

イネ病害抵抗性における PRONE 型 GEF による  
OsRac1 活性化メカニズムの解明

赤松 明  
奈良先端科学技術大学院大学  
バイオサイエンス研究科 植物分子遺伝学研究室  
(島本 功 教授)  
平成 25 年 3 月 6 日

## 目次

1. 序論	4
1-1. 植物における MTI 機構	
1-2. 植物病害抵抗性における受容体キナーゼ	
1-3. 病原菌由来物質 chitin と chitin 受容体	
1-4. MTI 機構における抵抗性反応	
1-5. MTI 機構における低分子量 G タンパク質 OsRac1 の役割	
1-6. Rac/Rop GTPase 活性化因子	
1-7. FRET プローブ Raichu-OsRac1	
1-8. 病害抵抗性因子の細胞内局在	
2. 材料と方法	13
2-1. 植物材料	
2-1-1. イネ培養細胞	
2-1-2. イネ培養細胞の培養条件	
2-2. イネプロトプラストへの一過的形質転換	
2-3. FRET 解析	
2-3-1. FRET 解析用 DNA コンストラクト	
2-3-2. レシオイメージング法	
2-3-3. 使用した MAMPs	
2-3-4. MAMPs 処理に伴うリアルタイムイメージング	
2-4. 細胞内局在解析	
2-4-1. 細胞内局在解析用 DNA コンストラクト	
2-4-2. イネ Oc 細胞のプロトプラストにおける局在解析	
2-5. BiFC 解析	
2-5-1. BiFC 解析用 DNA コンストラクト	
2-5-2. イネ Oc 細胞のプロトプラストにおける BiFC 解析	
2-6. 共免疫沈降法	
2-6-1. 共免疫沈降法用 DNA コンストラクト	
2-6-2. イネ Oc 細胞のプロトプラストからのタンパク質抽出および共免疫沈降法	
2-7. 形質転換イネの作製	
2-8. イネいもち病菌による感染実験	
2-9. ROS 産生量の測定	
2-10. 質量分析によるリン酸化解析実験	
3. 結果	22
3-1. Raichu-OsRac1 によるイネ細胞内での OsRac1 の活性化解析	
3-1-1. cFRET	
3-1-2. Raichu-OsRac1 の機能性の確認	
3-1-3. MAMPs 処理に伴う OsRac1 の活性化	

3-2. OsRac1 活性化因子の同定	
3-2-1. OsRacGEF1 の細胞内局在の観察	
3-2-2. OsRacGEF1 と OsRac1 の相互作用解析	
3-2-3. OsRacGEF1 の OsRac1 に対する活性化能の確認	
3-2-4. <i>OsRacGEF1</i> 発現抑制イネの表現型解析	
3-3. MAMPs 受容体による OsRacGEF1 の制御機構	
3-3-1. OsRacGEF1 と MAMPs 受容体の相互作用解析	
3-3-2. OsRacGEF1 の活性化解析	
3-3-3. OsRac1 と MAMPs 受容体との相互作用解析	
3-4. MAMPs 受容体、OsRacGEF1、OsRac1 の細胞内輸送機構	
4. 考察	..... 48
4-1. MAMPs による OsRac1 の活性化	
4-2. イネ MTI 経路における OsRacGEF1	
4-3. OsRacGEF1 の活性制御機構	
4-4. OsRac1、MAMPs 受容体、OsRacGEF1 の細胞内輸送機構	
4-5. Defensome 複合体と OsRacGEF1 の関係	
5. 謝辞	.....56
6. 参考文献	.....57

## 1. 序論

### 1-1. 植物における MTI 機構

自然環境下において、動植物は細菌、糸状菌、ウイルスなどさまざまな病原体の脅威に常にさらされている。動物では、白血球や好中球のような可動性の細胞を利用した獲得免疫系が発達し、細胞どうしのコミュニケーションを巧みに利用しながら免疫システムを維持している。一方で、植物はそのような獲得免疫系を持たない (Jones and Dangl, 2006)。そのため植物においては、自然免疫系と呼ばれる先天的に備わっている免疫応答を利用している。植物は、この自然免疫系を発達させたことで、個々の細胞が病原体認識から防御反応の誘導までの全てのメカニズムを負うことを可能にしてきた。動物においても、獲得免疫系だけではなく自然免疫系を利用した病害抵抗性を保持していることが明らかにされている。動植物で見られる自然免疫系には、共通する部分も多い。例えば、哺乳類で確認されている Toll-like 受容体である TLR5 とシロイヌナズナが持つ FLAGELLIN-SENSING2 (AtFLS2) 受容体は、共に細胞外に高度に保存された Leucine-rich repeat (LRR) ドメインを有し、細菌のフラジェリンを認識する (Gomez-Gomez et al., 2000; Hayashi et al., 2001)。また、これら受容体の下流において機能する MAP キナーゼ経路は動植物において重要な経路である。このような共通する部分を保持しながらも、多くの部分において植物と動物の抵抗性機構は異なる進化を遂げてきた。植物における自然免疫系の基本となる戦略は MAMP-triggered immunity (MTI) 機構である (Figure 1; Jones and Dangl, 2006; Boller and Felix, 2009)。これは Microbe associated molecular patterns (MAMPs) と呼ばれる病原菌の細胞表層に普遍的に存在する非特異的な分子を、植物の細胞膜上の受容体が認識することで引き起こされる抵抗性機構である。つまり、MTI 機構は非常に幅広い種の病原菌に対して有効であり、これが正常に機能することによって、自然界に存在する数万種にもおよぶ病原菌に対して抵抗性を獲得すること可能となる。

### 1-2. 植物病害抵抗性における受容体キナーゼ

MTI 機構が誘導されるためには、細胞膜上の受容体キナーゼが MAMPs を認識することが必要である。これまでにシロイヌナズナやイネにおいて報告されている MAMPs に対する受容体キナーゼは、細胞外のリガンド認識部位の違いによって主に2つのタイプに分けることができる (Figure 2)。ひとつは細胞外に LRR ドメインを持つもので、フラジェリンペプチド flg22 の受容体である FLS2 や、Elongation factor Tu の受容体である EF-Tu receptor (EFR) 、Ax21 ペプチドの受容体 Xa21 などが知られている (Gómez-Gómez and Boller, 2002; Zipfel et al., 2006; Lee et al., 2009; Segonzac and Zipfel, 2011; Schwessinger and Ronald, 2012)。もうひとつのタイプは、細胞外にリシンモチーフ (LysM) を有するもので、chitin の受容体である CHITIN ELICITOR RECEPTOR KINASE 1 (CERK1)

が知られている。(Miya et al., 2007)。マイクロアレイ解析により、シロイヌナズナに病原菌由来のフラジェリン処理を行うと、30分後にはシロイヌナズナの全23,000遺伝子のうち625個の遺伝子の発現が上昇することが明らかにされている (Zipfel et al., 2004)。興味深いことに、上昇した625遺伝子のうち155遺伝子が受容体キナーゼであった。これは *flg22* によって、その他の MAMPs に対する感受性を増加させているためと考えられる。このことから病害抵抗性における受容体キナーゼの重要性を推測することができる。また、フラジェリンが欠損したバクテリアを感染させたシロイヌナズナの遺伝子発現解析によると、フラジェリンの有無による遺伝子発現の顕著な違いは見られないという報告がある (Thilmony et al., 2006)。そのため、細胞膜上でさまざまな種類の受容体が受け取ったシグナルは、細胞内において共通の防御応答を誘導すると考えられている。

シロイヌナズナにおいて、いくつかの MAMPs 受容体は、MAMPs 刺激により異なる受容体型キナーゼと急速にヘテロマーもしくはオリゴマーを形成し、数分でまたモノマーに戻ることが報告されている。細胞内へのシグナル伝達には、このような共受容体との複合体形成が欠かせないことが明らかとなっている (Schulze et al., 2010; Chinchilla et al., 2007; Li et al., 2012)。このような事実は、MAMPs 刺激により、細胞膜上の受容体だけではなく、細胞内のシグナル伝達分子においても、ダイナミックな構造変化や、複合体形成因子の入れ替わりなどが起こっていることを推測させる。

### 1-3. 病原菌由来物質 chitin と chitin 受容体

MAMPs は、病原菌の細胞表層に共通して存在する非特異的な分子であり、病原菌において保存性の高い分子である。一方で、宿主である植物側も、これらを認識するために、進化の過程で受容体を獲得し、長い間、保持してきた。植物の感染病の8割程度は、真菌に属する糸状菌 (カビ) によって引き起こされる。糸状菌の細胞壁に多く存在する chitin は *N*-acetylglucosamine が  $\beta$ -1,4-結合によって、直鎖状に連なった多糖、つまり  $\beta$ -1,4-poly-*N*-acetyl-*D*-glucosamine である。この chitin は、古くから MAMP として同定されており、植物側の受容体も明らかとなっている。また、これまで同定されている MAMPs のなかで、chitin がもっとも病原菌において保存されており、かつ多くの植物種によって受容されることが知られている (Boller and Felix, 2009)。さらに、最近では病原菌がもつエフェクター因子が chitin 受容を阻害するために、LysM ドメインを持つタンパク質を分泌することが明となり、宿主による chitin 受容が非常に重要であることが裏付けられた (de Jonge et al. 2010; Marshall et al., 2011; Mentlak et al., 2012)。そのため、chitin によって誘導される MTI 機構を明らかにすることは、植物の自然免疫機構の解明において、もっとも重要な課題のひとつとなっている。

イネにおける chitin 受容には、LysM ドメインをもつ OsCEBiP と OsCERK1 が重要であることが明らかとなっている (Kaku et al., 2006; Shimizu et al., 2010;

Shinya et al., 2012)。OsCEBiP は、細胞内ドメインを持たない受容体型タンパク質で、これまでに生化学的解析から chitin と結合することが証明されている。一方で、OsCERK1 は、細胞外に LysM ドメインを有するにもかかわらず、chitin と結合できないことが報告されている (Kaku et al., 2006; Shimizu et al., 2010; Shinya et al., 2012)。そのため、chitin シグナル依存的にヘテロダイマー OsCEBIP/OsCERK1 を形成することが chitin 受容のための重要であると考えられている (Shimizu et al., 2011; Shinya et al., 2012)。シロイヌナズナにおける chitin 受容体は、細胞外に LysM ドメイン、細胞内にキナーゼドメインを持つ AtCERK1 が知られている (Iizasa et al., 2010; Petutschnig et al., 2010; Liu et al., 2012)。構造解析によって、AtCERK1 は chitin と結合し、chitin 依存的にホモイマーを形成することが明らかとなっており、シロイヌナズナでは CEBiP 様タンパク質は機能せずに AtCERK1 が chitin 受容の中心として機能している (Petutschnig et al., 2010; Shinya et al., 2012; Wan et al., 2012)。つまり、イネとシロイヌナズナでは、chitin 受容のシステムが異なる。

#### 1-4. MTI 機構における抵抗性反応

MTI 機構によって誘導される抵抗性反応を、反応が開始するまでの時系列をもとに 3 つに分類すると (1) 1~30 分：細胞質への  $\text{Ca}^{2+}$  の流入、同時に細胞外への  $\text{K}^{+}$  の流出することが知られている (Wendehenne et al., 2002)。また、活性酸素や一酸化窒素の産生も早期の応答として知られており、これらは、セカンドメッセンジャーとして機能していると考えられている。そのほかにも MTI 経路には、MAP キナーゼカスケードが関与していることが報告されており、イネにおける OsMAPK6 の活性化は、15 分~2 時間の間で起こることも明らかにされている (Lieberherr et al., 2005; Kishi-Kaboshi et al., 2010)。(2) 30 分~数時間：低分子の抗菌性物質であるファイトアレキシンの合成系酵素フェニルアラニンアンモニアリアーゼ (PAL) や、PR 遺伝子 (pathogenesis-related gene) であるキチナーゼや  $\beta$ -グルカナーゼなどの抵抗性に関与する多くの遺伝子の転写が開始される。(3) 数時間~数日：フラジェリン由来のペプチドを添加すると子葉や葉柄においてカロース ( $\beta$ -1.4 結合によるグルコースの重合体) の蓄積が誘導され、物理的に病原菌の侵入を抑制すると考えられている (Gomez-Gomez et al., 1999)。また近年、MAMPs 認識後、24 時間程度で細胞死が引き起こされることが報告されている。しかしながら、その詳しいメカニズムは不明である (Taguchi et al., 2003)。以上のように、MTI 機構として、MAMPs 認識直後から数日に亘ってさまざまな応答が観察される。しかしながら、MTI 機構は未だに不明な点が多い。なかでも、受容体型キナーゼの直接的な下流のシグナル伝達経路については、ほとんど明らかにされていない。これまでに、受容体キナーゼの下流において機能する因子として、セリン/スレオニン フォスファターゼである XB15 が受容体キナーゼのシグナル伝達を負に制御することや、受容体キナーゼの自己リン酸化を促す ATPase である XB24 などが報告されている。(Park et al., 2008; Park et al., 2010; Chen et al., 2010a) また、当研究室においてシャペロンタンパク質 Hsp90

や、そのコシャペロンタンパク質 Hop/Sti1 が受容体キナーゼと関与することが示されている (Chen et al., 2010b)。しかしながら、直接的なシグナル伝達因子の存在に関しての知見は、依然として得られていない (Chen and Ronald, 2011; Segonzac and Zipfel, 2011; Gust et al., 2012)。受容体キナーゼにどのような分子が直接結合し、受容体キナーゼからシグナルを受け取るのか、そしてその後、どのようにして MAP キナーゼを活性化するのは、大きな疑問となっている。

#### 1-5. MTI 機構における低分子量 G タンパク質 OsRac1 の役割

低分子量 G タンパク質は、一般的に GTP 結合型と GDP 結合型によるコンフォメーションの違いを利用して、GTP 結合型では下流へのシグナルを伝達する“ON”の状態を、GDP 結合型ではシグナル伝達を行わない“OFF”の状態をとる。このため、生体内のスイッチ分子として非常に重要な役割を果たしている。植物においては、小胞の生成に関与する Arf ファミリー、小胞の輸送を制御する Rab ファミリー、核と細胞質間の輸送に関与する Ran ファミリー、細胞骨格の制御や病害抵抗性に関与する Rac/Rop ファミリーの低分子量 G タンパク質が知られている。低分子量 G タンパク質 OsRac1 は、Rac/Rop GTPase ファミリーの属する分子量 25 kDa 程度の小さな分子である。OsRac ファミリーは OsRac1~OsRac7 までの 7 つの遺伝子の存在が確認されており、そのなかの OsRac1 がイネ病害抵抗性において非常に重要な役割を果たしていることが示されている (Figure 3; Ono et al., 2001; Lieberherr et al., 2005; Kawasaki et al., 2006; Thao et al., 2007; Nakashima et al., 2008; Chen et al., 2010a; Kim et al., 2012)。カリフラワーモザイクウイルス由来の 35S プロモーターによる恒常的活性型 OsRac1 (CA-OsRac1) の過剰発現イネは、親和性イネいもち病菌に対して強い抵抗性を示した。さらに、CA-OsRac1 過剰発現イネ培養細胞に対し、chitin やスフィンゴ脂質といった MAMPs を処理すると、野生型の培養細胞に比べて活性酸素の産生量が増加することも示されている。このことは、OsRac1 が MTI 機構に関与することを示唆する (Ono et al., 2001)。当研究室により、CA-OsRac1 をベイトとした酵母 Two-hybrid スクリーニングが行われ、OsRac1 の下流因子の探索がなされた。その結果、植物細胞壁の主要な構成生物であるリグニンの合成酵素である Cinnamoyl-CoA reductase1 (CCR1) が下流因子のひとつであることが明らかとなった (Kawasaki et al., 2006)。OsRac1 を介した抵抗性経路が NADPH オキシダーゼである OsRboh を活性化することが示された (Kawasaki et al., 1999; Wong et al., 2007)。また、同時に活性酸素のスキャベンジャータンパク質である OsMT2B の発現が抑制されることも明らかとなっている (Wong et al., 2004)。さらに、OsRac1 が OsMAPK6 と相互作用すること、OsRac1 の RNAi 植物体では OsMAPK6 タンパク質が活性化されないことが示されている (Lieberherr et al., 2005)。そのため、OsRac1 は MAP キナーゼカスケードの上流にも位置している考えられている。このように OsRac1 によって、さまざまな下流因子を制御されることで、病原菌に対する抵抗性が成立している。しかしながら、これまで OsRac1 の活性化調節を行う活性化因子の存在は明らかにさ

れていない。また、*In vivo* での MAMPs 依存的に OsRac1 の活性化が誘導されるかどうかは明らかにされていない。

#### 1-6. Rac/Rop GTPase 活性化因子

低分子量 G タンパク質の活性化因子は、Guanine nucleotide exchange factor (GEF) と呼ばれる。動物において、Rac は Rho ファミリーに属する低分子量 G タンパク質である。Rho に対する GEF は、Diffuse B-cell lymphoma-homology (DH) ドメインと Pleckstrin-homology (PH) ドメインを有する。しかしながら、植物においては DH ドメインをコードする遺伝子はほとんど存在しない。イネにおいては 2 遺伝子、シロイヌナズナにおいては 1 遺伝子、その他の植物種においてもごく少数しか存在しないことが明らかとなっている。一方で、Rac/Rop GTPase は、イネにおいては 7 遺伝子、シロイヌナズナにおいては 11 の遺伝子の存在が確認されている。そのため、植物は、動物とは異なる GEF を主に利用することで Rac/Rop の活性化制御を行っていると考えられる。シロイヌナズナにおいて、AtRop4 を用いた酵母 Two- hybrid スクリーニング解析等により、新規の GEF の探索が行われた。その結果、Rac/Rop GTPase ファミリーの GEF として、植物特異的な plant specific Rop nucleotide exchanger (PRONE) ドメインを有する GEF が同定された。この PRONE 型の Rac/RopGEF は、シロイヌナズナでは 14 遺伝子、イネでは 11 遺伝子が報告されている (Berken et al., 2006)。これまでに、これら PRONE 型の GEF は、植物の形態形成において重要な機能を担っていることが報告されている (Duan et al., 2010; Chen et al., 2011; Zhang and McCormick, 2007)。その例としては、シロイヌナズナの AtRopGEF12 が花粉管の伸長に関与することや、植物の光センサーであるフィトクロム A と AtRopGEF8 相互作用し、さらに AtRop11 を活性化することなどが挙げられる (Shin et al., 2010; Zhang et al., 2007)。以上のことから、植物において Rac/Rop GTPase ファミリーに属する GTPase は、主に PRONE 型 GEF によって、GDP と GTP の交換反応が触媒され活性化されることが考えられる。

#### 1-7. FRET プローブ Raichu-OsRac1

我々はこれまでに、OsRac1 の活性化の状態を細胞内でモニタリングするために、Raichu-OsRac1 と呼ばれる FRET バイオセンサーを開発した (Figure 4; Mochizuki et al., 2001; Itoh et al., 2002; Kawano et al., 2010)。Raichu-OsRac1 は、N 末端から Venus、CRIB モチーフ、OsRac1、そして C 末端に CFP という構造をとる。CRIB モチーフは、OsRac1 が活性化したときのみ OsRac1 と結合することが確認されている。OsRac1 が活性化されると、OsRac1 と CRIB ドメインが結合し、Venus と CFP が近接する。これにより Förster resonance energy transfer (FRET) が強く起こる。我々は、FRET が起こる割合を測定することでイネ細胞内において、OsRac1 の活性化状態をモニタリングすることに成功している。



## 1-8. 病害抵抗性因子の細胞内局在

すべての真核生物において、翻訳後修飾であるアスパラギン酸へのグリコシル化 (N-glycosylation) は、タンパク質の正しい局在のためには重要なイベントのひとつである。動物や植物の MAMPs 受容体も、細胞外ドメインがグリコシル化を受けることが報告されている。また、OsCERK1 も ER に局在することが確認されているため、ER においてグリコシル化を受け、ER 上で Hsp90 や STI1 と複合体を作り、そのままの形で小胞輸送によって細胞膜まで輸送されるということも報告されている (Sorek et al., 2009; Chen et al., 2010)。

