(0.1M glycine, 0.15M HCl) で RACK1A 特異的抗体を溶出し, 速やかに 450 μ l の pH 8.5 HEPES buffer(0.5M HEPES, NaOH) を加え攪拌し, 中和した。

2-9-2 免疫沈降法及びイムノブロット解析

イネの培養細胞及び, 葉は TEDM buffer (25 mM Tris/HCl at pH 8.0, 5 mM EGTA, 1 mM DTT, 10 mM MgCl₂, 10% Sucrose, 1 μ g/ml Leupeptin) を加え, 乳鉢で破碎した。プロテアーゼ阻害剤(Roche complete protease inhibitor cocktail tablets) は 1 錠を 2 ml の蒸留水に希釈し(25 倍希釈)適時使用した。2000 \times g, 10 分, 4°C で遠心し, その上

精を Total タンパク質とした。その後さらに $100,000 \times g$, 60 分, 4°C で遠心し, 細胞質画分とミクロソーム画分を調製した。Total タンパク質を用いた免疫沈降法は myc タグ融合 OsRac1 を導入した培養細胞を用いて行った(Lieberherr *et al.*, 2005)。

12. 5% SDS-PAGE2 電気泳動を行った後, 5 mM Tris, 192 mM glycine, 6.5 mM methanol の緩衝液にゲルを 20 分間浸した。PVDF メンブレン(MILLIPORE Immobilon)は methanol に 20 秒浸した後, ゲルと同様にした。メンブレンは 15V, 20 分間プロットし, ブロック液(大日本製薬 ブロックエース)に一晚, 室温でインキュベートした。その後, 0.1% Tween 20, 1%BSA を PBS(137mM NaCl, 8.1 mM Na_2HPO_4 , 2.68 mM KCl, 1.47 mM KH_2PO_4)に加え, 500 倍希釈のウサギ RACK1A 抗体, 2000 倍希釈のマウス Tubulin 抗体(Oncogene)をそれぞれ 1 時間反応させた。PBS で 4 回洗浄後, 10000 倍希釈の二次抗体(Amersham Biosciences)を入れ 1 時間インキュベートした。その後 HRP-ECL 反応(Amersham Biosciences)によりシグナルを検出した(Lieberherr *et al.*, 2005)。

3. 結果

3-1. OsRac1 アフィニティークロマトグラフィーによる相互作用因子の同定

OsRac1 との相互作用因子を探索するため、動物ではすでに方法が確立し、Rho のエフェクタータンパク質（下流の標的タンパク質）が同定されている手法を用いた(Amano *et al.*, 1996)。Glutathion-S-transferase(GST)と OsRac1 を融合させた GST-OsRac1 タンパク質を大腸菌によるタンパク質発現系を用いて調製し、それを用いて OsRac1 のアフィニティークロマトグラフィーを行い、相互作用因子の同定を試みた。スフィンゴ脂質エリクターを処理したイネの培養細胞から抽出したタンパク質を、GTP γ S あるいは GDP β S(GTP γ S, GDP β S は非加水分解性である)を結合させた GST-OsRac1 アフィニティークロマトグラフィーに通した。カラムを洗浄後、OsRac1 に結合したタンパク質を、500 mMNaCl で溶出し、得られたタンパク質を SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動で展開した(図 1-A)。その結果、GST のみを使用したカラムと比較して、GST-OsRac1 では多くのタンパク質が検出された(図 1-B)。また、GDP と比較して、GTP に特異的なバンドも見られた。検出したタンパク質を同定するため、ゲルからタンパク質を抽出し、質量分析計を用いて同定した。その結果、21 個のタンパク質が同定された(参考資料表 1, 2, 3)。その中には、5 つの NB-LRR 型タンパク質(Dangl and Jones, 2001), stress-inducible protein 1 (STI1)及び RACK1(for Receptor for Activated C-Kinase 1)が含まれていた(表 1)。STI1 は、哺乳類では Hop として知られており HSP90 や HSP70 のコシャペロンとして機能し(Pratt and Toft, 2003), 3 つの tetratricopeptide repeat (TPR) domains をもっている(Smith, 2004)。RACK1 は動物では多くの分子活性に機能し、シグナル伝達に関与するさまざまなタンパク質と相互作用することがわかっており、protein kinase C (PKC)のアンカータンパク質として単離され、ヘテロ三量体 G タンパク質サブユニット G β と相互作用することがわかっている(Ron *et al.*, 1994)。また、RACK1 は哺乳類の midbody に局在することや、PKC を介した JNK の活性化に必要であることが報告されている(Scechtman and Mochly-Rose, 2001; Yaka *et al.*, 2002; Patterson *et al.*, 2004; Lopez-Bergami *et al.*, 2005)。RACK1 の構造はトリプトファン、アスパラギン酸が約 40 アミノ酸配列ごとに現れる WD40 リピートドメインによる β シート配列を 7 回持っており(McCahill *et al.*, 2002), その構造解析の結果からスキャフォールド(足場)タンパク質であると考えられている。イネではヘテロ三量体 G タンパク質

サブユニット G β との相同性から RWD (rice protein containing the WD-40 repeat)とも名付けられている(Iwasaki *et al.*, 1995)。

本研究では GTP 型 OsRac1 カラムから溶出したタンパク質の中で動物ではさまざまなシグナル伝達に関わることが知られているが、植物においてはほとんど知見のされていない RACK1 に着目し、より詳細な機能解析を行うことにした。

3-2. OsRac1 は RACK1A の WD リピートドメイン 1 及び 2 と相互作用する

質量分析によって同定されたアミノ酸配列を四角で示した(図 2)。イネには 2 遺伝子(*RACK1A*, *RACK1B*)が存在し、シロイヌナズナには 3 つ存在する (Chen *et al.*, 2006)。RACK1A と RACK1B のアミノ酸配列の相同性は 82%であるが、質量分析の結果から RACK1A のみが OsRac1 と相互作用するタンパク質として同定された(図 2)。酵母 two-hybrid 法によって RACK1A, RACK1B それぞれと OsRac1 との相互作用を調べたところ、CA-OsRac1 は RACK1A, RACK1B それぞれと結合し、DN-OsRac1 との相互作用は確認されなかった(図 3-A)。また、RACK1A の方が、RACK1B に比べ、強く OsRac1 に相互作用することが明らかとなった(図 3-A)。

RACK1 は 7 回の WD40 リピートにより構成されており、N 末端配列から順番に WD1~7 配列と名づけた。動物では、7 個の WD ドメインのうち、WD3-7 ドメインを介して PKC などと直接相互作用することが知られている(McCahill *et al.*, 2002)。そのため、まず WD1-2 及び WD3-7 の断片を使用し、OsRac1 と相互作用する RACK1A のドメイン決定を行った。その結果、N 末端側の WD1-2 ドメインが CA-OsRac1 と相互作用することがわかった(図 3-B)。さらに、WD1 と WD2 を分けて相互作用の解析を行ったところ、それぞれが CA-OsRac1 と相互作用することが明らかとなった(図 3-B)。次に 3-AT の濃度を変化させ CA-OsRac1 と RACK1A, RACK1B のそれぞれの全長との相互作用の強さを調べた。その結果、50 mM 3-AT の濃度においても CA-OsRac1 と RACK1A の相互作用が確認されたのに対し、RACK1B との相互作用は 3-AT の濃度に依存して強く抑制され(図 3-C), RACK1A が RACK1B より強い結合活性をもつという図 3-A の結果と一致した。

イネの 7 個の OsRac (OsRac1~7) について、split ubiquitin two-hybrid 法により (Kim *et al.*, 2002), RACK1A との相互作用を調べた (参考資料 図 1)。その結果、OsRac1, OsRac3 及び OsRac6 は RACK1A と相互作用し、OsRac5 と OsRac7 は弱い

ながらも RACK1A と相互作用することがわかった。OsRac4 は RACK1A との相互作用は確認されなかった。

3-3. RACK1A は CA-OsRac1 複合体中に存在する

Rac/Rop ファミリーは C 末端に脂質修飾モチーフを有し、動物ではイソプレニル化を受け翻訳後修飾のシグナルとなっている。これまでにイネプロトプラストの一過的発現系を用いた GFP-OsRac1 の局在解析により、OsRac1 の C 末端の脂質修飾モチーフのシステイン残基をセリンに置換する(C212S)ことで OsRac1 の膜への局在が失われることがわかっている(Ono *et al.*, 2001)。イネの CA-OsRac1, DN-OsRac1 及び CA-OsRac1(C212S)を発現する形質転換培養細胞を用いて、免疫沈降法により OsRac1 複合体中での RACK1A の存在を調べた。これまでに myc タグを融合した myc-CA-OsRac1, myc-DN-OsRac1 及び myc-C212S-OsRac1 をトウモロコシのユビキチンプロモーターを使用して過剰発現させた培養細胞を作出している(Lieberherr *et al.*, 2005)。そこで、野生型(非形質転換体:NT)とこれら 3 つの形質転換培養細胞からタンパク質を抽出し、抗 myc 抗体で免疫沈降後、RACK1A 抗体で RACK1A タンパク質の検出を試みた。尚、本研究に用いた RACK1A 抗体は RACK1B タンパク質をほとんど認識しないことを確認している(参考資料 図 2)。抗 myc 抗体を用いた免疫沈降実験の結果、myc-CA-OsRac1 との共免疫沈降によって RACK1A が検出され、DN-及び C212S-OsRac1 複合体中には RACK1A は確認されなかった(図 4-A)。この結果は酵母 two-hybrid 法を用いた結果と一致し、イネの細胞内において RACK1A は活性型 OsRac1 に特異的に相互作用していることが示唆された。また、これまでに抗 OsRac1 抗体を作成しているが、力価が弱いため、内在性の OsRac1 を対象とした免疫沈降実験は出来ていない(Lieberherr *et al.*, 2005)(data not shown)。

細胞内での RACK1A の局在を調べるため、同じく myc-CA-OsRac1, myc-DN-OsRac1 及び myc-CA-OsRac1 (C212S)培養細胞を用いて細胞質画分とミクロソーム画分を調製し、イムノブロット解析を行った。その結果、NT 及び 3 つの形質転換培養細胞において細胞質とミクロソーム画分両方で RACK1A タンパク質のシグナルを検出した(図 4-B)。このことから、RACK1A は OsRac1 の活性型、不活性型に関係なく野生型と同様に細胞質及びミクロソーム画分に局在することがわかった。

3-4. イネ培養細胞中で *RACK1A* の遺伝子発現はスフィンゴ脂質エリシターや植物ホルモンによって誘導される

イネの培養細胞を用いて *RACK1A* の遺伝子発現を調べた。その結果、スフィンゴ脂質エリシターを処理 3 時間後に CA-OsRac1 を導入した培養細胞において、一時的な *RACK1A* の発現誘導が見られた(図 5-A)。このことから、*RACK1A* の発現は OsRac1 とエリシター信号伝達系により協調的に制御されていると考えられる。

シロイヌナズナの *RACK1* 遺伝子については、生長段階で様々な植物ホルモンとの関連が示唆されている(Chen *et al.*, 2006)。そこで、MeJA, IAA 及び ABA をイネ培養細胞に処理することにより、*RACK1A* の植物ホルモンに対する発現応答を調べた。その結果、すべての植物ホルモンに応答して *RACK1A* の遺伝子発現が誘導された(図 5-B, C, D)。これらの結果から、スフィンゴ脂質エリシターだけでなく、植物ホルモンによっても *RACK1A* の遺伝子発現が誘導されることがわかった。しかしながら、上記 3 つの植物ホルモンの応答は、スフィンゴ脂質エリシターを処理した場合のように CA-OsRac1 依存的な発現誘導はみられなかったことから、*RACK1A* の遺伝子発現誘導に関わるメカニズムはエリシターと植物ホルモンでは異なることが示唆された。

3-5. イネの培養細胞において *RACK1A* は活性酸素種の生成と防御遺伝子の発現に関わっている

イネにおける *RACK1A* の機能を明らかにするために RNAi による *RACK1A* 発現抑制(*RACK1A*-RNAi)形質転換体及び培養細胞の作出を試みた。RNAi に用いた配列は、終止コドンの上流 73 bp から 3' UTR 領域 255 bp までの 328 bp の断片を使用した。*RACK1A*-RNAi コンストラクトをアグロバクテリウム法により導入したカルスについて約 50 系統以上の選抜を行ったが、全てのカルスは再生初期の段階で完全に枯死し、形質転換体は得られなかった。この結果から *RACK1A* は、イネにおいてカルスから植物体を再生させる際に重要な機能を果たしていることが推測された。形質転換体を得られなかったため以降の実験は、*RACK1A*-RNAi 培養細胞を用いて解析を行った。

作出した *RACK1A*-RNAi 培養細胞の遺伝子発現を調べたところ、*RACK1B* の発現は抑制されず、*RACK1A* の発現が特異的に抑制されていた(図 6-A)。また、*RACK1A* のタンパク質も抗 *RACK1A* 抗体により野生型と比較して減少していた(図

6-B)。これら独立した 3 系統の *RACK1A*-RNAi 培養細胞を用いて活性酸素種の生成及び防御遺伝子のマーカーである *PBZ1* 遺伝子(Midoh and Iwata, 1996)の発現量をリアルタイム RT-PCR を用いて調べた。その結果、スフィンゴ脂質エリシターを処理 3 時間後、野生型及び CA-OsRac1 において活性酸素種の生成が確認されたのに対して、*RACK1A*-RNAi 培養細胞では活性酸素種の生成が観察されなかった(図 6-C)。また、野生型と比較して *RACK1A*-RNAi 培養細胞では通常の *PBZ1* 遺伝子の発現量が低下していることがわかった(図 6-D)。これらの結果からイネの培養細胞において、*RACK1A* は活性酸素種の生成及び防御遺伝子の発現制御に関わっていることが示唆された。

3-6. *RACK1A* 過剰発現体はいもち病菌に対して抵抗性を示す

RACK1A をトウモロコシのユビキチンプロモーターにより過剰発現させた植物体を作成した。過剰発現体の mRNA の発現量とタンパク質の蓄積量をリアルタイム RT-PCR とイムノブロット解析を行い、*RACK1A* の過剰発現を確認した(図 7-A, B)。*RACK1A* 過剰発現体の防御応答を解析するため、長日条件で育てた播種後 30 日目の植物体に親和性いもち病菌レース 007 を接種した。導入遺伝子を確認した独立した 8 系統の T1 植物体の第 4 葉、第 5 葉それぞれ 4 スポット、合計 8 スポットにパンチ接種を行った。その結果、*RACK1A* 過剰発現体では野生型と比較して病斑が顕著に抑えられていた(図 7-C, D)。したがって、*RACK1A* は防御反応の正に制御する因子として機能していると考えられる。さらに、過剰発現体における OsRac1 と *PBZ1* の発現量を解析したところ、両遺伝子とも発現が上昇していることが明らかとなった(図 7-E, F)。

RACK1A-RNAi 形質転換体を得られなかったため、R 遺伝子を介した防御応答における *RACK1A* の機能を解析することができなかった。今後は転写誘導系を用いて一過的に *RACK1A* の発現を抑制する、あるいはイネの内在性レトロトランスポゾン *Tos17* を転移させて作成したイネ日本晴から発現抑制効率の低い遺伝子破壊系統などを探し、非親和性いもち病菌との関係を調べる必要がある。

RACK1A 過剰発現体では植物体の形態に影響は見られなかったが、*RACK1A* 過剰発現体の種子では胚の肥大化が観察された。スーパーオキシドを検出する Nitro blue tetrazolium (NBT) を用いて野生型と *RACK1A* 過剰発現体の発芽後 5 日目の種子の染色を行ったところ、野生型では分裂活性の高い主根の根端領域、冠根及び胚周

辺で染まるのに対し、*RACK1A* 過剰発現体の種子では、根の染色領域が広く、将来側根が形成される領域も観察され、大きな胚が強く染色された(図 8)。このことから、発芽時あるいは幼苗期に活性酸素種の生成を伴う生長に *RACK1A* が機能していると考えられる。

