

リン栄養情報に基づく植物の免疫制御

李 泰洪

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科 植物免疫学研究室

(西條 雄介 教授)

令和2年2月17日提出

目次

要旨	1
1. 序論.....	3
1-1. 植物の自然免疫	3
1-2. 免疫応答を誘導するパターン認識受容体 (PRR)	5
1-3. 植物のリン欠乏環境の認識と応答の制御	8
1-4. リン欠乏による MAMP 応答および DAMP 応答への影響	10
1-5. 本研究の概要	11
2. 材料と方法.....	13
2-1. 植物材料と栽培方法.....	13
2-2. 貧栄養条件培地の作成と Pep1 処理	13
2-3. RNA 抽出および qRT-PCR 解析.....	13
2-4. RNA-seq 解析.....	14
2-5. 活性化 MAPK および BIK1-HA の検出	14
2-6. BAK1 および PEPR-FLAG の検出.....	14
2-7. PROPEP3-Venus の検出.....	15
2-8. タンパク質抽出とウェスタンブロッティング	15
3. 結果.....	17
3-1. リン欠乏条件において Pep1 応答は増強される.....	17
3-2. リン欠乏による Pep1 応答の増強には LPR1/LPR2 が必要である	19
3-3. Pep1 応答性トランスクリプトームとそのリン栄養依存性の解析 (PHR1/PHL1 経路・LPR1/LPR2 経路の役割)	21

3-4.	リン欠乏条件下では PROPEP3 の放出量が増加する	24
3-5.	PEPR の蓄積や BAK1 との複合体形成はリン欠乏条件においても変化しない	26
3-6.	リン欠乏条件では Pep1 により BIK1 タンパク質量が増加する	28
3-7.	Pep1 応答の増強は AGB1 を介した BIK1 タンパク質安定性制御メカニズムに依存する	29
4.	考察.....	30
4-1.	リン欠乏条件における Pep1 応答の増強は、LPR1/LPR2 を介したリン欠乏応答経路が必要である	30
4-2.	リン欠乏条件における Pep1 応答の増強は新規のメカニズムを介する	33
4-3.	リン欠乏条件における病原菌抵抗性には LPR1/LPR2 と PHR1/PHL1 の両経路が寄与する	36
4-4.	PEPR1/PEPR2 経路はリン欠乏応答に寄与する	38
4-5.	本研究の結論・展望.....	39
	図表	40
	謝辞	59
	参考文献.....	60

要旨

所属 (主指導教員)	植物免疫学研究室 (西條雄介 教授)		
氏名	李 泰洪	提出	令和2年1月20日
題目	リン栄養条件に依存した植物の免疫制御		
<p><研究の目的></p> <p>植物は、微生物に特徴的な因子 (Microbe-associated molecular patterns : MAMPs)や植物自身の細胞ダメージに伴い産生されるシグナル因子(Damage-associated molecular patterns : DAMPs) を、パターン認識受容体を介して認識することで微生物の感染を感知している。MAMPs および DAMPs の認識は植物の免疫応答を誘導し、微生物の感染を抑制する。その一方で、貧栄養条件下では栄養吸収を補助する内生微生物と共生関係を結ぶことが知られている。シロイヌナズナ等のアブラナ科では菌根共生や根粒共生が起こらないが、リン欠乏条件において糸状菌 <i>Colletotrichum tofieldiae</i> (<i>Ct</i>)が根に感染し植物の成長を促進することが報告されている (Hiruma et al. 2016)。植物は、リン十分条件においては <i>Ct</i> に対して防御応答を示す一方でリン欠乏条件では感染を許容する。しかし、<i>Ct</i> と近縁な病原菌である <i>Colletotrichum incanum</i> (<i>Ci</i>) に対してはリン欠乏条件でも防御応答を強く誘導する (Hacquard et al. 2016)。これらのことから、植物は栄養環境に応じて免疫応答を調節し、共生菌の感染は許容しながら病原菌の感染を排除していることが考えられた。しかし、その分子制御メカニズムについてはよくわかっていないのが現状である。本研究では、その分子メカニズムの解明に向けた第一歩として、リン栄養条件変動が植物の MAMPs および DAMPs 応答に及ぼす影響、並びにその制御に関わる遺伝子基盤の解析を行った。</p> <p><結果・考察></p> <p>リン欠乏条件で生育した植物に対し、真菌 MAMP であるキチンと植物 DAMP である Pep1 ペプチドを投与した場合の根における遺伝子発現の変化を RNA-seq 解析によって網羅的に調べた。その結果、リン欠乏条件ではキチンによる免疫応答に関連した遺伝子の誘導が低下する一方で、Pep1 による誘導はむしろ増強されることが明らかになった。</p> <p>次に、リン枯渇ストレス応答 (Phosphate Starvation Response : PSR) に異常を示す既知の変異体を用いて、リン欠乏条件における Pep1 応答の増強に重要な因子を探索した。PSR のマスター制御因子としてリン欠乏応答性遺伝子の約 70%に影響を与える転写因子 PHR1/PHL1、およびリン欠乏条件での主根の伸長抑制に必要な分泌性フェロキシンダーゼ LPR1/LPR2 の役割を調査した。<i>phr1 phl1</i> 変異体ではリン欠乏条件において野生型と同様に Pep1 応答の増強が見られた一方で、<i>lpr1 lpr2</i> 変異体では Pep1 応答の増強が観察されなかった。この結果から、LPR1/LPR2 を介した PSR 経路によって Pep1</p>			

応答が増強されていることが示唆された。

さらに、PHR1/PHL1 と LPR1/LPR2 のそれぞれが制御する PSR および Pep1 誘導性の遺伝子群を明らかにするため、*phr1 phl1* 変異体と *lpr1 lpr2* 変異体を用いてトランスクリプトーム解析を行った。その結果、リン欠乏条件で Pep1 処理により発現が上昇する遺伝子群にはエチレン・ジャスモン酸応答に関連する遺伝子群が含まれていた。また、それらの遺伝子群の発現が *lpr1 lpr2* 変異体では低下する一方で、*phr1 phl1* 変異体では野生型と比較して増強される傾向が見られた。このことから、これらの遺伝子の Pep1 応答性を LPR1/LPR2 経路が亢進させる一方で PHR1/PHL1 経路は抑制的に働くことが示唆された。

また、PEPR シグナル系のどのステップがリン欠乏条件において増強されるのかを調査したところ、Pep1 受容体である PEPR1/PEPR2 および共受容体 BAK1 のタンパク質量やリガンド誘導性の複合体形成において変化は見られなかった。*bak1* 欠失変異体では Pep 応答が増強されることが報告されており (Yamada et al, 2016)、それに加えてリン欠乏による Pep1 応答の増強が見られた。このことから、リン欠乏条件における Pep1 応答の増強は BAK1 欠損による Pep 応答の増強とは異なるメカニズムに起因することが示唆された。また、*pepr1* 変異体および *pepr2* 変異体において Pep1 応答性遺伝子の発現量を調べたところ、根における増強には PEPR2 がより寄与していることが示された。

受容体複合体の近傍で働く受容体様細胞質キナーゼ BIK1 について調べたところ、*bik1 pbl1* 変異体では Pep1 応答が損なわれたことからリン欠乏条件でも Pep1 応答には BIK1/PBL1 が必要であることが確認された。リン欠乏条件における Pep1 処理時の BIK1 タンパク質の変化を調べた結果、リン欠乏条件では BIK1 タンパク質の蓄積並びにそのリン酸化が増強されていることが明らかになった。なお、リン欠乏条件において *BIK1* の mRNA レベルが上昇することが報告されているものの (Zhang et al. 2016)、本条件では同様の傾向が認められなかったことから、BIK1 タンパク量の増加は mRNA レベルでの上昇によるものではないことが考えられた。そこで、BIK1 タンパク質の安定性を制御する既知の因子の役割を調べた。CPK28 と PUB25/PUB26 は BIK1 の分解を促し、AGB1 を含む複合体は BIK1 の分解を抑制することが報告されている (Wang et al. 2018)。BIK1 の分解が促進される *agb1* 変異体では Pep1 応答が著しく低下したことから、Pep1 応答において BIK1 が必要であることが再度示された。また、BIK1 タンパク質の蓄積量が増加する *cpk28* 変異体と *pub26* 変異体においてはリン欠乏による Pep1 応答の増強が見られた。このことから、リン欠乏条件での BIK1 タンパク質量の増加はこれらの経路と独立して働く新規のメカニズムを介している可能性が考えられた。

また、リン欠乏条件で発現が増強される Pep1 応答性の遺伝子群は *Ci* 感染時に誘導される一方で *Ct* 感染時には発現が低いままであった。このことから、植物がリン欠乏条件で細胞ダメージ応答の感受性を高めることが病原菌抵抗性の保持の一端を担っていることが考えられた。

1. 序論

1-1. 植物の自然免疫

植物は、動物が有しているような免疫に特化した細胞や獲得免疫を持たないが、各細胞に先天的に備わっている自然免疫に依存して環境中に存在する微生物との相互作用を成立させている。植物の自然免疫では、細胞表面に局在する免疫センサーを介して微生物に広く保存される構成成分（microbe-associated molecular patterns : MAMPs）に加えて、植物自身の細胞ダメージによって生成される分子パターン（damage-associated molecular patterns : DAMPs）を感知することで病原菌の侵入を認識する。それにより活性化されるパターン誘導性免疫（pattern-triggered immunity : PTI）が、第一の防御ラインとして、病原菌の感染を最小限に抑える基礎抵抗性において重要な役割を果たしている。PTIの活性化に至る過程において、MAPK（mitogen-activated protein kinase）カスケードの活性化、活性酸素種（reactive oxygen species : ROS）の産出、防御応答遺伝子群の発現、カロースの蓄積といった種々の防御応答が誘導される（Dodds and Rathjen 2010; Monaghan and Zipfel 2012）。しかしながら、病原菌はエフェクターと総称される分泌タンパク質を植物細胞内に注入し、これらの防御応答についてはPTIを阻害することで感染を促進する