OsRac ファミリーを含め、植物の Rac/Rop GTPase ファミリーは、C 末端にガラニルガラニル化を受ける CaaX シグナル配列を有する Type I と GC-CG Box を有しパルミトイル化を受ける Type II に分類することができる。イネでは OsRac5、OsRac6、OsRac7 が、Type I に属しており、ER においてガラニルガラニル化を受け、小胞輸送により最終的に細胞膜に局在すると考えられている。一方で、Type II に属する OsRac1,2,3,4 は、翻訳後に細胞膜上でアシル化されることによって、細胞膜に局在することが予想されている (Chen et al., 2010)。しかしながら、Type II に属する OsRac がどのようにして細胞膜上まで輸送されるかは、明らかにされていない。

以上のようなことを踏まえ、本研究では、受容体による MAMPs シグナル認識後、OsRac1 活性化までのシグナル伝達機構を明らかにすること、また、それぞれの因子が生体内のどこで出会い、どこで反応しているのかを FRET プローブなどのイメージング技術を有効に利用することで明らかにすることを目的とした。さらに、OsCERK1 を中心とする複合体形成の時空間的制御を明らかにすることで、MAMPs 認識から、実際の抵抗性応答までの一連の応答が初めて明らかにした。

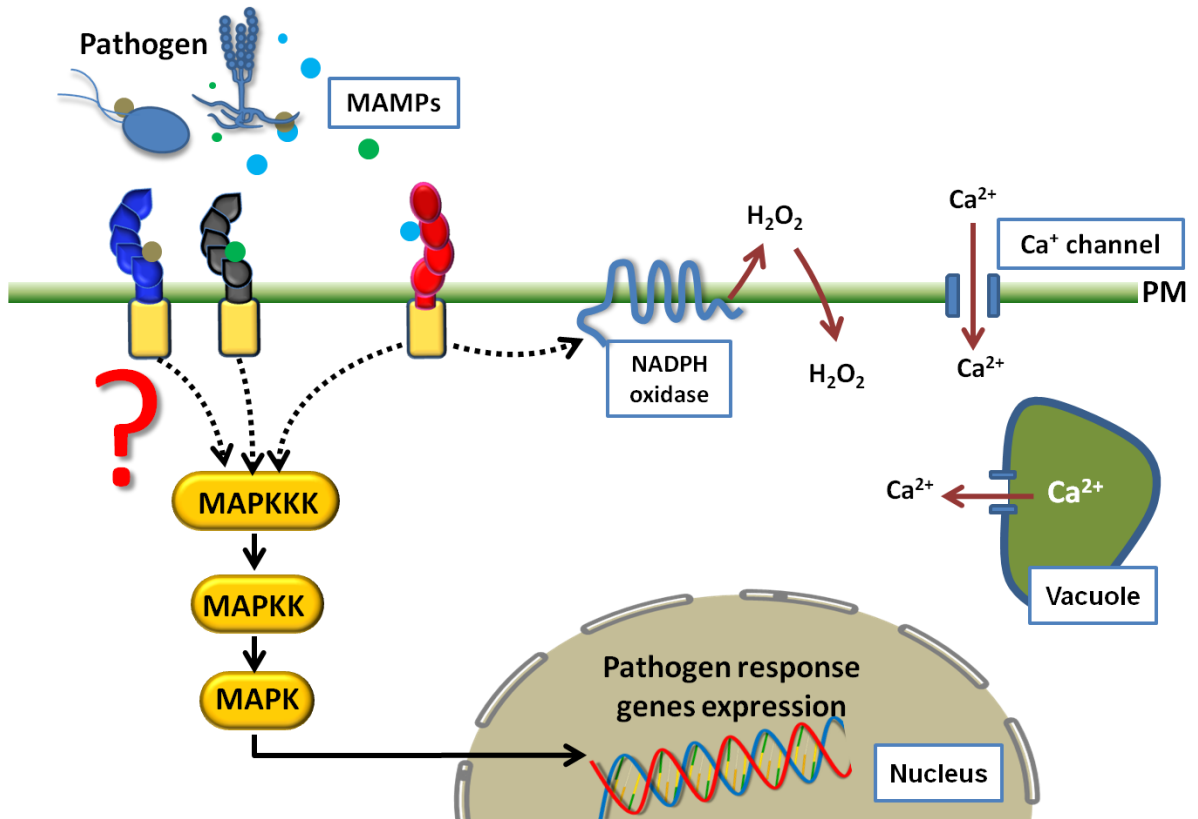


Figure 1. MTI機構モデル

細胞膜上の受容体キナーゼによって病原菌由来のMAMPsが認識される。細胞内に伝達されたシグナルは、MAPキナーゼカスケードを介しての耐病性遺伝子の発現、NADPH oxidaseによる活性酸素の産生、細胞質へCa<sup>2+</sup>が流入を誘導することなどが知られている。

→ 直接的に関与する

.....→ 直接的な関与は不明

→ 分子・イオンの動き

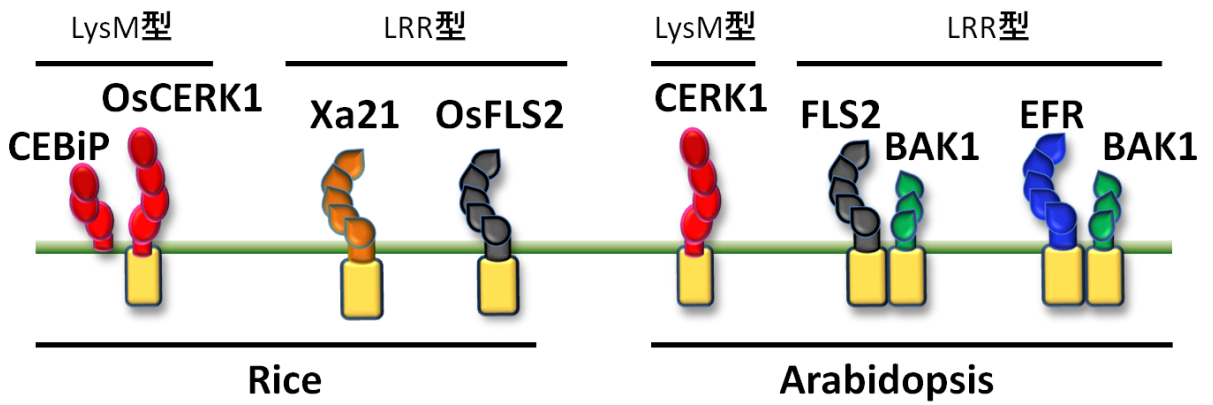


Figure 2. イネとシロイヌナズナにおけるMAMPs受容体

MAMPs受容体の多くは、細胞外のリガンド認識ドメインと細胞内のシグナルを伝達するキナーゼドメインから構成される。細胞外ドメインがLRR型のものやLysM型のものなどが知られている。

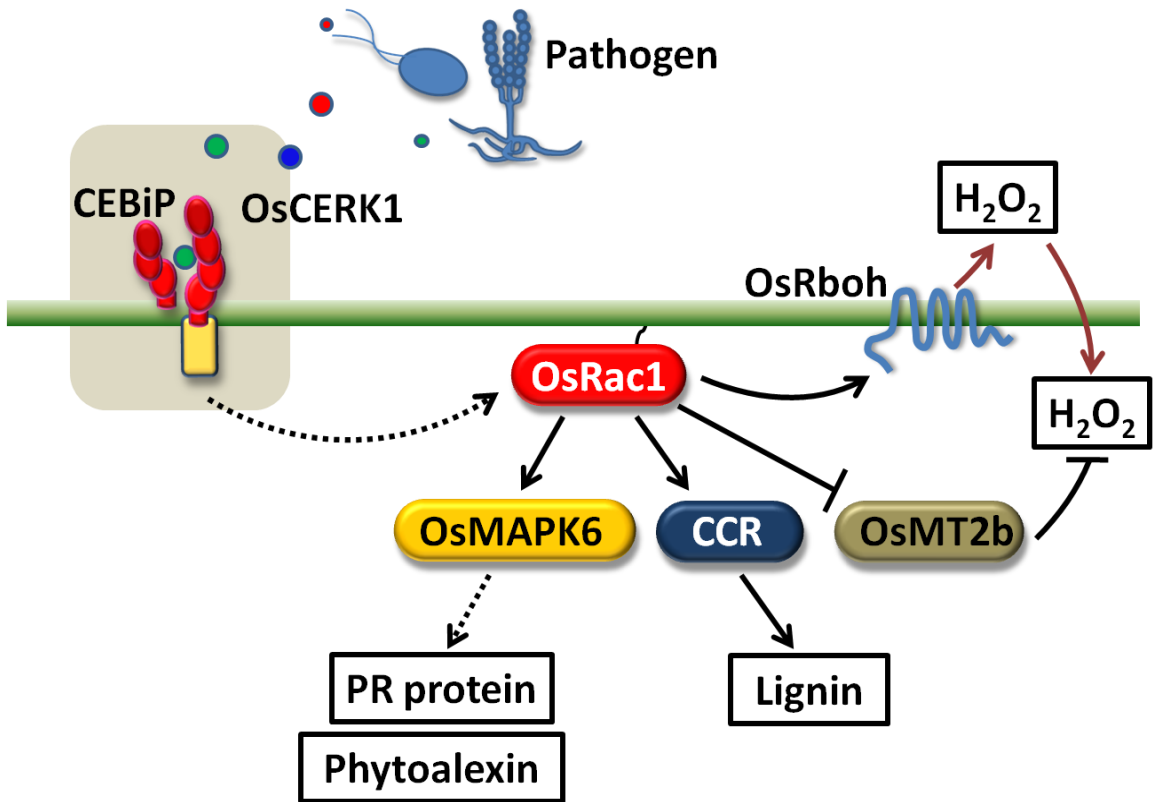


Figure 3. イネにおける低分子量Gタンパク質OsRac1を介したMTI機構

OsRac1はイネMTI経路において、分子スイッチとして機能する。細胞内での活性化状態および活性化経路については明らかにされていない。OsRac1の下流の因子として、OsMAPK6、リグニンの合成酵素CCR、OsRbohなどが同定されている。

——→ 直接的に関与する

.....→ 直接的な関与は不明

——→ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の動き

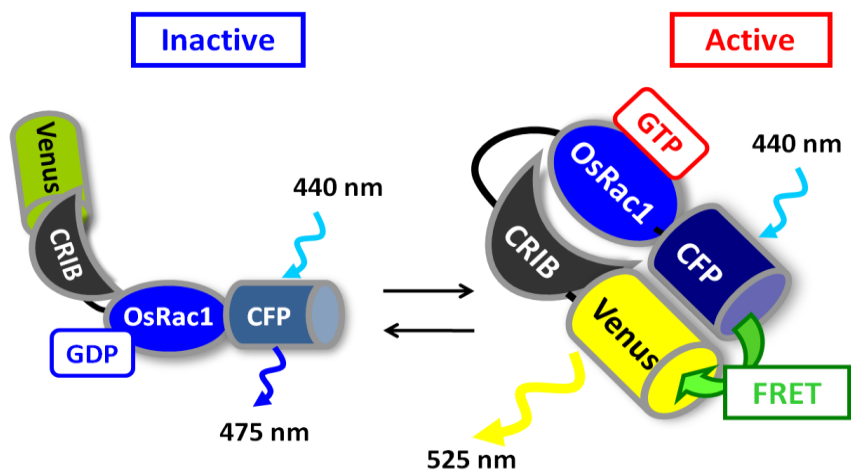


Figure 4. Raichu-OsRac1のモデル図

活性化型OsRac1（GTP結合型）のみCRIBモチーフと相互作用するため、440 nmの励起光を照射した場合に、より強くFRETが検出される。イネの細胞においてRaichu-OsRac1を発現させFRETを測定することで、OsRac1の活性化状態を可視化できる。

## 1. 材料と方法

### 2-1. 植物材料

#### 2-1-1. イネ培養細胞

##### ・Oc 細胞

イネ培養細胞である Oc 細胞 (*Oryza sativa* L. C5924) を使用した。Oc 細胞は、イネ栽培種であるインディカ由来の細胞で、細胞間の接着が弱く、細胞塊が小さい。そのため、プロトプラストの作製および遺伝子導入が容易に行うことができるという利点のほかに、クロロプラストが未成熟なため、植物特有の赤色光の自家蛍光がほぼ存在しない。そのため、蛍光タンパク質や蛍光色素を用いた解析に適している。

##### ・金南風培養細胞

いもち病菌に対する抵抗性遺伝子 *Pi-a* をもつジャポニカ由来の金南風培養細胞を、形質転換植物体を作製する際に使用した。

#### 2-1-2. イネ培養細胞の培養条件

Oc 細胞は 100 ml 三角フラスコに 20 ml の R2S 液体培を入れ、振とう培養機 (BR 3000 LF; TAITEC) を用い、30 °C、90 rpm、連続光下設定 BRIGHTHIGH の条件下で培養した。7 日間培養後のフラスコから 10 ml を捨て、R2S のみを抜き、新しい R2S を 20 ml 加えて培養するという方法で Oc 細胞を維持した (2005 島本ら)。

### 2-2. イネプロトプラストへの一過的形質転換

継代後7日間培養したOc細胞培養液からR2S液体培地を除き、新たに20 ml のR2Sを加え3日間培養後、一過的形質転換に使用した。R2S液体培地を除いたOc細胞にプロトプラスト調製用酵素溶液 {4 % (w/v) セルラーゼ オノズカ RS (ヤクルト)、1 % (w/v) マセロザイムR10 (ヤクルト)、0.1 % (w/v) MES (同人化学)、0.1 % (w/v) CaCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O (和光純薬工業)、0.4 Mマンニトール (ナカライテスク)、pH5.6} を20 ml加え遮光し、30 °C、50 rpmで3時間振蕩した。振蕩後、滅菌したナイロンメッシュ (PP-40 共進理工) でろ過し、ろ液に対してW5溶液 {154 mM NaCl (和光純薬工業)、125 mM CaCl<sub>2</sub> (和光純薬工業)、5 mM KCl (和光純薬工業)、2 mM MES (同人化学)、pH5.7} を25 ml加え、ろ過液を50 mlチューブに移し、800 rpm、3 分間遠心分離を行い (himac CT60、HITACHI)、プロトプラストの沈殿を回収した。上清を除いた後、W5溶液を50 ml加え穏やかに再懸濁し、再度800 rpm、3 分間

遠心分離を行った。上清を除いた後、W5を1-5 ml程度加え緩やかに再懸濁を行う。その後、氷上で30 分間静置した。細胞の濃度を血球計算板を用いて計測し、 $2.0 \times 10^6$ 個/mlになるようにMMg溶液 {0.4 Mマンニトール (ナカライテスク)、15 mM  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  (和光純薬工業)、4 mM MES (同人化学)、pH5.7} で調整した。1.5 mlチューブに一過的発現用プラスミド10  $\mu$ l (10  $\mu$ g)、プロトプラスト溶液100  $\mu$ lを加えた。穏やかに混合した後、PEG溶液 {40 % (v/v) PEG4000 (Fluka)、0.2 M マンニトール (ナカライテスク)、0.1 M  $CaCl_2 \cdot 6H_2O$  (和光純薬工業)} を110  $\mu$ l加え、緩やかに混合し30 分間室温で静置した。1 mlのW5溶液を加え緩やかに混合し、800 rpm、8 分間遠心分離を行い (himac CT60、HITACHI)、プロトプラストの沈殿を回収した。上清を除いた後、WI溶液 {0.5 Mマンニトール (ナカライテスク)、4 mM MES (同人化学)、20 mM KCl (和光純薬工業)、pH5.7} もしくはR2P溶液を100  $\mu$ l加え穏やかに再懸濁した。チューブを横に倒し、遮光下で30  $^{\circ}C$ 、9~24 時間静置後使用した。

## 2-3. FRET 解析

### 2-3-1. FRET 解析用 DNA コンストラクト

※ *Raichu-WT-OsRac1*、*Raichu-CA-OsRac1* および *Raichu-DN-OsRac1* コンストラクトは、松田道行博士より分与していただいた p*Raichu-187x/-188x/-191x* をもとにして、当研究室において作製された(松田友徳 修士論文 2007)。また、CA-*OsRac1* は、Gly19→Val、DN-*OsRac1* は Thr24→Asn に置換したものである。

※ 35S::*OsRacGEF1* WT および 35S::*OsRacGEF1* PRONE は、当研究室奥田および Wong 博士より分与していただいた。

### 2-3-2. レシオイメージング法

前述の PEG 法によって *Raichu-OsRac1* を一過的に形質転換したプロトプラスト混合液を 12-16 時間・30  $^{\circ}C$ において遮光し、静置したものを、スライドガラス (高撥水性印刷 白縁磨フロスト No.1 2 穴 15 mm 黒 MATSUNAMI GLASS) 上に 6  $\mu$ l 滴下した。カバーガラスをかぶせ、乾燥しないよう、四方をマニキュアで封じた。

レシオイメージングでは、IX81 (Olympus) / CSU22 (Yokogawa) / DualView (OMTical Insights) / EM-CCD カメラ (Hamamatsu) 顕微鏡システムを用い、画像解析には MetaMorph6.0 を、レーザーは 440 nm のものを使用した。DualView のフィルタセットは CFP (480 nm $\pm$ 15 nm)、Venus (535 nm $\pm$ 20 nm) を用いた。観察にあたっては以下のプロトコールに従って行った。

- 1) Metamorph を立ち上げる。
- 2) 顕微鏡本体を操作し、サンプルにピントを合わせた上で、【Multi

**Dimensional Acquisition】** の **【Main】** タブ中の **illumination** で **CFP** を選択し、蛍光が観察されるサンプルを探す。対物レンズは 60 倍の油浸レンズを使用した。

- 3) **【Multi Dimensional Acquisition】** の **illumination** を **【FRET100】** に設定し、**【Live】** でサンプルのピントをモニター上で調整する。
- 4) **【Sensitivity】** と **【Exposure】** を調節した後、**【Preview】** ボタンでサンプルの蛍光強度を確認後、**【Acquire】** でイメージング開始。本実験では、**【Sensitivity】** は 50-150、**【Exposure】** では 1000-1500 の間で値を調整した。
- 5) **【Review Multi Dimensional Data】** で画像を確認し、stack 画像を構築する。**【Split View】** ボタンで、CFP と Venus それぞれのシグナルに分け、**【Align】** で二つの画像を重ね合わせたのち**【Apply】** ボタンを押し、CFP と Venus それぞれの stack 画像を構築する。
- 6) stack 画像中で蛍光が存在しない領域を選択し、**【Background】** で background 減算後の画像を構築。
- 7) **【Ratio】** ボタンを押し、Source1 に Venus-back の分子画像、Source2 に CFP-back 分母画像を選択。Divide タブを選択し、Numerator100 または 1000 で Ratio 画像を構築。
- 8) CFP または Venus 画像上で、実際に Venus/CFP 値を確認したい部分を選択し、**【region copy】** で Ratio 画像に移す。
- 9) **【Measure/Region Measurement】** で選択した部分の Venus 及び CFP の蛍光の波長の蛍光強度 (mean value) を確認する。
- 10) **【Ratio Images】** によりレシオ画像を構築する。

本研究では、9) で検出した蛍光強度から、Venus の蛍光波長にある CFP の蛍光のクロストークを差し引く処理を行い、蛍光強度比を算出した。算出方法は後述する。本論文ではこの処理後の蛍光強度比を **Normalized emission ratio** と表記する (Sorkin et al.,2000)。

レシオイメージングでは蛍光タンパク質の退色に気を付けて行う必要がある。それぞれの蛍光タンパク質の退色を防がなければ、解析結果が毎回大きくばらつく。実際の解析では、まず高圧水銀ランプ及び CFP フィルターを用いプロトプラストに励起光を与えて顕微鏡で状態の良いサンプルを探し、その後 440 nm のレーザーを使ってイメージングを行う。この時、水銀ランプによる励起光により CFP が退色することがある。そのために顕微鏡観察時には水銀ランプの光量を調節する絞りを可能な限り閉め、顕微鏡観察も迅速に行うことを心がけた。さらに顕微鏡観察後は、レシオイメージングを行う前に 5 分から 10 分の間サンプルを静置し、蛍光を回復させた。このような工夫によって退色の影響による解析結果のばらつきを防ぐようにした。また、より純粋に OsRac1 と CRIB の結合状態を蛍光強度比に反映させるため、DN-OsRac1 を用いたネガティブコントロール及び CA-OsRac1 を用いたポジティブコントロールにおいて安定的に蛍光強度比が得られるよう、検出器の感度と照射時間を調節した。