3-7. *OsRac1*-RNAi では *RACK1A* の遺伝子発現、タンパク質量や *PBZ1* の遺伝子発現が低下している

RACK1A の発現は *OsRac1* とエリシター信号伝達系により協調的に制御されていることが示されたので(図 5-A)、*OsRac1* の発現抑制が *RACK1A* の発現に与える影響を調べた。*OsRac1*-RNAi 培養細胞(Miki *et al.*, 2005)(図 9-A)における *RACK1A* の遺伝子発現を調べた結果、野生型と比較して減少していることがわかった(図 9-B)。また、同じ培養細胞の系統を使用し、*RACK1A* のタンパク量を調べたところ野生型と比較して顕著に減少していることがわかった(図 9-C)。さらに *PBZ1* の遺伝子発現も低下していることから(図 9-D)、*OsRac1* は、*RACK1A* の転写を正に制御していると示唆された。

3-8. *RACK1A* は *RAR1* 及び *SGT1* と相互作用する

シロイヌナズナや他の植物では *RAR1* と *SGT1* が R 遺伝子を介した防御応答に重要な役割を担っている(Shirasu and Shulze-Lefert, 2003)。最近、*RAR1* と *SGT1* は、NB-LRR 型 R タンパク質の安定性を保つため分子シャペロンとして機能しているのではないかと報告されているが(Bieri *et al.*, 2004; Holt *et al.*, 2005; Leister *et al.*, 2005; Azevedo *et al.*, 2006)、生化学的機能はほとんどわかっていない。これまで、我々は *RAR1* と *HSP90* が *OsRac1* 複合体中に存在することを明らかにし、イネの免疫応答に関っていることを報告した(Thao *et al.*, 2007)。これらのことから、*RACK1A* は *RAR1*、*SGT1* 及び *HSP90* と一緒に *OsRac1* 複合体に含まれているのではないかと推測された。それを検証するために、酵母 two-hybrid 法により各タンパク質の相互作用を解析したところ、*RACK1A* は *HSP90* とは相互作用しないが、*RAR1* や *SGT1* と相互作用することがわかった(図 10-A)。さらに、*SGT1* や *RAR1* が *RACK1A* のどの領域と結合しているかを調べたところ、*RAR1* と *SGT1* は CA-*OsRac1* と同様に *RACK1A* の WD1、WD2 ドメインを介して相互作用することが明らかとなった(図 10-B)。なお、イネの *RAR1* と *SGT1* との相互作用は他の植物と同様に(Azevedo *et*

al., 2002; Liu *et al.*, 2002), 直接相互作用することが報告されている(Wang *et al.*, 2008)。このことから OsRac1 複合体中に存在する RACK1A は RAR1 及び SGT1 とも相互作用することで、OsRac1 複合体を束ねる働きをしていることが示唆された。

4. 考察

4-1. OsRac1 アフィニティークロマトグラフィー

これまで当研究室では酵母 two-hybrid 法により CA-OsRac1 と特異的に相互作用する因子をスクリーニングし、リグニン合成経路に関わる cinnamoyl-CoA reductase (CCR)などを単離している(Kawasaki *et al.*, 2006)。本研究では、イネの培養細胞からは大量にタンパク質を抽出することが可能であったため、動物ですでに確立されている手法(Amano *et al.*, 1996)であるアフィニティークロマトグラフィーを試みることにした。これまでに動物では同手法を用いて、活性型 RhoA に特異的に相互作用する因子として、セリン-スレオニンキナーゼである 128 kDa の protein kinase N (PKN) (Amano *et al.*, 1996) , 活性型 R-Ras に特異的に結合する 95 kDa の GTPase 促進タンパク質である新規な GAP (Yamamoto *et al.*, 1995) や活性型 Cdc42 および活性型 Rac1 に特異的に相互作用する 170 kDa の IQGAP などの単離が報告されている (Kuroda *et al.*, 1996) 。

本研究では OsRac1 のアフィニティークロマトグラフィーにより、21 個のタンパク質を同定することに成功した。よってこの手法は相互作用因子を探索する上で、動物のみならず植物においても有効な方法であると考えられる。しかし、植物には細胞壁があるなどタンパク質の調製段階で動物細胞とは異なる難しさも残っている。本研究では硫酸分画を行いタンパク質を濃縮することで、カラムに通すタンパク濃度を確保した。また、質量分析によって同定するためにはデータベースの充実は欠かせず、たとえ MS/MS スペクトラムからアミノ酸配列の断片を同定出来たとしても、そのアミノ酸配列とヒットする配列が既知のタンパク質のアミノ酸配列としてデータベース上になければ全て推定タンパク質と同定されてしまうという欠点も存在する。しかし、ゲノム解読が進む今日、今後アフィニティークロマトグラフィーを用いた相互作用タンパク質の同定は非常に有効なツールとなるであろう。

本研究では OsRac1 アフィニティークロマトグラフィーと質量分析の結果からこの有用性を植物において初めて示し、NB-LRR 型タンパク質など病原体に対する免疫応答に関わる因子など(表 1)をはじめとする 21 タンパク質を同定した。これらの同定したタンパク質の中でも、植物においては知見がほとんどなく、植物の耐病性機構に重要な位置を示す可能性が高いと推測された、RACK1 について詳細な機能解析を行うこととした。

4-2. 活性型 OsRac1 特異的に相互作用する RACK1A の機能

RACK1 は動物では多くのシグナル伝達に関与し、さまざまなタンパク質と相互作用することがわかっている。例えば、RACK1 が、ヘテロ三量体 G タンパク質サブユニット $G\beta$ と相互作用することや、哺乳類の midbody に局在すること、PKC を介した JNK の活性化に必要であることなどが報告されている (Scechtman and Mochly-Rose, 2001; Yaka *et al.*, 2002; Patterson *et al.*, 2004; Lopez-Bergami *et al.*, 2005)。また、酵母や動物では、RACK1 が 80S リボソームと相互作用し、翻訳制御に関わっていることや (Link *et al.*, 1999; Ceci *et al.*, 2003; Sengupta *et al.*, 2004)、シロイヌナズナにおいても RACK1 が細胞質リボソームに相互作用することがわかっている (Chang *et al.*, 2005; Giavalisco *et al.*, 2005)。また、イネのヘテロ三量体 G タンパク質サブユニット β と相同性があることから RWD (rice protein containing the WD-40 repeat) とも名付けられている (Iwasaki *et al.*, 1995)。

イネには 2 つの RACK1 遺伝子 (*RACK1A1*, *RACK1B*) が存在する。このうち、RACK1A は、イネ胚のタンパク質のプロテオーム解析により、ヘテロ三量体 G タンパク質サブユニット $G\alpha$ のイネ変異体 *dwarf1* (*dl*) の胚において、野生型と比較して蓄積量が減少しているタンパク質として同定されている (Komatsu *et al.*, 2005)。また、*dl* 変異体に恒常的活性型 $G\alpha$ を導入した場合 (QL/*dl* transgenic rice) には、RACK1A のタンパク質の蓄積量が野生型と同等、あるいはそれ以上となり、さらに ABA を種子に処理した場合、RACK1A のタンパク質量が野生型では増加するのに対して *dl* 変異体では処理前とタンパク質量は変化しないことが明らかとなっている (Komatsu *et al.*, 2005)。このことは、RACK1A が $G\alpha$ を介したシグナル伝達系によって制御されていることを示唆している。さらに、OsRac1 が耐病性の信号伝達系で $G\alpha$ の下流で機能していることから (Suharrsono *et al.* 2001)、RACK1A、OsRac1、 $G\alpha$ が同じ信号伝達系で機能していると考えられる。

ヒトのヘテロ三量体 G タンパク質は 23 の $G\alpha$ 、5 つの β サブユニット、12 の γ サブユニットから構成され、理論上 1300 以上のヘテロ三量体複合体を形成できると考えられている (McCudden *et al.*, 2005)。それに対して、植物のヘテロ三量体 G タンパク質としてシロイヌナズナとイネでは 1 つの $G\alpha$ 、1 つの β サブユニット、2 の γ サブユニットのみから構成されている (Assmann *et al.*, 2005)。また、植物の低分子量 G タンパク質には動物のような Ras ファミリーは存在せず、植物のヘテロ三量体 G タンパク質と低分子量 G タンパク質との関係はほとんど明らかにされていない。

い。本研究で活性型 OsRac1 と特異的に相互作用する因子として RACK1A を同定した。また、RACK1A はヘテロ三量体 G タンパク質 $G\alpha$ によって制御されていることが報告されていることから、RACK1A は動物と同様に β サブユニットとも直接相互作用する可能性も考えられる。今後は RACK1A と相互作用する新たな因子を探索することで、本研究のイネの自然免疫応答だけでなく、植物の G タンパク質を介するさまざまなシグナル伝達の解明にもつながると考えられる。

シロイヌナズナでは *RACK1A*, *RACK1B*, *RACK1C* の 3 つの遺伝子が存在する。その中で *RACK1A* が最も高発現しており、*RACK1A* プロモーター: *GUS* を導入した植物の解析から、*RACK1A* の発現は全ての組織で検出されるものの、特に頂端分裂組織など活性の高い部位で強く発現していることがわかった。さらに、*rack1a* 変異体の解析から、*RACK1A* は様々なホルモン応答、成長段階に関っていると報告された(Chen *et al.*, 2006)。例えば、*rack1a* 変異体では野生型と比較してロゼット葉の数が減少し、全体的に小さい葉が形成されること、また *rack1a* 変異体はジベレリンやブラシノステロイドによる感受性の鈍化が観察されること、さらに ABA を処理すると *rack1a* 変異体では発芽が激しく抑制され、オーキシン処理による側根形成も抑制されることが観察された。これらの結果からシロイヌナズナにおいても *RACK1A* はさまざまな植物ホルモンのシグナル伝達に関与していると推測される。

シロイヌナズナ CA-AtRop10/AtRac8 を bait として酵母 two-hybrid 法によって新規なエフェクター-ICR1 (interactor of constitutive active Rops 1)が単離された(Lavy *et al.*, 2007)。このタンパク質は coiled-coil ドメインを有している以外に特徴的な配列はないが、Rho-associated coiled-coil making protein kinase 1 (ROCK1: Coleman *et al.*, 2001)タンパク質と 47%の相同性があった。*icr1* 変異体の解析から ICR1 は細胞極性、根端分裂組織の維持、及び小胞輸送に関わっていることが示唆された。酵母では小胞輸送に関わる複合体サブユニットである SEC3 は、Rho1 と Cdc42 それぞれのエフェクターであり直接相互作用することが知られている。酵母の SEC3 と異なり、植物と動物の SEC3 は Rho ファミリーと相互作用するドメインを欠失している。ICR1 の解析により、シロイヌナズナの細胞内で ICR1 と SEC3 は直接相互作用することが明らかとなり、ICR1 は Rac/Rop とそのエフェクター-SEC3 をリンクさせるためのスキャフォールドタンパク質として働いているのではないかと考察している(Lavy *et al.*, 2007)。本研究の結果においても RACK1A は活性型 OsRac1 だけでなく RAR1 及び SGT1 とも相互作用したことから、イネの自然免疫応答においてスキャ

フォールドタンパク質として機能していることが示唆される。OsRac1, RAR1, SGT1 は, RACK1A の WD1 及び WD2 ドメインを利用して相互作用していることから, 仮に RACK1 が活性型 OsRac1 と直接相互作用している場合は, RAR1 及び SGT1 それぞれが RACK1 と相互作用できない可能性が考えられる。しかしながら, RACK1 の相互作用の解析により, RACK1A/RACK1A, RACK1A/RACK1B の組み合わせで RACK1 はダイマーあるいは多量体を形成することがわかった (参考資料 図 5)。そのため, ダイマーを形成することにより, RACK1 の同じドメインを利用して, 同時に異なるタンパク質が相互作用できるとも考えられる。また, RACK1 の WD1 及び WD2 それぞれのドメインに異なるタンパク質が相互作用することも推測され, 同時に複数のタンパク質が RACK1 と相互作用できるのかについては今後, 調べる必要がある。また, RACK1A の局在は細胞質及びミクロソーム画分両方で確認され(図 4, B), OsRac1 の共免疫沈降により CA-OsRac1 の複合体中のみに RACK1A の存在が確認された(図 4, A)。このことから, RACK1A との相互作用には OsRac1 の構造も重要であることが示唆される。

4-3. イネの自然免疫応答での RACK1 の機能

我々はイネの細胞内で OsRac1 複合体中に RAR1 と SGT1 がそれぞれ存在するのにかについて調べるために, 野生型と *Rar1*-RNAi 培養細胞を用いて共免疫沈降を行っている(Thao et al., 2007)。野生型培養細胞では, RACK1A は RAR1 との共免疫沈降により検出したが, *Rar1*-RNAi 培養細胞中での RAR1 との共免疫沈降により, RACK1A タンパク質のバンドは検出されず, 細胞内で RAR1 と RACK1A が相互作用していることを確認した (参考資料 図 3-A)。また, イネの SGT1 はシングルコピーで *SGT1*-RNAi 培養細胞を作出できなかったため (Thao et al., 2007), 野生型培養細胞を用いて免疫沈降実験を行い, RACK1A と SGT1 が複合体を形成していることを明らかにした (参考資料 図 3-B)。

イネの自然免疫応答において RACK1 には 2 つの機能が考えられる(図 11)。1 つは OsRac1, RAR1, SGT1, HSP90 及び HSP70 から構成される OsRac1 複合体中の 1 つの構成成分としての機能であり, RACK1 はこの免疫複合体においてスキャフォールドタンパク質として機能していると考えられる。我々は, このような大きな複合体を形成することで, 病原体への侵入に対して迅速に対応しているのではないかと考えている (Thao et al., 2007)。しかしながら, 現時点では, 定常的に複合体を

形成しているのか、あるいはいくつかの構成成分は一過的に複合体中に存在するの
かについては不明であり、さらなる研究が必要である。もう 1 つの機能として、
NADPH オキシダーゼ複合体に OsRac1 と共に存在し、RACK1A は NADPH オキシ
ダーゼの N 末端と相互作用することで(参考資料 図 4-A, B), 免疫応答の初期段階
で活性酸素種の生成を調節している可能性が考えられる。このように、RACK1A
の 2 つの機能が推定されたが、RACK1A のこれらの機能がどのように調節されて
いるのか、病原体の感染後、RACK1A と他のタンパク質との相互作用は時間的、
空間的にどのように調節しているのかについては今後明らかにする必要がある。

イネには 2 つの RACK1 遺伝子が存在するが、今回、質量分析によって同定され
たタンパク質は RACK1A のみであった。本実験により、RACK1A が RACK1B よ
り活性型 OsRac1 との相互作用が強いこと (図 3 A, C) , また、*RACK1A* の遺伝子
発現のみが抑制されている培養細胞で活性酸素種の生成や防御遺伝子の発現が低下
していたことから(図 6), *RACK1A* が主としてイネの自然免疫応答に関っていると
示唆される。また、ホルモン処理により発現が上昇したこと、*RACK1A*-RNAi の再
生個体が得られなかったことから *RACK1A* がさまざまなシグナル伝達で重要な
役割を担っていることが考えられる。しかしながら RACK1A と RACK1B とは直接
相互作用できることから(参考資料 図 5), RACK1B はイネの自然免疫応答において
関与する可能性はまだ残されており、ヘテロダイマーを形成することで OsRac1 複
合体中に存在するののかについては今後の課題である。