（Jones JD et al. 2006）。これに対して植物は、エフェクター分子そのもの、もしくは大部分のケースではエフェクターによる細胞内の攪乱を細胞内に存在する受容体で認識することでエフェクター誘導性免疫（effector-triggered immunity : ETI）を引き起こす。ETIは、PTIと比較して、細胞死などの激しい防御応答を伴うより強い防御応答である上、シグナル経路の攪乱などに対してよりロバストに機能する（Jacob F et al. 2013; Jones JD et al. 2006）。ETIは特定の病原菌に対する抵抗性に大きく寄与しており、PTIと防御応答やシグナル経路を共有している。高温などの環境ストレス条件下ではETIの機能が低下する一方で、PTIの機能は維持される（Cheng et al. 2013）。この例からも

明らかなように、植物の免疫システムには環境条件によって活性や有効性が異なる様々な経路が存在し、環境状況に応じてそれらを有効に活用して環境中の微生物に対する抵抗性を維持している可能性が考えられる。

1-2. 免疫応答を誘導するパターン認識受容体 (PRR)

MAMPs および DAMPs は細胞膜表面に局在するパターン認識受容体 (pattern recognition receptor : PRR) に認識されることで免疫応答を誘導することが知られている。植物免疫における重要な役割を果たす PRR には受容体様キナーゼ (receptor-like kinase : RLK) があり、ロイシンリッチリピート (leucine-rich repeat : LRR) やリジンモチーフ (lysine motif : LysM) という共通した細胞外ドメインを介してリガンドと結合する。LRR-RLK の PRR として細菌の鞭毛成分であるフラジェリンを認識する FLS2 (FLAGELIN SENSING) と細菌の翻訳伸長因子である EF-Tu を認識する EFR (EF-Tu RECEPTOR) があげられる (Gomez and Boller 2000; Bauer et al. 2001; Kunze et al. 2004; Zipfel et al. 2006)。また、CERK1 (CHITIN ELICITOR RECEPTOR KINASE) は真菌の細胞壁の成分であるキチンを認識する LysM-RLK である (Liu et al. 2012; Miya et al. 2007; Wan et al. 2008)。さらに、DAMPs を認識する RLK として PEPR がある。PEPR は、シロイヌナズナに 8 分子種存在する PROPEP ペプチドファミリー (Huffaker et al. 2006; Huffaker and Ryan 2007) の C 末端にある Pep エピトープを認識し、上述の MAMP 認識時と類似の防御応答を誘導する。PROPEP 遺伝子 (特に PROPEP1-PROPEP3) の発現は、病原菌の感染や傷害、並びに MAMPs や Pep ペプチドを含む DAMPs により誘導され、産生・放出された PROPEP 由来のペプチドを PEPR が認識することにより、さらなる防御応答の活性化並びに PROPEP の発現を誘導する (Huffaker and Ryan 2007; Tintor et al. 2013)。そのような正のフィードバックを有するため、PEPR 経路は植物の防御応答を増強する役割があると考えられている。実際に、当研究室を始めとして、PEPR 経路が MAMP 応答の増強に寄与する役割をもつことが報告されている (Liu et al. 2013; Tintor et al. 2013)。

これらの RLK はリガンド結合後に LRR-RLK である BAK 1 (BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1-ASSOCIATED RECEPTOR KINASE 1) と複合

体を形成し、相互のリン酸化や細胞内受容体様キナーゼ (Receptor-like cytoplasmic kinase : RLCK) のリン酸化を介してシグナルを伝達する。なお、BAK1 は PEPR によるシグナル伝達のポジティブ制御因子である一方で、その除去時には、PEPR は、BAK1 に類似の他の SERK ファミリー分子種と複合体を形成し、シグナル伝達を行う。BAK1 は、サリチル酸 (SA) を介した免疫応答や細胞死を抑制する機能もあり (Yasuda et al., 2017 COPB)、BAK1 の除去時には PEPR シグナル系がこれらの増強に働くようになって抵抗性を保持する (Yamada et al. 2016)。なお、葉に炭疽病を引き起こす糸状菌 *Colletotrichum higginsianum* は感染過程で BAK1 を選択的に除去すること、及び本菌に対する抵抗性が PEPR に依存することが示され (Yamada et al., 2016)、PEPR が特に BAK1 を除去して感染する病原菌に対して有効な防御システムであることが明らかになっている。

BIK1 (BOTRYNUS-INDUCED KINASE1) は PBL (PBS1-like kinase) ファミリーに属する RLCKs の一つであり、多くの PRR 複合体のすぐ下流で働き、MAPK の活性化や ROS の産生、植物ホルモンの産生といった様々な防御応答については PTI の誘導に重要であることが明らかになっている (Zhang et al. 2010; Liu et al. 2013)。近年、BIK1 の安定性を制御するメカニズムの一端が解明され、CPK28 が E3 ユビキチンリガーゼである PUB25/PUB26 をリン酸化することで BIK1 の分解を促し、AGB1 を含む G タンパク質複合体は PUB25/PUB26 の活性を抑制し BIK1 を安定化させることが報告されている (Wang et al. 2018)。

なお、以上の知見は植物の栄養が十分である条件において得られたものである。しかしながら、植物の栄養環境条件の変動が PRR を介した免疫応答やシグナル伝達に影響を及ぼすことも明らかになっている。糖の供給が低下した植物では PTI 応答が低下することや (Park et al. 2015)、植物内での炭素と窒素の比率を制御するユビキチンリガーゼ ATL6 が SNARE タンパクであり侵入阻止型の防御応答に必要な PEN1 と相互作用することで病原糸状菌であるうどん粉病菌に対する防御応答に関与していることが報告されている (Maekawa

et al. 2014)。さらには、植物にとって必須元素の一つであるリンが欠乏した条件では、シロイヌナズナにおいて共生糸状菌である *Colletotrichum tofieldiae* (後述) と比較して、近縁の病原菌 *C. incanum* (後述) 感染時には防御関連遺伝子の発現が強く誘導されることが報告されている (Hacquard et al. 2016)。したがって、栄養条件の変動に伴い、特に貧栄養環境において免疫応答が調節されていることが示唆される。しかしながら、その詳細なメカニズムについては未だに不明な点が多い。

1-3. 植物のリン欠乏環境の認識と応答の制御

植物はリン欠乏条件において主根の伸長抑制、側根・根毛数の増加、葉におけるアントシアニンの蓄積といった応答を示す。これらの応答は、それぞれ、根の表面積の拡大によるリン吸収能の増加や光阻害を回避・軽減しながらの転流の促進（及びフラボノイドの抗酸化作用によるストレス耐性）を促すと考えられている。これらのリン欠乏応答（PSR）の制御メカニズムに関して、主としてシロイヌナズナにおいて分子遺伝学的研究が進められてきており、いくつかの主要制御因子・経路が同定されている。

リン欠乏応答を制御する因子として MYB 転写因子である PHR1 およびそのパラログである PHL1 が報告されている（Rubio et al. 2001; Bustos et al. 2010）。PHR1/PHL1 は多くのリン欠乏応答遺伝子をもつ P1BS という DNA 配列に結合し転写を制御することで、根毛数の増加やアントシアニンの蓄積に関連した遺伝子、並びにリン酸トランスポーター遺伝子の発現を制御する（Bustos et al. 2010）。さらに、PHR1/PHL1 が根圏に感染する共生糸状菌や根圏細菌叢の制御および Flg22 誘導性防御関連遺伝子応答の制御に関与していることなどが明らかになってきている（Hiruma et al., 2016; Castrillo et al., 2016）。

また、体外環境のリン欠乏状態の認識に関与する因子として、根端で発現している分泌性フェロキシダーゼ LPR1 および LPR2 が報告されている（Svistoonoff et al. 2007）。これに関して、根端以外の部位がリン十分条件培地に接していても根端のみがリン欠乏条件培地に接していることで、LPR1/LPR2 依存的に主根の伸長抑制が起こることが示されている。したがって、土壌環境中（植物体外）のリン欠乏状態を認識するには、根端における LPR1/LPR2 の機能が重要な役割を果たすと考えられている（Svistoonoff et al. 2007）。リン欠乏条件での LPR1/LPR2 依存的な主根の伸長抑制のメカニズムやそのリン欠乏適応における意義については未だ不明な点が多いものの、LPR1/LPR2 の働きにより生じた Fe^{3+} の酸化力を利用して ROS が産生され、

主根の根端分裂組織近傍で特に原形質連絡においてカロースが蓄積することが報告されている (Luna et al. 2011; Müller et al. 2015)。原形質連絡にカロースが蓄積した結果、根の細胞分化・細胞パターン形成に関わる転写因子 SHR (SHORT ROOT) の静止中心への細胞間輸送が妨げられ、主根の頂端分裂の阻害つまり主根の伸長抑制が引き起こされるというモデルが提唱されている (Müller et al. 2015; Coline et al. 2016; Mora-Macías et al. 2017)。

他にも、リン吸収を制御する主要な因子として PHO1, PHO2, PHF1 が報告されている。PHO1 は木部へのリン酸の流入に関与するトランスポーターであり、欠損株においては根でリン酸が蓄積する一方で地上部でのリン酸濃度が顕著に低下する (Liu et al. 2014)。PHO2 は E2 ユビキチン結合酵素であり、PHO1 やリン酸トランスポーター (PHT1s) の分解を制御することが報告されている (Liu et al. 2014)。PHF1 は ER においてリン酸トランスポーター (PHT1s) の細胞膜への移行に関与することが報告されている (Liu et al. 2014)。しかしながら、これらのリン欠乏応答 (PSR) 制御因子の作用機序や、PSR 制御メカニズムに関しては依然として不明な点が多い。