### 2-3-3. 使用した MAMPs

イネ Oc 細胞 のプロトプラストに対して MAMPs (chitin 及びスフィンゴ脂質エリシター) 処理を行った。MAMPs の詳細は以下である。

- chitin : 糸状菌の細胞壁の構成成分である

Hepta-N-Acetyl-chitoheptaose ([GlcNAc]<sub>7</sub>) (Sigma) を R2P 溶液に溶解した。

- スフィンゴ脂質エリシター (SE) いもち病菌の細胞膜の構成成分である。梅村賢司博士より分譲していただいた Cerebroside A (CerA) を R2P 溶液に溶解した。

プロトプラスト溶液に対して、目的の最終濃度に応じて、R2P に溶解した MAMPs 溶液を加えた。必要な処理時間でスライドガラスに移し観察を行った。

### 2-3-4. MAMPs 処理に伴うリアルタイムレシオイメージング

通常のレシオイメージングに、タイムラプスシステムを用い継時的な観察を行った。MAMPs 処理時にプロトプラストが視野から流出してしまうのを防ぐために、カバーガラスを利用して薄い低融点アガロースゲル板を作製し、カバーガラス上にのせたプロトプラスト溶液の上から慎重に被せた。これにより、MAMPs 添加時のプロトプラストの流出を防ぐことができる。MAMPs は、被せたゲル板の側面から毛細管現象を利用して添加した。さらに、MAMPs 処理による Z 軸方向へのずれを補正するため、Z 軸フォーカスを行った。プロトプラスト固定後、撮影を開始し、一枚目の撮影後すぐに MAMPs 処理を行った。タイムラプス、Z 軸フォーカス、撮影の詳細な条件は以下に示す。

タイムラプス

Number of time point...21

Duration...60 min

Time interval...3 min

Z 軸フォーカス

Current position...10 µm

Increment...1

Keep shutter open between steps

Range...20

Top...13

Bottom...7

Step size...1.0 µm

撮影条件

sensitivity...100~150

exposure...150~300 msec

以上の条件で撮影を行い、一枚目の撮影終了後、速やかにエリシターを添加した。

## 2-4. 細胞内局在解析

### 2-4-1. 細胞内局在用DNAコンストラクト

#### ・ 35S::*Venus-OsRac1* WT

*OsRac1* WTのエントリークローンを35S::*Venus-GW*ベクターへLR反応によって導入した。

以上のコンストラクトは、作製後シークエンスによって配列の確認を行った。

※ 35S::*CFP-HDEL*、35S::*OsCERK1-Venus*および35S::*OsCERK1-sGFP*はChen Letian博士より分与していただいた。

### 2-4-2. イネOc細胞のプロトプラストにおける局在解析

細胞内局在解析には、波長情報の分離ができ、蛍光の検出感度が優れた共焦点レーザー顕微鏡TCS SP5 (Leica Microsystems) を用いた。Venusに対する励起光は、空冷アルゴンレーザーの出力を30%に設定し、514 nmの波長を75%減光したのを使用した。検出波長は、プリズムスリット方式により525-560 nmの波長を分光し検出した。すべての観察においてピンホールサイズは、1 AUに、画像サイズ512×512、スキャンスピードは400 Hz、Line average 2、Frame average 1で画像を取得し、Gainのみを各テストサンプルの種類ごとに最適な値に設定し、比較すべきテストサンプルについては同じ値に設定した。データ用の画像を取得する際は画像サイズ1024×1024、スキャンスピード100 HzでGainをサチュレーションしない程度まで高くして画像を取得した。

細胞内局在解析のサンプルは形質転換後16時間培養したプロトプラストを使用した。過剰発現系ということを考慮し、本来のタンパク質の細胞内局在を見極めるために極端に蛍光が強いサンプルは観察しなかった。また、細胞全体の形がいびつなもの、液胞が崩壊して極端に細胞質の割合が高いもの等、異常の見られるプロトプラストも観察対象からは除外した。

## 2-5. Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) 解析

### 2-5-1. BiFC 解析用 DAN コンストラクト

#### ・ 35S::*OsRacGEF1-Vc*

*OsRacGEF1* WTのエントリークローンを35S::*GW-Vc*ベクターへLR反応によって導入した。

※ 35S::*Vn-OsRac1* WT CA DN、35S::*OsCERK1-Vn*および35S::*OsFLS2-Vn*コンストラクトは、Chen Letian博士より分与していただいた。

※ネガティブコントロールとして使用した35S::*GUS-Vc*および35S::*GUS-Vn*コンストラクトは、当研究室の辻博士より分与していただいた。

## 2-5-2. イネ Oc 細胞のプロプラストにおける BiFC 解析

BiFC 法は、分割した蛍光タンパク質 Venus の再構成を利用してタンパク質-タンパク質の手法作用を観察する手法である。この手法の最大のメリットは、細胞において幅広いダイナミックレンジで、相互作用場所を同定できることにある。一方で、デメリットとして、蛍光タンパク質の再構成に数時間必要であることと、一度再構成した蛍光タンパク質は、再分割しないため不可逆的な反応のみしか追跡出来ないことが考えられる。観察時には、これらの問題点を考慮しながら解析する必要がある。本研究では、蛍光タンパク質 mVenus の C 末端断片 84 アミノ酸 (Vc) および N 末端 154 アミノ酸 (Vc) を使用した。励起光は、空冷アルゴンレーザーの出力を 30% に設定し、514 nm の波長を 75% 減光したのを使用した。検出波長は、プリズムスリット方式により 525-560 nm の波長を分光し、内部標準に使用した mCherry の検出は半導体 Green Diode レーザーの出力を 30 % に設定し、561 nm 波長を 90% 減光し使用した。プリズムスリット方式により 610-650 nm の波長を分光し、検出した。すべての観察においてピンホールサイズは、1 AU に、画像サイズ 512×512 、スキャンスピードは 400 Hz、Line average 2、Frame average 1 で画像を取得し、Gain のみを各テストサンプルの種類ごとに最適な値に設定し、比較すべきテストサンプルについては同じ値に設定した。取得後の画像は、Process 中の Tools タグを選択し Adjust の Background モードによって、バックグラウンドを減算した。得られた画像の蛍光強度を Quantify 中の Statistics を選択し、Mean Value によってシグナルの有無を判断した。その判断基準は Mean value 10 とし、それ以上のもをシグナル有りと、以下のものを無しと判断することとした。

定量的な解析法として、内部標準のうち BiFC シグナルが確認できる割合を明らかにした (Kanaoka et al., 2008)。

## 2-6. 共免疫沈降法

### 2-6-1. 共免疫沈降法用 DNA コンストラクト作製

・35S::*OsCERK1*-3×*FLAG* および 35S::*OsFLS2*-3×*FLAG*

35S::*GW*-3×*FLAG* ベクターを制限酵素 *Apa* I によって処理を行いリニアにし、*OsCERK1* を LR 反応によって導入した。

### 2-6-2. プロトプラストからのタンパク質抽出および共免疫沈降

イネ Oc 細胞のプロトプラストに前述した手法で、相互作用を確認したいタンパク質の DNA コンストラクトを導入した。導入後、16 時間 30°C で静置した。抽出バッファー {10 mM HEPES [pH7.5]、100 mM NaCl、1 mM EDT、10 % glycerol、0.5 % Triton X-100、Complete EDTA-free (Roche)} を加え、ボルテッ

クを 30 秒間行い細胞を破砕した (Shan et al.,2008)。13,000 rpm、15 分間遠心し、得られた上清を使用した。μ MACS GFP Tagged Protein Isolation kit (Miltenyi Biotec)を使用して共免疫沈降を行った。作業手順は付属の説明書に準じて行った。得られた試料を 8 %アクリルアミドゲルによって、SDS-PAGE 電気泳動し、タンパク質を分離した。PVDF 膜 Immobilon-P (MILLIPORE) に Trans-Blot (BIO-RAD) 装置を用いてトランスファーを行った。Venus タンパク質の検出には、GFP 抗体(Roche)、FLAG タンパク質は FLAG 抗体(SIGMA)を使用した。

## 2-7. 形質転換イネの作製

OsRacGEF1 の RNAi 用コンストラクトは、ファミリー遺伝子間で相同性が低い C 末端領域約 300 bp を用いた。まず、プライマー

OsRacGEF1 C ter F: 5'- CACCATGTCTGCCGCTGCTGACTCTG-3'
--

OsRacGEF1 Stop(+) R: 5'- TCAGTCTCTTTCAGGGGCATCTCCTG-3'
--

を用い、*OsRacGEF1* cDNA を鋳型とし PCR で増幅し、pENTR にサブクローニングを行った。そして、LR 反応により pANDA vector に導入した (Miki and Shimamoto, 2004)。その後、イネ金南風のカルスに対してアグロバクテリウムによる形質転換を行った。

## 2-8. イネいもち病菌による感染実験

形質転換イネに対する感染実験には、いもち病菌 (*Magnaporthe oryzae*) race007 稲 86-139 MAFF 101511 を用いた。これは、イネ金南風種に対して親和性である。いもち病菌は、POTATO DEXTROSE AGAR 培地 (BD) において、約 1 週間、23 °C、暗所で培養した。その後、オートミール培地 (30 g/l Oatmeal、5 g/l Sucrose、16 g/l agar) で再び約 1 週間、23 °C、暗所で培養した。菌糸が培地上を隙間なく覆ったのち、培地上に滅菌水を加え、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 3-5 日間 UV 照射を行い、孢子誘導を行った。長日条件で生育した播種後 60~90 日の植物体に、孢子誘導を行ったいもち病菌を接種した。RT-PCR により、遺伝子導入を確認した独立した 5 系統の T1 形質転換イネの第 4 葉、第 5 葉に直径約 2 mm のパンチを行った。それらのポイントに、いもち病菌の培地を 3~5 mm 四方に切り出したものを張り付け、ビニールテープで固定し、同時に保湿も行った。その後は、同様の長日条件で 6 日間生育し、病斑の写真撮影および病斑長を測定した。なお、ネガティブコントロールとして金南風の野生型にも同様の接種を行った。いもち病菌の DNA 量の測定には、病斑箇所 (パンチ箇所) を 6 個含む葉を 0.1 g になるように切断し、DNA 抽出を行った。リアルタイム PCR を用いて、いもち病菌の *MgPot2*、イネの *Ubiquitin* を定量し、*MgPot2/Ubi* を算出し比較した。

## 2-9 ROS 産生量の測定

chitin 処理に伴う ROS の産生量の測定には、発芽後 2 週間のイネの根を使用した。96 well プレートに根を 0.01~0.02 g 入れ、W5 buffer を加えた。その後、L-012 (Wako Chemicals) を最終濃度 0.5 mM、Chitin (hepta-N-aetylchitoheptaose; Sigma) を最終濃度 10  $\mu$ g/ml になるように添加した。Chemiluminescence は LAS-4000 min Luminescent image nalyzer (GE Healthcare) によって測定した。測定後、それぞれのサンプル重量で補正を行い、さらに野生型の値を 1 とし、相対値を算出した。

## 2-10 質量分析によるリン酸化解析実験

リン酸化解析のための質量分析には、イネ Oc 細胞のプロトプラスト  $5 \times 10^8$  細胞に 35S::*OsRacGEF1-Venus* を PEG 法によって導入したものをを使用した。導入後 W5 溶液に再懸濁し、30°C で 16 時間静置した。その後、chitin を 10  $\mu$ g/ml となるよう処理し、処理後 10 分で W5 を除去し、液体窒素で凍結した。以後の作業は、奈良先端科学技術大学院大学 植物グローバル 藤原正幸 助教の協力のもと Fujiwara et al., 2009 を参考に行った。凍結したプロトプラストから、タンパク質を抽出後、抗 GFP 抗体を用いて共免疫沈降を行った。得られたサンプルを LTQ-Orbitrap XL mass spectrometer (Thermo Scientific, Bremen, Germany) によって解析した。

## 1. 結果

### 3-1. Raichu-OsRac1 による細胞内での OsRac1 の活性化解析

#### 3-1-1. cFRET

これまでに OsRac1 の活性化状態の変化がリアルタイムで観察されたことはない。本研究では、MAMPs 依存的な OsRac1 の活性化状態をモニタリングするために、FRET プローブ Raichu-OsRac1 を使用した。従来の Raichu-OsRac1 を用いた FRET 検出方法では、検出された CFP の蛍光波長及び Venus の蛍光波長の蛍光強度より Venus/CFP 値を算出していたが、FRET による蛍光をより正確に検出するために、本研究では蛍光タンパク質どうしのクロストークを差し引く処理を行った (Figure 5A)。検出した蛍光強度から Venus の蛍光波長に漏れこむ CFP の蛍光のクロストークを補正するために、蛍光強度比を算出した (Figure 5B; Sorkin et al., 2000)。補正の方法は以下の通りである。CFP\* (Venus のチャンネルで検出される CFP の蛍光) は、CFP の発現量に依存する。つまりある一定以上に CFP が発現しているときには CFP と CFP\* は比例する。そのために、まず CFP を単独に発現させた細胞から、異なる蛍光強度を示す細胞を選び出した。CFP の発現量に対する Venus チャンネルに漏れてくる CFP のクロストークを測定することにより CFP\* を算出した。その結果、 $CFP^* = 0.7781 \times CFP$  という式が得られた。本論文では、 $FRET - CFP^*$  の値を cFRET (corrected FRET) とし、この処理後の蛍光強度比 (cFRET/CFP) を Normalized emission ratio と表記する。

#### 3-1-2. Raichu-OsRac1 の機能性の確認

植物細胞は、病原菌が細胞表層に共通して持つ物質である MAMPs を細胞膜上に存在する受容体キナーゼによって認識し、MTI 機構を引き起こす。当研究室の研究により、この防御応答に OsRac1 が寄与していることが明らかとなった (Ono et al., 2001; Lieberherr et al., 2005; Kawasaki et al., 2006; Thao et al., 2007; Nakashima et al., 2008; Chen et al., 2010a; Kim et al., 2012)。しかし、これまでイネの細胞において実際に OsRac1 が MAMPs シグナル依存的に活性化されるかどうかは明らかとなっていなかった。これまでの生化学的解析などからは、細胞内での低分子量 G タンパク質の活性化を時空間的に観察することは困難である。そこで本研究では、当研究室において作製した FRET バイオセンサー Raichu-OsRac1 を用いて、これを明らかにしようと試みた (Kawano et al., 2010)。まず、Raichu-OsRac1 がイネ細胞内で機能するかどうかの確認を行った。OsRac1 の恒常的活性化型変異体である CA-OsRac1 およびドミナントネガティブ変異体である DN-OsRac1 をそれぞれを含む Raichu-OsRac1 コンストラクトが作製された (Figure 6A)。これらのコンストラクトをイネ Oc 細胞のプロトプラストに PEG 法によって導入し、タンパク質を発現させた。前述の Normalized emission ratio を算出したところ、CA-OsRac1 を導入した Raichu-CA-OsRac1 発現細胞では、

DN-*OsRac1* を導入した Raichu-DN-*OsRac1* 発現細胞と比べ 1.94 倍の値を示した。また、Raichu-WT-*OsRac1* 発現細胞は、Raichu-DN-*OsRac1* 発現細胞と同程度の値を示した (Figure.6B)。このことから、Raichu-WT-*OsRac1* 発現細胞が示す FRET シグナルは、イネ Oc 細胞のプロトプラスト内において *OsRac1* の活性化状態を反映していることが示された。

### 3-1-3. MAMPs 処理に伴う *OsRac1* の活性化

糸状菌類の細胞壁の構成成分である chitin をイネ培養細胞に処理すると、 $H_2O_2$  の産生や病害応答遺伝子の発現が誘導される (Ono et al., 2001)。同様に、いもち病菌の細胞膜由来のスフィンゴ脂質エリシターである Cerebroside A (CerA) も MTI を誘導する MAMP として報告されている (Umemoura et al., 2000; Suharsono et al., 2002)。そこで、Raichu-WT-*OsRac1* を発現させたイネ Oc 細胞のプロトプラストに、chitin 及び CerA をそれぞれ処理した。chitin を処理した場合、処理後すぐに Venus/CFP の蛍光強度比の上昇が確認された。30 分程度まで急激な上昇を続け、その後、測定を行った 60 分まで緩やかな上昇が見られた (Figure 7A and 7B)。また、CerA を添加した場合も、活性化のタイミングは少し緩やかであったものの、同様の傾向の結果が得られた (Figure.7A and 7B)。このことから MAMPs によって、*OsRac1* の活性化の誘導が数分以内に起こることが示された。

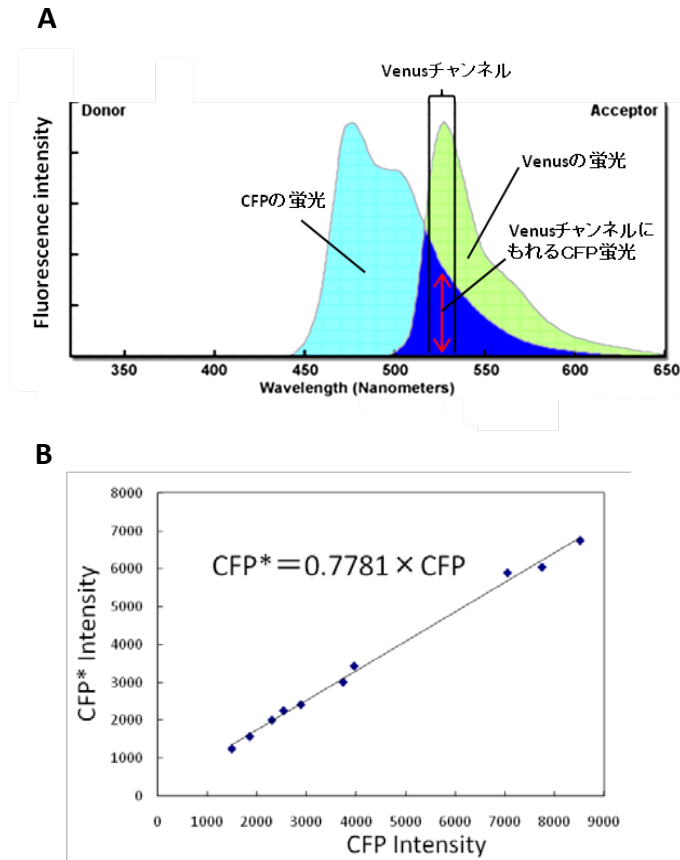


Figure 5. FRET値の補正

(A) CFPおよびVenusの蛍光波長と、Venus検出チャンネルの波長を示した。通常、Venus検出チャンネルには、CFPの蛍光が漏れこむ（

<http://www.microscopyu.com/tutorials/java/fluorescence/fpfret/>）。

(B) IX81 (Olympus) / CSU22 (Yokogawa) / DualView (OMTical Insights) / EM-CCD カメラ

(Hamamatsu) 顕微鏡システムにおいて、CFP蛍光タンパク質のCFPチャンネルに検出される蛍光強度とVenusチャンネルによって検出される蛍光強度を測定しプロットした。



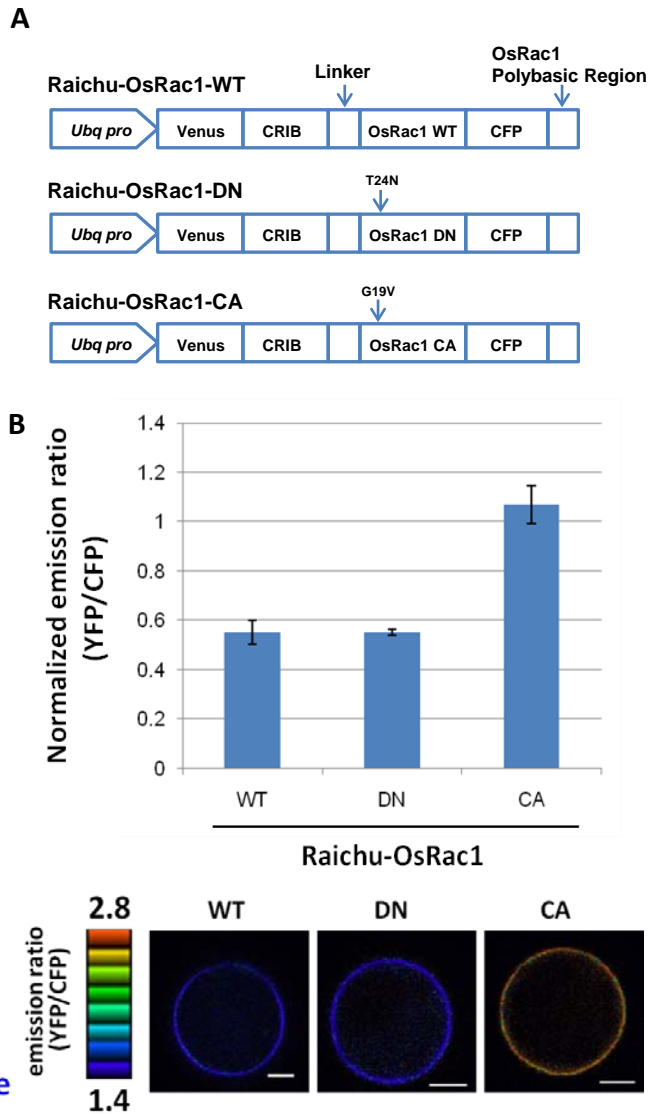


Figure 6. Raichu-OsRac1はイネ細胞内でOsRac1の活性化を反映する

(A) Raichu-OsRac1 WT, DN, CA型の配列模式図を示す。

(B) イネO<sub>c</sub>細胞のプロトプラストにRaichu-OsRac1-WT、Raichu-OsRac1-DN、Raichu-OsRac1-CAを発現させNormalized emission ratioを算出した。下図は、Emission ratioの大きさを疑似カラーにより表した。y誤差範囲は、標準誤差を示す。