4-4. NB-LRR 型 R タンパク質, OsRac1 及び RACK1 との関係

最近、NB-LRR 型 R タンパク質の中で、核に局在しているものが報告された
(Burch-Smith *et al.*, 2007; Shen *et al.*, 2007; Wirthmueller *et al.*, 2007)。そのため、免疫
応答の初期段階では、細胞膜周辺で機能している因子の中に、核へ移行するタンパ
ク質が存在するのではないかと推測されている。RACK1 は動物では細胞膜、核、
小胞輸送などに関連してさまざまなシグナル伝達に関わっており、受容体、タンパ
ク質キナーゼ、転写因子、転写関連タンパク質と相互作用することから、RACK1
はスキャフォールドあるいはアダプタータンパク質であると考えられている
(Schechtman and Mochly-Rosen, 2001; Yaka *et al.*, 2002; Patterson *et al.*, 2004; Lopez-
Bergami *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2007; Parent *et al.* 2008)。

G protein-coupled receptor (GPCR)の1つである thromboxane A2 receptor (TP β)と相互作用するタンパク質として RACK1 が単離され、RACK1 は TP β の小胞体から細胞表面への輸送を調節するという報告がある(Parent *et al.*, 2008)。このことから RACK1A の機能としては、スキヤフォールドタンパク質として複合体を束ねていること、あるいは TP β のようにそれぞれのシグナル伝達に関与するタンパク質の移行にも関わっているとも推測される。

本研究では OsRac1 と相互作用する因子として5つの NB-LRR 型タンパク質が同定された。NB-LRR 型 R タンパク質が低分子量 G タンパク質 OsRac1 と相互作用することが、どのように自然免疫応答に重要であるのかについては今後、調べる必要がある。また、NB-LRR 型 R タンパク質と OsRac1 との相互作用の關係に RACK1 がどのように関わっているのかについても調べる必要がある。さらに、RACK1A-RNAi の形質転換体が作出できなかったことから、ウイルス誘導型遺伝子サイレンシング(virus-induced gene silencing ; VIGS)を利用して、*N. benthamiana* の RACK1 をノックダウンした場合に OsRac1 を介した活性酸素種の生成や一連の自然免疫応答がどのようなになるのかなど興味深い。

4-5. OsRac1 によって RACK1A の発現は調節されている

RACK1A の遺伝子発現は OsRac1 によって正に制御されていることがわかった(図9)。我々はこれまでに OsRac1 は RARI 及び SGT1 の遺伝子発現を正に制御していることを報告している(Thao *et al.*, 2007)。OsRac1 は RACK1A, RARI 及び SGT1 の遺伝子発現を制御することで、OsRac1 複合体の構成成分を調節していることが示唆される。さらに OsRac1 の発現も RACK1A によって正に制御されている。よって、RACK1A は自然免疫応答において OsRac1 と共に上流に位置し、自然免疫反応を調節している可能性が強く示唆された。

4-6. 最後に

病原体が宿主である植物側因子の活性を抑制、あるいは利用することでどのように自身の感染を成立させようとしているのか、また、それに対して宿主はいかに迅速にその侵入を認識しているのかという分子機構の解明は、科学技術の進歩とともに大きく進展している。1845年から1849年の4年間にわたって、ヨーロッパ全域において"Great Famine"とよばれたジャガイモ疫病が大発生し壊滅的な被害を受け

たことは非常に有名である。この大飢饉によりアイルランド人は民族の大移動を強いられた。その当時はまだ微生物が病気を引き起こすという考え方そのものがない時代で、*Phytophthora infestans* がその原因菌であることが明らかになったのは 1867 年のことである。アイルランドでは収量の多い品種に偏って栽培されており、宿主であるジャガイモの遺伝的多様性がほとんどなかったといわれている。しかし、ジャガイモを主食としていた地方では、1つの畑にいくつもの品種を混ぜて栽培する習慣が経験的に存在し、これが特定の病原菌（レース）の蔓延を防いでいた。この方法はジャガイモの栽培に限らず、他の作物においても同様にあてはまり我々は長年に渡って宿主の品種の多様性を保つことで新たな病原菌の発生を防いできた。

近年、シロイヌナズナとイネを中心として防御応答に関わる重要な因子が多く発見され、それぞれの菌に対する宿主の分子機構モデルは複雑になってきている。しかしながらこの複雑さは非常に妥当であり、新たな病原菌が発生した場合も、迅速且つ柔軟に対応するための植物側の戦略であると推測される。その複雑なモデルの中に共通した現象として観察される活性酸素種生成の分子メカニズムを解明することは宿主を問わず、病気に強い作物を作出するために今後も重要な研究課題となるであろう。1983 年、道家によって発見された一過的な活性酸素種の生成は PAMPs による自然免疫応答、R 遺伝子特異的な防御応答に共通してみられる現象である。我々の研究室ではこの活性酸素種の生成は NADPH オキシダーゼである *rboh* が引き起こしていること、低分子量 G タンパク質 OsRac1 がその調節因子であることを明らかにしてきた (Wong *et al.*, 2007)。その他に、*rboh* の N 末端をリン酸化する CDPK(Calcium-dependent protein kinase)も NADPH オキシダーゼの酵素活性に重要であることが報告されている(Kobayashi *et al.*, 2007)。

本研究により OsRac1 と相互作用する RACK1A という新たな因子を同定した。今後はアフィニティークロマトグラフィーによって同定された NB-LRR 型タンパク質や Sti1 タンパク質それぞれと OsRac1 との相互作用に関する機能解析を行うことで、OsRac1 を介するイネの免疫応答機構を解明することにつながるであろう。相互作用の結晶構造解析に加え、FRET のような技術が発展し、時空間的、ダイナミックにこれらの相互作用因子を生体内においてリアルタイムに観察することが可能になってきており、今後はどのような複合体形成パターンで抵抗性が誘導されるのか、相互作用の組み合わせによって OsRac1 の活性化とその下流の防御応答が異なるのかなど、さらなる研究が期待される。

5. 謝辞

最後まで諦めず、サイエンスに対して真摯に向き合う姿勢を学ばせて頂いた島本功教授に深く感謝致します。また、分子生物学を全く理解していなかった時から御指導して頂いた川崎 努准教授に深く感謝致します。実験を始めた当時、イムノブロット解析に使用できる OsRac1 特異的抗体を作成することに苦勞し、タグをつけるなどさまざまなアプローチを学ぶことができました。植物分子遺伝学講座に所属していた際お世話になった経塚淳子先生(現 東京大学)、井澤 毅先生(現 農業生物資源研究所)、一色正之先生(現 横浜市立大学)、横井修司先生(現 岩手大学)、Dr. Hann Ling Wong 先生、辻 寛之先生に感謝致します。また、Dr. Letian Chen さん、藤原正幸博士には論文をまとめるにあたり多大なる貢献をして頂きました。また、桑野晶喜さん(北海道大学)には質量分析の解析を行って頂きました。スフィンゴ脂質エリシターを譲渡して頂いた梅村賢司博士(明治製菓株式会社)、アフィニティークロマトグラフィーを行うにあたり、熱心に御指導御鞭撻を頂いた 貝淵弘三先生(現 名古屋大学)、天野睦紀先生(現 名古屋大学)、河野洋治博士(現 奈良先端科学技術大学院大学)に感謝致します。イネ培養細胞から大量のタンパク質を調製し、バンドを検出するまでに約1年近くを必要としましたが、生化学的手法を学ぶことが出来ました。

Dr. Ian Smith 先生には英語の口頭発表や就職活動のための英語面接など幅広くサポートして頂きました。白須 賢先生(理化学研究所)、吉岡博文先生(名古屋大学)、岩崎行玄先生(福井県立大学)、高橋 章博士(農業生物資源研究所)、西條雄介博士(Max-Planck-Institute for Plant Breeding Research)には研究を進めるにあたり有益なアドバイスを頂きました。また、私のつたない英語でも会話をしてくださった Dr. Jeffery L. Dangl (University of North Carolina)、Dr. Sarah Grant (University of North Carolina)と Dr. Zhenbiao Yang (University of California)に感謝致します。

当研究室の技術補佐 延原美香さん、神田雅子さん、玉置優子さん、研究に集中出来るよう助けてくださった秘書横井さゆりさん、松岡真由香さんに感謝致します。三木さん、森藤さん、小宮さん、岡野さん、石川さん、ヤスくん、ヒロキくんなどみなさんと出会えたこと、植物分子遺伝学講座を通して駅伝大会やソフトボールなど多くの学生と研究生活の中で楽しい時間を共有できました。私に関わってくださった全ての方々に感謝申し上げたいと思います。

最後に研究を続けるにあたり、いつも温かく見守ってくれた家族に深く感謝します。

奈良先端科学技術大学院大学の基礎研究の発展と、皆様のご健康とご多幸を心よりお祈りしています。本当にありがとうございました。

6. 参考文献

Amano, M., Mukai, H., Ono, Y., Chihara, K., Matsui, T., Hamajima, Y., Okawa, K., Iwamatsu, A., and Kaibuchi, K. (1996). Identification of a putative target for Rho as the serine-threonine kinase protein kinase N. *Science* 271: 648–650.

Azevedo, C., Betsuyaku, S., Peart, J., Takahashi, A., Noel, L., Sadanandom, A., Casais, C., Parker, J., and Shirasu, K. (2006). Role of SGT1 in resistance protein accumulation in plant immunity. *EMBO J.* 25: 2007–2016.

Azevedo, C., Sadanandom, A., Kitagawa, K., Freialdenhoven, A., Shirasu, K., and Schulze-Lefert, P. (2002). The RAR1 interactor SGT1, an essential component of R gene-triggered disease resistance. *Science* 295: 2073–2076.

Assmann, S. M. (2005). G proteins Go green: a plant G protein signaling FAQ sheet. *Science*. 310: 71–73.

Axtell, M.J., and Staskawicz, B.J. (2003). Initiation of RPS2-specified disease resistance in *Arabidopsis* is coupled to the AvrRpt2-directed elimination of RIN4. *Cell* 112: 369–377.

Azevedo, C., Sadanandom, A., Kitagawa, K., Freialdenhoven, A., Shirasu, K., and Schulze-Lefert, P. (2002). The RAR1 interactor SGT1, an essential component of R gene-triggered disease resistance. *Science* 295: 2073–2076.

Bai, J., Pennill, L.A., Ning, J., Lee, S. W., Ramalingam, J., Webb, C.A., Zhao, B., Sun, Q., Nelson, J.C., Leach, J.E., and Hulbert, S.H. (2002). Diversity in nucleotide binding site-leucine-rich repeat genes in cereals. *Genome Res.* 12: 1871-1884.

Bieri, S., Mauch, S., Shen, Q.H., Peart, J., Devoto, A., Casais, C., Ceron, F., Schulze, S., Steinbiss, H.H., Shirasu, K., and Schulze-Lefert, P. (2004). RAR1 positively controls steady state levels of barley MLA resistance proteins and enables sufficient MLA6 accumulation for effective resistance. *Plant Cell* 16: 3480–3495.

Bischoff, F., Molendijk, A., Rajendrakumar, C.S., and Palme, K. (1999). GTP-binding proteins in plants. *Cell Mol Life Sci.* 55: 233-256.

Burch-Smith, T.M., Schiff, M., Caplan, J.L., Tsao, J., Czymmek, K., and Dinesh-Kumar, S.P. (2007). A novel role for the TIR domain in association with pathogen-derived elicitors. *PLoS Biol.* 5: e68.

Ceci, M., Gaviraghi, C., Gorrini, C., Sala, L.A., Offenhauser, N., Marchisio, P.C., and Biffo, S. (2003). Release of eIF6 (p27BBP) from the 60S subunit allows 80S ribosome assembly. *Nature* 426: 579–584.

Chang, I.F., Szick-Miranda, K., Pan, S., and Bailey-Serres, J. (2005). Proteomic characterization of evolutionarily conserved and variable proteins of Arabidopsis cytosolic ribosomes. *Plant Physiol.* 137: 848–862.

Chen, J.G., Ullah, H., Temple, B., Liang, J., Guo, J., Alonso, J.M., Ecker, J.R., and Jones, A.M. (2006). RACK1 mediates multiple hormone responsiveness and developmental processes in Arabidopsis. *J. Exp. Bot.* 57: 2697–2708.

Chisholm, S.T., Coaker, G., Day, B., and Staskawicz, B.J. (2006). Host-microbe interactions: Shaping the evolution of the plant immune response. *Cell* 124: 803–814.

Christensen, A.H., Sharrock, R.A. and Quail, P.H. (1992). Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation. *Plant Mol. Biol.* 18: 675-689.

Coaker, G., Falick, A., and Staskawicz, B. (2005). Activation of a phytopathogenic bacterial effector protein by a eukaryotic cyclophilin. *Science.* 22: 548-550.

- Coleman, M.L., Sahai, E.A., Yeo, M., Bosch, M., Dewar, A., and Olson, M.F. (2001). Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. *Nat Cell Biol.* 3: 339–345.
- Dangl, J.L., and Jones, J.D. (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411: 826–833.
- Doke, N. (1983). Involvement of superoxide anion generation in the hypersensitive response of potato tuber tissues to infection with an incompatible race of *Phytophthora infestans* and to hyphal wall components. *Physiol. Plant Pathol.* 23: 345-357.
- Flor, H.H. (1971). Current status of gene-for-gene concept. *Annu. Rev. Phytopathol.* 9: 275-296.
- Fujisawa, Y., Kato, H., and Iwasaki, Y. (2001). Structure and function of heterotrimeric G proteins in plants. *Plant Cell Physiol.* 42: 789–794.
- Fujiwara, M., Umemura, K., Kawasaki, T., and Shimamoto, K. (2006). Proteomics of Rac GTPase signaling reveals its predominant role in elicitor-induced defense response of cultured rice cells. *Plant Physiol.* 140: 734–745.
- Giavalisco, P., Wilson, D., Kreitler, T., Lehrach, H., Klose, J., Gobom, J., and Fucini, P. (2005). High heterogeneity within the ribosomal proteins of the *Arabidopsis thaliana* 80S ribosome. *Plant Mol. Biol.* 57: 577–591.
- Hammond-Kosack, K.E., and Parker, J.E. (2003). Deciphering plant-pathogen communication: Fresh perspectives for molecular resistance breeding. *Curr. Opin. Biotechnol.* 14: 177–193.
- Holt III, B.F., Belkhadir, Y., and Dangl, J.L. (2005). Antagonistic control of disease resistance protein stability in the plant immune system. *Science* 309: 929–932.

- Ishida, S., Takahashi, Y., and Nagata, T. (1993). Isolation of cDNA of an auxin-regulated gene encoding a G protein beta subunit-like protein from tobacco BY-2 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 11152–11156.
- Iwasaki, Y., Komano, M., Ishikawa, A., Sasaki, T., and Asahi, T. (1995). Molecular cloning and characterization of cDNA for a rice protein that contains seven repetitive segments of the Trp-Asp forty-amino-acid repeat (WD-40 repeat). *Plant Cell Physiol.* 36: 505–510.
- Jia, Y., McAdams, S.A., Bryan, G.T., Hershey, H.P., and Valent, B. (2000). Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. *EMBO J.* 19: 4004-4014.
- Jones, A.M., and Assmann, S.M. (2004) Plants: the latest model system for G-protein research. *EMBO Rep.* 5:572–578.
- Jones, J.D., and Dangl, J.L. (2006). The plant immune system. *Nature* 444: 323–329.
- Kawasaki, T., Henmi, K., Ono, E., Hatakeyama, S., Iwano, M., Satoh, H., and Shimamoto, K. (1999). The small GTP-binding protein Rac is a regulator of cell death in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 10922–10926.
- Kawasaki, T., Koita, H., Nakatsubo, T., Hasegawa, K., Wakabayashi, K., Takahashi, H., Umemura, K., Umezawa, T., and Shimamoto, K. (2006). Cinnamoyl-CoA reductase, a key enzyme in lignin biosynthesis, is an effector of small GTPase Rac in defense signaling in rice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 230–235.
- Kim, M.C., Panstruga, R., Elliott, C., Muller, J., Devoto, A., Yoon, H.W., Park, H.C., Cho, M.J., and Schulze-Lefert, P. (2002). Calmodulin interacts with MLO protein to regulate defence against mildew in barley. *Nature* 416: 447–451.
- Kim, M.G., da Cunha, L., McFall, A.J., Belkhadir, Y., DebRoy, S., Dangl, J.L., and Mackey, D. (2005). Two *Pseudomonas syringae* type III effectors inhibit RIN4-regulated basal defense in *Arabidopsis*. *Cell* 121: 749–759.