1-4. リン欠乏による MAMP 応答および DAMP 応答への影響

リン欠乏条件において、大部分の地上植物はアーバスキュラー菌根菌と根で共生関係を樹立してリンなどの必須栄養素を受け取る。一方で、モデル植物シロイヌナズナをはじめとするアブラナ科植物は、アーバスキュラー菌根菌とは共生しないものの、その代わりに共生糸状菌 *Colletotrichum tofieldiae* (*Ct*) (Hiruma et al. 2016) と共生関係を樹立して、菌糸からリンの供給を受けることが近年明らかになっている。一方で、*Ct*の近縁種の *Colletotrichum incanum* (*Ci*) は根に感染して植物の成長を著しく阻害してしばしば枯死させる。シロイヌナズナが *Ct* と共生関係を結ぶようなリン欠乏条件において、*Ct* 感染時と *Ci* 感染時の植物の遺伝子発現変化を比較すると、*Ct* 感染時には植物の成長に関する遺伝子群が誘導されるのに対して、*Ci* 感染時には防御応答に関連する遺伝子の発現が *Ct* 感染時と比較して顕著に上昇することが報告されている (Hacquard et al. 2016)。 *Ct* および *Ci* の MAMP、例えば真菌の細胞壁成分であるキチン等を認識することで、植物は感染を察知して防御応答を誘導することが考えられる。さらに、病原菌 *Ci* の感染に伴い、激しい組織破壊が引き起こされることから (Hacquard et al. 2016)、 *Ci* 感染時には特に MAMP に加えて DAMP が細胞の傷害部分から流出し、防御応答を誘導していることも想定される。このことから、 *Ct* と比べて、 *Ci* に対しては MAMP 応答に加えて DAMP 応答がより大きく寄与していることが予想され、その違いが、リン欠乏条件において *Ct* に対する植物の防御応答に比べて *Ci* に対する防御応答が強く活性化される要因になっている可能性が考えられた。さらに、当研究室において、 *Ci* 感染時には MAMP・DAMP 受容体の共受容体である BAK1 が分解されることから (井上 修論, 2019)、 *Ci* 感染時に上昇する防御応答は BAK1 依存性が低いことも想定された。

1-5. 本研究の概要

植物は PSR を駆使することにより、リンが欠乏した環境に適応している。植物は、リン欠乏条件において共生菌に対しては免疫応答を顕著に活性化させず寛容する一方で、細胞・組織ダメージを誘導する病原菌に対しては免疫応答を効果的に活性化させることが示唆されていた。しかしながら、その実態やメカニズムについては明らかではなかった。

本研究では、リン欠乏条件において DAMP の一種である Pep1 による免疫応答がむしろ増強される現象を見出し、そのメカニズムおよびその病原菌感染時における意義について解明を進めた。具体的には、シロイヌナズナにおいて、リン欠乏環境で Pep 応答の増強に必要な PSR 制御因子や PEPR シグナル制御因子を遺伝学的に同定するとともに、トランスクリプトーム解析を行い、リン栄養・PSR 経路・PEPR シグナル制御因子依存的に発現が影響を受ける遺伝子群をリスト化することで、本現象の分子制御基盤並びに標的遺伝子・経路に関する大枠を得た。

その結果、*phr1 phl1* 植物においてもリン欠乏条件において防御関連遺伝子の Pep1 誘導性が野生型植物と比較してより一層増強されることを見いだした。一方で、*lpr1 lpr2* 植物においては、防御関連遺伝子（特に、真菌抑制に関わるファイトアレキシン合成関連遺伝子群）の Pep 誘導性のリン欠乏による増強が引き起こされなかった。したがって、PHR1/PHL1 経路及び LPR1/LPR2 経路が、リン欠乏条件においてそれぞれ Pep 応答を負または正に制御していることが明らかになった。この結果は、植物の PSR に伴い、免疫応答が負に制御されるだけでなく、一部の免疫応答を積極的に活性化させることを示した初めての成果である。

リン欠乏環境で増強される PEPR シグナル系のステップについて、リガンド、受容体、下流のシグナル制御因子のそれぞれに着目し調査した。その結果、PROPEP リガンドの植物体外への放出量が増大することを発見した。PEPR と共受容体 BAK1 の複合体レベルでは変化が認められなかったものの、

その下流で働く受容体様細胞質キナーゼ **BIK1** の蓄積量はその活性化型リン酸化フォームも含め増加していた。以上から、リン欠乏時にはリガンド及び **BIK1** レベルで **PEPR** シグナル系が増強されていることが示された。

最後に、病原菌抵抗性に **PEPR** 経路や **LPR1/LPR2** 経路が必要であるという結果（田中 修論, 2018）と併せて、本研究は、**LPR1/LPR2-PEPR** シグナル系を介してリン欠乏環境においても病原菌に対する免疫を保持していることが示唆された。したがって、共生菌への依存度を高める貧栄養条件においても、ダメージ誘導性ペプチドを介した免疫シグナル系によって病原菌抵抗性を発動する準備を整えている仕組みを明らかにした。多種多様な微生物が同時に混在する根圏において、共生菌・病原菌を効率よく区別する仕組みの一端に迫る結果を得た。

2. 材料と方法

2-1. 植物材料と栽培方法

本研究ではシロイヌナズナの Col-0 および表 2-1 に示した変異体を使用して実験を行った。種子は、6% 次亜塩素酸ナトリウム、0.2% Triton-X100 で 15 分間滅菌処理した後、滅菌水で洗浄し 4 °C の暗所で 2 日間静置した。その後、0.8% agar、25 mM sucrose を含む 1/2MS 培地 (pH 5.7) に播種し、明期 12 時間、暗期 12 時間、22 °C の条件に設定したチャンバー内で縦置きに静置して生育させた。これらを標準栽培条件とした。

2-2. 貧栄養条件培地の作成と Pep1 処理

1% agar (Granulated Agar : Difco) を加えた栄養十分条件および貧栄養条件を再現した培地 (Gruber et al. 2013 に倣った。組成は表 2-2 に示す。) を 6 ウェルプレートの 1 ウェルあたり 4 ml 加えた後、傾斜をつけた状態で固まらせた (図 2-1)。その培地に標準栽培条件で 7 日間生育させた植物を移し替えた。3 日後に 1 μ M Pep1 を 1 ml 処理し、6 時間後に植物体から根を切り離し液体窒素により瞬間凍結させサンプルとした。

2-3. RNA 抽出および qRT-PCR 解析

凍結させたサンプルをホモジナイザー (ヴァーダー・サイエンティフィック社) により破砕し、PureLink® Plant RNA Reagent (invitrogen) を用いて RNA を抽出した。その後、PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) (TaKaRa) を用いて逆転写反応を行い RNA から cDNA を合成した。qRT-PCR には SYBR Green (life technologies) と任意のプライマー、Thermal Cycler Dice® (TaKaRa) を使用した。解析に用いたプ

ライマーの一覧を表 2-3 に示す。

2-4. RNA-seq 解析

凍結させたサンプルをホモジナイザー（ヴァーダー・サイエンティフィック社）により破碎し、NucleoSpin® RNA Plant（MACHERRY-NAGEL）を用いて RNA を抽出した。抽出した RNA を BGI 社に依頼して RNA-seq に供して配列ファイルを取得した。Galaxy (<https://usegalaxy.org/>) を用いて RNA-seq 後の配列ファイルから、Tophat-Cufflinks-Cuffdiff のデフォルトのプラットフォームを用いて各サンプルでの発現量を算出した。遺伝子発現量の可視化のためのヒートマップの作成には Morpheus (<https://software.broadinstitute.org/morpheus/>) を用いた。GO 解析については、agriGO (<http://systemsbiology.cau.edu.cn/agriGOv2/>) に解析対象の遺伝子 ID を投入し、有意な GO タームを抽出した ($p < 0.05$)。

2-5. 活性化 MAPK および BIK1-HA の検出

リン十分培地およびリン欠乏培地に標準栽培条件で 7 日間生育させた植物を移し替えた。3 日後に 1 μ M Pep1 を 1 ml 投与して、0, 5, 15, 30 分後にそれぞれ植物体から根を切り離した後、生重量を測定し液体窒素中で瞬間凍結させた。凍結サンプルをウェスタンブロッティング解析（下記）に供した。

MAPK の検出には野生型植物、BIK1-HA の検出には *rps5-2 / BIK1p::BIK1-HA* を用いた。

2-6. BAK1 および PEPR-FLAG の検出

リン十分培地およびリン欠乏培地に標準栽培条件で 7 日間生育させた植物を移し替えた。3 日後に植物体から根を切り離した後、生重量を測定し液体窒素

により瞬間凍結させサンプルとした。凍結サンプルをウェスタンブロッティングに（下記）に供した。

BAK1 の検出には野生型植物、PEPR-FLAG の検出には *pepr1 pepr2 / 35S::PEPR1* または *pepr1 pepr2 / 35S::PEPR2* を用いた。

2-7. PROPEP3-Venus の検出

標準栽培条件で7日間生育させた植物をリン十分液体培地に移し替えた。20日後に培地をリン十分またはリン欠乏液体培地に交換し24時間後に0.5 μM Pep1 を投与した。12, 24, 36時間後に植物体と培地を別々に回収した。植物体は生重量を測定し液体窒素により瞬間凍結させサンプルとした。液体培地はStrataclean resin (Agilent Technologies)を用いて濃縮し遠心分離した後、上清を回収しサンプルとした。