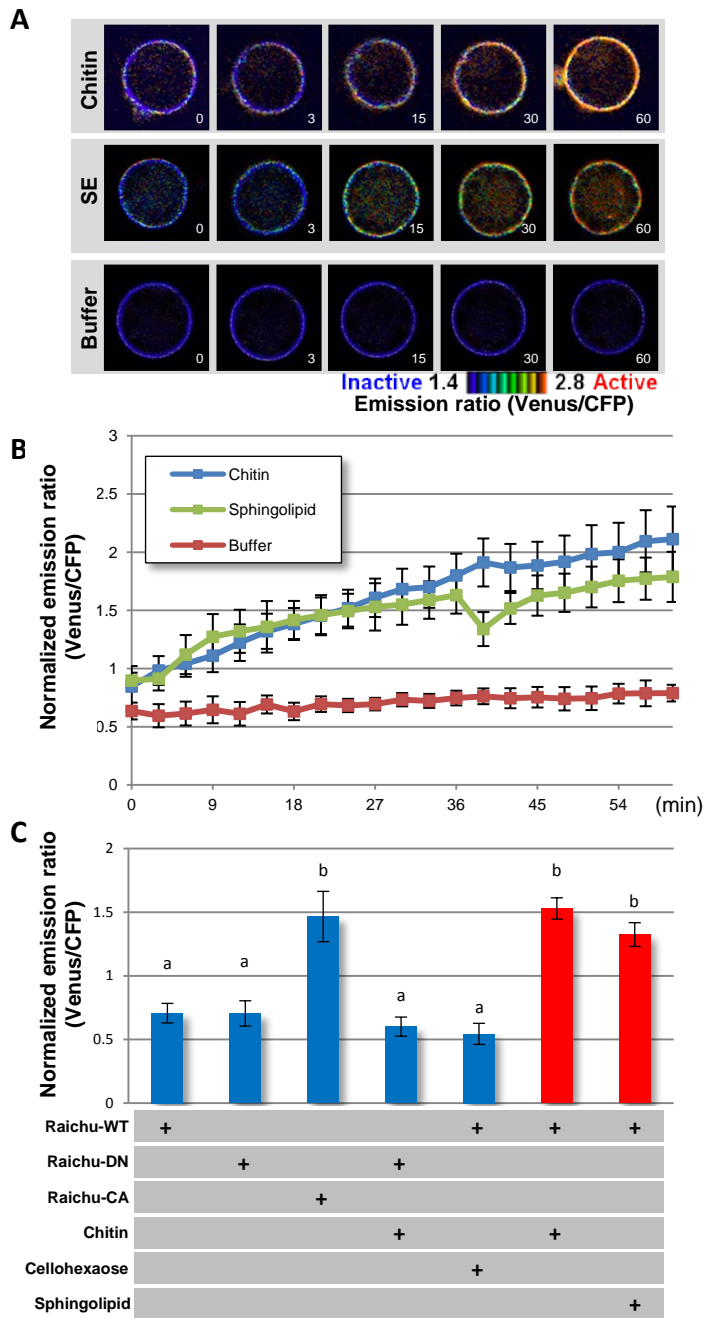


Figure 7. Raichu-OsRac1を用いたOsRac1の活性化解析

(A) Raichu-OsRac1によるOsRac1の活性化解析を示す。イネOc細胞のプロトプラストに*Ubi::Raichu-OsRac1 WT*を発現させた。Chitin、Spingoolipid (CerA)、Bufferをそれぞれ処理した。処理後3分ごとに60分までEmission ratio (Venus/CFP)を算出した。図は、それらを疑似カラーによって示した。

(B) MAMPs処理後60分までのNormalized emission ratioをグラフに示す。

(C) MAMPs処理後30分～1時間において、計測したNormalized emission ratioの平均値をグラフに示す。Cellohexaoseは、chitinのネガティブコントロールとして使用した。y誤差範囲は、標準誤差を示す。アルファベットはそれぞれの有意差により分類した。(n > 20、P < 0.05)

## 3-2. OsRac1 活性化因子 OsRacGEF1

### 3-2-1. OsRacGEF1 の細胞内局在の観察

動植物において、低分子量 G タンパク質の活性化因子 GEF が多く同定されている。近年、植物の Rac/RopGEF として PRONE ドメインを有する PRONE 型 GEF が同定された (Berken et al., 2006)。PRONE 型 GEF は、シロイヌナズナにおいては 14 個、イネにおいては 11 個のファミリー遺伝子が報告されている (Figure 8A; Gu et al., 2006)。当研究室において、OsRac1 の活性化因子を探索のために、OsRac1 をベイトとして酵母 Two-Hybrid スクリーニングが行われた (Cool et al., 1999; Akmatsu et al., In press)。その結果、14 個の遺伝子が相互作用候補として得られ、PRONE 型 GEF ファミリーで、唯一 OsRacGEF1 が相互作用因子として同定された。この OsRacGEF1 は、高度に保存された C1、C2、C3 サブドメインを含む PRONE ドメインと N 末端、および C 末端領域から成る (Figure 8B)。本研究では、OsRacGEF1 がイネ MTI 機構において OsRac1 の活性化因子として機能するかどうかを検証することとした。まず、OsRacGEF1 が細胞内のどの場所で機能しているかを明らかにするために、*35S::OsRacGEF1-Venus* コンストラクトを作製した。OsRacGEF1-Venus が機能的なタンパク質であるかどうかを確認するために、イネ Oc 細胞のプロトプラストに PEG 法によって、*35S::OsRacGEF1-Venus*、*35S::OsRacGEF1*、Empty vector をそれぞれイネ Oc 細胞のプロトプラストに PEG 法によって導入し、抵抗性関連遺伝子である *PAL1* の発現量をリアルタイム PCR によって定量した (Figure 9A)。その結果、OsRacGEF1-Venus は OsRacGEF1 と同様の機能を有していることが示唆された。そこで、OsRacGEF1-Venus を発現させた細胞を共焦点レーザー顕微鏡によって観察したところ、OsRacGEF1-Venus は、細胞膜近傍、細胞質、また核周辺において強く局在するようなシグナルが観察された (Figure 9B)。ER 局在タンパク質のマーカーである CFP-HDEL を OsRacGEF1-Venus と同時に発現させ、シグナルを比較したところ、CFP-HDEL のシグナルの大部分は、OsRacGEF1 のシグナルの一部と一致したため、OsRacGEF1-Venus が ER に局在することが示された。さらに、細胞膜マーカーである SYP132-mCherry と同時に発現させ、シグナルを比較したところ、この場合も OsRacGEF1-Venus のシグナルとほぼ一致したため、OsRacGEF1-Venus は細胞膜近傍にも存在すると考えられた。そのため、OsRacGEF1 は、主には細胞質に局在し、ER 上や細胞膜に沿っても存在するタンパク質であることが明らかとなった。CFP-OsRac1 および OsRacGEF1-Venus を共発現させた時、これら 2 つの因子は、細胞膜上ではっきりとした共局在を示した (Figure 9B)。

### 3-2-2. OsRacGEF1 と OsRac1 の相互作用

当研究室における酵母 Two-hybrid、GST-pull down 法によって、OsRacGEF1 の PRONE ドメインが OsRac1 と直接的に相互作用することが示されている (Akamatsu et al., 2013)。この結果は、シロイヌナズナの AtRop4 が、AtRopGEF8 の PRONE ドメインに結合することと類似している (Thomas et al., 2007)。しかしながら、これらがイネ細胞内で相互作用するかどうかということ、また、細胞内のどの場所で相互作用するのかということは不明なままであった。前述したように OsRacGEF1 は、イネ Oc 細胞のプロトプラストの細胞膜近傍、細胞質、ER 上に局在する。一方で、OsRac1 の多くは細胞膜上に局在することが明らかとなっている。これは、OsRac1 が C 末端に存在する Polybasic 領域に GC-CG BOX という配列を有しており、これがパルミトイル化のシグナル配列となっているためであると考えられている。(Ono et al., 2001) これらのことを踏まえ、これら二つのタンパク質が細胞内のどこで相互作用しているのかを確認するために Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) 法を用いて解析を行った (Figure 9C)。Vn-WT-OsRac1 および OsRacGEF1-Vc をイネ Oc 細胞のプロトプラストに発現させたところ、86.6 % の細胞で BiFC シグナルが確認され、それらは主に細胞膜上であった。一方で、ネガティブコントロールである GUS-Vc と Vn-WT-OsRac1 を発現させた細胞では、19.0 % の細胞でしか BiFC シグナルが確認されなかったため、OsRac1 は OsRacGEF1 と細胞膜上で相互作用していることが示唆された。さらに、OsRacGEF1 と OsRac1 の相互作用が OsRac1 の活性化状態によって変化するのかどうかを確認するために、Vn-OsRac1 DN および Vn-OsRac1 CA を OsRacGEF1-Vc と共発現させた。その結果、いずれの場合においても、ネガティブコントロールと比較して高い割合でシグナルが確認され、その割合は Vn-OsRac1 WT を発現させた時と同程度であった (Figure 9C)。また、シグナルが観察された場所も、いずれの場合においても主に細胞膜で観察されたことから、OsRacGEF1 は定常状態においても、活性化状態においても OsRac1 と細胞膜上で相互作用していることが明らかとなった。

### 3-2-3. OsRacGEF1 の OsRac1 に対する活性化能の確認

本研究では、イネ細内で OsRac1 が活性化されるかどうかを明らかにするために、Raichu-OsRac1 WT を利用して明らかにしようとした。Ubi::Raichu-OsRac1 WT と 35S::RacGEF1 WT をイネ Oc 細胞のプロトプラストで共発現させ Normalized emission ratio 値を測定した (Figure 9D)。その結果、わずかながら有意に上昇した。これまでに PRONE 型の GEF は、高度に保存された PRONE ドメインにより、基質である Rac/Rop GTPase を活性化することが報告されている。そこで、OsRacGEF1 PRONE と Raichu-WT-OsRac1 を共発現させ、Normalized emission ratio 値を測定したところ、OsRacGEF1 WT と比較して大きく上昇することが明らかとなった (Figure 9D)。さらに精製タンパク質を用いた *In vitro* GEF 解析からも、OsRacGEF1 の PRONE ドメインが OsRac1 を活性化することが示された (Akamatsu et al., 2013)。

#### 3-2-4. *OsRacGEF1* 発現抑制イネの表現型解析

これまでの結果から、*OsRacGEF1* が *OsRac1* を活性化する因子であることが示唆された。しかしながら、*OsRacGEF1* がイネ MTI 経路において、*OsRac1* を活性化するのかどうかは、不明のままである。そこで、*OsRacGEF1* が病害抵抗性に関与する GEF であるかどうかを明らかにするために、*OsRacGEF1* 特異的な配列を用いた RNAi により、発現抑制イネを作出した (Figure 10A)。作出した植物体において、実際に *OsRacGEF1* の発現が抑制されているかを確認するために、播種後 20 日のイネの葉身から RNA を抽出し、*OsRacGEF1* の RNA の発現量をリアルタイム PCR によって確認した (Figure 10B)。その結果、*OsRacGEF1* の発現量が有意に抑制されていることが示された。また、これらは *OsRacGEF1* 特異的に抑制されていることも確認された (Figure 10C)。今回得られた、形質転換体は培養細胞の状態で維持することが困難であった。そこで、*OsRacGEF1* の RNAi 植物体の幼苗から、根をとり出し chitin を処理し、MTI 経路のマーカー遺伝子である *PAL1*、*PBZ1*、*Chitinase1*、*Chitinase3* の発現量を定量した (Figure 11A-D)。コントロールの野生型の金南風においていずれの遺伝子の発現も、*OsRacGEF1* 発現抑制体においては抑制されることが示された。さらに、ROS の産生量も減少することが示された (Figure 11E)。また、これら RNAi 植物体に親和性菌であるいもち病菌 (*Magnaporthe oryzae* strain 2403-1, race 007) を感染させると (Figure 11F-H)、野生型に比べて病斑が拡大することが示された (Figure 11G)。感染葉での、いもち病菌の増殖量を定量的に比較するために、感染部を含むイネの葉身からゲノム DNA の抽出を行い、それらをもとにリアルタイム PCR を利用していもち病菌の DNA 量を測定した。その結果、野生型と比較して RNAi 植物体では、いもち病菌の DNA 量が増加していることが示された (Figure 11H)。これらの結果から、*OsRacGEF1* は、chitin によって誘導される抵抗性経路において機能しており、いもち病菌の感染に対しても重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

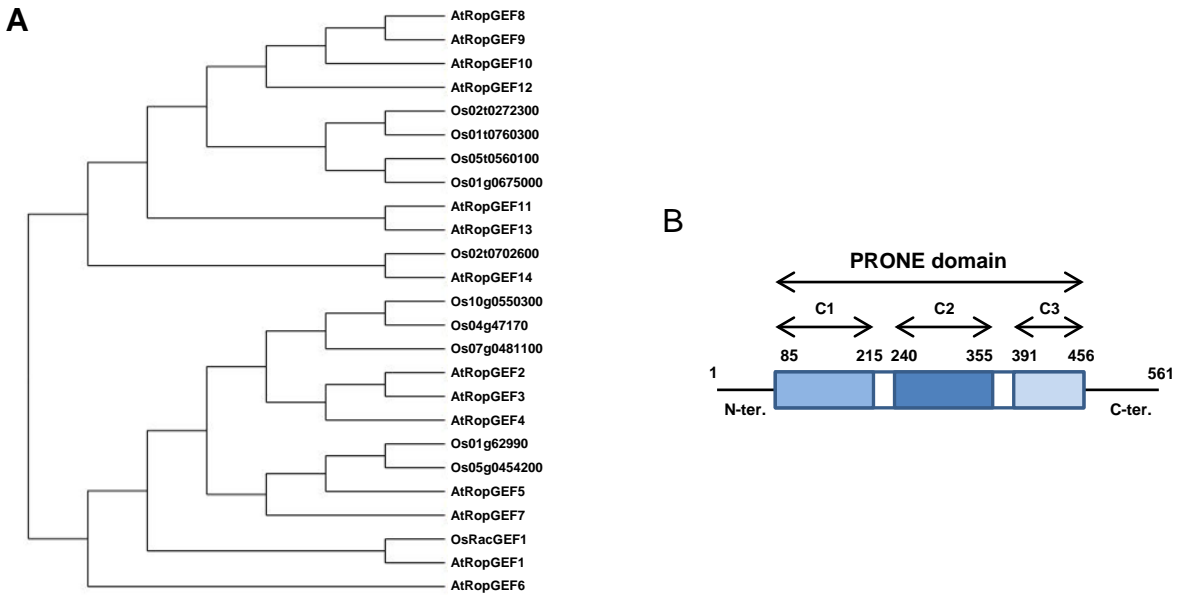


Figure 8. 植物特異的なPRONE型GEF

(A) イネおよびシロイヌナズナのゲノム中に存在するPRONE型GEFの系統樹を示す。

(B) OsRacGEF1の構造を模式的に示す。OsRacGEFファミリーは、高度に保存されたサブドメイン (C1-C3) を含むPRONEドメインを持つ。N-ter. は、N末端領域、C-ter.は、C末端領域を表す。

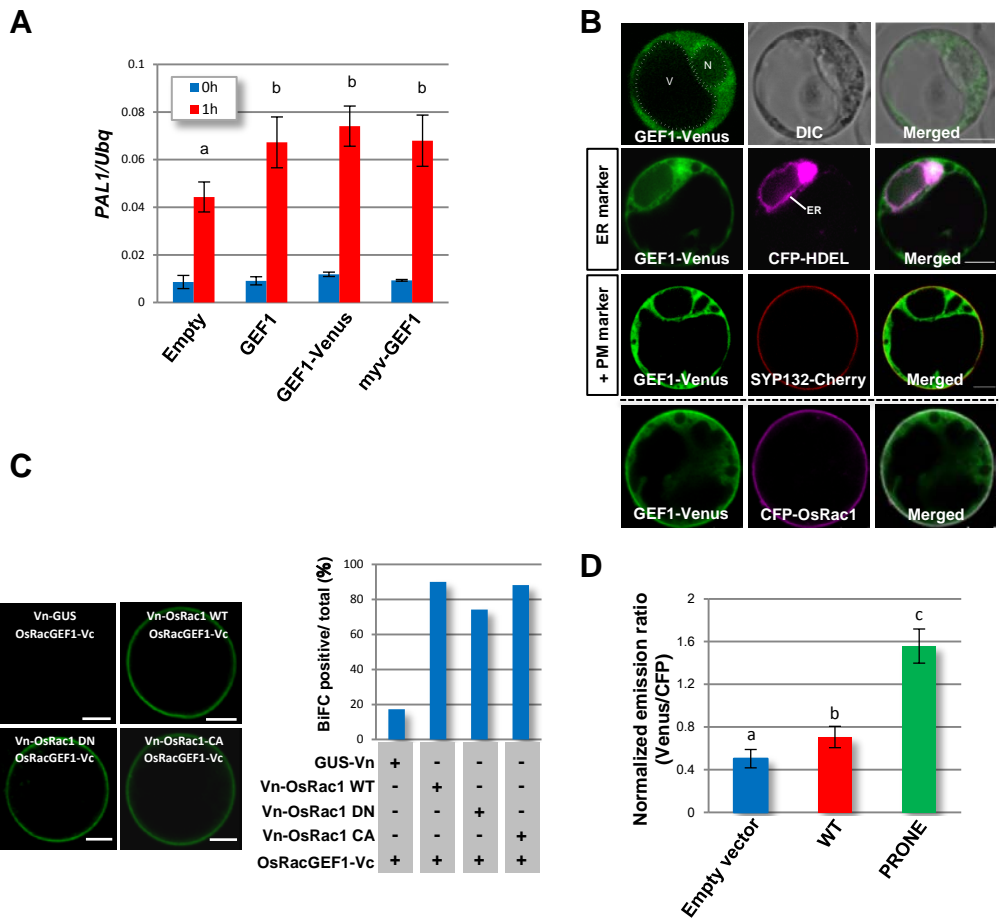


Figure 9. OsRac1に対するGEF1の同定

(A) 融合タンパク質による影響の解析。OsRacGEF1、OsRacGEF1-Venus、myc-OsRacGEF1をそれぞれ発現させたイネプロトプラストからRNAを抽出し、*PAL1*の発現量を定量的PCRによって測定した。y誤差範囲は、標準誤差を示す (n > 30、P : \*\* < 0.01 \* < 0.05)

(B) OsRacGEF1の局在解析を示す。35S::*OsRacGEF1-Venus*をイネOc細胞のプロトプラストに導入した。35S::*CFP-HDEL*はER、35S::*SYP132-cherry*は細胞膜の標識として使用した。下段は、35S::*OsRacGEF1-Venus*および35S::*CFP-OsRac1*を共発現させた細胞を示す。スケールバーは5 μmを示す。

(C) BiFC法によるOsRacGEF1およびOsRac1の相互作用解析。イネOc細胞のプロトプラストに、35S::*Vc-OsRacGEF1*および35S::*Vn-OsRac1* WT, DN, CA、ネガティブコントロールとして35S::*GUS-Vc*を導入し発現させた。内部標準として*Ubi::mCherry*を共発現させた。グラフは、内部標準が観察できる細胞でのBiFCシグナルの有無の比を表した。スケールバーは、5 μmを示す。n > 60