- Kunze, G., Zipfel, C., Robatzek, S., Niehaus, K., Boller, T., and Felix, G. (2004). The N terminus of bacterial elongation factor Tu elicits innate immunity in Arabidopsis plants. *Plant Cell*. 16: 3496-507.
- Kobayashi, M., Ohura, I., Kawakita, K., Yokota, N., Fujiwara, M., Shimamoto, K., Doke, N., and Yoshioka, H.(2007). Calcium-dependent protein kinases regulate the production of reactive oxygen species by potato NADPH oxidase. *Plant Cell*. 19: 1065-1080.
- Koga, J., Yamauchi, T., Shimura, M., Ogawa, N., Oshima, K., Umemura, K., Kikuchi, M., and Ogasawara, N. (1998). Cerebrosides 'A and C, sphingolipid elicitors of hypersensitive cell death and phytoalexin accumulation in rice plants. *J. Biol. Chem*. 273: 31985–31991.
- Komatsu, S., Abbasi, F., Kobori, E., Fujisawa, Y., Kato, H., and Iwasaki, Y. (2005). Proteomic analysis of rice embryo: An approach for investigating Galpha protein-regulated proteins. *Proteomics* 5: 3932–3941.
- Kuroda, S., Fukata, M., Kobayashi, K., Nakafuku, M., Nomura, N., Iwamatsu, A., and Kaibuchi, K. (1996). Identification of IQGAP as a putative target for the small GTPases, Cdc42 and Rac1. *J Biol Chem*. 271: 23363-23367.
- Lamb, C., and Dixon, R.A. (1997). The Oxidative burst in plant disease resistance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol*. 48: 251–275.
- Lavy, M., Bloch, D., Hazak, O., Gutman, I., Poraty, L., Sorek, N., Sternberg, H., and Yalovsky, S. (2007). A Novel ROP/RAC effector links cell polarity, root-meristem maintenance, and vesicle trafficking. *Curr. Biol*. 17: 947–952.
- Leister, R.T., Dahlbeck, D., Day, B., Li, Y., Chesnokova, O., and Staskawicz, B.J. (2005). Molecular genetic evidence for the role of SGT1 in the intramolecular complementation of Bs2 protein activity in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell* 17: 1268–1278.
- Li, H., Shen, J.J., Zheng, Z.L., Lin, Y., and Yang, Z. (2001). The Rop GTPase switch controls multiple developmental processes in Arabidopsis. *Plant Physiol*. 126: 670-684.

Li, H., Wu, G., Ware, D., Davis, K.R., and Yang, Z. (1998). Arabidopsis Rho-related GTPases: differential gene expression in pollen and polar localization in fission yeast. *Plant Physiol.* 118: 407-417.

Lieberherr, D., Thao, N.P., Nakashima, A., Umemura, K., Kawasaki, T., and Shimamoto, K. (2005). A sphingolipid elicitor-inducible mitogen-activated protein kinase is regulated by the small GTPase OsRac1 and heterotrimeric G-protein in rice. *Plant Physiol.* 138: 1644–1652.

Link, A.J., Eng, J., Schieltz, D.M., Carmack, E., Mize, G.J., Morris, D.R., Garvik, B.M., and Yates III, J.R. (1999). Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry. *Nat. Biotechnol.* 17: 676–682.

Liu, Y., Schiff, M., Serino, G., Deng, X.W., and Dinesh-Kumar, S.P. (2002). Role of SCF ubiquitin-ligase and the COP9 signalosome in the N gene-mediated resistance response to Tobacco mosaic virus. *Plant Cell* 14: 1483–1496.

Liu, Y.V., Baek, J.H., Zhang, H., Diez, R., Cole, R.N., and Semenza, G.L. (2007). RACK1 competes with HSP90 for binding to HIF-1alpha and is required for O(2)-independent and HSP90 inhibitor-induced degradation of HIF-1alpha. *Mol. Cell* 25: 207–217.

Lopez-Bergami, P., Habelhah, H., Bhoumik, A., Zhang, W., Wang, L.H., and Ronai, Z. (2005). RACK1 mediates activation of JNK by protein kinase C. *Mol. Cell* 19: 309–320.

Mackey, D., Belkhadir, Y., Alonso, J.M., Ecker, J.R., and Dangl, J.L. (2003). Arabidopsis RIN4 is a target of the type III virulence effector AvrRpt2 and modulates RPS2-mediated resistance. *Cell* 112: 379–389.

Mackey, D., Holt, B.F., Wiig, A., and Dangl, J.L. (2002). RIN4 interacts with *Pseudomonas syringae* type III effector molecules and is required for RPM1-mediated resistance in Arabidopsis. *Cell* 108: 743–754.

McCahill, A., Warwicker, J., Bolger, G.B., Houslay, M.D., and Yarwood, S.J. (2002). The RACK1 scaffold protein: A dynamic cog in cell response mechanisms. *Mol. Pharmacol.* 62: 1261–1273.

McCudden, C.R., Hains, M.D., Kimple, R.J., Siderovski, D.P., and Willard, F.S. (2005). G-protein signaling: back to the future. *Cell Mol Life Sci.* 62: 551–577.

McKhann, H.I., Frugier, F., Petrovics, G., de la Pena, T.C., Jurkevitch, E., Brown, S., Kondorosi, E., Kondorosi, A., and Crespi, M. (1997). Cloning of a WD-repeat-containing gene from alfalfa (*Medicago sativa*): A role in hormone-mediated cell division? *Plant Mol. Biol.* 34: 771–780.

Meyers, B.C., Kozik, A., Griego, A., Kuang, H., and Michelmore, R.W. (2003). Genome-wide analysis of NBS-LRR-encoding genes in Arabidopsis. *Plant Cell.* 15: 809-834.

Midoh, N., and Iwata, M. (1996). Cloning and characterization of a probenazole-inducible gene for an intracellular pathogenesis-related protein in rice. *Plant Cell Physiol.* 37: 9-18.

Miki, D., Itoh, R., and Shimamoto, K. (2005). RNA silencing of single and multiple members in a gene family of rice. *Plant Physiol.* 138: 1903–1913.

Miki, D., and Shimamoto, K. (2004). Simple RNAi vectors for stable and transient suppression of gene function in rice. *Plant Cell Physiol.* 45: 490–495.

Molendijk, A.J., Bischoff, F., Rajendrakumar, C.S., Friml, J., Braun, M., Gilroy, S., and Palme, K. (2001). Arabidopsis thaliana Rop GTPases are localized to tips of root hairs and control polar growth. *EMBO J.* 20: 2779-2788.

Muskett, P.R., Kahn, K., Austin, M.J., Moisan, L.J., Sadanandom, A., Shirasu, K., Jones, J.D., and Parker, J.E. (2002). Arabidopsis RAR1 exerts rate-limiting control of R gene-mediated defenses against multiple pathogens. *Plant Cell* 14: 979–992.

Navarro, L., Zipfel, C., Rowland, O., Keller, I., Robatzek, S., Boller, T., and Jones, J.D. (2004). The transcriptional innate immune response to flg22. Interplay and overlap with Avr gene-dependent defense responses and bacterial pathogenesis. *Plant Physiol.* 135: 1113-1128.

Ono, E., Wong, H.L., Kawasaki, T., Hasegawa, M., Kodama, O., and Shimamoto, K. (2001). Essential role of the small GTPase Rac in disease resistance of rice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 759–764.

Parent, A., Laroche, G., Hamelin, E., and Parent, J.L. (2008). RACK1 regulates the cell surface expression of the G protein-coupled receptor for thromboxane A₂. *Traffic* 9: 394–407.

Patterson, R.L., van Rossum, D.B., Barrow, R.K., and Snyder, S.H. (2004). RACK1 binds to inositol 1,4,5-trisphosphate receptors and mediates Ca²⁺ release. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 2328–2332.

Perennes, C., Glab, N., Guglieni, B., Doutriaux, M.P., Phan, T.H., Planchais, S., and Bergounioux, C. (1999). Is arcA3 a possible mediator in the signal transduction pathway during agonist cell cycle arrest by salicylic acid and UV irradiation? *J. Cell Sci.* 112: 1181–1190.

Pratt, W.B., and Toft, D.O. (2003). Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery. *Exp. Biol. Med.* 228: 111–133.

Ron, D., Chen, C.H., Caldwell, J., Jamieson, L., Orr, E., and Mochly-Rosen, D. (1994). Cloning of an intracellular receptor for protein kinase C: A homolog of the beta subunit of G proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 839–843.

Schechtman, D., and Mochly-Rosen, D. (2001). Adaptor proteins in protein kinase C-mediated signal transduction. *Oncogene* 20: 6339–6347.

Schultheiss, H., Dechert, C., Kogel, K.H., and Huckelhoven, R. (2002). A small GTP-binding host protein is required for entry of powdery mildew fungus into epidermal cells of barley. *Plant Physiol.* 128: 1447–1454.

Schultheiss, H., Dechert, C., Kogel, K.H., and Huckelhoven, R. (2003). Functional analysis of barley RAC/ROP G-protein family members in susceptibility to the powdery mildew fungus. *Plant J.* 36: 589–601.

Sengupta, J., Nilsson, J., Gursky, R., Spahn, C.M., Nissen, P., and Frank, J. (2004). Identification of the versatile scaffold protein RACK1 on the eukaryotic ribosome by cryo-EM. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11: 957–962.

Shen, Q.H., Saijo, Y., Mauch, S., Biskup, C., Bieri, S., Keller, B., Seki, H., Ulker, B., Somssich, I.E., and Schulze-Lefert, P. (2007). Nuclear activity of MLA immune receptors links isolate-specific and basal disease-resistance responses. *Science* 315: 1098–1103.

Shirasu, K., Lahaye, T., Tan, M.W., Zhou, F., Azevedo, C., and Schulze-Lefert, P. (1999). A novel class of eukaryotic zinc-binding proteins is required for disease resistance signaling in barley and development in *C. elegans*. *Cell* 99: 355–366.

Shirasu, K., and Schulze-Lefert, P. (2003). Complex formation, promiscuity and multifunctionality: Protein interactions in disease-resistance pathways. *Trends Plant Sci.* 8: 252–258.

Smith, D.F. (2004). Tetratricopeptide repeat cochaperones in steroid receptor complexes. *Cell Stress Chaperones* 9: 109–121.

Suharsono, U., Fujisawa, Y., Kawasaki, T., Iwasaki, Y., Satoh, H., and Shimamoto, K. (2002). The heterotrimeric G protein alpha subunit acts upstream of the small GTPase Rac in disease resistance of rice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 13307–13312.

Takahashi, A., Casais, C., Ichimura, K., and Shirasu, K. (2003). HSP90 interacts with RAR1 and SGT1 and is essential for RPS2-mediated disease resistance in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 11777–11782.

Takahashi, A., Kawasaki, T., Henmi, K., Shi, I.K., Kodama, O., Satoh, H., and Shimamoto, K. (1999). Lesion mimic mutants of rice with alterations in early signaling events of defense. *Plant J.* 17: 535–545.

Takai, Y., Sasaki, T., and Matozaki, T. (2001). GTP-binding proteins. *Physiol Rev.* 81: 153–208.

Thao, N.P., Chen, L., Nakashima, A., Hara, S., Umemura, K., Takahashi, A., Shirasu, K., Kawasaki, T., and Shimamoto, K. (2007). RAR1 and HSP90 form a complex with Rac/Rop GTPase and function in innate-immune responses in rice. *Plant Cell* 19: 4035–4045.

Tornero, P., Merritt, P., Sadanandom, A., Shirasu, K., Innes, R.W., and Dangl, J.L. (2002). RAR1 and NDR1 contribute quantitatively to disease resistance in Arabidopsis, and their relative contributions are dependent on the R gene assayed. *Plant Cell* 14: 1005–1015.

Umemura, K., Ogawa, N., Koga, J., Iwata, M., and Usami, H. (2002). Elicitor activity of cerebroside, a sphingolipid elicitor, in cell suspension cultures of rice. *Plant Cell Physiol.* 43: 778–784.

VanAelst, L., and D'Souza-Schorey, C. (1997). Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev.* 11: 2295-322.

Wang, C.I., Guncar, G., Forwood, J.K., The, T., Catanzariti, A.M., Lawrence, G.J., Loughlin, F.E., Mackay, J.P., Schirra, H.J., Anderson, P.A., Ellis, J.G., Dodds, P.N., and Kobe, B. (2007). Crystal structures of flax rust avirulence proteins AvrL567-A and -D reveal details of the structural basis for flax disease resistance specificity. *Plant Cell.* 19: 2898-2912.

Wang, Y., Gao, M., Li, Q., Wang, L., Wang, J., Jeon, J.S., Qu, N., Zhang, Y., and He, Z. (2008). OsRAR1 and OsSGT1 physically interact and function in rice basal disease resistance. *Mol. Plant Microbe Interact.* 21: 294–303.

Wirthmueller, L., Zhang, Y., Jones, J.D., and Parker, J.E. (2007). Nuclear accumulation of the Arabidopsis immune receptor RPS4 is necessary for triggering EDS1-dependent defense. *Curr. Biol.* 17: 2023–2029.

Wong, H.L., Pinontoan, R., Hayashi, K., Tabata, R., Yaeno, T., Hasegawa, K., Kojima, C., Yoshioka, H., Iba, K., Kawasaki, T., and Shimamoto, K. (2007). Regulation of rice NADPH oxidase by binding of Rac GTPase to its N-terminal extension. *Plant Cell* 19: 4022–4034.

Wong, H.L., Sakamoto, T., Kawasaki, T., Umemura, K., and Shimamoto, K. (2004). Down-regulation of metallothionein, a reactive oxygen scavenger, by the small GTPase OsRac1 in rice. *Plant Physiol.* 135: 1447–1456.

Yaka, R., Thornton, C., Vagts, A.J., Phamluong, K., Bonci, A., and Ron, D. (2002). NMDA receptor function is regulated by the inhibitory scaffolding protein, RACK1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 5710–5715.

Yamamoto, T., Matsui, T., Nakafuku, M., Iwamatsu, A., and Kaibuchi, K. (1995). A novel GTPase-activating protein for R-Ras. *J Biol Chem.* 270: 30557-30561.

Yang, Z. (2002). Small GTPases: versatile signaling switches in plants. *Plant Cell.* 14: S375-388.

Yang, Z., and Watson, J.C. (1993). Molecular cloning and characterization of rho, a ras-related small GTP-binding protein from the garden pea. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90: 8732-8736.

Zipfel, C. (2008). Pattern-recognition receptors in plant innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 20: 10–16

Zipfel, C., and Felix, G. (2005). Plants and animals: A different taste for microbes? *Curr. Opin. Plant Biol.* 8: 353–360.

Zipfel, C., Kunze, G., Chinchilla, D., Caniard, A., Jones, J.D., and Boller, T., and Felix, G. (2006). Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts *Agrobacterium*-mediated transformation. *Cell.* 125: 749-760.

Zipfel, C., Robatzek, S., Navarro, L., Oakeley, E.J., Jones, J.D., Felix, G., and Boller, T. (2004). Bacterial disease resistance in *Arabidopsis* through flagellin perception. *Nature.* 428: 764-767.