2-8. タンパク質抽出とウェスタンブロッティング

凍結させた植物サンプルをホモジナイザーにより破碎し、タンパク質抽出バッファー（50 mM Tris-HCl (pH 7.5) , 200 mM NaCl, 2 mM EDTA, 10% Glycerol, 10 mM NaF, 1 mM DTT, Phosphatase Inhibitor Cocktail : EDTA free (ナカライ)）を加えた。遠心分離（14000 rpm 4 °C 15 min）後に回収した上清をタンパク抽出溶液とした。

SDS-PAGE は10%ゲルで行い、泳動したタンパク質はCriterionBlotter (BIO-RAD) を用いてTransfer Membranes (Immobion) へ転写した。メンブレンのブロッキングにはTBST buffer（10 mM Tris-HCl (pH 7.5) , 150 mM NaCl, 0.1%Tween20）に溶かした2.5%スキムミルクを用いた。一次抗体をSolution1 (TOYOBO) により1/1000希釈した反応液を用い、メンブレンを浸して4 °Cで一晩インキュベートした。TBST bufferによりメンブレンを洗浄した後、二次抗体を、TBST bufferに溶かした2.5%スキムミルクにより

1/5000 希釈した反応液にメンブレンを浸して 1 時間インキュベートした。
TBST バッファーによりメンブレンを洗浄した後、Chemi-Lumi One L
(nacalai tesque) を使用し ImageQuant LAS 4000 (富士フィルム) を用い
て蛍光を検出した。

蛍光を検出した後、メンブレンを WB Stripping Solution (nacalai
tesque) で処理し抗体を乖離させた。次に、1/1000 希釈した RPN6 抗体にメ
ンブレンを浸して 4 °C で一晩インキュベートした。二次抗体処理および蛍光の
検出は一次抗体の場合と同様に行った。

26S プロテアソームサブユニットである RPN6 は恒常的に発現するため、
これをローディングコントロールとして用いた。

使用した抗体を表 2-4 に示す。

3. 結果

3-1. リン欠乏条件において Pep1 応答は増強される

当研究室では、真菌 MAMP モデルとしてキチン、並びに DAMP モデルとして BAK1 が機能不全の際にも効果的に防御関連応答を誘導できる Pep1 を用いて、それぞれに対する植物根の遺伝子応答について、微生物共生が促されるリン欠乏条件でリン十分条件と比較して変化するのかを調査していた。リン欠乏条件においてキチンと Pep1 をそれぞれ処理した植物体の根における遺伝子発現の変化を RNA-シーケンス解析 (RNA-seq) により網羅的に解析した結果、リン欠乏条件ではリン存在条件と比較して、Pep1 に顕著に反応する遺伝子群の大半の発現が増強されていた。一方で、キチン応答性遺伝子群はリン欠乏条件においてむしろ低下傾向にあった。したがって、植物はリン栄養条件の変化に応じて免疫応答をその種類に応じて異なる様式で正負に制御していることが示唆された。

第一に、上述の先行研究の結果の再現性を検証するため、および、真菌 MAMP であるキチンに加えて細菌性 MAMP である flg22 応答についても調査するため、flg22、キチン、および Pep1 を処理した植物根における防御関連遺伝子の発現を qRT-PCR により調べた。リン欠乏時に Pep1 応答時に増強される遺伝子群の中でも、真菌抵抗性に寄与するトリプトファン由来の二次代謝産物カマレキシンの産生に必要であり (Hiruma 2019)、かつ、防御応答に伴い誘導される遺伝子の一つである *CYP71A12* の発現変化が特に顕著であったため、本研究における防御応答を示すマーカー遺伝子として *CYP71A12* を用いることにした。その結果、先行研究と同様にキチン処理では *CYP71A12* の発現量にリン栄養の違いで有意な差が認められなかった。一方で、Pep1 処理時にはリン欠乏条件でリン十分条件と比較して有意に発現量が増加した (図 3-1A)。また、細菌性 flg22 処理においても、リン栄養の違いによる *CYP71A12* の発現量に差が見られなかった。以上から、DAMP の一つである Pep1 誘導性

応答がリン欠乏では増強されることが示唆された。次に、他の Pep1 応答性防御関連応答もリン欠乏条件で増強されるかについて検証するために、遺伝子発現応答の上流に位置する MAPK の活性化の度合いについて、リン酸化 MAPK を検出する抗体を用いて調べた。その結果、Pep1 処理による MAPK の活性もリン欠乏条件ではリン十分条件と比較して増大していた (図 3-1B)。以上の結果から、リン欠乏条件において、Pep1 応答性の防御関連応答が増強されることが判明した。

3-2. リン欠乏による Pep1 応答の増強には LPR1/LPR2 が必要である

リン欠乏条件で認められた Pep1 誘導性防御関連応答の増強に関して、既知のリン欠乏応答 (PSR) の制御因子の関与の有無を調査した。既存のシロイヌナズナの PSR 関連変異体を用いてリン十分およびリン欠乏条件での Pep1 処理時のマーカー遺伝子 *CYP71A12* の発現量の変動を qRT-PCR により調べた。

まず、植物のリン欠乏応答の主要制御経路を代表する構成因子である PHR1/PHL1 および LPR1/LPR2 に着目した。シロイヌナズナでは、MYB 型転写因子である PHR1/PHL1 が植物体内のリン枯渇状況を、一方で、根端で発現する LPR1/LPR2 を介した経路が植物外のリン枯渇状況を、それぞれ感知して PSR を発揮すると考えられている (Thibaud et al. 2010)。また、PHR1/PHL1 はリン欠乏に応答する遺伝子群の大半を正に制御することが報告されている (Rubio et al. 2001; Bustos et al. 2010)。両経路の欠損変異体を用いてリン十分と欠乏条件のそれぞれで Pep1 応答を調べたところ、予想と反してリン欠乏条件で *phr1 phl1* 変異体では野生型と同様に Pep1 応答が増強された (図 3-2A)。一方で、*lpr1 lpr2* 変異体では Pep1 応答の増強が認められなかった (図 3-2A)。したがって、Pep1 応答の増強には PHR1/PHL1 ではなく LPR1/LPR2 が必要であることが示唆された。さらに、シロイヌナズナの Bay-0 アクセションを用いて同様に実験を行った。Bay-0 アクセションは *LPR1* のプロモーター領域の点変異により *LPR1* 遺伝子の発現量が顕著に低下している (Svistoonoff et al. 2007)。調査の結果、Bay-0 においてもリン欠乏条件における Pep1 応答の増強が野生型と比較して抑制されていた (図 3-2B)。したがって、この結果も Pep1 応答の増強には LPR1/LPR2 を介した PSR 経路が必要であることを支持した。

次に、リン吸収に関連する他の主要な PSR 制御因子についても同様の方法を用いて調査した。それぞれの欠損株において、リン欠乏条件での Pep1 応答を調べたところ、*pho1* 変異体と *pho2* 変異体では野生型植物と同様にリン十分条件とリン欠乏条件の間で有意な差が見られた (図 3-2B)。しかし、*pho1*

変異体では野生型と比較してマーカー遺伝子の発現が低下していた（図 3-2B）。*pho1* 変異体では地上部へのリン輸送が阻害された結果、根におけるリン酸濃度が上昇して *CYP71A12* の発現が低下してしまったものと考えられる。また、*phf1* 変異体では、リン十分条件においてもリン欠乏条件と同等に *CYP71A12* が誘導されており、両処理区の間で差は見られなかった。これは、植物のリン酸吸収に必要な PHT1s の細胞膜への移行が阻害された結果、リン十分条件においても植物はリン栄養の獲得が低下し、常にリン欠乏の状態になっているためだと考えられる。このことから、根におけるリンの存在量が Pep1 応答のレベルに影響することが考えられた。

3-3. Pep1 応答性トランスクリプトームとそのリン栄養依存性の解析

(PHR1/PHL1 経路・LPR1/LPR2 経路の役割)

リン欠乏条件での PSR を介した Pep1 応答の増強に伴う遺伝子発現変化の全容を明らかにするため、PSR 制御因子の変異体も活用したトランスクリプトーム解析を行った。野生型、*phr1 phl1*、*lpr1 lpr2*、*pepr1 pepr2* 植物の根を用いてリン十分条件とリン欠乏条件のそれぞれで Pep1 処理後 2 時間および 10 時間後の遺伝子発現を RNA-seq 解析により調べた。着目する遺伝子として、①リン十分条件と比較してリン欠乏条件で発現が有意に上昇する遺伝子（リン十分 vs リン欠乏, $\log_2 FC > 1$, $p < 0.05$ ）、②野生型植物において無処理区と比較して Pep1 処理時に発現が有意に上昇しており（Mock vs Pep1, $\log_2 FC > 1$, $p < 0.05$ ）、かつ Pep1 処理時の野生型植物と *pepr1 pepr2* 植物と比較して野生型植物で発現が有意に上昇している遺伝子（野生型 vs *pepr1 pepr2*, $\log_2 FC > 1$, $p < 0.05$ ）を選択した。その結果、2429 遺伝子が選抜された。次に、2429 遺伝子の発現パターンを可視化する目的のもと、ヒートマップを作成した（図 3-3A）。さらに、選抜した遺伝子群の発現パターンに基づき、発現が確認された遺伝子は 7 つのクラスターに分類した（図 3-3A）。