(D) Raichu-OsRac1によるOsRac1の活性化解析を示す。イネOc細胞のプロトプラストにおいて*Raichu-OsRac1-WT*および*OsRacGEF1* WTもしくはPRONEをそれぞれ導入し発現させNormalized emission ratioを算出した。y誤差範囲は、標準誤差を示す (n > 30、P < 0.05)。アルファベットは、有意差の有無による分類

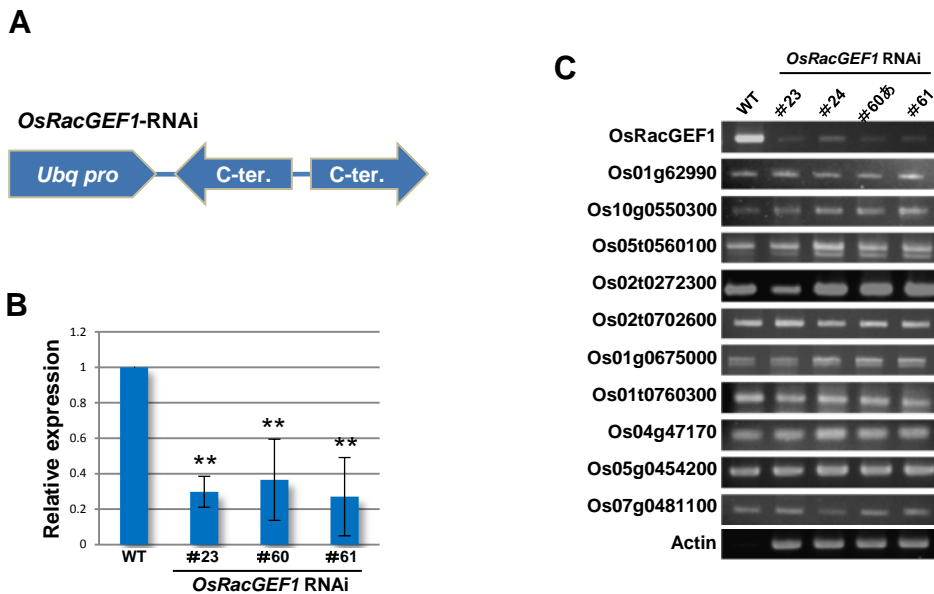


Figure10. OsRacGEF1 RNAi植物体の作製

(A) RNAiコンストラクトの模式図を示す。pANDAベクターにOsRacGEF1のC末端領域を挿入した。

(B) OsRacGEF1 RNAi植物体におけるOsRacGEF1の発現解析。定量的PCRによって、独立した3つの系統における遺伝子発現量を測定した。

(C) OsRacGEF1 RNAi植物体におけるOsRacGEFファミリーの発現解析。OsRacGEF1 RNAi植物体の葉から抽出したRNAをもとにRT-PCRを行い、OsRacGEFファミリーの発現を確認した。



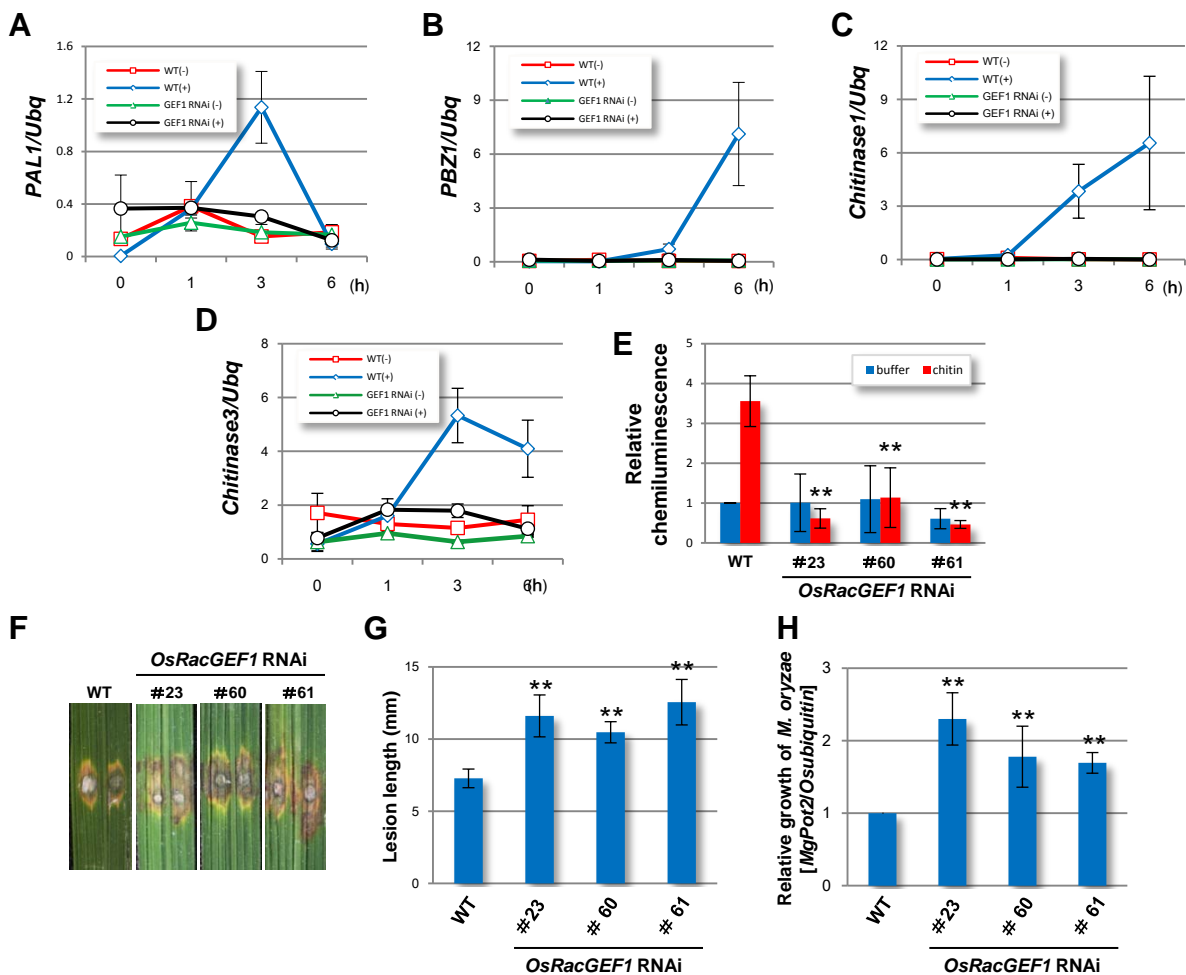


Figure 11. *OsRacGEF1* RNAi植物体を用いた抵抗性の解析

(A-D) *OsRacGEF1* RNAiおよび野生型植物体の根における抵抗性遺伝子である*PAL1* (A), *PBZ1* (B), *Chitinase1* (C)および*Chitinase3* (D)の遺伝子発現を定量的PCRによって測定した。(–)はMock処理を、(+)はchitin処理を示す。y誤差範囲は、標準誤差を示す (n=3)

(E) *OsRacGEF1* RNAiおよび野生型植物体の根におけるROS産生量解析。Chitin処理によって誘導されるROSの産生量をluminescence image analyzerを用いて解析を行い、WT=1とし相対値を示した。y誤差範囲は、標準誤差を示す (n = 3、P : \*\*<0.01)

(F-H) *OsRacGEF1* RNAi植物体に対する親和性もち病菌 race 007の感染解析。(F) *OsRacGEF1* RNAiおよび野生型植物体の典型的な病斑を示す。(G) 感染6日目の病斑長を示す。y誤差範囲は、標準誤差を示す (n > 60、P : \*\*<0.01) (H) 感染6日目の親和性もち病菌 race 007のDNA量の定量解析。y誤差範囲は、標準誤差を示す (n > 6、P : \*\*<0.01)

### 3-3. MAMPs 受容体による OsRacGEF1 の制御機構

前述の結果より、OsRacGEF1 の全長を使用した場合よりも PRONE ドメインのみを使用した場合の方が OsRac1 を強く活性化することが明らかとなった (Figure 9D)。そのため、OsRacGEF1 の機能制御機構では、OsRacGEF1 自身の C 末端領域もしくは N 末端領域によって PRONE ドメインの活性が制御されていることが予想された。そこで、OsRacGEF1 の活性化がどのように制御されているのかを検証することとした。Raichu-OsRac1 を用いた解析において、OsRac1 は MAMPs シグナル受容後、即座に活性化された。そのため、OsRac1 の活性化因子である OsRacGEF1 は、MTI 経路の初期に機能することが推測された。また、シロイヌナズナの AtCERK1 は、細胞内の細胞膜近傍ドメインが自己リン酸化することや、Myelin basic protein (MBP) をリン酸化することが示されている (Miya et al., 2007)。そのため、イネにおけるホモログである OsCERK1 のキナーゼドメインも、基質をリン酸化し得ることが推測される。以上のことなどから、OsRacGEF1 の活性化が受容体キナーゼによるリン酸化によって制御されているという作業仮説を立て検証を行った。

#### 3-3-1. OsRacGEF1 と MAMPs 受容体の相互作用解析

OsRacGEF1 と受容体型キナーゼ OsCERK1、OsFLS2、XA21 との相互作用を共免疫沈降法によって検証した (Takai et al., 2008; Figure 12A-B and 13A)。OsRacGEF1-Venus と OsCERK1-FLAG もしくは OsFLS2-FLAG を発現させたイネ Oc 細胞のプロトプラストからタンパク質を抽出し、GFP 抗体によって共免疫沈降解析を行い、FLAG 抗体によってウエスタンブロット解析を行った。その結果、OsRacGEF1 が OsCERK1 および OsFLS2 とそれぞれ相互作用することが示された (Figure 12A)。しかしながら、XA21 とは相互作用しないことが示された (Figure 13A)。これらの相互作用が MAMPs シグナル依存的に変化するかどうかを確認するために、chitin を処理したプロトプラストを用いて共免疫沈降を行ったところ、いずれの場合においても、相互作用の強さに変化は見られなかった (Figure 13B)。そのため、これらの解析からは OsRacGEF1 と OsRac1 の相互作用は、MAMPs シグナル依存的に変化するものではないことが示唆された。OsRacGEF1 と OsCERK1 および OsFLS2 の相互作用が細胞のどの場所で起こるのかを明らかにするために、BiFC 解析を行った。その結果、これらが細胞膜および ER においてシグナルが検出された (Figure 12C)。同様の結果が、OsFLS2 についても得られた (Figure 12D)。以上の結果から、OsCERK1 および OsFLS2 は OsRacGEF1 と *in vivo*、*in vitro* どちらにおいても相互作用することが明らかとなった。

#### 3-3-2. OsRacGEF1 のリン酸化解析

シロイヌナズナの AtRopGEF1 は C 末端領域を欠損すると恒常的な活性化を

示すことが知られている。また、花粉管の伸長に関与する AtRopGEF12 の活性も C 末端領域に制御されており、その制御にはリン酸化が関与することが示唆されている (Zhang and McCormick 2007)。さらに、本研究室において OsRacGEF1 の PRONE ドメインが自身の C 末端領域と結合するが、N 末端領域とは結合しないことが示された (Akamatsu et al., 2013)。そのため、OsRacGEF1 の C 末端領域のリン酸化が活性の制御に重要であることが推測された。SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) によるドメイン検索の結果、OsCERK1 が有するキナーゼドメインは、セリン/スレオニン キナーゼタイプであることが明らかとなった。そのため、OsRacGEF1 の C 末端領域のセリンおよびスレオニン残基のうち、保存されたふたつのセリン残基をアスパラギン酸に置換することでリン酸化を模倣する変異体を作成し、Raichu-OsRac1 を利用した解析を行った (Figure 14A)。その結果、OsRacGEF1 S549D で、OsRacGEF1 PRONE と同程度に OsRac1 を活性化することが明らかとなった。一方で、OsRacGEF1 S480D は OsRac1 を活性化することはなかった。以上のことから、OsRacGEF1 の活性化は、C 末端のリン酸化によって制御されている可能性が高く、OsRacGEF1 の 549 番目のセリン残基が活性化制御に関与することが予想された。

549 番目のセリンのリン酸化がイネの免疫応答にも影響を与えるかどうかを検証するために、OsRacGEF1 S549A 過剰発現変異体を作製した (Figure 15A)。OsRacGEF1 の発現量は、独立した #19 および #21 系統では有意に上昇していた (Figure 15B)。#8 系統では発現に変化がなかったため、ネガティブコントロールとして使用した。これら形質転換体の培養細胞に chitin を処理し、免疫応答遺伝子の発現を定量したところ、#19 および #21 系統において *PAL1*、*PBZ1*、*Chitinase1*、*Chitinase3* の発現量が野生型と比較して有意に減少することが示された (Figure 16A-D)。しかしながら、#8 系統では野生型と有意な差が見られなかった。さらに、OsRacGEF1 S549A 過剰発現植物体に親和性のいもち病菌を感染させると、#19 および #21 系統では、野生型と比較して、より履病性を示した (Figure 16E-G)。#8 系統では、野生型と有意な差は見られなかった。以上のことから、OsRacGEF1 の 549 番目のセリンが chitin によって誘導される抵抗性に重要であること、いもち病菌に対する抵抗性に重要であることが示された。

OsRacGEF1 の 549 番目のセリンのリン酸化が実際にイネ細胞内で chitin によって誘導されるかどうかを明らかにするために、質量分析を行った (Figure 17A-D)。イネ Oc 細胞に *35S::OsRacGEF1-Venus* を発現させ、chitin を 10 分間処理したものと無処理のものを準備した。それぞれ、タンパク質を抽出後、GFP 抗体によって Co-IP を行い、タンパク質を濃縮した。それらを用いて LC-MS/MS を行ったところ、chitin 処理依存的に OsRacGEF1 の 549 番目のセリン残基がリン酸化されていることが示された。さらに、*in vitro* リン酸化解析から、OsCERK1 の細胞内ドメインが OsRacGEF1 の 549 番目のセリンをリン酸化することが示された (Akamatsu et al., 2013)。以上のことから、OsRacGEF1 の C 末端 549 番目のセリン残基は、chitin シグナル依存的に OsCERK1 の細胞内ドメインによってリン酸化されることが明らかとなった。

それによって、OsRac1 は活性化される。

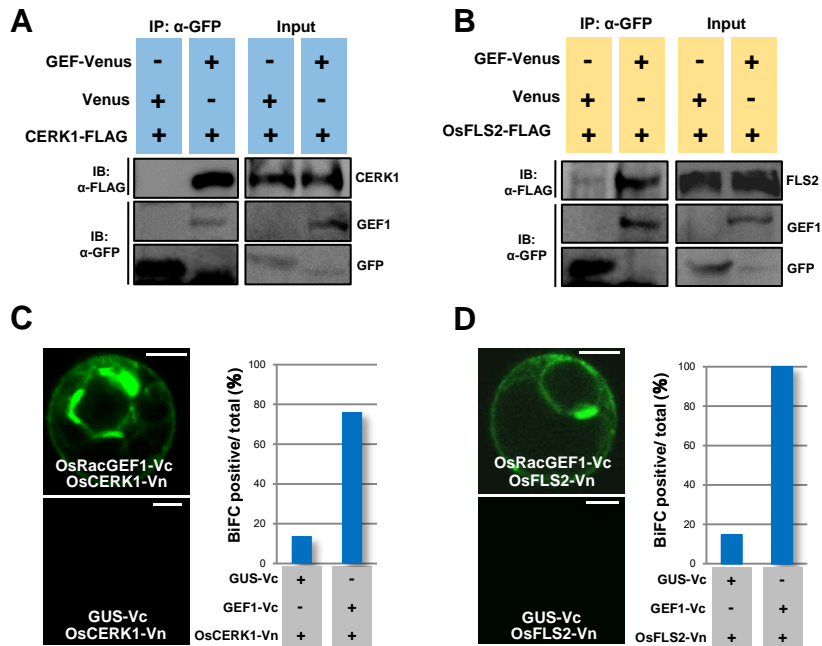


Figure12. OsRacGEF1と受容体型キナーゼの相互作用解析

(A-B) Co-IPによる相互作用解析。イネOc細胞のプロプラストに35S:: *Venus-OsRac1*と*Ubi:: OsCERK1-FLAG*もしくは*Ubi:: OsFLS2-FLAG*を発現させ、タンパク質を抽出後anti-GFP抗体によってCo-IPを行った。その後、anti-GFP抗体を用いてウエスタンブロットを行った。

(C-D) BiFCによる相互作用解析。イネOc細胞のプロプラストに35S:: *OsRacGEF1-Vc*と35S:: *OsCERK1-Vn*もしくは35S:: *OsFLS2-Vn*を発現させた。ネガティブコントロールとして35S::*GUS-Vc*を導入し発現させた。内部標準として*Ubi::mCherry*を共発現させた。グラフは、内部標準が観察できる細胞でのBiFCシグナルの有無の比を表した。スケールバーは、5 μmを示す。n>60

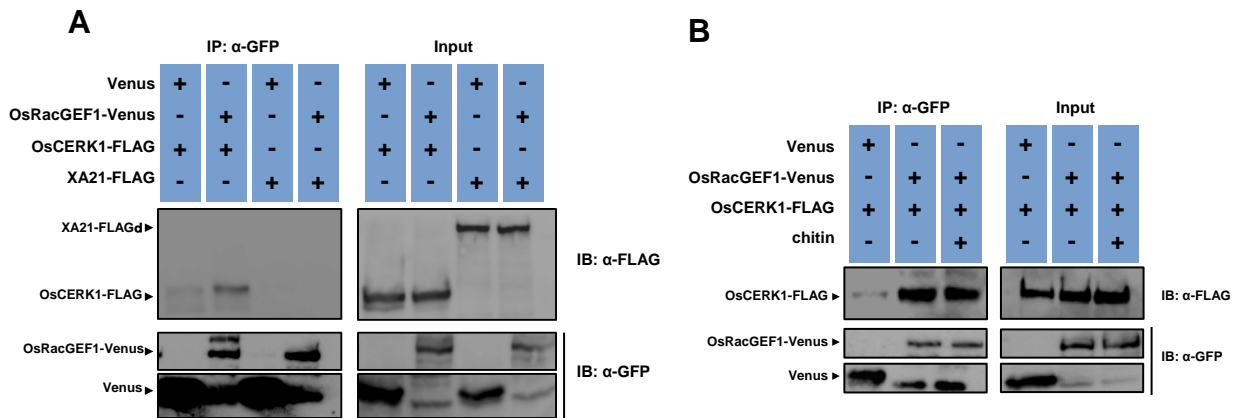


Figure 13. OsRacGEF1複合体の解析

(A) Co-IPによる相互作用解析。イネOc細胞のプロプラストに35S:: OsRacGEF1-Venusと*Ubi*:: OsCERK1-FLAGもしくは*Ubi*:: XA21-FLAGを発現させ、タンパク質を抽出後anti-GFP抗体によってCo-IPを行った。その後、anti-FLAG抗体を用いてウエスタンブロットを行った。

(B) Co-IPによる相互作用解析。イネOc細胞のプロプラストに35S:: OsRacGEF1-Venusと*Ubi*:: OsCERK1-FLAGを発現させ、chitin処理10分後にタンパク質を抽出し、anti-GFP抗体によってCo-IPを行った。その後、anti-FLAG抗体を用いてウエスタンブロットを行った。

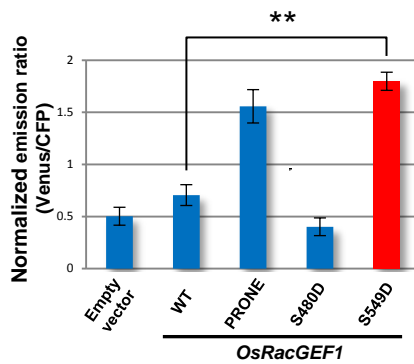


Figure 14. Raichu-OsRac1を用いたOsRacGEF1の機能解析

Raichu-OsRac1 WTによるOsRacGEF1の機能解析。イネOc細胞のプロプラストに*Ubi:: Raichu-OsRac1*とともに*Ubi:: OsRacGEF1 WT*、*Ubi:: OsRacGEF1 PRONE*、*Ubi:: OsRacGEF1 S480D*、*Ubi:: OsRacGEF1 S549D*、Empty vectorをそれぞれ共発現させ、Normalized emission ratioを測定した。y誤差範囲は、標準誤差を示す (n > 20、P : \*\*<0.01)