7. 表

表 1. OsRac1アフィニティークロマトグラフィーによって同定したタンパク質

M. W.	Homologous protein	* GTP/GDP	Accession	Mascot score	**No. of peptides
p230	NB-LRR protein	GTP	gi 16905161	121	13
p210	NB-LRR protein	GTP	gi 115443832	103	9
P180	NB-LRR protein	GTP	gi 15422169	87	5
p180	NB-LRR protein	GTP	gi 55770686	125	13
p110	NB-LRR protein	GTP	gi 14589374	65	8
p70	Stress-induced protein 1 (STI1 / Hop) like protein (OsST1a, OsST11b)	GTP	gi15234549	59	9
p36	WD-repeat-containing receptor of activated C kinase 1 (RACK1) homolog (RACK1A)	GTP	gi 1346109	51	11

* GTP と GDP はそれぞれ GTP-OsRac1, GDP-OsRac1 のカラムを示す。

** Mascot 解析によってデータベース上のアミノ酸配列と一致したペプチド配列の数を示す。

表 2. 使用した遺伝子のプライマー配列

Primer name	Sequence (5' – 3')
Primers for real-time PCR	
OsRac1-F	TAGTACAGCAACCAGCAAGAACAAA
OsRac1-R	ACTTGATGAACCTCGTCGCC
Ubiquitin-F	AACCAGCTGAGGCCCAAGA
Ubiquitin-R	ACGATTGATTTAACCAGTCCATGA
RACK1A-F	AGGGATCTGTTTTGCACCAT
RACK1A-R	GAGAGAAGCACCATGGATCG
PBZ1-F	AATACGCCTAAGATGAAGAGGAATA
PBZ1-R	ACCACAAACTTAAAGCACGAAATTA
Primers for analysis of RACK1A overexpressor	
RACK1Aox-F	CACCATGGCCGGCGCGCAGGAGTCT
RACK1Aox-R	CTAGCCGGCGTAGCTGAAACC
Primers for analysis of RACK1A RNAi cells	
RACK1A RNAi-F	GCGCAGGAGTCTCTGGTGTT
RACK1A RNAi-R	GTGGTGACCCCGGTGGAGAG
RACK1B RNAi-F	GGCCAGGAGTCGCTCACCCCT
RACK1B RNAi-R	GTGGTGCGGCCGGTGGCTAG

8. 図

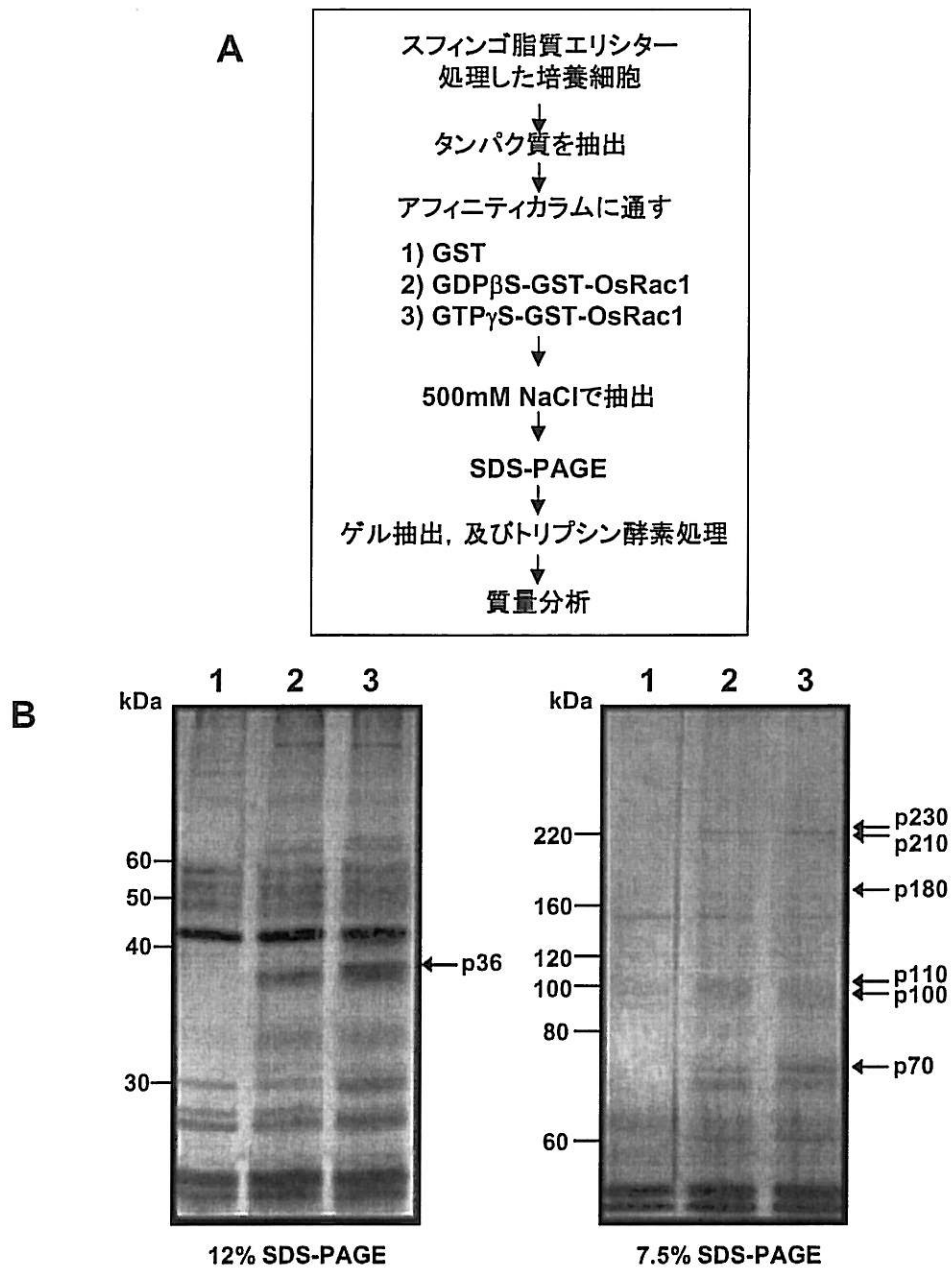


図1. OsRac1アフィニティクロマトグラフィーによってOsRac1と相互作用するタンパク質を検出

A. OsRac1アフィニティクロマトグラフィーの一連の流れを示す。

B. SDS-PAGE電気泳動によりタンパク質を分離後、銀染色によってバンドを検出した。1はGST, 2はGDPβS-GST-OsRac1, 3はGTPγS-GST-OsRac1カラムにそれぞれ通し、500 mM NaClで溶出したタンパク質画分を示す。矢印は、質量分析によって同定したタンパク質(表1)の分子量を示した。

```

RACK1A 1:MAGAQESLVLAGVMHGHNDVVTAIATPIDNSPFIVSSSRDKSLLVWDLTNPVQNVGEGA- 59
RACK1B 1:MAG-QESLTLAGVLRGHNDMVTATAIAPIDNSPFIVSSSRDKSLLVWDITNPSTAVATDPE 59
      *** ** *
RACK1A 60:-GASEYGVFFRRLTGHSHFVQDVVLSSDGQFALSGSWDGELRIWDLSTGVTRRRFVGHDK 118
RACK1B 60:AAPPEYGVSYRRLTGHSHFVQDVVLSSDGQFALSGSWDGELRLWDLATGRTRRRFVGHDK 119
      **** *
RACK1A 119:DVLSVAFSVDNRQIVSASRDRTIKLWNTLGECKYTIGGDLGGGEGHNGWVSCVRFSPNTF 17
RACK1B 120:DVLSVAFSVDNRQIVSAAARDNTIKLWNTLGECKYTIGGDHGAGEGHTGWVSCVRFSPNPM 179
      ***** ** *
RACK1A 179:QPTIVSGSWDRTVKVNLTNCKLRNLEGHGGYVNAVAVSPDGLCASGGKDVITLLWDL 238
RACK1B 180:APTIVSGSWDRSVKVNLTNCKLRNLEGHNGYVNAVAVSPDGLCASGGKDGITLLWDL 239
      ***** *
RACK1A 239:REGKRLYSLDAGSIIHSLCFSPNRYWLCAATQDSIKIWDLESKHIVQDLKPEIPVSKNQM 298
RACK1B 240:TEGKMLYKLDAGAIHSLCFSPNRYWLCAATEDSVKIWDLESKLVQDLKPEVQAFKSQM 299
      *** *
RACK1A 299:LYCTSLNWSADGSTLYAGYTDGTIRIYKISGFYSYAG- 334
RACK1B 300:LYCTSLSWSADGSTLFAGYTDGTIRVWVSGFPGGYAI 336
      ***** *

```

図2. RACK1A及びRACK1Bのアミノ酸配列

四角枠は質量分析によって同定されたペプチド配列を示し、RACK1A及びRACK1B両タンパク質における同一アミノ酸は★で示した。

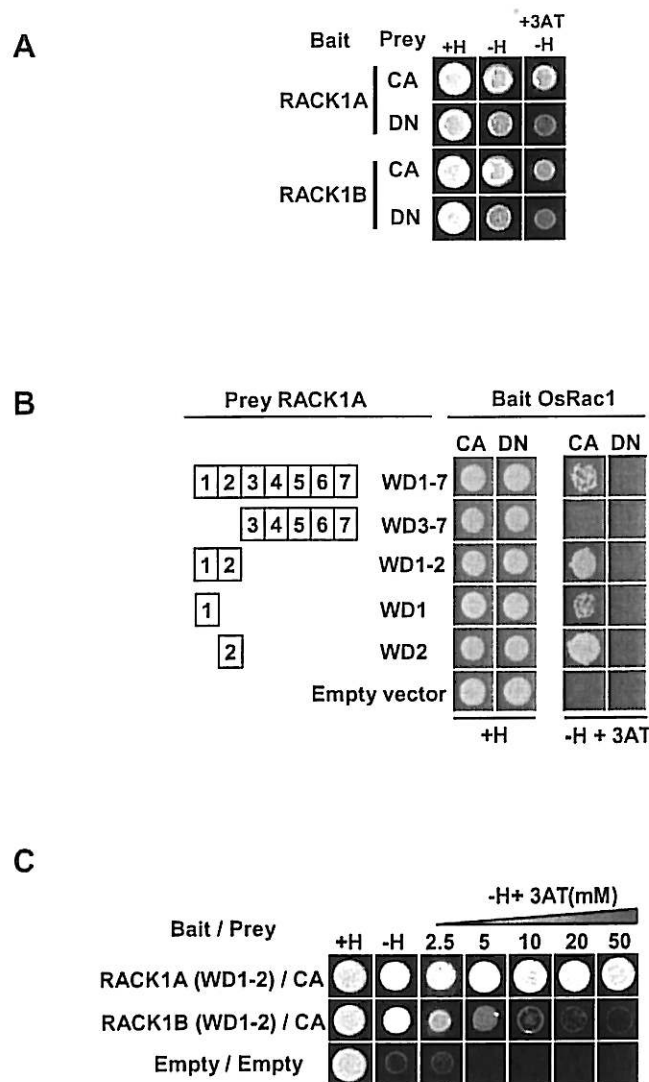


図3. 酵母two-hybrid法によるRACK1とOsRac1との相互作用

+Hはヒスチジンを含む培地(非選択培地), -Hはヒスチジンを含まない培地(選択培地), -H+3ATは選択培地に3-アミノ-1H-1, 2, 4-トリアゾール(3AT)を2.5 mMの濃度で加えた培地を示す。図2のN末端から47番目をWD1, 48番目から103番目をWD2, 104番目から145番目をWD3, 146番目から195番目をWD4, 196番目から237番目をWD5, 238番目から277番目をWD6, 278番目から334番目をWD7ドメインとする。

A. LexA-VP16システムを用いてbaitはRACK1A, RACK1Bとし, preyはCA-, DN-OsRac1 (C212S)として相互作用を調べた。

B. RACK1AのWD1-7, WD3-7, WD1-2, WD1及びWD2ドメインをpreyとし, CA-, DN-OsRac1 (C212S)をbaitとして, OsRac1と相互作用するRACK1AのWDドメインを調べた。

C. RACK1A (WD1-2), RACK1B (WD1-2)それぞれをbaitとし, CA-OsRac1 (C212S)をpreyとして相互作用の強さを3-ATの濃度で調べた。

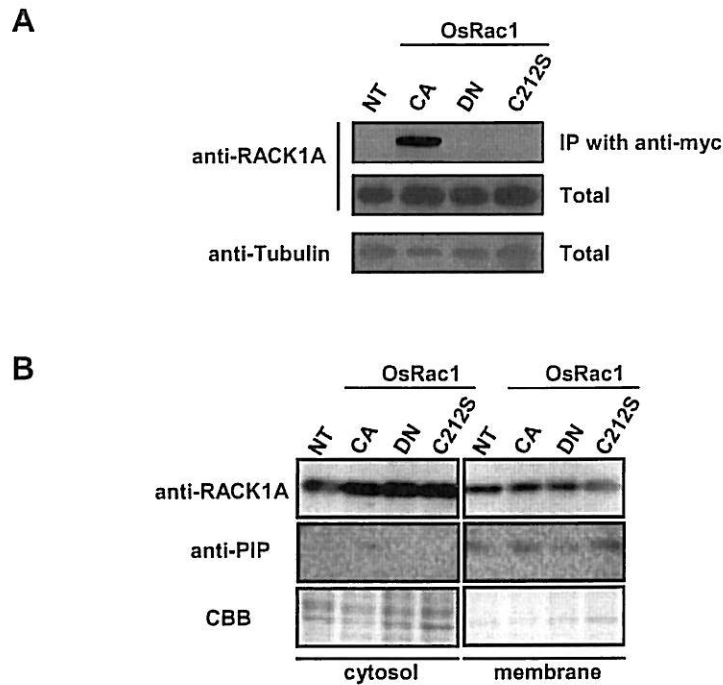


図4. OsRac1の共免疫沈降及びRACK1Aの細胞内局在

A. myc-OsRac1の共免疫沈降によってCA-OsRac1 (CA)特異的に RACK1タンパク質を検出した。mycタグを融合したCA-OsRac1 (CA), DN-OsRac1 (DN), CA-OsRac1 (C212S)を過剰発現させた培養細胞からタンパク質を抽出し, 抗myc抗体とprotein A sepharoseビーズを加え, 共免疫沈降を行った。コントロールとして非形質転換培養細胞(NT)を使用した。抗RACK1抗体, 内部標準として抗Tubulin抗体を使用し, イムノブロット解析を行った。

B. CA, DN, C212S及びNTから細胞質, ミクロソーム画分を抽出し, 抗RACK1A抗体, 細胞膜のマーカーとして抗PIP抗体を用いてイムノブロット解析を行った。下の泳動図はCoomassie blue染色を示す。

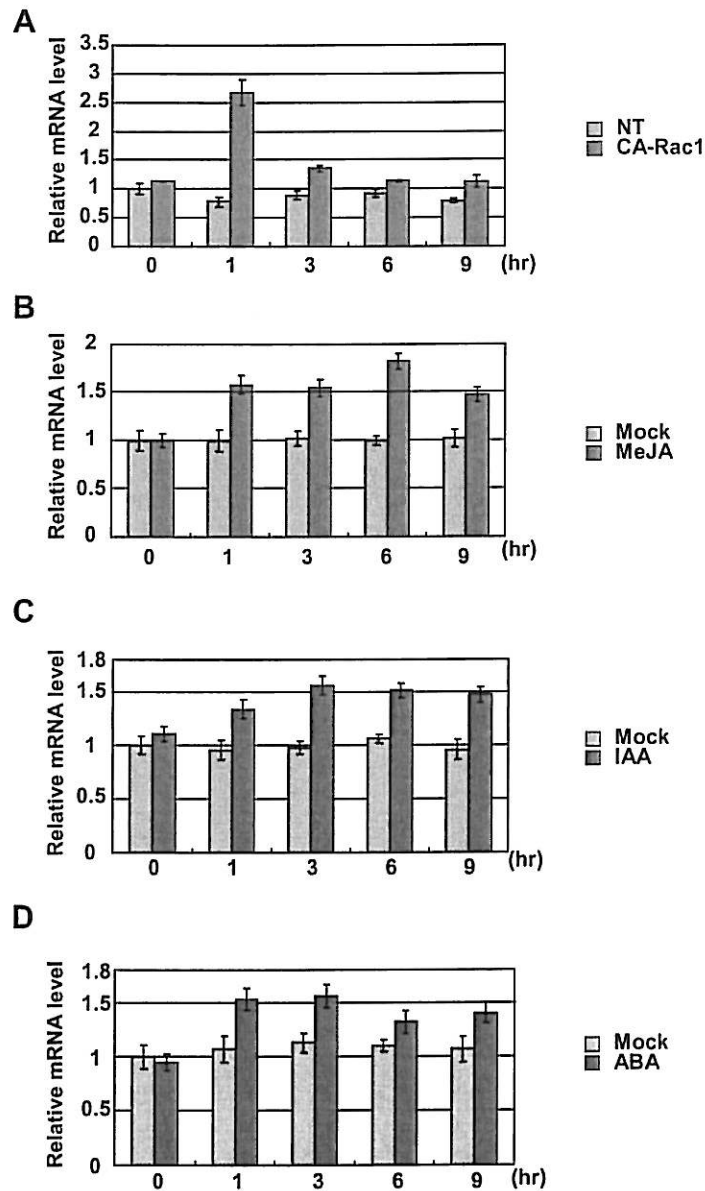


図5. スフィンゴ脂質エリシターや植物ホルモン処理時におけるイネ培養細胞中の*RACK1A*遺伝子発現解析

リアルタイムRT-PCRの内部標準として*Ubiquitin (Ubg)*遺伝子を用いた。それぞれ3回処理実験を行い、それらの材料を用いて2回リアルタイムRT-PCRを行った。グラフの棒は平均値±標準偏差を示す。