まず、Pep1 誘導性は認められなかったもののリン欠乏に応答を示す遺伝子群（クラスター 7）に着目し GO 解析を行ったところ、PSR に伴い誘導されマーカー遺伝子として使われる、リン酸結合タンパク質をコードする *SPX1* やリン酸トランスポーターをコードする *PHT1;2* といった PSR 関連遺伝子群が含まれており、それらの遺伝子発現は LPR1/LPR2 および PHR1/PHL1 に依存していた。興味深いことに、*pepr1 pepr2* 変異体においてもクラスター 7 の大半の遺伝子の発現が野生型植物と比較して低下していた（図 3-3, A）。このことから、免疫応答を担う PEPR 経路は PSR 遺伝子群の制御に関与していることが示唆された。次に、Pep1 誘導性の遺伝子群（クラスター 1～6）に着目すると、野生型植物ではリン欠乏条件においてもリン十分条件と比較して発現が上昇しない遺伝子群（クラスター 2, 4, 5）が存在することから、全ての Pep1 誘

導性の遺伝子発現誘導が一律に増強されるわけではないことが示唆された。

Pep1 応答遺伝子の中でリン欠乏条件において発現が上昇する遺伝子群（クラスター 1, 3, 6）においては *lpr1 lpr2* 植物では発現が低下する傾向を示す一方で、*phr1 phl1* 植物では逆に発現が上昇する傾向が認められた。この結果から、リン欠乏条件におけるこれらの遺伝子群の発現増強は LPR1/LPR2 経路に依存している一方で、PHR1/PHL1 経路は LPR1/LPR2 経路と異なりこれらの遺伝子群の発現を負に制御している可能性が考えられた。次に、LPR1/LPR2 依存的に発現が増強されるクラスター 1, 3, 6 の Pep1 応答遺伝子がどのようなストレス条件下で誘導されるかについて、Genevestigator にて調査した。その結果、クラスター 1, 3, 6 の遺伝子群の多くが根の病原菌である *Colletotrichum incanum (Ci)* 感染初期 (10 dpi) に発現することが明らかになった (Hacquard et al. 2016, 図 3-3B)。また、完全無リン (0 μ M Pi) 条件 (Sun et al. 2016) においても、上記の遺伝子群の大半の発現の増強が見られた。一方で、*Ci* と近縁の植物成長促進菌 *C. tofieldiae (Ct)* の感染時では *Ci* 感染時と比較して発現量は低く抑えられていた。以上から、Pep1 処理で発現が上昇する遺伝子の多くが病原菌 *Ci* 感染時に特に強く誘導されており、その多くがリン欠乏応答によって制御されていることが推察された (図 3-3B)。次に、LPR1/LPR2 経路に正に制御される Pep1 誘導性遺伝子群の生理機能を推察する目的の元、クラスター 1, 3, 6 の 1070 遺伝子に対し GO 解析を行った。その結果、植物ホルモン (エチレンやジャスモン酸など) 関連遺伝子群や抗真菌活性物質関連の遺伝子群、並びにその合成に CYP71A12 も必要とするカマレキシン合成関連遺伝子群の存在比が顕著に増加していた。特に、カマレキシン合成関連遺伝子群は、リン欠乏条件・リン十分条件で発現レベルが変動しない Pep1 誘導性遺伝子群 (クラスター 2, 4, 5) においては検出されなかったことから、Pep1 応答の中でも、リン欠乏時にはファイトアレキシン合成に関連した応答が PHR1/PHL1 によって負に制御される一方で、LPR1/LPR2 依存的に強化されていることが示唆された。

また、リンの有無にかかわらず Pep1 処理後 2 時間と 10 時間のそれぞれで

phr1 phl1 植物と *lpr1 lpr2* 植物において特異的に発現が低下した遺伝子群に対し GO 解析を行った結果、*phr1 phl1* 植物では根系の変化や細胞壁に関する遺伝子群が有意に多く含まれており、*lpr1 lpr2* 植物では防御応答関連や二次代謝経路に関する遺伝子群が有意に多く含まれていた (図 3-3D)。また、上記の GO 解析の結果と一致して、ジャスモン酸応答に関連する遺伝子群も見られたことから、ジャスモン酸が LPR1/LPR1 依存的な Pep1 応答の増強に関与していることが考えられる。

3-4. リン欠乏条件下では PROPEP3 の放出量が増加する

リン欠乏条件において、Pep1 シグナルのうち MAPK 応答と遺伝子応答が増強されることを明らかにしている。次に、リン欠乏条件において Pep シグナルのどのステップが増強されるのかを検証するため、Pep シグナル系の他の既知のシグナル因子が増強されているかについて調べた。まず、Pep 前駆体である PROPEP に着目した。PROPEP ファミリーの中には、病原菌の感染や傷害、または MAMPs や DAMPs を感知すると産生が誘導される分子種が含まれる (Huffaker and Ryan 2007; Tintor et al. 2013)。PROPEP1 は、細胞質においてメタカスパーゼによるプロセッシングを経て Pep となり液胞膜から放出される (Hander et al. 2019; Shen et al. 2019)。PROPEP3 は、細胞死を誘導する Pep1 処理時や病原菌感染時に放出される (Yamada et al. 2016)。このように細胞膜のダメージに伴って放出され、PEPR の細胞外 LRR ドメインで認識されることで免疫応答が誘導されると考えられている。そこで、リン欠乏環境が PROPEP の放出に与える影響を調べるため、Venus タグを付加した PROPEP3 を発現する *pPROPEP3::PROPEP3-Venus* 植物を用いて植物体内および体外 (培地中) の PROPEP3 を GFP 抗体を用いたウェスタンブロッティング解析により検出した。なお、PROPEP3-Venus が機能性を保持していることは確かめられている (Ross et al. 2014)。その結果、植物体内と培地中双方で PROPEP3 が検出された。興味深いことに、植物体内と培地中で分子量が異なる 2 種類の PROPEP3 が検出された (図 3-4)。また、培地中には分子量が大きい PROPEP3 も少量ではあるが放出されていたことから (図 3-4)、PROPEP3 はプロセッシングを受けなくても細胞外へと放出されることが明らかになった。さらに、植物内の PROPEP3 の蓄積量がリン欠乏条件において Pep1 処理後 36 時間に増加していた。また、培地中に放出された PROPEP3 の量はリン欠乏条件において Pep1 処理後 24 時間と 36 時間に増加していた (図 3-4)。このことから、リン欠乏条件においては内生リガンドも増加し、正のフィードバックが働くことで Pep1 応答の増強に寄与していることが考え

られた。また、植物体外画分のタンパク質量（植物組織量ベース）もリン欠乏条件では増えていたことから（図 3-4）、タンパク質全般の放出量が増加している可能性が示唆された。

3-5. PEPR の蓄積や BAK1 との複合体形成はリン欠乏条件においても変化しない

Pep1 の受容体である PEPR1/PEPR2 および共受容体 BAK1 のタンパク質量をウェスタンブロットティングにより測定した。PEPR1/PEPR2 のタンパク質量測定には *pepr1 pepr2 / 35S::PEPR1* または *pepr1 pepr2/35S::PEPR2* をそれぞれ用いた。BAK1 の検出には野生型植物を用いた。その結果、リンの有無によって、PEPR1/PEPR2 および BAK1 のタンパク質量に有意な変化は見られなかった (図 3-5A)。また、リン欠乏条件において PEPR-BAK1 の複合体形成が強化されている可能性を検証するために共免疫沈降解析を行った。その結果、リン欠乏条件においてもリン十分条件と同様にリガンド誘導性の PEPR1-BAK1 複合体形成が起こり、リン条件の変化に応じた差は見られなかった (当研究室の安田博士による、未発表)。なお、Pep による細胞死や免疫応答 (SA 依存的な経路) の誘導は、BAK1 欠損時に増強されることが報告されている (Yamada et al. 2016)。BAK1 は PEPR のシグナル伝達を正に制御するものの、その不在時には、BAK1 に近縁な他の SERK ファミリー分子種が相補してシグナル伝達が行われる一方で BAK1 特異的な細胞死・SA 免疫経路の抑制機構は不活化されるためであると解釈されている。しかしながら、リン欠乏条件においても BAK1 タンパク質の蓄積量に有意な変化は検出されず、BAK1 欠損株である *bak1-3* 植物においてもリン欠乏による Pep1 応答の増強がさらに見られた。これらの結果から、リン欠乏条件での Pep1 応答の増強は BAK1 欠損による Pep シグナルの増強とは異なるメカニズムを介して引き起こされることが示唆された。しかし、BAK1 のキナーゼドメインの点変異でリン酸化活性が低下し、特に PRR のシグナル伝達補助機能が特異的に欠損している *bak1-5* 植物 (Schwessinger et al. 2011) では、栄養十分条件で既に報告されている通り、リン欠乏条件においても Pep1 応答が顕著に低下した (図 3-5B)。よって、リン欠乏条件において PEPR のシグナル伝達が増強される際にも BAK1 のリン酸化活性が必要であることが確認された。

また、*pepr1* 変異体および *pepr2* 変異体を用いて根における Pep1 誘導性のマーカー遺伝子の発現を調べたところ、*pepr1* 変異体においてはマーカー遺伝子の発現が大部分維持されていた一方で、*pepr2* 変異体においてマーカー遺伝子 *CYP71A12* の発現がより顕著に低下した (図 3-5C)。このことから、根における Pep1 応答には PEPR2 がより重要であることが示唆された。さらに、*pepr1 pepr2* 変異体においては Pep1 応答が野生型の Mock 処理と同様であったことから (図 3-5C)、PEPR2 の貢献度合いが高いものの、PEPR1 もリン欠乏条件下での Pep1 応答に必要であることが明らかになった。以上の傾向は、リン十分条件・リン欠乏条件にかかわらず見られた (図 3-5C)。したがって、Pep1 応答が增強されるリン欠乏条件においても PEPR1-PEPR2 の貢献度合いの変化を示唆するような結果は得られなかった。