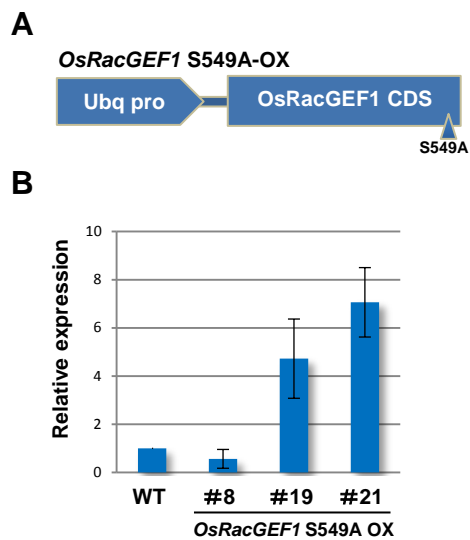


Figure 15. *OsRacGEF1* S549A過剰発現植物体の作製

(A) 過剰発現用コンストラクトの模式図を示す。pGWB2ベクターに*OsRacGEF1* S549Aを挿入した。

(B) *OsRacGEF1* S549A植物体における*OsRacGEF1*の発現解析。定量的PCRによって、独立した3つの系統における遺伝子発現量を測定した。



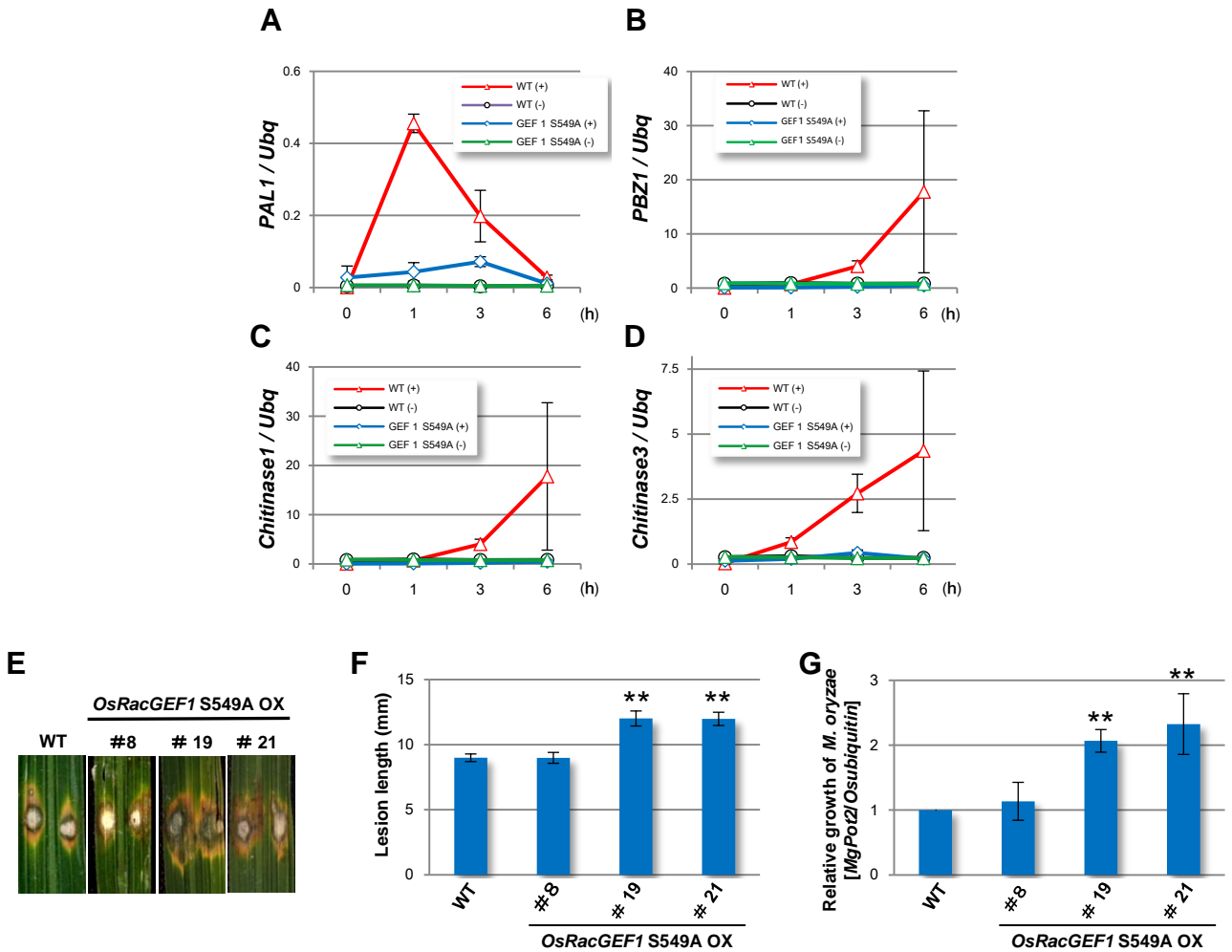


Figure 16. *OsRacGEF1* S549A植物を用いた抵抗性の解析

(A-D) *OsRacGEF1* S549Aおよび野生型植物体のカルスにおける抵抗性関連遺伝子*PAL1* (A), *PBZ1* (B), *Chitinase1* (C) and *Chitinase3* (D) の遺伝子発現を定量的PCRによって測定した。(-)はMock処理を、(+)はchitin処理を示す。y誤差範囲は、標準誤差を示す (n=3)

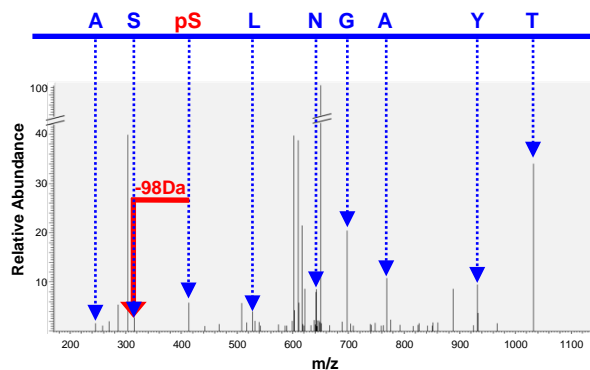
(E-G) *OsRacGEF1* S549A植物体に対する親和性もち病菌 *race 007* の感染解析。(F) *OsRacGEF1* S549Aおよび野生型植物体の典型的な病斑を示す。(G) 感染6日目の病斑長を示す。y誤差範囲は、標準誤差を示す (n > 60、P : \*\* < 0.01) (H) 感染6日目の親和性もち病菌 *race007* のDNA量の定量解析。y誤差範囲は、標準誤差を示す (n > 6、P : \*\* < 0.01)

**A**

```

1 MASASEDDAGSERCCGSYSPSADVSESETSSDCSAPTTTTTTRRFASSSS
51 RGVASSSSSSLLPTPPSSAAAFFLSAKPAADLSEVDMMKERFAKLLLGE
101 DMSGSGKGVCTALAINAITNLSATVFGELWRLEPMASARKAMWTREMDW
151 LLSVADSIVELTPSIQELPDGGGQFEVMVPRPRSDLYMNLPAKLLDAML
201 LAMIDGFKETEFWYVDRGIVVDDSGGPFSSSSSSCGRPSVRQEKEWWLPC
251 PRVPPKGLSEDARRKQQDRDCANQILKAAMAINSDVLAEMEIVEVYLES
301 LPKSGKSCLGEIYRYITAEQFSPECLLDCLDLSSEHHTLEVANRIEAAI
351 HWVRLKGQKSTPQAKSKKSWGKVKGLVGDTEKSHVLSQRADGLLQSLR
401 LRYPLPQTSLDMNKIQYNKDVGQSILEYSRVLESFAFNIIARIDDDVIY
451 VDDATKSAAADSVSIFNRGIGVVPVQKRISPPFSIQHTPYASPFATPTF
501 CSSTPVTGSPGRVQPLNKNLPTKQEVKVEKLFSGDIEKVWTYAGNLSA*
551 RKDAGDAPERD

```

**B****C**

```

1 MASASEDDAGSERCCGSYSPSADVSESETSSDCSAPTTTTTTRRFASSSS
51 RGVASSSSSSLLPTPPSSAAAFFLSAKPAADLSEVDMMKERFAKLLLGE
101 DMSGSGKGVCTALAINAITNLSATVFGELWRLEPMASARKAMWTREMDW
151 LLSVADSIVELTPSIQELPDGGGQFEVMVPRPRSDLYMNLPAKLLDAML
201 LAMIDGFKETEFWYVDRGIVVDDSGGPFSSSSSSCGRPSVRQEKEWWLPC
251 PRVPPKGLSEDARRKQQDRDCANQILKAAMAINSDVLAEMEIVEVYLES
301 LPKSGKSCLGEIYRYITAEQFSPECLLDCLDLSSEHHTLEVANRIEAAI
351 HWVRLKGQKSTPQAKSKKSWGKVKGLVGDTEKSHVLSQRADGLLQSLR
401 LRYPLPQTSLDMNKIQYNKDVGQSILEYSRVLESFAFNIIARIDDDVIY
451 VDDATKSAAADSVSIFNRGIGVVPVQKRISPPFSIQHTPYASPFATPTF
501 CSSTPVTGSPGRVQPLNKNLPTKQEVKVEKLFSGDIEKVWTYAGNLSA
551 RKDAGDAPERD

```

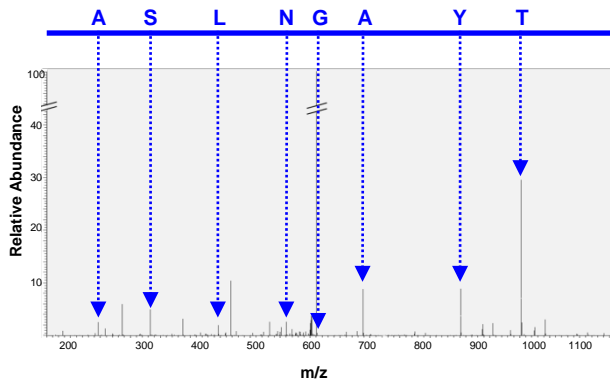
**D**

Figure 17. 質量分析によるOsRacGEF1のリン酸化解析

(A-D) LC-MS/MSによるリン酸化部位の解析。イネOc細胞のプロプラストに*Ubi::myc-OsRacGEF1*を発現させ、chitin処理を10分間行いタンパク質抽出した(A-B)。chitin処理を行わずにタンパク質抽出した(A-B)。抽出タンパク質をanti-myc抗体を用いてCo-IPを行い、LC-MS/MS解析に用いた。(A) 検出されたOsRacGEF1ペプチドを赤色で、リン酸化が確認されたアミノ酸残基をアスタリスクで示した。(B) Mass spectrometryスペクトラムを示す。

### 3-3-3. OsRac1 と MAMPs 受容体との相互作用解析

OsRac1 と OsRacGEF1 は、細胞膜上で相互作用する。また、OsCERK1 は、OsRacGEF1 と相互作用する。そこで、これらの複合体が同一の複合体を示すのかどうかを検証するために、OsRac1 と受容体型キナーゼとの相互作用を BiFC 解析によって検証した (Figure 18A)。その結果、Venus の蛍光が細胞膜上で観察された。さらに、myc-OsRac1、OsRacGEF1-Venus、OsCERK-FLAG の全てを発現させたイネ Oc 細胞のプロトプラストを用い、myc 抗体によって Co-IP を行った (Figure 18B)。GFP 抗体および FLAG 抗体を用いてウエスタンブロットを行ったところ、これらの相互作用が示された。以上のことから、OsCERK1-OsRacGEF1-OsRac1 が複合体を形成している可能性が高いことが占めされた。

OsRacGEF1 のリン酸化が OsRac1 との相互作用に影響を与えるかどうかを検証するために、OsRacGEF1 S5459D 変異体を用いて、OsRac1 との BiFC 解析を行った (Figure 19A)。その結果、549 番目のセリンのリン酸化はこれらの相互作用に影響を与えないことが示された。

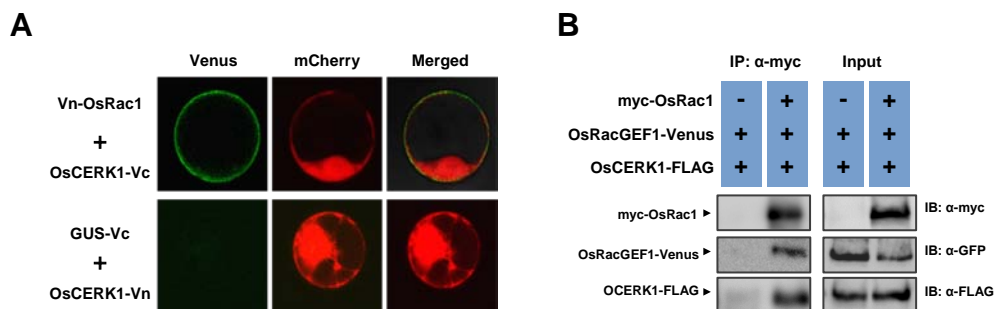
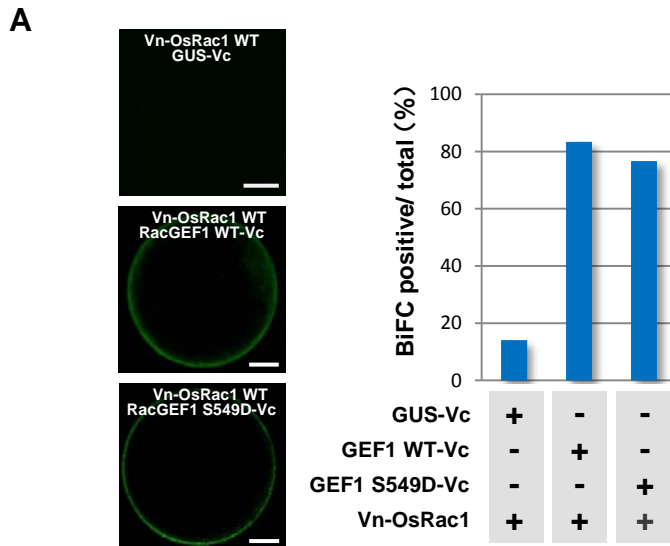


Figure 18. OsCERK1/OsRacGEF1/OsRac1モジュールの解析

(A) BiFCによる相互作用解析。イネOc細胞のプロプラストに35S::*OsCERK1-Vc*と35S::*Vn-OsRac1* WTを発現させた。ネガティブコントロールとして35S::*GUS-Vc*を導入し発現させた。内部標準として*Ubi::mCherry*を共発現させた。n > 60

(B) Co-IPによる相互作用解析。イネOc細胞のプロプラストに35S::*myc-OsRac1*、35S::*OsRacGEF1-Venus*および*Ubi::OsCERK1-FLAG*発現させ、タンパク質を抽出後anti-myc抗体によってCO-IPを行った。その後、anti-GFP抗体およびanti-FLAG抗体を用いてウエスタンブロットを行った。



**B**

```

OsRacGEF1  511  GRVQPPLNKNLPTKQEVKEKLFSGDIEKVWTYAGNLSSARKDAGDAPERD 561
AtRopGEF1  502  PRRAPPL - - - - YSVKRNGTREKGIVGETEKAWSYAGNLSSRRRVTGVTPERD 548
AtRopGEF12 497  TKKTSYLETLGGVKSPTARH - - - - - * - - - - - 515
  
```

Figure 19. OsRacGEF1のリン酸化による相互作用への影響

(A) BiFCによる相互作用解析。イネOc細胞のプロプラストに35S:: *Vn-OsRac1*と35S:: *OsRacGEF1 S549S-Vc*もしくは35S:: *OsRacGEF1 WT-Vc*を発現させた。ネガティブコントロールとして35S::*GUS-Vc*を導入し発現させた。内部標準として*Ubi::mCherry*を共発現させた。グラフは、内部標準が観察できる細胞でのBiFCシグナルの有無の比を表した。スケールバーは、5  $\mu$ mを示す。n > 60

(B) OsRacGEF1、AtRopGEF1、AtRopGEF12の配列比較  
 アステリスクはOsRacGEF1の549番目のセリン残基を示す。

### 3-4. MAMPs 受容体、OsRacGEF1,OsRac1 の細胞内輸送機構

前述した OsRacGEF1 と OsCERK1 および OsFLS2 を用いた BiFC 解析の結果、Venus の蛍光が細胞膜上および ER 上に局在することが示された。受容体キナーゼである OsCERK1 や OsFLS2 は、細胞膜上で MAMP 認識を行うと考えられているため、これらが ER において相互作用し、その後、細胞膜まで複合体として輸送されることが予想された。これまでの報告から、OsCERK1 は ER において Hsp90 と、Hop/Sti と ER 上で相互作用し、複合体として細胞膜まで輸送されるということが示唆されている (Chen et al., 2010)。そこで、OsRacGEF1 および OsRac1 も同様の複合体に含まれるかどうかを検証した。

シロイヌナズナにおいて、Cop II 小胞による ER からゴルジ体への小胞輸送には、低分子量 G タンパク質である AtSar1 が関与する。この AtSar1 の恒常的活性化型 AtSar1-CA は、ER からゴルジへの小胞輸送を阻害することが知られている (Takeuchi et al., 2000)。OsRacGEF1-CFP、OsCERK1-Cerulean および Cerulean-OsRac1 をそれぞれ発現するイネ Oc 細胞のプロトプラストに AtSar1-CA を共発現させた。その結果、OsRacGEF1-Cerulean、OsCERK1-Venus、OsFLS2-Venus の細胞膜局在が減少し、ER において多く観察されるようになった (Figure 20A and 20B)。このことから、OsRacGEF1 および OsCERK1 は、小胞輸送によって細胞膜まで輸送されていることが示唆された。

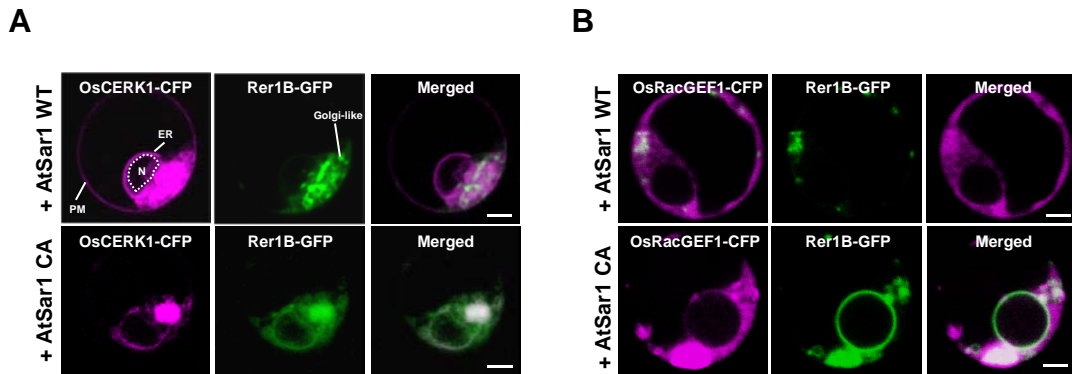


Figure 20. OsRacGEF1/OsCERK1複合体の細胞内輸送

(A-B) AtSar1 恒常的活性化型 (AtSar1 CA)による輸送阻害

(A) イネOc細胞のプロトプラストにOsCERK1-CFPおよびAtSar1 CA-Rer1B-GFPもしくは AtSar1 WT Rer1B-GFPを共発現させた。(B) OsRacGEF1-CFPおよびAtSar1 CA-Rer1B-GFPもしくは AtSar1 WT-Rer1B-GFPを共発現させた。スケールバーは、5  $\mu$ mを示す。