A. 非形質転換培養細胞(NT)とCA-OsRac1形質転換培養細胞にスフィンゴ脂質エリシターを処理し、1, 3, 6, 9時間後の*RACK1A*の遺伝子発現をリアルタイムRT-PCRによって調べた。

B, C, D. 非形質転換培養細胞に植物ホルモンであるMeJA (B), IAA (C), ABA (D)を処理し、1, 3, 6, 9時間後の*RACK1A*の遺伝子発現をリアルタイムRT-PCRによって調べた。Mockは植物ホルモンを処理しなかった非形質転換培養細胞を示す。

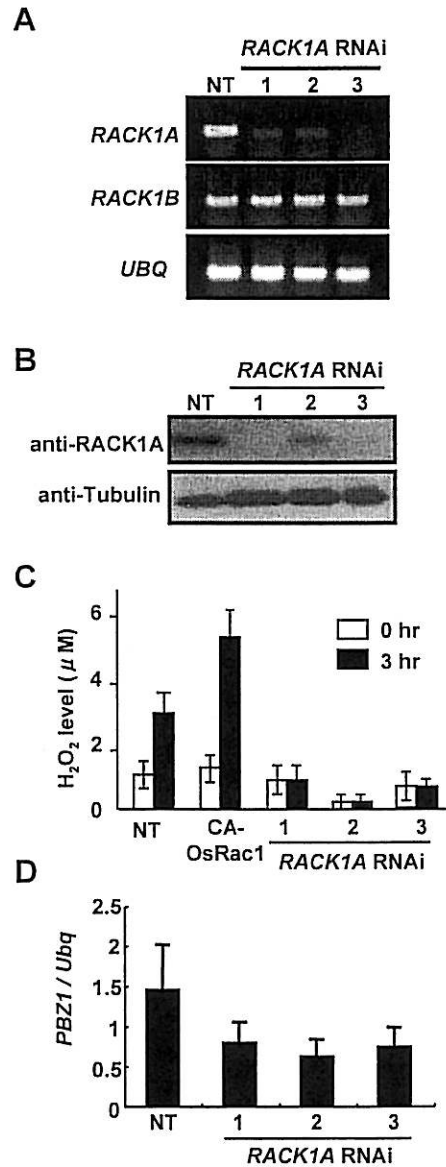


図6. RNAiによる*RACK1A*発現抑制 (*RACK1A*-RNAi)形質転換培養細胞

*RACK1A*遺伝子の機能解析を行うため、RNAi形質転換培養細胞を作出した。以下、それぞれ独立した3系統の*RACK1A*-RNAi形質転換培養細胞を用い実験を行った。RT-PCR及びリアルタイムRT-PCRの内部標準として*Ubq*遺伝子を使用した。

A. 非形質転換培養細胞(NT)と*RACK1A*-RNAi培養細胞での*RACK1A*及び*RACK1B*の遺伝子発現をRT-PCRによって調べた。

B. 非形質転換培養細胞(NT)と*RACK1A*-RNAi培養細胞を用いた抗*RACK1A*抗体によるイムノプロット解析を行った。内部標準として抗Tubulin抗体を使用した。

C. 非形質転換培養細胞(NT), CA-OsRac1及び*RACK1A*-RNAi培養細胞を用いて、スフィンゴ脂質エシレーター処理3時間後の活性酸素種の生成量を調べた。4回の実験を行い、グラフの棒は平均値±標準偏差を示す。

D. 非形質転換培養細胞(NT)と*RACK1A*-RNAi培養細胞での*PBZ1*の遺伝子発現をリアルタイムRT-PCRによって調べた。3回RNAを抽出し、それぞれのサンプルで2回リアルタイムRT-PCRを行った。グラフの棒は平均値±標準偏差を示す。

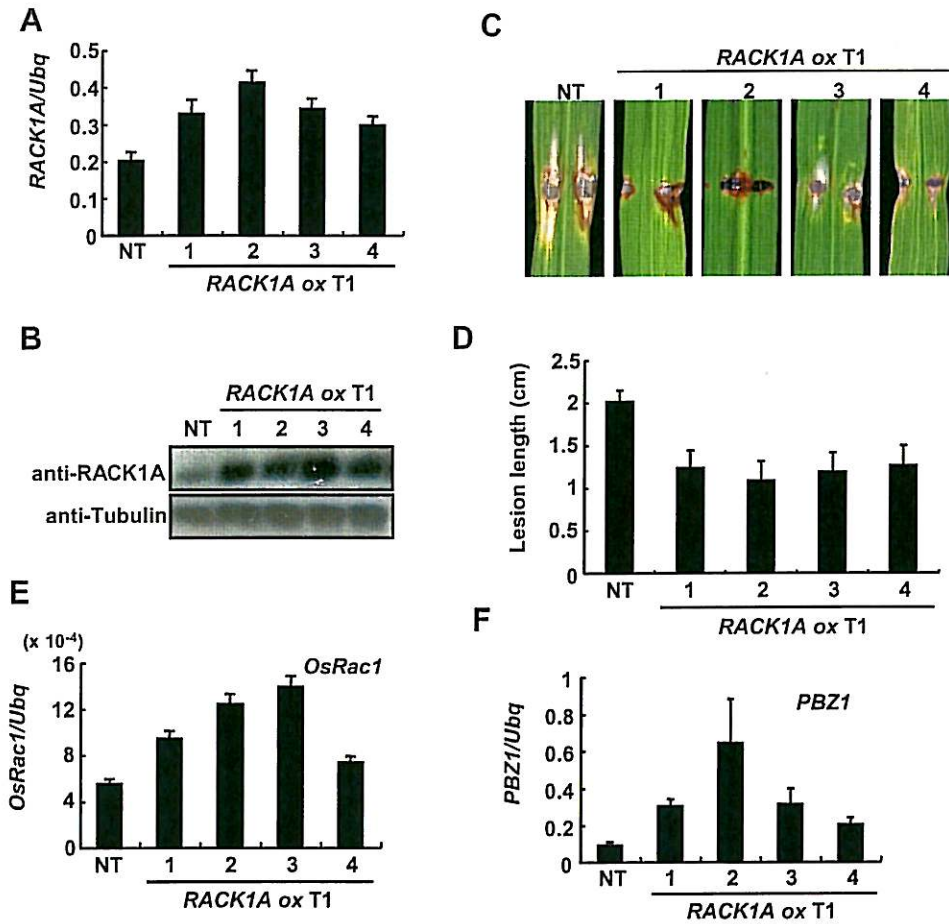


図7. *RACK1A*過剰発現体の解析

T1の*RACK1A*過剰発現体の1, 2, 3, 4はそれぞれ独立した形質転換体のラインを示す。リアルタイムRT-PCRの内部標準として*Ubgq*遺伝子を用いた。グラフの棒は平均値±標準偏差を示す。

A. 非形質転換培養細胞(NT)とT1の*RACK1A*過剰発現体での*RACK1A*の遺伝子発現をリアルタイムRT-PCRによって調べた。3回RNAを抽出し、それぞれのサンプルで2回リアルタイムRT-PCRを行った。

B. 非形質転換培養細胞(NT)とT1の*RACK1A*過剰発現体を用いた抗*RACK1A*抗体によるイムノブロット解析を行った。内部標準として抗*Tubulin*抗体を使用した。

C. 非形質転換培養細胞(NT)とT1の*RACK1A*過剰発現体に親和性もち病菌(レース007)を接種し、2週間後の病斑を示す。

D. Cでの病斑の長さをそれぞれ独立した個体での第4葉及び第5葉での合計8スポット測定した。

E. 非形質転換培養細胞(NT)とT1の*RACK1A*過剰発現体での*OsRac1*の遺伝子発現をリアルタイムRT-PCRによって調べた。3回RNAを抽出し、それぞれのサンプルで2回リアルタイムRT-PCRを行った。

F. 非形質転換培養細胞(NT)とT1の*RACK1A*過剰発現体での*PBZ1*の遺伝子発現をリアルタイムRT-PCRによって調べた。3回RNAを抽出し、それぞれのサンプルで2回リアルタイムRT-PCRを行った。

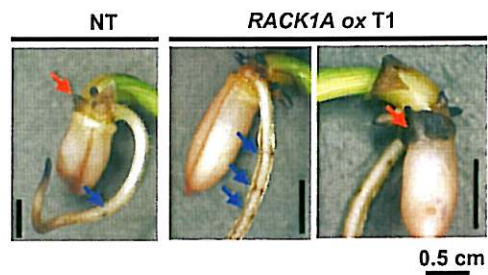


図8. *RACK1A*過剰発現体の幼苗期での活性酸素種の生成

活性酸素種の生成を調べるため、発芽後5日目の非形質転換培養細胞(NT)とT1の*RACK1A*過剰発現体にNBT染色を行った。矢印は染色されている部分を示し、赤は冠根領域、青は側根形成領域を示す。下線は0.5 cmの大きさを示す。

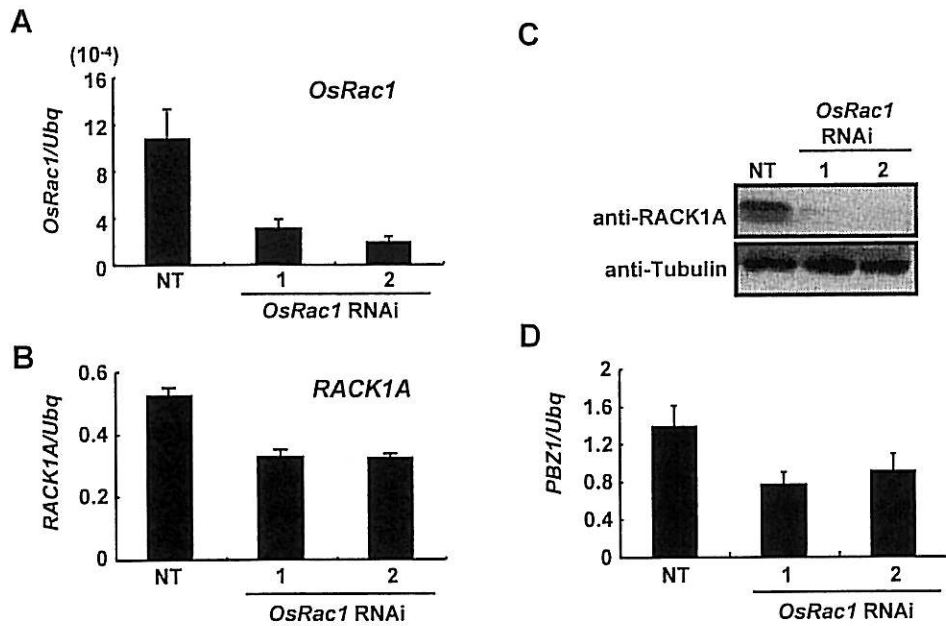


図9. RNAiによる*OsRac1*発現抑制 (*OsRac1*-RNAi)形質転換培養細胞

OsRac1-RNAi培養細胞の1, 2はそれぞれ独立した形質転換培養細胞のラインを示す。リアルタイムRT-PCRの内部標準として*Ubq*遺伝子を用いた。グラフの棒は平均値±標準偏差を示す。

- A. 非形質転換培養細胞(NT)と*OsRac1*-RNAi培養細胞での*OsRac1*の遺伝子発現をリアルタイムRT-PCRによって調べた。3回RNAを抽出し、それぞれのサンプルで2回リアルタイムRT-PCRを行った。
- B. 非形質転換培養細胞(NT)と*OsRac1*-RNAi培養細胞での*RACK1A*の遺伝子発現をリアルタイムRT-PCRによって調べた。3回RNAを抽出し、それぞれのサンプルで2回リアルタイムRT-PCRを行った。
- C. 非形質転換培養細胞(NT)と*OsRac1*-RNAi培養細胞を用いた抗*RACK1A*抗体によるイムノブロット解析を行った。内部標準として抗*Tubulin*抗体を使用した。
- D. 非形質転換培養細胞(NT)と*OsRac1*-RNAi培養細胞での*PBZ1*の遺伝子発現をリアルタイムRT-PCRによって調べた。3回RNAを抽出し、それぞれのサンプルで2回リアルタイムRT-PCRを行った。

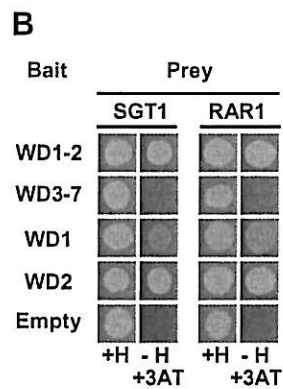
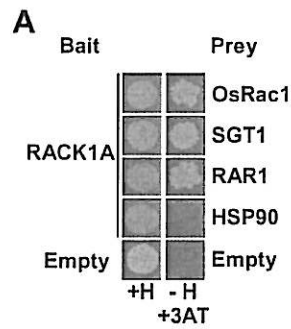


図10. 酵母two-hybrid法によるRAR1, SGT1それぞれとRACK1Aとの相互作用
 +Hはヒスチジンを含む培地(非選択培地), -Hはヒスチジンを含まない培地(選択培地), -H+3ATは選択培地に3ATを2.5 mMの濃度で加えた培地を示す。