3-6. リン欠乏条件では Pep1 により BIK1 タンパク質量が増加する

細胞質キナーゼ BIK1 およびそのホモログである PBL1 は、PEPR (複合体) と相互作用し、PEPR による防御応答のシグナル伝達に必要であることが報告されている (Liu et al. 2013; Yamada et al. 2016)。リン欠乏条件において PEPR および BAK1 の蓄積量や複合体形成に変化が見られなかった一方で、MAPK 活性化は増強されていたことからその上流ステップで機能する BIK1 に着目した。*BIK1p::BIK1-HA* 植物 (Zhang et al. 2010) を用いて Pep1 処理時の BIK1-HA のタンパク質量の変化をウェスタンブロットティングにより調べたところ、リン欠乏条件下では BIK1 およびリン酸化型 BIK1 (見かけ上の分子量が大きいバンド) の蓄積量が増加していた (図 3-6A)。このことから、Pep1 応答の増強は一つには BIK1 発現レベルの調節に依存している可能性が示唆された。また、BIK1 に加えて BIK1 と近縁の PBL1 を欠損した *bik1 pbl1* 変異体では、Pep1 処理によるマーカー遺伝子の発現誘導が見られなかったことから (図 3-6B)、BIK1/PBL1 が Pep1 応答に必要であることが確認された。

3-7. Pep1 応答の増強は AGB1 を介した BIK1 タンパク質安定性制御メカニズムに依存する

BIK1 のタンパク質量が増加したメカニズムを探るため、BIK1 の安定性制御に関連する既知の因子に着目した。それぞれの因子を欠損した変異体を用いてリン欠乏条件下での Pep1 応答を調べた。その結果、恒常的に BIK1 の蓄積量が上がっている *cpk28* 変異体と *pub26* 変異体では、リン十分条件において野生型植物と比較して Pep1 応答が増強されていた。さらに、*cpk28* 変異体ではリン欠乏条件において野生型と同様に Pep1 応答がさらに増強する傾向が見られた (図 3-7)。この結果から、リン欠乏条件下での BIK1 タンパク質量の増加はこれら既知の経路・因子と異なる経路で働く因子に依存する可能性が示唆された。一方、BIK1 の分解が促進され、恒常的に BIK1 蓄積量が低下している *agb1* 変異体では、マーカー遺伝子の発現について Pep1 誘導性が顕著に見られなかった (図 3-7)。この結果は、PEPR のシグナル伝達に BIK1 が必要であるという結果 (図 3-6B) と合致する。なお、*pub26* 変異体ではリン欠乏条件において有意な Pep1 応答の増強が見られなかった。この点に関しては、上記と同様の実験を PUB26 およびそれと冗長的に働く PUB25 を同時に欠損した *pub25 pub26* 変異体で現在進めている。この結果により、PUB25/PUB26 の関与について明らかにできると考えている。

4. 考察

4-1. リン欠乏条件における Pep1 応答の増強は、LPR1/LPR2 を介したリン欠乏応答経路が必要である

植物は免疫応答を環境変動に応じて調節することで、微生物との相互作用様式を最適化し、環境適応に役立てている。本研究では、植物が微生物共生を促す栄養枯渇ストレス条件において、どのようにして自身の免疫を調節して病原菌を防除するかについて重要な知見を得ることができた。栄養条件に応じた植物の免疫制御に関して、これまでも、植物のリン欠乏応答 (PSR) を制御するマスター転写因子 PHR1 とそのパラログ PHL1 がリン欠乏時に免疫応答を負に制御することが報告されていた (Castrillo et al. 2017)。本研究においては、リン栄養条件依存的な免疫応答トランスクリプトームプロファイルを取得し、PHR1 と PHL1 が植物成長に関連した遺伝子群を正に制御する一方で、免疫応答遺伝子群を負に制御すること (後述) を明らかにした。これらの結果は先行研究とも一致する。一方で、本研究では、フェロオキシダーゼ LPR1 と LPR2 が制御する PSR がリン欠乏条件において免疫応答を正に制御することを新たに見出した。これまでに LPR1/LPR2 経路はリン欠乏条件での主根の伸長抑制に必要であることが報告されていたが (Svistonoff et al. 2007)、主根の伸長抑制が植物のリン欠乏適応にどのように寄与するのか、その意義や他にも機能を有しているのかについては不明であった。本研究により LPR1/LPR2 経路はリン欠乏条件において、病原菌に対して選択的に活性化される Pep1 応答を増強させることで、病原菌の侵入・感染に応じて免疫応答を強化する新たな機能を有していることが明らかになった。また、RNA-seq の結果から、リン欠乏条件における Pep1 遺伝子発現応答の多くが LPR1/LPR2 経路に依存する一方で、PHR1/PHL1 経路により負に制御されていることが示唆された。これに関連して、*phr1 phl1* 変異体においてはリン欠乏条件での *flg22* 誘導性の防御応答遺伝子の発現が野生型と比較して上昇し、その多くの遺伝子群のプロモー

ター領域に PHR1 が直接結合するとの報告もある (Castrillo et al. 2017) 。これらの結果は、リン欠乏時において LPR1/LPR2 経路が Pep1 誘導性免疫を活性化する一方で、PHR1/PHL1 経路が Pep1 応答を含む PTI 全般に抑制的に働く一面を持つことを示唆している。もしくは、*phr1 phl1* 植物では体内のリン獲得率や利用効率が低下してリン欠乏状態が強まることが予想され、それを反映して間接的に Pep1 応答が増大している可能性もある。ただし、もしその仮説が正しいとすると、LPR1/LPR2 経路が体内のリン栄養状態の感知・応答に関与することが予想され、旧来のモデルに修正を迫ることになる。いずれにしても、両経路を同時に欠損した多重変異体の解析などさらなる解析が待たれる。

しかし、*phr1 phl1* と *lpr1 lpr2* において Pep1 処理時に野生型植物と比較して発現が低下した遺伝子に関して GO 解析を行ったところ、LPR1/LPR2 経路と PHR1/PHL1 経路の制御下にある遺伝子セットに違いが見られた。*phr1 phl1* 植物では根の形態形成に関連する遺伝子や細胞壁に関連する遺伝子が低下していた一方で、*lpr1 lpr2* 植物では防御応答遺伝子の発現が低下していた。先の研究においても LPR1/LPR2 は SIZ1 による制御から独立していることが示唆されており (Wang et al. 2010) 、LPR1/LPR2 経路と PHR1/PHL1 経路は互いに独立に機能することが考えられた。以上から、リン欠乏条件において LPR1/LPR2 経路と PHR1/PHL1 経路が、それぞれ独自に発現を制御する Pep1 応答性遺伝子セットに加えて、両者が発現を逆方向に制御する Pep1 応答性遺伝子も存在すること明らかになった。この結果は、両 PSR 経路が複雑に影響し合いながらリン欠乏環境において免疫応答を調節している実態を明らかにしただけではなく、今後の解析に有用なマーカー遺伝子を提供するものである。

本研究の RNA-seq において同定した、Pep1 処理時に発現が上昇する遺伝子群について、病原菌 *Ci* 感染と共生菌 *Ct* 感染に対する応答性を調べた RNA-seq データ (Hacquard et al. 2016) と照合した結果、病原菌 *Ci* 感染時には発現が上昇する一方で共生菌 *Ct* 感染時には発現が低いままであることがわかつ

た。病原菌 *Ci* は植物への感染時に激しい根の組織破壊を伴うことが報告されている (Hacquard et al. 2016)。また、PROPEP は、細胞破壊時や細胞死誘導時に放出が増大することも報告されている (Yamada et al., 2016; Hander et al. 2019)。当研究室では、野生型植物と同等の抵抗性が *phr1 phl1* 植物でも保持されているものの *phr1 phl1 pepr1 pepr2* 植物では著しく低下することを見出している (田中 修論, 2018)。したがって、少なくとも PHR1/PHL1 経路の非存在下において、PEPR が *Ci* 抵抗性に寄与することが示唆される。一方で、共生菌 *Ct* の感染時には顕著な組織破壊は伴わず、*pepr1 pepr2* 植物においても共生菌 *Ct* による成長促進効果は正常に見られており (当研究室、未発表)、PEPR が共生菌 *Ct* の感染制御には関与する遺伝学的証拠は得られていない。以上から、植物は、リン欠乏条件においても組織破壊による Pep1 等 DAMP の細胞外への流出を病原菌感染の指標の一つとして防御応答を強く誘導することが示された。この仕組みは同時に、組織破壊を伴わない共生菌感染時には防御応答を低く維持する上でも寄与しており、共生菌の許容を促進することにもつながると考えられた。

興味深いことに、リン欠乏条件においては PROPEP3 だけではなく、放出量が増加している他のタンパク質が認められた。細胞破壊無しに、シグナルペプチドを持たない Pep ペプチドが放出されるメカニズムは未だ明らかになっておらず、未知の機構が存在すると考えられる。リン欠乏条件では細胞膜のリン脂質が減少し糖脂質へと変化することが知られている (Nakamura 2012)。これにより細胞膜の性質が変化しダメージが生じた場合と類似した状況が生じた結果、タンパク質が細胞外へと出やすくなっている可能性も想定された。また、リン欠乏条件では植物組織内に分子量が大きい (おそらく完全長の) PROPEP3 が増加するのに伴い、植物組織外に分子量が小さい PROPEP3 が増加した。この結果から、PROPEP のプロセッシングが起こるのが細胞内または細胞外であるかは不明ではあるものの、少なくともそれがリン欠乏により増強していることが示唆された。