## 1. 考察

### 4-1. MAMPs による OsRac1 の活性化

MTI 機構における OsRac1 の重要性は以前から示されてきた (Ono et al., 2001; Wong et al., 2004; Lieberherr et al., 2005; Kawasaki et al., 2006; Wong et al., 2007; Thao et al., 2007; Nakashima et al., 2008; Chen et al., 2010a; Kin et al., 2012)。しかしながら、MTI 機構において OsRac1 が *In vivo* で活性化するかどうかは不明であった。本研究において、Raichu-OsRac1 をイネ Oc 細胞のプロトプラストで発現させることにより、MAMPs 依存的に OsRac1 が活性化されることを *In vivo* において観察することができた (Figure 7A and 7B)。今回観察された蛍光強度比は、Raichu-CA-OsRac1 発現細胞での値とほぼ同程度まで上昇することが確認されたため、発現している Raichu-OsRac1 の多くが活性化状態に移行していることが示唆された。chitin は、これまで明らかにされた MAMPs のなかで、病原菌においてもっとも保存されている分子のひとつである。また、CerA も多くの糸状菌において保存された因子であり、イネは糸状菌特異的にみられるスフィンゴ脂質エリシターの構造を認識することが知られている (Umemura et al., 2000)。これら広く保存された因子によって、OsRac1 の活性化が誘導されたことから、OsRac1 が機能することは MTI 機構において非常に重要であることが改めて示され、複数の MAMPs の下流において OsRac1 が抵抗性を制御している可能性が明らかとなった。

これまで、動物細胞で機能するさまざまな FRET を利用したプローブが作製されている。ラットの副腎髄質由来の PC12 細胞において、Raichu-Rac1、Raichu-Cdc42、Raichu-Ras はそれぞれ Epidermal Growth Factor (EGF) によって、数分以内に活性化されることが観察されている。また、その後 30 分程度でその活性が抑制されることも明らかとなっている (Nakamura et al., 2005)。マウス繊維芽細胞 Swiss3T3 において、Raichu-Rab5 がファゴサイトーシス (食作用) 開始時に活性化され、ファゴサイトーシスが終了する 15 分程度で Raichu-Rab5 の活性も抑制される (Kitano et al., 2008)。今回の解析においても、OsRac1 の活性化は MAMPs 処理後数分以内に開始された (Figure 7B)。MTI 経路の初期で起こるイベントとして、活性酸素の産生や MAP キナーゼ活性が知られており、それらの上流で OsRac1 が機能することも示されている (Wong et al., 2007)。そこで、これらの応答のタイミングと OsRac1 の活性化のタイミングとを比較した。活性酸素の産生は、MAMPs 処理後数分で開始され 1 時間後でピークを迎え、2 時間後には定常状態に戻る (Yoshioka et al., 2005)。また、イネの OsMAPK6 の活性化は 15 分~2 時間の間で起こる (Lieberherr et al., 2005)。つまり、OsRac1 の活性化のタイミングはこれらとほぼ同時に応答していることが分かる。以上のことを踏まえると、これらが同経路で機能することをさらに裏付ける結果となったといえる。MTI 経路において、もっとも素早い応答のひとつに、MAMPs 処理後数十秒で  $\text{Ca}^{2+}$  が細胞質に流入することが報告されている。今回の Raichu-OsRac1 を用いた解析では、MAMPs 処理後 3 分で最初の測定を行った。蛍光の退色や、MAMPs 処



理の作業時間等を考慮すると、3分より早い時間で観察を行うのは困難である。そのため、Ca<sup>2+</sup>の流入との関係については、Raichu-OsRac1を利用した解析からは言及できない (Wendehenne et al., 2002)。また、今回の結果では、OsRac1の活性化はMAMPs処理後60分においても維持されていた。活性酸素の産生やMAPキナーゼの活性化が2時間程度継続されることから、この活性化の継続は細胞内の正しい反応を反映していると考えられた。一方で、動物細胞におけるRaichuセンサーの観察では、いずれの場合も活性化後数十分程度で活性が抑制されることが観察されている。そのため、Raichu-OsRac1は不活性化の応答が正常に反映できていない可能性も考えられた。その原因として、Raichu-OsRac1の観察を行う細胞中で、過剰に存在するOsRac1によって抵抗性のスイッチが通常よりも長く、強く“ON”の状態になっていること、Raichu-OsRac1に含まれるOsRac1に対する抑制機構が機能していない可能性などが考えられた。本研究では、1時間より長時間の観察も試みたが、Raichu-OsRac1が過剰に発現する細胞においては、MAMPs処理後1時間を超えると多くの細胞が死滅してしまう。そのため、Normalized emission ratioを測定することはできなかった。今後は、細胞が死滅しないような条件の検討し、より長時間の必要となる。

以上のことから、本研究によって明らかになったMAMPs処理によるOsRac1の活性の変化のタイミングや傾向は、個々の細胞やMAMPsの違いによる差はあるものの、総じて同傾向を示した。このことは、病原菌に存在するさまざまなMAMPsをイネの細胞が認識後、下流においてOsRac1が非常に素早いタイミングで活性化されることを示唆する結果といえる。

#### 4-2. イネ MTI 経路における OsRacGEF1

酵母 Two-Hybrid スクリーニングにより、OsRac1の相互作用因子として同定されたOsRacGEF1の組織別発現量を、Yale rice project (<http://bioinformatics.med.yale.edu/riceatlas/>)のマイクロアレイデータベースを利用して調べたところ、根や葉を中心に植物体全体で発現していることが分かった。また、蛍光タンパク質を用いたOsRacGEF1の細胞内局在解析から、細胞質、ERおよび細胞膜近傍に局在することが示された (Figure 9B)。これらの局在がOsRacGEF1自身のシグナル配列によるものかどうかを明らかにするために、WoLF PSORT (<http://wolfsort.org/>)によって、シグナル配列を検索したが、OsRacGEF1の配列には、目立った局在化シグナル配列の存在は検出されなかった。これまでに、イネ細胞内においてPRONE型のGEFの細胞内局在の詳細を調べた例はないが、シロイヌナズナの花粉管においては、AtRopGEFsが細胞質と細胞膜付近に局在するという報告がされている (Zhang et al., 2007; Gu et al., 2006; Riely et al., 2010)。しかしながら、ERに局在するという報告例はない。Cop II小胞による輸送を阻害するAtSar1 (CA)との共発現解析から、ERにおいて強いシグナルが観察されたことから、OsRacGEF1がERに局在することが支持された (Figure 20B)。

BiFC解析から、OsRacGEF1とOsRac1の相互作用が確認された(Figure 9C)。さらに、これらの結果を裏付けるものとして、GST-pull down解析によってOsRacGEF1とOsRac1は他のPRONE型のGEFホモログと比較して強く相互作用していること、また、OsRac1の活性化状態には影響されずにOsRacGEF1とOsRac1は相互作用することも示されている(Akamatsu et al., 2013; 今井圭子 未発表)。今回行われた酵母Two-Hybridスクリーニングにおいて、Baitとして使用したOsRac1は、GEFとの親和性が高いOsRac1 D125N変異体である(Cool et al., 1999)。また、cDNAライブラリーは、イネ培養細胞にchitinを処理し、そこから得られたRNAをもとにして作製されたものである。このcDNAライブラリーには、イネに存在する11個のOsRacGEFホモログ全てが含まれていた。スクリーニングの結果、600個近い陽性クローンが得られた。非常に興味深いことに、そのうち9割以上のクローンがOsRacGEF1であった。また、この解析ではその他のOsRacGEFホモログは得られなかった。このため、OsRac1とOsRacGEF1の間には高い特異性が存在することが示唆された(西出圭太 修士論文 2008)。

OsRacGEF1のOsRac1に対するGEF活性を検証するために、Raichu-OsRac1とOsRacGEF1の共発現解析を行った。その結果、OsRacGEF1のPRONEドメインがOsRac1を強く活性化することが示された(Figure 9D)。また、精製タンパク質を用いた*In vitro*の解析からも、同様の結果が得られている(Akamatsu et al., 2013)。さらに、OsRacGEF1特異的な配列であるC末端領域によるRNAi植物体の解析によって、OsRacGEF1がchitinに対する応答だけではなく、活性酸素の産生やいもち病菌への抵抗性にも非常に重要な因子であることが明らかとなった(Figure 11A-H)。また、OsRacGEF1のRNAi植物体は、極端な矮化や不稔などの目立った表現型を示さなかった。前述したようにPRONE型のGEFホモログは、イネにおいて11遺伝子存在する。そのため、ホモログ遺伝子間での冗長性によって表現型が顕著に表れない可能性も予想された。しかしながら、本研究からOsRacGEF1のRNAiの植物体において、抵抗性の顕著な低下が観察された。これは、OsRac1との相互作用能が他のGEFホモログと比較しても高い強いことが考えられる。また、OsRacGEF1のRNAi植物体での、遺伝子発現や、活性酸素の産生の低下は、これまで知られているOsCEBiPやOsCERK1のRNAi植物体と同程度と考えられる(Kaku et al., 2006; Shimizu et al., 2012)。このことから、OsRacGEF1はchitinシグナル伝達において重要なGEFであると言える。

動物では、Rho GTPaseに対するGEFとしてDH型GEFがもっとも解析が進んでいる。イネにおけるDH型GEFホモログとしてSWAP70Aが報告された(Yamaguchi et al., 2013)。しかしながら、SWAP70A RNAi植物体では、抵抗性への影響が観察されなかったことや、細胞内の局在がOsRac1とは大きく異なることから、病害抵抗性においては、機能が限定的であることが示唆された。

これらのことをまとめると、OsRacGEF1はいもち病菌の感染部位である葉や根において、MTI経路での中心的なOsRac1活性化因子であると言える。

#### 4-3. MAMPs 受容体による OsRacGEF1 の制御機構

生物がもつシグナル伝達システムのなかで、もっとも利用されるものひとつがリン酸化を介したシグナル伝達である。受容体キナーゼは、細胞膜上に局在し、細胞外にシグナルを認識する受容ドメインをもち、細胞内の標的タンパク質をリン酸化するためのキナーゼドメインをもち、これまでに、受容体キナーゼに対する Rac/Rop GTPase の関与は、シロイヌナズナの CLAVATA1 と AtRop1 が複合体を形成するという報告や、花粉管において受容体キナーゼ AtPRK2a は AtRopGEF12 を介してと RopGTPase が関与しているという報告がされている (Trotochaud et al., 1999 ; Zhang et al., 2007)。本研究において、共免疫沈降および BiFC 解析によって OsRacGEF1 と OsCERK1 の相互作用が確認された (Figure 12A and 12C)。また、chitin 処理によって OsRac1 が活性化されることが明らかとなった (Figure 7C)。そのため、OsCERK1 による chitin の認識から、OsRacGEF1 を介して OsRac1 が活性化されるという経路の存在が証明された。つまり、細胞膜上で OsCEBiP が chitin を認識すると、おそらく OsCEBiP は OsCERK1-OsRacGEF1 複合体と結合するようになると間がられる。同様に、OsFLS2 においても、OsRacGEF1 と相互作用することが示された (Figure 12B and 12D)。以上の結果から、OsRacGEF1 が複数の受容体キナーゼの下流で機能することが強く示唆された。OsCERK1 は、細胞外に LysM ドメインを有し細胞内にキナーゼドメインを有する。キナーゼドメインは、保存されたアルギニンとアスパラギン酸 (RD) を有するものと、アルギニンを欠いたものに分類することができ、それぞれ RD kinase、Non-RD kinase と呼ばれる。シロイヌナズナにおいて、キナーゼドメインの約 70% が RD kinase に分類され、約 10 % が non-RD kinase に分類されている (Dardick and Ronald, 2006)。AtFLS2 は non-RD kinase に属し、一方で AtCERK1 は RD-kinase に属する。興味深いのは、細胞外に LRR ドメインを有し、細胞内に non-RD kinase を持つものは、BAK1 と呼ばれる受容体とヘテロマーを作りシグナルを伝達する。しかしながら、細胞外に LysM ドメインと細胞内に RD kinase ドメインを有する AtCERK1 は、BAK1 とは相互作用せずにシグナルを伝達する。イネにおいても、LRR と non-RD kinase を有する Xa21 が BAK1 ホモログと相互作用するという報告があり、一方で LysM と RD kinase を有する OsCERK1 は、BAK1 とは相互作用せずに細胞膜上に存在する CEBiP 受容体と相互作用する。このように、細胞外ドメインやキナーゼドメインの僅かな違いによって、共受容体との組み合わせが大きく異なる。今回の研究では、OsRacGEF1 は、いずれのタイプの受容体とも相互作用することが確認された。これらのことから、さまざまな MAMPs 受容体の下流には、OsRacGEF1 および OsRac1 を介した病害抵抗性経路が存在していることが考えられる。

Rahichu-OsRac1 を利用した解析から、OsRacGEF1 WT よりも PRONE ドメインを発現させた場合のほうが OsRac1 を強く活性化することが示された (Figure 11A)。前述したように、PRONE 型の GEF ホモログでは、PRONE ド

メインが高度に保存されている。そのため、それぞれの GEF がどのように機能するかは、N 末端領域もしくは C 末端領域による制御が非常に重要であることが予想される。これまでに、PRONE ドメインの活性を制御することが報告されているのは C 末端領域に限られるが、OsRacGEF ホモログのなかには C 末端領域を持たず、N 末端領域と PRONE ドメインのみで構成されるものも存在するため、N 末端領域の関与も十分に考えられる。しかしながら、本研究室において OsRacGEF1 の PRONE ドメインは、自身の C 末端領域と結合するが、N 末端領域とは結合しないことが示されたため、本研究では、C 末端領域に着目して研究を行った (Akamatsu et al., 2013)。C 末端領域において、予想リン酸化部位をアミノ酸置換しリン酸化を模倣した変異体を作製した。これら変異体と Raichu-OsRac1 を用いた解析から、OsRacGEF1 の C 末端にある 549 番目のセリンのリン酸化が重要であることが示された (Figure 14)。さらに、質量分析の結果から、chitin シグナル依存的に OsRacGEF1 の 549 番目のセリンがリン酸化されることが示された (Figure 17A-D)。加えて、生化学的解析から、OsCERK1 の細胞内ドメインが OsRacGEF1 の 549 番目のセリンをリン酸化することが示された (Akamatsu et al., 2013)。シロイヌナズナにおいて OsRacGEF1 と最も相同性の高い RopGEF である OsRopGEF1 では、非常に相同性の高い C 末端領域と、OsRacGEF1 S549 が保存されている (Figure 19B)。これらの結果から、OsRacGEF1 は、chitin シグナル依存的に 549 番目のセリンがリン酸化されることが明らかとなった。

この結果から、リン酸化された C 末端領域は負に電荷し、構造変化がもたらされ、その結果 C 末端領域と PRONE ドメインの結合に変化が生じ、活性が抑制されていた PRONE ドメインが解放される。解放された PRONE ドメインは OsRac1 に結合する GDP を解離させ GTP を呼び込むことにより OsRac1 の活性化型に変化することが考えられた。この考えを支持する結果として、OsCERK1 受容体の細胞内ドメインが OsRacGEF1 の C 末端領域と相互作用することも酵母 Two-Hybrid 法により示されている (Akamatsu et al., 2013)。

#### 4-4. OsRac1、MAMPs 受容体、OsRacGEF1 の細胞内輸送機構

近年、植物の受容体型キナーゼの細胞内輸送が植物の抵抗性に重要であることが示されている (Beck et al., 2012)。植物の MAMPs に対する受容体キナーゼは、疎水性の LRR ドメインもしくは LysM ドメインを有する。これら受容体キナーゼは、ER において、グリコシル化やフォールディングを受けると明らかとなった (Gurkan et al., 2006)。オリゴ糖転移酵素複合体のサブユニットである STT3A の機能欠損変異体では、MAMPs 受容体がグリコシル化されず、病原菌に対する抵抗性が低下する (Häweker et al., 2010)。そのため、植物の耐病性機構において、タンパク質の輸送と修飾は重要なものであると考えられている (Collins et al., 2003; Speth et al., 2009; Wang et al., 2005)。しかし、その詳しいメカニズムは不明な点が多い。最近、ER quality control (ERQC)

が BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1 (BRI1) を介したホルモンシグナリングおよび病害抵抗性応答に関与することが報告された (Saijo et al., 2009; Li et al., 2009; Caplane et al., 2009)。また、OsCERK1 が HSP90 および Hop/Sti1 により ER において成熟し、その後、ゴルジ体を介して小胞輸送により細胞膜まで輸送されることが、当研究室により示された (Chen et al., 2010)。本研究より、OsRacGEF1 も CA-AtSar1 によって小胞輸送を阻害すると、細胞膜近傍で観察されていたシグナルが減少し、ER でみられるシグナルが増加することが明らかとなった (Figure 20B)。このことから、OsRacGEF1 は ER から、Cop II 小胞を介して細胞膜まで輸送されることが示唆された。また、BiFC 解析からも、OsRacGEF1 と OsCERK1 および OsFLS2 が ER において相互作用することが示されたことから、OsRacGEF1 と OsCERK1 もしくは OsFLS2 が複合体として細胞膜に小胞輸送されることが考えられる。現在のところ、主に細胞質に存在する OsRacGEF1 がどのような理由で、小胞輸送によって細胞膜に輸送される必要があるのかは明らかではない。ひとつの仮説として、OsRacGEF1 が細胞内で極性をとるために輸送系を利用しているのではないかと考えられる。シロイヌナズナの AtRop4 が病原菌の侵入部位に対して極性をとることが報告されている (Schutz et al., 2006)。また、シロイヌナズナの RopGAP が小胞輸送によって、根の先端に移動し機能することが明らかになっている (Mucha et al. 2011)。そのため、OsRacGEF1 が病原菌感染時に極性をとるために小胞による局在の制御を受けている可能性が予想される。

#### 4-5. Defensome 複合体と OsRacGEF1 の関係

当研究室の研究により OsRac1 の相互作用因子が多数報告されている。これらは OsRac1 を中心とした Defensome と呼ばれるシグナリングネットワークを形成していると考えられている (Chen et al., 2010)。MAMPs 受容体である OsCERK1 は、ER 上で Hsp90、Hop/STI1a と相互作用する。その後、Defensome 複合体として細胞膜上まで輸送される。本研究で行った BiFC 解析および共免疫沈降による解析から、OsRac1 と OsRacGEF1、OsRacGEF1 と OsCERK1 が定常状態においてそれぞれ相互作用することが示されたことから、これらが細胞膜上で同一の複合体を形成していることが考えられた (Figure 9C, Figure 12A and 12C, and Figure 13B)。さらに、生化学的な解析から、~350 kDa のタンパク質画分に、OsCERK1、OsRacGEF1、OsRac1、Hsp90 や Hop/STI1a が含まれることが示されている (濱田聡 未発表)。

本論文で示した結果と、さまざまな知見をもとに Figure 21 のようなモデルが考えられた。OsRac1 の GEF として同定された OsRacGEF1 は、ER 上で OsRacGEF1/受容体キナーゼ複合体を形成する。これらは複合体を維持したまま小胞輸送により輸送され細胞膜上にたどり着く。次に、この OsRacGEF1/受容体キナーゼの複合体は、細胞膜上に局在する OsRac1 と相互作用し OsCERK1-OsRacGEF1-OsRac1 を主としたシグナリングモジュールを形成する。このモジュールは、細胞膜上で病原菌由来の MAMPs シグナルが来るの

を待ち構える。受容体キナーゼによって、病原菌由来の chitin を OsCEBiP が認識すると OsCEBiP と OsCERK1 が結合し (Kaku et al., 2006; Shimizu et al., 2012)、OsCERK1 が細胞内にシグナルを伝える。細胞内キナーゼドメインによって、OsRacGEF1 の C 末端領域にある 549 番目のセリン残基がリン酸化される。リン酸化された OsRacGEF1 の C 末端は、構造変化により PRONE ドメインを解放し、細胞膜上で OsRac1 を活性化する。その後、OsRac1 および OsRacGEF1 が Defensome 複合体から解離し下流の因子が活性化され防御応答が誘導される。

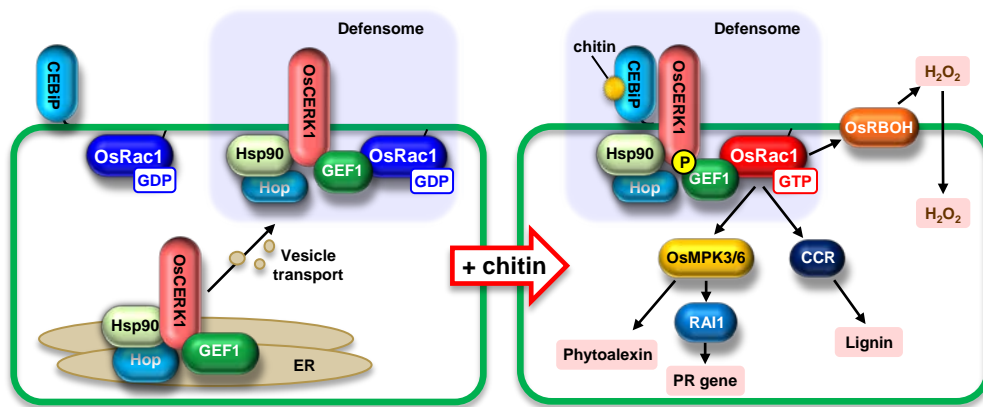


Figure 21. OsCEBiP/OsCERK1/OsRacGEF1/OsRac1モジュールのモデル図

CEBiPによるchitin認識後、OsCEBiP/OsCERK1/OsRacGEF1/OsRac1モジュールが形成され、シグナル伝達が行われる。その結果、様々な抵抗性反応が誘導される。