A. RACK1Aをbaitとし, CA-OsRac1(OsRac1), SGT1, RAR1及びHSP90をpreyとし相互作用を調べた。

B. RACK1AのWD1-2, WD3-7, WD1, WD2をbaitとし, SGT1及びRAR1をpreyとし, それぞれのタンパク質と相互作用するRACK1Aのドメインを調べた。

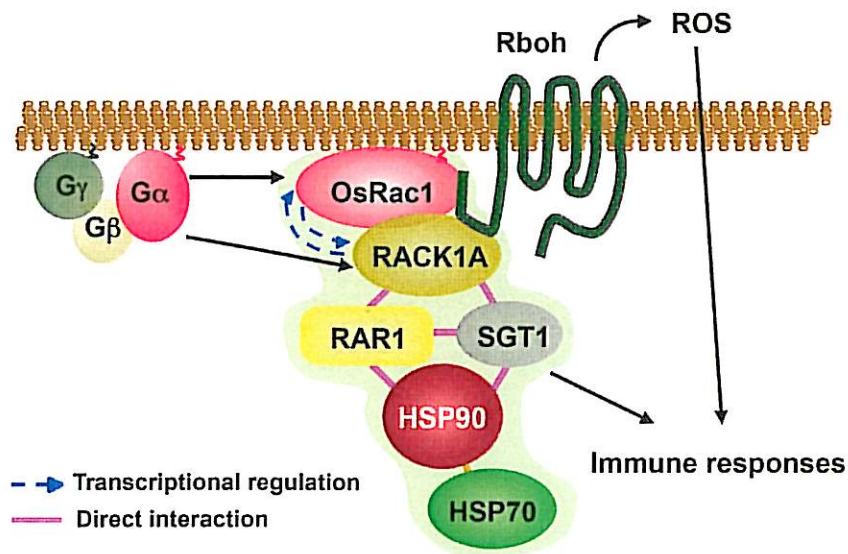


図11. イネの自然免疫応答でのRACK1Aを含む免疫複合体のモデル

RACK1Aは活性型OsRac1と相互作用し、Rboh (NADPHオキシダーゼ)のN末端、RAR1及びSGT1と相互作用することがわかった。SGT1、HSP90及びHSP70は細胞膜での免疫複合体を形成する(Thao et al., 2007)。OsRac1は*RACK1*の遺伝子発現を正に制御しており、RACK1AはRbohB (NADPHオキシダーゼ)のN末端に結合し、活性酸素種の生成に関わっていることが示唆された。また、RACK1Aは、OsRac1複合体全体を束ねるスキャフォールドとして機能していることが示唆された。ヘテロ三量体Gタンパク質はOsRac1 (Suharsono et al., 2002) やRACK1 (Komatsu et al., 2005)の遺伝子発現を正に制御し、イネの自然免疫応答に関わっていることが推測される。

9. 参考資料

参考資料 表 1. OsRac1アフィニティークロマトグラフィー及び質量分析によって同定したタンパク質

Homologous protein	Accession	*M.W. (kDa)	**GTP/GDP	Mascot score	***No. of peptide
Armadillo/beta-catenin-like repeat family protein	gi 108864075	210	GTP	117	3
Blue-light photoreceptor	gi 5689255	65	GDP	90	2
Cyclin-like F-box domain containing protein	gi 115480593	70	GTP	82	2
Cysteine endopeptidase	gi 5761329	50	GTP	121	2
Cytochrome P450 family protein	gi 110289408	65	GDP	45	2
Elongation factor 1 -beta (EF-1-beta)	gi 232031	30	GTP/GDP	169	3
Heat shock protein	gi 14488362	63	GTP/GDP	76	2
Hypothetical protein	gi 15528854	230	GTP/GDP	72	2
Hypothetical protein	gi 125589507	230	GDP	80	2
PKCq-interacting protein	gi 22165075	50	GTP	91	2
Protein phosphatase 2A regulatory subunit	gi 13129508	63	GTP	69	2
rCOP11 protein	gi 10443485	63	GDP	85	2
Reverse transcriptase	gi 14165324	80	GDP	85	2
Unknown protein	gi 125535146	110	GTP	98	2

*分子量は図1-Bで示したSDS-PAGE電気泳動図での分子量を示す。

**GTP とGDPはそれぞれGTP γ S-GST-OsRac1、GDP β S-GST-OsRac1のカラムを示す。

** Mascot解析によってデータベース上のアミノ酸配列と一致したペプチド配列の数を示す。

参考資料表2. 同定したタンパク質のMSデータ

M.W.	Identified protein	Accession No.	Mascot score	No. of peptide	Mascot score of individual peptide	Identified peptide fragment	Accession No. of candidate protein	Matching position in each sequences	Other matching protein (peptide base)							
210	protein	gi 108864075	117	3	56	VLLGGCIPPLLSLLK	gi 108864075	Query 1 Sbjct 186	VLLGGCIPPLLSLLK VLLGGCIPPLLSLLK VLLGGCIPPLLSLLK	15 200						
							gi 125576446	Query 1 Sbjct 186	VLLGGCIPPLLSLLK VLLGGCIPPLLSLLK VLLGGCIPPLLSLLK	15 200	hypothetical protein OsJ_031877					
							gi 125533546	Query 1 Sbjct 186	VLLGGCIPPLLSLLK VLLGGCIPPLLSLLK VLLGGCIPPLLSLLK	15 200	hypothetical protein OsI_034153					
							gi 62732907	Query 1 Sbjct 186	VLLGGCIPPLLSLLK VLLGGCIPPLLSLLK VLLGGCIPPLLSLLK	15 200	C2 domain, putative					
							LSSGNISK	gi 108864075	Query 1 Sbjct ###	LSSGNISK LSSGNISK LSSGNISK	8 1377					
								gi 125576446	Query 1 Sbjct ###	LSSGNISK LSSGNISK LSSGNISK	8 1377	hypothetical protein OsJ_031877				
						gi 115484501		Query 1 Sbjct ###	LSSGNISK LSSGNISK LSSGNISK	8 1346	Os11g0183800					
						gi 62732907		Query 1 Sbjct ###	LSSGNISK LSSGNISK LSSGNISK	8 1377	C2 domain, putative					
						MVEPLFLLLR		gi 108864075	Query 1 Sbjct ###	MVEPLFLLLR MVEPLFLLLR MVEPLFLLLR	10 1563					
								gi 115484501	Query 1 Sbjct ###	MVEPLFLLLR MVEPLFLLLR MVEPLFLLLR	10 1532	Os11g0183800				
						65	Blue-light photoreceptor	gi 5689255	90	2	59	MEREETVDGGGGGGMVGR	gi 5689255	Query 1 Sbjct 600	MEREETVDGGGGGGMVGR MEREETVDGGGGGGMVGR MEREETVDGGGGGGMVGR	18 617
													gi 115446841	Query 1 Sbjct 600	MEREETVDGGGGGGMVGR MEREETVDGGGGGGMVGR MEREETVDGGGGGGMVGR	18 617
gi 16444957	Query 1 Sbjct 600	MEREETVDGGGGGGMVGR MEREETVDGGGGGGMVGR MEREETVDGGGGGGMVGR	18 617	cryptochrome 1a												
MSASPSSMK	gi 5689255	Query 1 Sbjct 1	MSASPSSMK MSASPSSMK MSASPSSMK	9 9												
	gi 115480593	Query 1 Sbjct 479	AGNGSASR AGNGSASR AGNGSASR	8 486												
70	Cyclin-like F-box domain containing protein	gi 115480593	82	2	46								AGNGSASR	gi 115480593	Query 1 Sbjct 479	AGNGSASR AGNGSASR AGNGSASR

							gi 115473889	Query	1	LVPVGYGIK	9	Os07g0662500
								Sbjct	173	LVPVGYGIK	181	
							gi 90101284	Query	1	LVPVGYGIK	9	Elongation factor 1-delta 2
								Sbjct	175	LVPVGYGIK	183	(EF-1-delta 2)
							gi 6166140	Query	1	LVPVGYGIK	9	Elongation factor 1-delta 1
								Sbjct	178	LVPVGYGIK	186	(EF-1-delta 1)
		47			ALEQHLSGK		gi 232031	Query	1	ALEQHLSGK	9	
								Sbjct	16	ALEQHLSGK	24	
							gi 125601404	Query	1	ALEQHLSGK	9	hypothetical protein OsJ_024463
								Sbjct	16	ALEQHLSGK	24	
							gi 115473889	Query	1	ALEQHLSGK	9	Os07g0662500
								Sbjct	16	ALEQHLSGK	24	
63	Heat shock protein	gi 14488362	76	2	43	SLDIEDAQRKK	gi 14488362	Query	1	SLDIEDAQRKK	11	
								Sbjct	274	SLDIEDAQRKK	284	
							gi 17027260	Query	1	SLDIEDAQRKK	11	hypothetical protein, 5'-partial
								Sbjct	466	SLDIEDAQRKK	476	
				33		LTIDDIVTK	gi 14488362	Query	1	LTIDDIVTK	9	
								Sbjct	151	LTIDDIVTK	159	
230	Hypothetical protein	gi 15528854	72	2	45	KCGSQNLETK	gi 15528854	Query	1	KCGSQNLETK	11	
								Sbjct	23	KCGSQNLETK	33	
							gi 125531067	Query	1	KCGSQNLETK	11	hypothetical protein
								Sbjct	23	KCGSQNLETK	33	
				27		LQNLLK	gi 15528854	Query	1	LQNLLK	7	
								Sbjct	37	LQNLLK	43	
							gi 125573941	Query	1	LQNLLK	7	hypothetical protein OsJ_029434
								Sbjct	37	LQNLLK	43	
							gi 115481046	Query	1	LQNLLK	7	Os10g0135100
								Sbjct	37	LQNLLK	43	

230	Hypothetical protein	gi 125589507	80	2	51	ENAIQLAR	gi 125589507	Query	1	ENAIQLAR	8						
								Sbjct	188	ENAIQLAR	195						
							gi 115457222	Query	1	ENAIQLAR	8	Os04g0194500					
								Sbjct	310	ENAIQLAR	317						
				29	SVLILQMKYR	gi 125589507	Query	1	SVLILQMKYR	10							
							Sbjct	887	SVLILQMKYR	896							
230	NB-LRR protein	gi 16905161	121	2	62	LEKVGAAVR	gi 16905161	Query	1	LEKVGAAVR	9						
								Sbjct	41	LEKVGAAVR	49						
							gi 10440622	Query	1	LEKVGAAVR	9	putative NB-LRR type resistance protein, 3' partial					
								Sbjct	41	LEKVGAAVR	49						
									60	SEDNVPDR	gi 16905161	Query	1	SEDNVPDR	8		
												Sbjct	###	SEDNVPDR	1101		
						gi 125575117	Query	1	SEDNVPDR	8	hypothetical protein Os_J_030610						
							Sbjct	###	SEDNVPDR	1034							
210	NB-LRR protein	gi 115443833	103	3	38	FHAELSR	gi 115443833	Query	1	FHAELSR	7						
								Sbjct	20	FHAELSR	26						
									35	IENHFDLR	gi 115443833	Query	1	IENHFDLR	8		
												Sbjct	461	IENHFDLR	468		
												gi 7248786	Query	1	IENHFDLR	8	NB-LRR-like protein
													Sbjct	18	IENHFDLR	25	
												gi 7248767	Query	1	IENHFDLR	8	NB-LRR-like protein
													Sbjct	18	IENHFDLR	25	
				31	NETLVHAHR	gi 115443833	Query	1	NETLVHAHR	9							
							Sbjct	84	NETLVHAHR	92							
180	NB-LRR protein	gi 15422169	87	2	53	DYFNEMVSGSFSQPVSK	gi 15422169	Query	1	DYFNEMVSGSFSQPVSK	17						
								Sbjct	454	DYFNEMVSGSFSQPVSK	470						
									35	SCWCIR	gi 15422169	Query	1	SCWCIR	6		
												Sbjct	999	SCWCIR	1004		
												gi 125572240	Query	1	SCWCIR	6	hypothetical protein Os_J_003580
													Sbjct	937	SCWCIR	942	
						gi 115440325	Query	1	SCWCIR	6	Os01g0781100						
							Sbjct	###	SCWCIR	1053							

						gi 20804846	Query	1	SCWCIR	6	putative rust resistance protein	
							Sbjct	999	SCWCIR SCWCIR	1004		
180	NB-LRR protein	gi 55770687	125	3	46	TFDSTKLR	gi 55770687	Query	1	TFDSTKLR	8	
							Sbjct	130	TFDSTKLR TFDSTKLR	137		
					42	LMEIVDNR	gi 55770687	Query	1	LMEIVDNR	8	
							Sbjct	92	LMEIVDNR LMEIVDNR	99		
							gi 125569257	Query	1	LMEIVDNR	8	hypothetical protein OsJ_000597
							Sbjct	114	LMEIVDNR LMEIVDNR	121		
					38	LFIAGCDLLR	gi 55770687	Query	1	LFIAGCDLLR	10	
							Sbjct	495	LFIAGCDLLR LFIAGCDLLR	504		
							gi 125569257	Query	1	LFIAGCDLLR	10	hypothetical protein OsJ_000597
							Sbjct	###	LFIAGCDLLR LFIAGCDLLR	1267		
110	NB-LRR protein	gi 14589374	65	2	38	YTHIFGDSIDL	gi 14589374	Query	1	YTHIFGDSIDL	12	
							Sbjct	94	YTHIFGDSIDL YTHIFGDSIDL	105		
					27	EWGIGQAR	gi 14589374	Query	1	EWGIGQAR	8	
							Sbjct	500	EWGIGQAR EWGIGQAR	507		
50	PKCq-interacting protein	gi 22165075	91	2	47	IPFSSFDILTDDEVR	gi 22165075	Query	1	IPFSSFDILTDDEVR	15	
							Sbjct	327	IPFSSFDILTDDEVR IPFSSFDILTDDEVR	341		
							gi 115482778	Query	1	IPFSSFDILTDDEVR	15	Os10g0500700
							Sbjct	327	IPFSSFDILTDDEVR IPFSSFDILTDDEVR	341		
							gi 78708863	Query	1	IPFSSFDILTDDEVR	15	glutaredoxin-related protein, expressed
							Sbjct	327	IPFSSFDILTDDEVR IPFSSFDILTDDEVR	341		
					45	ALISSAPVMLFMK	gi 22165075	Query	1	ALISSAPVMLFMK	13	
							Sbjct	399	ALISSAPVMLFMK ALISSAPVMLFMK	411		
63	Protein phosphatase 2A regulatory subunit	gi 13129508	69	2	45	ITMDTASQIFEILR	gi 13129508	Query	1	ITMDTASQIFEILR	14	
							Sbjct	252	ITMDTASQIFEILR ITMDTASQIFEILR	265		
							gi 115482514	Query	1	ITMDTASQIFEILR	14	Os10g0476600
							Sbjct	215	ITMDTASQIFEILR ITMDTASQIFEILR	228		
							gi 16905168	Query	1	ITMDTASQIFEILR	14	putative phosphatase subunit, 3'-partial
							Sbjct	252	ITMDTASQIFEILR ITMDTASQIFEILR	265		
					24	ENPTLIEWDR	gi 13129508	Query	1	ENPTLIEWDR	10	
							Sbjct	535	ENPTLIEWDR ENPTLIEWDR	544		

						gi 115482514	Query	1	ENPTLIEWDR	10	Os10g0476600	
							Sbjct	498	ENPTLIEWDR	507		
63	rCOP11 protein	gi 10443485	85	2	43	IQARIDSHNK	gi 10443485	Query	1	IQARIDSHNK	10	
							Sbjct	381	IQARIDSHNK	390		
							gi 108705858	Query	1	IQARIDSHNK	10	COP9 signalosome complex subunit 1, putative, expressed
							Sbjct	381	IQARIDSHNK	390		
					42	VIDNSNFR	gi 10443485	Query	1	VIDNSNFR	8	
							Sbjct	278	VIDNSNFR	285		
80	Reverse transcriptase	gi 14165324	85	2	50	LDVAQER	gi 14165324	Query	1	LDVAQER	7	
							Sbjct	28	LDVAQER	34		
					35	ESLEALDK	gi 14165324	Query	1	ESLEALDK	8	
							Sbjct	532	ESLEALDK	539		
							gi 50726269	Query	1	ESLEALDK	8	hypothetical protein
							Sbjct	35	ESLEALDK	42		
70	Stress-induced protein 1 (ST1 / Hop) like protein (OsST1a, OsST1b)	gi 115447567	79	2	42	GLALDPTNEGLK	gi 115447567	Query	1	GLALDPTNEGLK	12	
							Sbjct	96	GLALDPTNEGLK	107		
					33	MISRALTR	gi 115447567	Query	1	MISRALTR	8	
							Sbjct	323	MISRALTR	330		
110	Unknown protein	gi 125535146	98	2	53	LILIGGAMAQK	gi 125535146	Query	1	LILIGGAMAQK	11	
							Sbjct	652	LILIGGAMAQK	662		
					45	LNPVQYLK	gi 125535146	Query	1	LNPVQYLK	8	
							Sbjct	90	LNPVQYLK	97		
							gi 115486309	Query	1	LNPVQYLK	8	Os11g0621300
							Sbjct	90	LNPVQYLK	97		
							gi 4680491	Query	1	LNPVQYLK	8	hypothetical protein
							Sbjct	90	LNPVQYLK	97		
36	WD-repeat-containing receptor of activated C kinase 1 (RACK1) homolog (RACK1A)	gi 1346109	162	3	61	LWDLSTGVTR		Query	1	LWDLSTGVTR	11	
							Sbjct	101	LWDLSTGVTR	111		
					53	FSPNTFQPTIVSGSWDR		Query	1	FSPNTFQPTIVSGSWDR	17	
							Sbjct	173	FSPNTFQPTIVSGSWDR	189		
					49	DGVTLWDLAEGK		Query	1	DGVTLWDLAEGK	13	
							Sbjct	230	DGVTLWDLAEGK	242		