4-2.リン欠乏条件における Pep1 応答の増強は新規のメカニズムを介する

FLS2 や EFR、PEPR は、リガンドを結合すると直ちに共受容体 BAK1 と複合体を形成することでシグナル伝達を行う。FLS2 のシグナル伝達は BAK1 非存在下で機能が損なわれる一方で、PEPR ではシグナル伝達が維持されるだけでなく細胞死の亢進といった Pep 応答が増強されることが報告されている (Yamada et al. 2016)。また、アブラナ科炭疽病菌 *Colletotrichum higginsianum* の感染後期には BAK1 タンパク質量が低下するとともに、それによる PEPR シグナル系の増強が病害抵抗性に重要であることが報告されている (Yamada et al. 2016)。一方で、本研究では、リン欠乏条件においても PEPR および BAK1 のタンパク質量が変化しなかった。また、*bak1-3*においてもリン欠乏による Pep1 応答の増強が BAK1 欠損による増強にプラスして見られたことから、BAK1 の機能不全による PEPR シグナル系の増強とは異なるメカニズムが関与していることが示唆された。

これまでに、免疫応答に重要な植物ホルモンであるエチレンに対して非感受性となる *ein2* 植物では FLS2 発現量が低下するとともに EFR を介した elf18 応答も低下する一方で、Pep に対する遺伝子発現応答は維持されることが報告されている (Tintor et al. 2013)。これらのことから、PEPR シグナル系は MAMP 応答の低下に伴う植物にとって危機的な状況において免疫応答を補完・増強する役割があることが示唆されていた。リン欠乏時の Pep1 による遺伝子発現応答を RNA-seq により調査した結果、大部分の PEPR シグナル依存的な防御関連遺伝子の発現がリン欠乏環境において増強されることが明らかになった。したがって、PEPR シグナル系は、構造的に類似した他の PRR を介した MAMP 応答経路と比較して、免疫応答の低下時や栄養枯渇条件など、植物にとって危機的状況で活性が保持・強化されるユニークな性質を有していることが明らかとなった。

これまでに BAK1 除去時にも PEPR シグナルが増強されることは報告されていたが、リン欠乏環境では BAK1 タンパク質の増加が起り BAK1 除去時の

PEPR シグナル増強に上乘せされる形でさらなるシグナル増強が起きることが示された。これに関して、リン欠乏条件では *BIK1* の発現量が増加することが報告されているものの (Zhang et al. 2016)、本研究では Pep1 応答の増強が見られるリン欠乏条件においてもリン十分条件と比較して *BIK1* の発現量に有意な増加は見られなかった。本研究と先行研究との見かけ上の齟齬については、研究室間でのリン濃度や観察しているタイムポイントの違いといった実験条件の不一致によるものと考えている。しかしながら、*BIK1* 安定性を制御する因子である CPK28 や PUB26 を欠損し、*BIK1* 発現量が恒常的に上昇した植物においてもリン欠乏条件において Pep1 応答のさらなる増強が見られた。すなわち、これらの *BIK1* タンパク質の安定性制御経路とは異なるメカニズムも PEPR シグナル増強に寄与していることが示唆され、複数の制御ステップを介して *BIK1* 発現レベルが上昇していると考えられる。なお、*BIK1* は多くの PRR 複合体の下流で働くものの、キチン受容体である CERK1 の下流では PBL27 が MAPK のリン酸化に必要であることが知られている (Yamada et al. 2016)。また、flg22 誘導性の MAPK の活性化には *BIK1/PBL1* への依存性は低いことが報告されている (Feng et al. 2012)。一方、PEPR による免疫応答の誘導には *BIK1/PBL1* は必須である (Yamada et al, 2016)。この、*BIK1* 要求性に関する PRR 間の差異は、リン欠乏条件において *BIK1* 発現レベルの増加が、多数の PRR のシグナル伝達を広範に増強するのではなく、特定の応答経路 (特にダメージ誘導性の PEPR 経路) の増強に顕著に働く結果と合致している。PEPR シグナル系が、生化学的特徴が類似した PRR やシグナル制御因子 BAK1・*BIK1* 等を概ね共有しながらもどのようにして上記のような細胞環境で機能を保持あるいは活性化しているのか、分子メカニズムの解明が待たれる。

リン欠乏環境において、往々にして植物はリン栄養獲得を補助する微生物との共生に依存して適応を進める。その際、共生菌を含む微生物全般に反応し得る MAMP 応答を低下する一方で、病原菌に対して特異的・選択的に免疫活性化を誘導する DAMP 応答への依存度を高めている可能性が推察される。根圏微

生物叢は、しばしば MAMP 誘導性応答を抑制する機構を有していることが近年報告されていることから (Garrido-Oter et al. 2018; Yu et al. 2019) 、病原菌感染時に特異的に活性化する DAMP 応答への依存度を高めることは共生菌を受容しつつ病原菌を排除する戦略上理にかなっていると考えられる。

4-3.リン欠乏条件における病原菌抵抗性には LPR1/LPR2 と PHR1/PHL1 の両経路が寄与する

本研究において発見した、リン欠乏環境における Pep1 応答の増強の意義を調べるため、当研究室において *Colletotrichum incanum* (*Ci*)の感染実験が行われた(田中 修論, 2018)。これまでにリン欠乏条件においても、共生菌 *Ct* に対してとは異なり病原菌 *Ci*に対して防御関連遺伝子の発現誘導が高まることは報告されていたが(Hacquard et al. 2016)、分子制御メカニズムについては明らかになっていなかった。リン欠乏条件で野生型植物と PEPR や PSR 制御因子を欠損する変異体における *Ci*の感染量を比較したところ、*phr1 phl1* や *lpr1 lpr2*、*pepr1 pepr2* といった変異体では有意な差が見られなかった。一方で、*phr1 phl1 lpr1* 変異体では感染量の増加が見られ、*phr1 phl1 pepr1 pepr2* 変異体では *phr1 phl1 lpr1* 変異体と比較してもさらに感染量が増加した。この結果から、リン欠乏条件での病原菌に対する抵抗性に関して、少なくとも PHR1/PHL1 経路の非存在下では PEPR が寄与していること、並びに LPR1/LPR2 経路のみならず PHR1/PHL1 経路も相補的に寄与していることが推察された。

一方で、*phr1 phl1* 変異体では、野生型と比較して Pep1・flg22 誘導性がさらに上昇する傾向を示す遺伝子群の存在が認められた。したがって、*phr1 phl1* 変異体においてはリン欠乏時にさらに PTI 応答が増強されることで *Ci* 感染が抑制されていることが考えられた。しかし、*phr1 phl1* 変異体では *Ci* と近縁な共生菌である *Ct* の感染量が増加することから(Hiruma et al. 2016)、PHR1/PHL1 経路が既知の PTI とは異なるメカニズムで真菌の感染の抑制に働く可能性も考えられる。

また、*phr1 phl1 lpr1 lpr2* 変異体は無菌の栄養十分培地では野生型と同様に生育するが、栄養十分土壌においては野生型と比較して生育が著しく阻害されるとの予備的結果も当研究室において得られている(未発表)。一方で、*phr1 phl1* や *lpr1 lpr2* 変異体では *phr1 phl1 lpr1 lpr2* 変異体ほど顕著な生育の阻害

は見られない。このことから、LPR1/LPR2 と PHR1/PHL1 の両経路はリン欠乏応答を制御するだけでなく栄養十分条件における土壌・根圏微生物群との相互作用およびそれに付随する植物成長にも独立に寄与している可能性が考えられた。

4-4. PEPR1/PEPR2 経路はリン欠乏応答に寄与する

本研究では、植物のダメージ応答の一つである Pep 応答がリン欠乏応答シグナルにより増強されることを見出した。また、Pep 応答性遺伝子の多くが無リン条件で発現が誘導されており、本研究で用いた防御応答のマーカー遺伝子 *CYP71A12* もリン欠乏応答性を示した。さらに、本研究で行なった RNA-seq の中でリン欠乏に応答性を示す遺伝子群（クラスター7）に着目すると、既知の PSR 制御因子を欠損した *phr1 phl1* 変異体植物や *lpr1 lpr2* 変異体植物だけではなく Pep 受容体を欠損した *pepr1 pepr2* 変異体植物においても発現が低下する傾向が見られた。このことは、PEPR1/PEPR2 経路が、おそらく免疫応答とは独立して PSR 応答そのものに貢献していることを示唆する。本研究の発見と関連して、先の研究においても PEPR2 が RLK である CLV2 とともにリン欠乏条件での主根の伸長抑制を制御することが報告されている（Gutiérrez-Alanís et al. 2017）。これらのことから、PEPR シグナルは免疫制御の際以外にもリン欠乏応答シグナルと相互に影響を与えることが考えられた。クラスター7の遺伝子群には、リン酸トランスポーター（PHT1s）や PHF1, PHO1 ファミリーに属する PHO1;H1 が含まれていたことから、PEPR1/PEPR2 がこれらの発現制御を介してリン吸収に寄与する可能性が考えられた。PEPR1/PEPR2 経路が PSR にどのように関与するのかを明らかにするには今後の研究が必要である。しかしながら、本研究で示したようにリン欠乏条件においては Pep1 処理により誘導された PROPEP3 の細胞外放出が増大していた。また、Pep1 処理無しでもリン欠乏条件においてはタンパク質の放出が全般に亢進されたことから、同条件において発現している内生 PROPEP 分子種の放出が促進され、PEPR シグナル系の活性化ひいてはリン欠乏環境の認識もしくはそれに対する応答に寄与していることが考えられる。