## 5. 謝辞

本論文は、著者が奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科博士課程に所属した4年間と、前期課程の2年間の研究成果をまとめたものです。本研究を進めるにあたり、研究の立案をはじめ、研究全般にわたり、御助言と御指導を賜りました奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・植物分子遺伝学研究室 島本功教授に心から感謝いたします。

本研究におきまして、適切な御助言、御指導を賜りました Hann Ling Wong 博士、河野洋治助教、田岡健一郎助教、辻寛之助教に心から御礼申し上げます。

本学の分子情報薬理学研究室 伊東広教授、植物成長制御研究室 梅田正明教授、細胞間情報学研究室 高山誠司教授からはアドバイザーとして多くの御助言と御指導を賜りました。心から御礼申し上げます。

本学の植物グローバルの稲田のりこ特任準教授には、顕微鏡解析に関しまして、ご指導賜りました。深尾陽一郎特任準教授、藤原正幸特任助教には、質量分析に関しまして多大な協力を賜りました。心から御礼申し上げます。

分子生物学実験の基礎を丁寧に御指導してくださいました青井智子さんに心から感謝いたします。実験上のサポートを熱心に行ってくれた吉岡幸江さんに心から感謝いたします。形質転換植物体の作製に関しましては、許斐友紀子さん、玉置優子さん、成富純子さんに御協力を賜りました。心から御礼申し上げます。

本学で研究活動を行う上で、研究の基礎、精神的な助言まで、多方面において支えて頂きました樋口雅之博士、高橋靖之博士、小宮怜奈博士、玉置祥二郎博士、そして長野稔博士に心より感謝いたします。

博士前期課程での5人の同期、多くの先輩、後輩たちと切磋琢磨することで濃密な研究生活を過ごすことができました。決して忘れることのない思い出になると思います。本当に有り難うございました。

最後に、大学院において研究していく上で、物心の両面から支えてくださった赤松達男・朋子夫妻に深く感謝いたします。日常生活から研究の議論まで、妻として、また同期の研究者として常に私を支えてくれた赤松理恵には、心より感謝いたします。

平成 25 年 3 月



## 6. 参考文献

- Akamatsu, A., Wong, H-L., Fujiwara, M., Okuda, J., Nishide., K., Uno, K., Imai, Keiko., Umemura, Kenji., Kawasaki, T., Kawano, Y., and Shimamoto, K. (2013). An OsCEBiP/OsCERK1-OsRacGEF1-OsRac1 module is an essential component of chitin-induced rice immunity. *Cell. Host Microbe* (In press)
- Beck, M., Heard, W., Mbengue, M., and Robatzek, S. (2012). The INs and OUTs of pattern recognition receptors at the cell surface. *Curr. Opin. Plant Biol.* *15*,367-374
- Berken, A. (2006). ROPs in the spotlight of plant signal transduction. *Cell Mol. Life Sci.* *63*, 2446-2459.
- Berken, A., Thomas, C., and Wittinghofer, A. (2005). A new family of RhoGEFs activates the Rop molecular switch in plants. *Nature* *436*, 1176-1180.
- Boller, T., and Felix, G. (2009). A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annu. Rev. Plant. Biol.* *60*, 379-406.
- Caplan, J.L., Mamillapalli, P., Burch-Smith, T.M., Czymbek, K., and Dinesh-Kumar, S.P. (2008). Chloroplastic protein NRIP1 mediates innate immune receptor recognition of a viral effector. *Cell* *132*, 449-462.
- Chen, L., Hamada, S., Fujiwara, M., Zhu, T., Thao, N.P., Wong, H.L., Krishna, P., Ueda, T., Kaku, H., Shibuya, N., Kawasaki, T., and Shimamoto, K. (2010). The Hop/Sti1-Hsp90 chaperone complex facilitates the maturation and transport of a PAMP receptor in rice innate immunity. *Cell. Host Microbe* *7*,185-196.
- Chen, M., Liu, H., Kong, J., Yang, Y., Zhang, N., Li, R., Yue, J., Huang, J., Li, C., Cheung, A.Y., and Tao, L.Z. (2011). RopGEF7 regulates PLETHORA-dependent maintenance of the root stem cell niche in Arabidopsis. *Plant Cell* *23*, 2880-2894.
- Chen, X., Chern, M., Canlas, P.E., Ruan, D., Jiang, C., and Ronald, P.C. (2010). An ATPase promotes autophosphorylation of the pattern recognition receptor XA21 and inhibits XA21-mediated immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 8029-8034.
- Chinchilla, D., Zipfel, C., Robatzek, S., Kemmerling, B., Nurnberger, T., Jones, J.D., Felix, G., and Boller, T. (2007). A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. *Nature* *448*, 497-500.
- Collins, N.C., Thordal-Christensen, H., Lipka, V., Bau, S., Kombrink, E., Qiu, J.L., Huckelhoven, R., Stein, M., Freialdhoven, A., Somerville, S.C., and Schulze-Lefert, P. (2003). SNARE-protein-mediated disease resistance at the plant cell wall. *Nature* *425*, 973-977.

Cool, R.H., Schmidt, G., Lenzen, C.U., Prinz, H., Vogt, D., and Wittinghofer, A. (1999). The Ras mutant D119N is both dominant negative and activated. *Mol. Cell Biol.* *19*, 6297-6305.

de Jonge, R., van Esse, H.P., Kombrink, A., Shinya, T., Desaki, Y., Bours, R., van der Krol, S., Shibuya, N., Joosten, M.H., and Thomma, B.P. (2010). Conserved fungal LysM effector Ecp6 prevents chitin-triggered immunity in plants. *Science* *329*, 953-955.

Duan, Q., Kita, D., Li, C., Cheung, A.Y., and Wu, H.M. (2010). FERONIA receptor-like kinase regulates RHO GTPase signaling of root hair development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 17821-17826.

Fujiwara, M., Hamada, S., Hiratsuka, M., Fukao, Y., Kawasaki, T., and Shimamoto, K. (2009). Proteome analysis of detergent-resistant membranes (DRMs) associated with OsRac1-mediated innate immunity in rice. *Plant Cell Physiol.* *50*, 1191-1200.

Gomez-Gomez, L., and Boller, T. (2002). Flagellin perception: a paradigm for innate immunity. *Trends Plant Sci.* *7*, 251-256.

Gomez-Gomez, L., and Boller, T. (2000). FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in Arabidopsis. *Mol. Cell* *5*, 1003-1011.

Gomez-Gomez, L., Felix, G., and Boller, T. (1999). A single locus determines sensitivity to bacterial flagellin in Arabidopsis thaliana. *Plant J.* *18*, 277-284.

Gurkan, C., Stagg, S.M., Lapointe, P., and Balch, W.E. (2006). The COPII cage: unifying principles of vesicle coat assembly. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *7*, 727-738.

Gust, A.A., Willmann, R., Desaki, Y., Grabherr, H.M., and Nurnberger, T. (2012). Plant LysM proteins: modules mediating symbiosis and immunity. *Trends Plant Sci.* *17*, 495-502.

Hayashi, F., Smith, K.D., Ozinsky, A., Hawn, T.R., Yi, E.C., Goodlett, D.R., Eng, J.K., Akira, S., Underhill, D.M., and Aderem, A. (2001). The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* *410*, 1099-1103.

Itoh, R.E., Kurokawa, K., Ohba, Y., Yoshizaki, H., Mochizuki, N., and Matsuda, M. (2002). Activation of rac and cdc42 video imaged by fluorescent resonance energy transfer-based single-molecule probes in the membrane of living cells. *Mol. Cell Biol.* *22*, 6582-6591.

Jeong, S., Trotochaud, A.E., and Clark, S.E. (1999). The Arabidopsis CLAVATA2 gene encodes a receptor-like protein required for the stability of the CLAVATA1 receptor-like kinase. *Plant Cell* *11*, 1925-1934.

Jones, J.D., and Dangl, J.L. (2006). The plant immune system. *Nature* *444*, 323-329.

Kaku, H., Nishizawa, Y., Ishii-Minami, N., Akimoto-Tomiyama, C., Dohmae, N., Takio, K., Minami, E., and Shibuya, N. (2006). Plant cells recognize chitin fragments for defense signaling through a plasma membrane receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 11086-11091.

Kanaoka, M.M., Pillitteri, L.J., Fujii, H., Yoshida, Y., Bogenschutz, N.L., Takabayashi, J., Zhu, J.K., and Torii, K.U. (2008). SCREAM/ICE1 and SCREAM2 specify three cell-state transitional steps leading to arabidopsis stomatal differentiation. *Plant Cell* *20*, 1775-1785.

Kawano, Y., Akamatsu, A., Hayashi, K., Housen, Y., Okuda, J., Yao, A., Nakashima, A., Takahashi, H., Yoshida, H., Wong, H.L., Kawasaki, T., and Shimamoto, K. (2010). Activation of a Rac GTPase by the NLR family disease resistance protein Pit plays a critical role in rice innate immunity. *Cell. Host Microbe* *7*, 362-375.

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. U. S. A.* *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. U. S. A.* *103*, 230-235.

Kim, S.H., Oikawa, T., Kyojuka, J., Wong, H.L., Umemura, K., Kishi-Kaboshi, M., Takahashi, A., Kawano, Y., Kawasaki, T., and Shimamoto, K. (2012). The bHLH Rac Immunity1 (RAI1) Is Activated by OsRac1 via OsMAPK3 and OsMAPK6 in Rice Immunity. *Plant Cell Physiol.* *53*, 740-754.

Kishi-Kaboshi, M., Okada, K., Kurimoto, L., Murakami, S., Umezawa, T., Shibuya, N., Yamane, H., Miyao, A., Takatsuji, H., Takahashi, A., and Hirochika, H. (2010). A rice fungal MAMP-responsive MAPK cascade regulates metabolic flow to antimicrobial metabolite synthesis. *Plant J.* *63*, 599-612.

Lee, S.W., Han, S.W., Sririyanyum, M., Park, C.J., Seo, Y.S., and Ronald, P.C. (2009). A type I-secreted, sulfated peptide triggers XA21-mediated innate immunity. *Science* *326*, 850-853.

Li, J., Zhao-Hui, C., Batoux, M., Nekrasov, V., Roux, M., Chinchilla, D., Zipfel, C., and Jones, J.D. (2009). Specific ER quality control components required for biogenesis of the plant innate immune receptor EFR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 15973-15978.

Liu, T., Liu, Z., Song, C., Hu, Y., Han, Z., She, J., Fan, F., Wang, J., Jin, C., Chang, J., Zhou, J.M., and Chai, J. (2012). Chitin-induced dimerization activates a plant immune receptor. *Science* *336*, 1160-1164.

- Marshall, R., Kombrink, A., Motteram, J., Loza-Reyes, E., Lucas, J., Hammond-Kosack, K.E., Thomma, B.P., and Rudd, J.J. (2011). Analysis of two in planta expressed LysM effector homologs from the fungus *Mycosphaerella graminicola* reveals novel functional properties and varying contributions to virulence on wheat. *Plant Physiol.* *156*, 756-769.
- Mentlak, T.A., Kombrink, A., Shinya, T., Ryder, L.S., Otomo, I., Saitoh, H., Terauchi, R., Nishizawa, Y., Shibuya, N., Thomma, B.P., and Talbot, N.J. (2012). Effector-mediated suppression of chitin-triggered immunity by *magnaporthe oryzae* is necessary for rice blast disease. *Plant Cell* *24*, 322-335.
- Mochizuki, N., Yamashita, S., Kurokawa, K., Ohba, Y., Nagai, T., Miyawaki, A., and Matsuda, M. (2001). Spatio-temporal images of growth-factor-induced activation of Ras and Rap1. *Nature* *411*, 1065-1068.
- Nakamura, T., Aoki, K., and Matsuda, M. (2005). Monitoring spatio-temporal regulation of Ras and Rho GTPase with GFP-based FRET probes. *Methods* *37*, 146-153.
- Nakashima, A., Chen, L., Thao, N.P., Fujiwara, M., Wong, H.L., Kuwano, M., Umemura, K., Shirasu, K., Kawasaki, T., and Shimamoto, K. (2008). RACK1 functions in rice innate immunity by interacting with the Rac1 immune complex. *Plant Cell* *20*, 2265-2279.
- Park, C.J., Han, S.W., Chen, X., and Ronald, P.C. (2010). Elucidation of XA21-mediated innate immunity. *Cell. Microbiol.* *12*, 1017-1025.
- Park, C.J., Peng, Y., Chen, X., Dardick, C., Ruan, D., Bart, R., Canlas, P.E., and Ronald, P.C. (2008). Rice XB15, a protein phosphatase 2C, negatively regulates cell death and XA21-mediated innate immunity. *PLoS Biol.* *6*, e231.
- Petutschnig, E.K., Jones, A.M., Serazetdinova, L., Lipka, U., and Lipka, V. (2010). The lysin motif receptor-like kinase (LysM-RLK) CERK1 is a major chitin-binding protein in *Arabidopsis thaliana* and subject to chitin-induced phosphorylation. *J. Biol. Chem.* *285*, 28902-28911.
- Riely, B.K., He, H., Venkateshwaran, M., Sarma, B., Schraiber, J., Ane, J.M., and Cook, D.R. (2011). Identification of legume RopGEF gene families and characterization of a *Medicago truncatula* RopGEF mediating polar growth of root hairs. *Plant J.* *65*, 230-243.
- Ronald, P.C., Albano, B., Tabien, R., Abenes, L., Wu, K.S., McCouch, S., and Tanksley, S.D. (1992). Genetic and physical analysis of the rice bacterial blight disease resistance locus, Xa21. *Mol. Gen. Genet.* *236*, 113-120.

Saijo, Y., Tintor, N., Lu, X., Rauf, P., Pajeroska-Mukhtar, K., Haweker, H., Dong, X., Robatzek, S., and Schulze-Lefert, P. (2009). Receptor quality control in the endoplasmic reticulum for plant innate immunity. *Embo j.* 28, 3439-3449.

Schulze, B., Mentzel, T., Jehle, A.K., Mueller, K., Beeler, S., Boller, T., Felix, G., and Chinchilla, D. (2010). Rapid heteromerization and phosphorylation of ligand-activated plant transmembrane receptors and their associated kinase BAK1. *J. Biol. Chem.* 285, 9444-9451.

Schwessinger, B., and Ronald, P.C. (2012). Plant innate immunity: perception of conserved microbial signatures. *Annu. Rev. Plant. Biol.* 63, 451-482.

Segonzac, C., and Zipfel, C. (2011). Activation of plant pattern-recognition receptors by bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 14, 54-61.

Shimizu, T., Nakano, T., Takamizawa, D., Desaki, Y., Ishii-Minami, N., Nishizawa, Y., Minami, E., Okada, K., Yamane, H., Kaku, H., and Shibuya, N. (2010). Two LysM receptor molecules, CEBiP and OsCERK1, cooperatively regulate chitin elicitor signaling in rice. *Plant J.* 64, 204-214.

Shin, D.H., Cho, M.H., Kim, T.L., Yoo, J., Kim, J.I., Han, Y.J., Song, P.S., Jeon, J.S., Bhoo, S.H., and Hahn, T.R. (2010). A small GTPase activator protein interacts with cytoplasmic phytochromes in regulating root development. *J. Biol. Chem.* 285, 32151-32159.

Shinya, T., Motoyama, N., Ikeda, A., Wada, M., Kamiya, K., Hayafune, M., Kaku, H., and Shibuya, N. (2012). Functional characterization of CEBiP and CERK1 homologs in arabidopsis and rice reveals the presence of different chitin receptor systems in plants. *Plant Cell Physiol.* 53, 1696-1706.

Sorek, N., Bloch, D., and Yalovsky, S. (2009). Protein lipid modifications in signaling and subcellular targeting. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12, 714-720.

Sorkin, A., McClure, M., Huang, F., and Carter, R. (2000). Interaction of EGF receptor and grb2 in living cells visualized by fluorescence resonance energy transfer (FRET) microscopy. *Curr. Biol.* 10, 1395-1398.

Speth, E.B., Imboden, L., Hauck, P., and He, S.Y. (2009). Subcellular localization and functional analysis of the Arabidopsis GTPase RabE. *Plant Physiol.* 149, 1824-1837.

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. U. S. A.* 99, 13307-13312.

Taguchi, F., Shimizu, R., Inagaki, Y., Toyoda, K., Shiraishi, T., and Ichinose, Y. (2003). Post-translational modification of flagellin determines the specificity of HR induction. *Plant Cell Physiol.* *44*, 342-349.

Takai, R., Isogai, A., Takayama, S., and Che, F.S. (2008). Analysis of flagellin perception mediated by flg22 receptor OsFLS2 in rice. *Mol. Plant Microbe Interact.* *21*, 1635-1642.

Takeuchi, M., Ueda, T., Sato, K., Abe, H., Nagata, T., and Nakano, A. (2000). A dominant negative mutant of sar1 GTPase inhibits protein transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus in tobacco and Arabidopsis cultured cells. *Plant J.* *23*, 517-525.

Tanabe, S., Okada, M., Jikumaru, Y., Yamane, H., Kaku, H., Shibuya, N., and Minami, E. (2006). Induction of resistance against rice blast fungus in rice plants treated with a potent elicitor, N-acetylchitoooligosaccharide. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* *70*, 1599-1605.

Tanaka, N., Che, F.S., Watanabe, N., Fujiwara, S., Takayama, S., and Isogai, A. (2003). Flagellin from an incompatible strain of *Acidovorax avenae* mediates H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation accompanying hypersensitive cell death and expression of PAL, Cht-1, and PBZ1, but not of Lox in rice. *Mol. Plant Microbe Interact.* *16*, 422-428.

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.

Thilmony, R., Underwood, W., and He, S.Y. (2006). Genome-wide transcriptional analysis of the Arabidopsis thaliana interaction with the plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 and the human pathogen *Escherichia coli* O157:H7. *Plant J.* *46*, 34-53.

Umemura, K., Ogawa, N., Yamauchi, T., Iwata, M., Shimura, M., and Koga, J. (2000). Cerebroside elicitors found in diverse phytopathogens activate defense responses in rice plants. *Plant Cell Physiol.* *41*, 676-683.

Wan, J., Tanaka, K., Zhang, X.C., Son, G.H., Brechenmacher, L., Nguyen, T.H., and Stacey, G. (2012). LYK4, a lysin motif receptor-like kinase, is important for chitin signaling and plant innate immunity in Arabidopsis. *Plant Physiol.* *160*, 396-406.

Wendehenne, D., Lamotte, O., Frachisse, J.M., Barbier-Brygoo, H., and Pugin, A. (2002). Nitrate efflux is an essential component of the cryptogein signaling pathway leading to defense responses and hypersensitive cell death in tobacco. *Plant Cell* *14*, 1937-1951.

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.

Yoshioka, H., Sugie, K., Park, H.J., Maeda, H., Tsuda, N., Kawakita, K., and Doke, N. (2001). Induction of plant gp91 phox homolog by fungal cell wall, arachidonic acid, and salicylic acid in potato. *Mol. Plant Microbe Interact.* 14, 725-736.

Zipfel, C., Kunze, G., Chinchilla, D., Caniard, A., Jones, J.D., 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.

島本功、岡田清孝、田畑哲之(2005) 細胞工学別冊 改訂 3 版 植物細胞工学シリーズ 21 モデル植物の実験プロトコール イネ・シロイヌナズナ・ミヤコグサ編 134-137

西出圭太 (2008) イネの病害抵抗性に関する新規 OsRac1 GEF の同定 奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科 修士論文

松田友徳 (2007) FRET による *in vivo* での低分子量 G タンパク質 OsRac1 の動態解析 奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科 修士論文