参考資料 表3. その他の候補タンパク質*

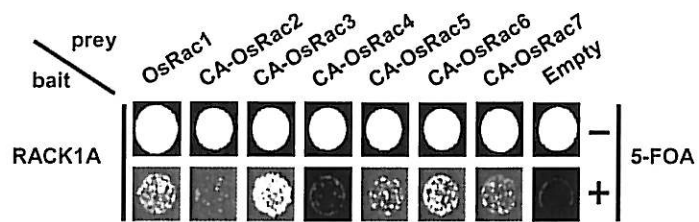
M.W.	Mascot score	No. of peptide	Mascot score of individual peptide	Identified peptide fragment	Matching position in each sequences			Other matching protein (peptide base)	Accession No. of candidate protein											
50	99	3	40	TNFREVAIK	Query	1	TNFREVAIK	9	Elongation factor 1-gamma	gi 13626515										
					Sbjct	284	TNFREVAIK	292												
					Query	1	TNFREVAIK	9	hypothetical protein OsJ_005750		gi 125581336									
					Sbjct	289	TNFREVAIK	297												
					Query	1	TNFREVAIK	9	Elongation factor 1-gamma 2 (EF-1-gamma 2)			gi 90101285								
					Sbjct	284	TNFREVAIK	292												
					Query	1	TNFREVAIK	9	elongation factor 1 gamma-like protein				gi 29367403							
					Sbjct	275	TNFREVAIK	283												
					Query	1	TNFREVAIK	9	putative elongation factor 1-gamma					gi 46806490						
					Sbjct	280	TNFREVAIK	288												
					31				YNDENTVSFVTMNK						Query	1	YNDENTVSFVTMNK	14	Elongation factor 1-gamma	gi 13626515
															Sbjct	312	YNDENTVSFVTMNK	325		
Query	1	YNDENTVSFVTMNK	14	hypothetical protein OsJ_020904						gi 125597641										
Sbjct	334	YNDENTVSFVTMNK	347																	
Query	1	YNDENTVSFVTMNK	14	hypothetical protein OsJ_005750							gi 125581336									
Sbjct	317	YNDENTVSFVTMNK	330																	
Query	1	YNDENTVSFVTMNK	14	Elongation factor 1-gamma 2 (EF-1-gamma 2)								gi 90101285								
Sbjct	312	YNDENTVSFVTMNK	325																	
Query	1	YNDENTVSFVTMNK	14	elongation factor 1 gamma-like protein									gi 29367403							
Sbjct	303	YNDENTVSFVTMNK	316																	
Query	1	YNDENTVSFVTMNK	14	elongation factor 1 gamma-like protein										gi 29367381						
Sbjct	307	YNDENTVSFVTMNK	320																	
Query	1	YNDENTVSFVTMNK	14	Elongation factor 1-gamma 3 (EF-1-gamma 3)	gi 75111966															
Sbjct	310	YNDENTVSFVTMNK	323																	
Query	1	YNDENTVSFVTMNK	14	putative elongation factor 1-gamma		gi 46806490														
Sbjct	308	YNDENTVSFVTMNK	321																	

			29	VDISDEAQK	Query	1	VDISDEAQK	9	Elongation factor 1-gamma	gi 13626515
					Sbjct	385	VDISDEAQK	393		
					Query	1	VDISDEAQK	9	hypothetical protein OsJ_005750	gi 125581336
					Sbjct	390	VDISDEAQK	398		
					Query	1	VDISDEAQK	9	Elongation factor 1-gamma 2 (EF-1-gamma 2)	gi 90101285
					Sbjct	385	VDISDEAQK	393		
					Query	1	VDISDEAQK	9	elongation factor 1 gamma-like protein	gi 29367403
					Sbjct	376	VDISDEAQK	384		
					Query	1	VDISDEAQK	9	putative elongation factor 1-gamma	gi 46806490
					Sbjct	381	VDISDEAQK	389		
50	98	2	53	AGIALNDNFVK	Query	1	AGIALNDNFVK	11	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	gi 3023816
					Sbjct	301	AGIALNDNFVK	311		
					Query	1	AGIALNDNFVK	11	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	gi 149390629
					Sbjct	183	AGIALNDNFVK	193		
					Query	1	AGIALNDNFVK	11	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic	gi 149392290
					Sbjct	175	AGIALNDNFVK	185		
					Query	1	AGIALNDNFVK	11	hypothetical protein OsJ_014636	gi 125590803
					Sbjct	349	AGIALNDNFVK	359		
					Query	1	AGIALNDNFVK	11	Os04g0486600	gi 115459078
					Sbjct	301	AGIALNDNFVK	311		
					Query	1	AGIALNDNFVK	11	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic (PP38)	gi 122222108
					Sbjct	301	AGIALNDNFVK	311		
			46	AASYDAIK	Query	1	AASYDAIK	8	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	gi 3023816
					Sbjct	254	AASYDAIK	261		
					Query	1	AASYDAIK	8	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic	gi 149392290
					Sbjct	128	AASYDAIK	135		
					Query	1	AASYDAIK	8	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic (PP38)	gi 122222108
					Sbjct	254	AASYDAIK	261		
65	92	2	54	LAVNLIPFPR	Query	1	LAVNLIPFPR	10	Tubulin beta chain	gi 1174598
					Sbjct	253	LAVNLIPFPR	262		

		Query	1	LAVNLIPFPR	10	hypothetical protein OsJ_017784	gi 125594242
		Sbjct	433	LAVNLIPFPR	442		
		Query	1	LAVNLIPFPR	10	hypothetical protein OsJ_012272	gi 125588125
		Sbjct	253	LAVNLIPFPR	262		
		Query	1	LAVNLIPFPR	10	hypothetical protein OsJ_003702	gi 125572362
		Sbjct	260	LAVNLIPFPR	269		
		Query	1	LAVNLIPFPR	10	hypothetical protein OsJ_001287	gi 125569947
		Sbjct	254	LAVNLIPFPR	263		
		Query	1	LAVNLIPFPR	10	hypothetical protein OsJ_008758	gi 125584611
		Sbjct	181	LAVNLIPFPR	190		
		Query	1	LAVNLIPFPR	10	hypothetical protein OsJ_011509	gi 125587362
		Sbjct	269	LAVNLIPFPR	278		
		Query	1	LAVNLIPFPR	10	Os06g0671900	gi 115469470
		Sbjct	253	LAVNLIPFPR	262		
		Query	1	LAVNLIPFPR	10	beta tubulin	gi 460989
		Sbjct	195	LAVNLIPFPR	204		
		Query	1	LAVNLIPFPR	10	beta tubulin	gi 460991
		Sbjct	253	LAVNLIPFPR	262		
		Query	1	LAVNLIPFPR	10	beta tubulin	gi 493725
		Sbjct	253	LAVNLIPFPR	262		
		Query	1	LAVNLIPFPR	10	beta-tubulin	gi 829169
		Sbjct	253	LAVNLIPFPR	262		
		Query	1	LAVNLIPFPR	10	beta-tubulin	gi 310317
		Sbjct	253	LAVNLIPFPR	262		
38	EVDEQMINVQNK	Query	1	EVDEQMINVQNK	12	Tubulin beta chain	gi 1174598
		Sbjct	325	EVDEQMINVQNK	336		
		Query	1	EVDEQMINVQNK	12	hypothetical protein OsJ_017784	gi 125594242
		Sbjct	505	EVDEQMINVQNK	516		
		Query	1	EVDEQMINVQNK	12	hypothetical protein OsJ_003702	gi 125572362
		Sbjct	332	EVDEQMINVQNK	343		

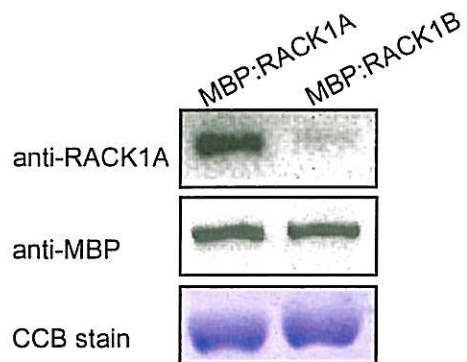
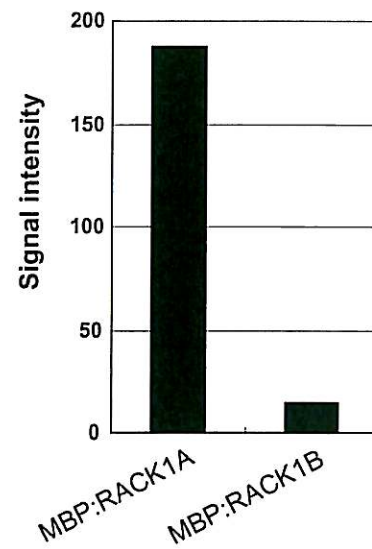
Query	1	EVDEQMINVQNK	12	hypothetical protein OsJ_003702	gi 125572362
		EVDEQMINVQNK			
Sbjct	326	EVDEQMINVQNK	337		
Query	1	EVDEQMINVQNK	12	hypothetical protein OsJ_011509	gi 125587362
		EVDEQMINVQNK			
Sbjct	341	EVDEQMINVQNK	352		
Query	1	EVDEQMINVQNK	12	beta tubulin	gi 460989
		EVDEQMINVQNK			
Sbjct	267	EVDEQMINVQNK	278		
Query	1	EVDEQMINVQNK	12	beta tubulin	gi 460991
		EVDEQMINVQNK			
Sbjct	325	EVDEQMINVQNK	336		
Query	1	EVDEQMINVQNK	12	beta-tubulin	gi 310317
		EVDEQMINVQNK			
Sbjct	325	EVDEQMINVQNK	336		

*これらのタンパク質は同一タンパク質として同定されなかった。



参考資料 図1. スプリットユビキチンtwo-hybrid法によるRACK1AとOsRacファミリーとの相互作用

5-フルオロオロト酸(5-FOA)選択培地を使用した。RACK1Aをbait, CA-OsRac1-7をpreyとして相互作用を調べた。

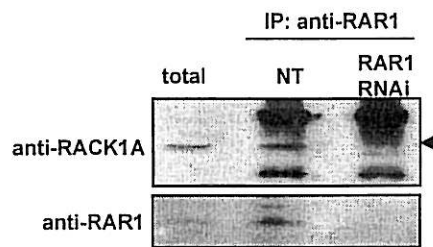
A**B**

参考資料 図2. 抗RACK1A抗体によるイムノブロット解析

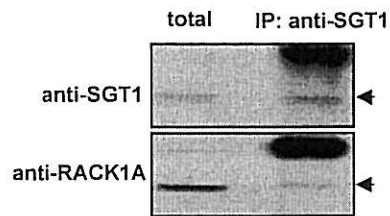
A. N末端にMBPタグを融合した RACK1A及びRACK1Bタンパク質を大腸菌で発現させ、精製後SDS-PAGE電気泳動を行い、抗RACK1A抗体を用いてイムノブロット解析を行った。内部標準として抗MBP抗体を使用した。下図はCBB染色を示す。

B. Aの抗RACK1A抗体によるイムノブロット解析のシグナル強度を示す。

A

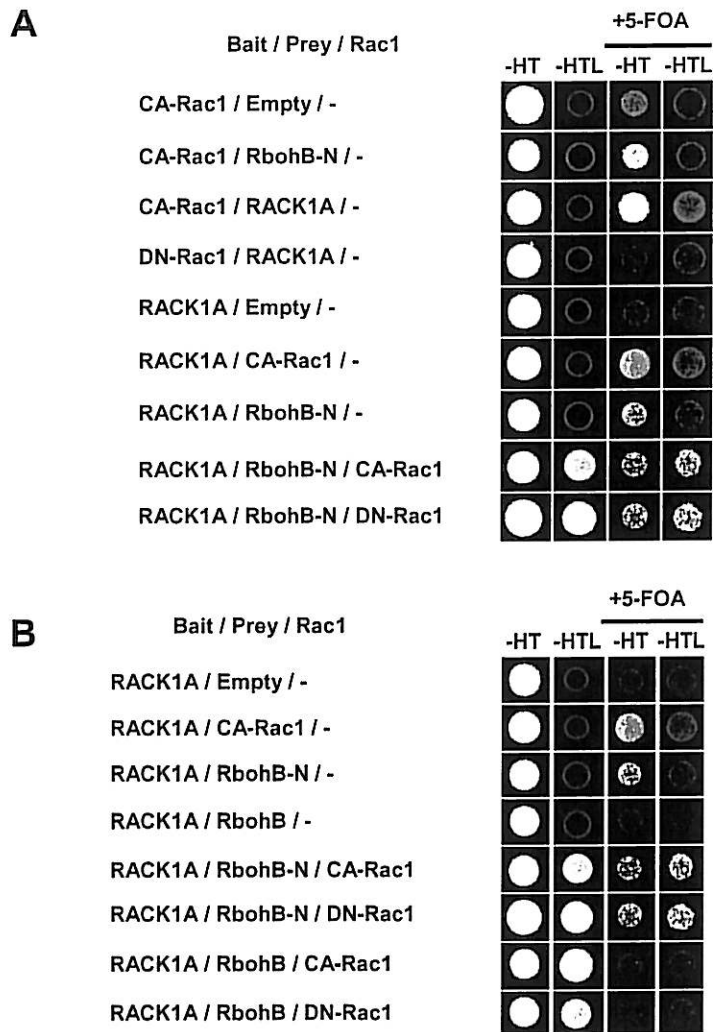


B









参考資料 図3. RAR1あるいはSGT1による共免疫沈降

totalは非形質転換培養細胞(NT)の可溶性画分を示し、抗RAR1抗体(A)あるいは抗SGT1抗体(B)を用いて免疫沈降を行った(IP)。また、Aでは*RAR1*-RNAi培養細胞を用いて同様に抗RAR1抗体で免疫沈降を行った。Aの矢印はRACK1Aタンパク質のシグナルを示す。Bの上図の矢印はSGT1タンパク質、下図の矢印はRACK1Aタンパク質のシグナルを示す。



参考資料 図4. スプリットユビキチンthree-hybrid法によるOsRac1存在下でのRACK1AとRbohBとの相互作用

5-フルオロオロト酸(5-FOA)選択培地を使用した。baitはヒスチジン非要求性(-H), preyはトリプトファン非要求性(-T), OsRac1を導入したpDEST32ベクターはロイシン非要求性(-L)である。OsRac1存在下でRbohBのN末端のみ(RbohB-N), RbohB全長とRACK1Aとの相互作用を調べた。

Bait / Prey	5-FOA	
	-	+
RACK1A / Empty		
RACK1A / RACK1A		
RACK1A / RACK1B		

参考資料 図5. スプリットユビキチンtwo-hybrid法によるRACK1A/RACK1A, RACK1A/RACK1Bの相互作用

5-フルオロオロト酸(5-FOA)選択培地を使用した。RACK1Aをbait, RACK1AあるいはRACK1Bをpreyとして相互作用を調べた。