4-5.本研究の結論・展望

本研究結果より、リン欠乏条件において植物は LPR1/LPR2 依存的に PEPR シグナルを増強させることが明らかになった。これにより、植物はリン欠乏環境を感知すると、同 PSR 経路を介して病原菌に対しては積極的に防御応答を活性化させる準備を整えていることが新たに示された。すなわち、LPR1/LPR2 が免疫応答の制御に果たす新たな機能を発見することができた。

一方で、PEPR 経路と LPR1/LPR2 経路をつなぐ分子リンクは未だ不明であり、今後の研究で明らかにしていく必要がある。方法としては、本研究で行った RNA-seq のデータをもとに LPR1/LPR2 で正に制御され PHR1/PHL1 には負に制御される遺伝子に着目し解析を進めることが考えられる。これ以外にも、鍵因子である BIK1 や LPR1/LPR2 と相互作用する因子の探索、マーカー遺伝子の発現を指標とした変異体の探索がメカニズムの解明に役立つと考えられる。

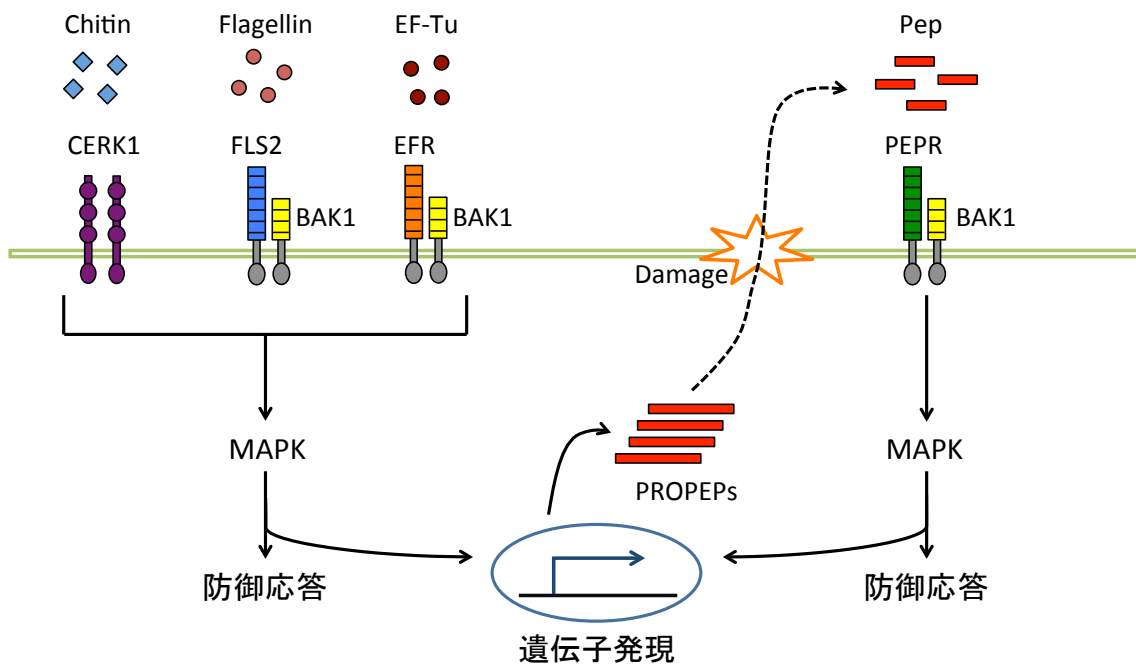


図1-1. PRR を介した植物の防御応答機構

植物は細胞膜に局在する PRR を介して微生物を感知する。細菌の鞭毛に由来するフラゲリンは FLS2、翻訳伸長因子 EF-Tu は EFR、真菌の細胞壁成分であるキチンは CERK1 にそれぞれ認識される。加えて、植物由来の DAMP であり PROPEPs 前駆体から形成される Pep は細胞へのダメージなどにより細胞外へ流出し、PEPR により認識され防御応答 (MAPK の活性化や防御関連応答遺伝子の誘導など) を誘導する。

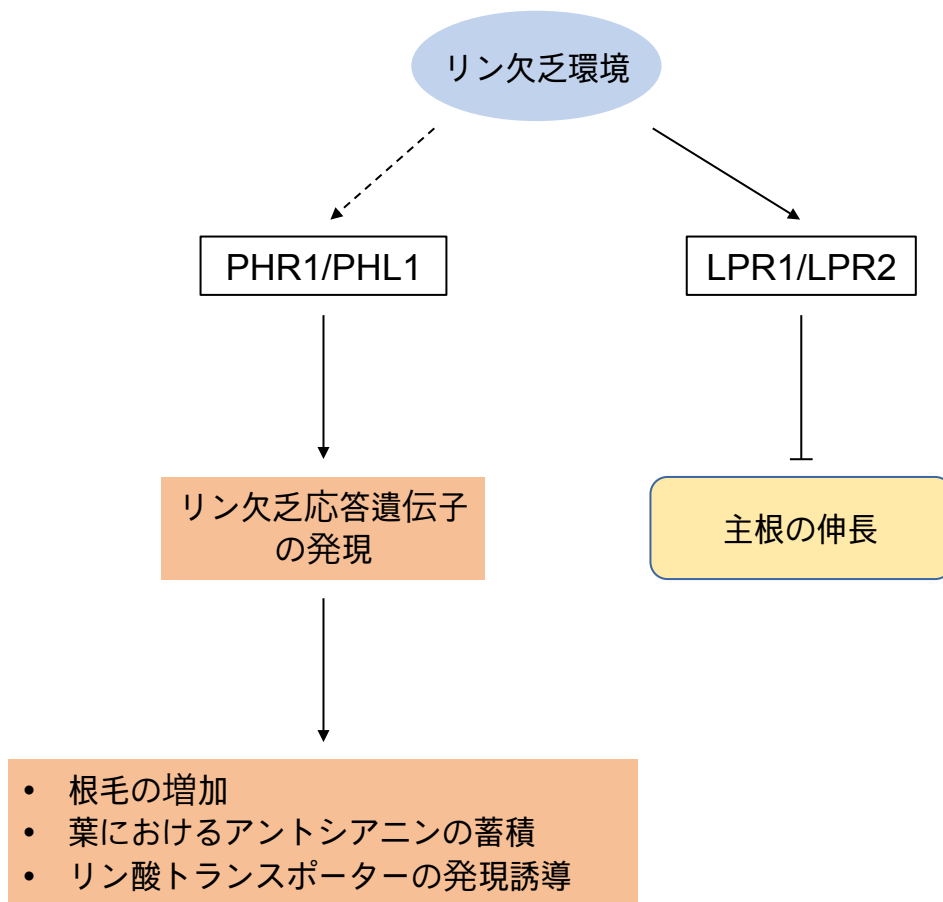


図1-2. リン欠乏環境の認識および応答の制御

リン欠乏環境において、転写因子である PHR1 および PHL1 はリン欠乏応答遺伝子の発現の多くを制御することで根毛の増加などのリン欠乏応答を誘導する。 LPR1/LPR2 は特に根端において体外環境のリン欠乏状態を認識し、主根の伸長を抑制する。

変異体名	publications / Public stock No.
<i>phr1 ph11</i>	SAIL_731_B09
<i>lpr1 lpr2</i>	SALK_016297, SALK_091930
<i>pho1</i>	Poirier et al. 1991
<i>pho2</i>	Delhaize et al. 1995
<i>phf1</i>	González et al. 2005
<i>35S::PEPR1-FLAG</i>	Yamada et al. 2016
<i>35S::PEPR2-FLAG</i>	Yamada et al. 2016
<i>pepr1-2</i>	SALK_059281
<i>pepr2-3</i>	SALK_059281
<i>pepr1-1 pepr2-3</i>	ABRC
<i>bak1-3</i>	SALK_034523
<i>bak1-5</i>	Schwessinger et al. 2011
<i>BIK1p::BIK1-HA</i>	Zhang et al. 2010
<i>bik1 pbl1</i>	SALK_005291C, SAIL_1236_D07
<i>cpk28</i>	Wang et al. 2018
<i>pub26</i>	Wang et al. 2018
<i>agb1</i>	Wang et al. 2018

表2-1. 本研究に用いた変異体

	最終濃度	
	リン十分条件	リン欠乏条件
MgSO ₄ ·7H ₂ O	750	750
KH ₂ PO ₄	625	10
NH ₄ NO ₃	10300	10300
KNO ₃	9400	9400
CaCl ₂ · 2H ₂ O	1500	1500
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.055	0.055
CuCl ₂ · 2H ₂ O	0.053	0.053
H ₃ BO ₃	50	50
KI	2.5	2.5
MnCl ₂ · 4H ₂ O	50	50
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.52	0.52
ZnCl ₂	15	15
Na-Fe-EDTA	75	75
MES pH5.5	1000	1000
KCl	0	615

表2-2. リン条件培地の組成

Primer name	Sequence
ACTIN_forward	ACCTTGCTGGACGTGACCTTACTGAT
ACTIN_reverse	GTTGTCTCGTGGATTCCAGCAGCTT
CYP71A12_forward	GATTATCACCTCGGTTCCT
CYP71A12_reverse	CCACTAATACTTCCCAGATTA

表2-3. 本研究の qRT-PCR 解析に用いたプライマー

抗体名	提供元
抗活性化 MAPK 抗体	Cell Signaling Technology
抗 BAK1 抗体	Agrisera
抗 FLAG 抗体	SIGMA-ALDRICH
抗 HA 抗体	Roche
抗 RPN6 抗体	Agrisera
抗ウサギ二次抗体 HRP 標識	Cell Signaling Technology
抗マウス二次抗体 HRP 標識	Cell Signaling Technology

表2-4. 本研究で用いた抗体

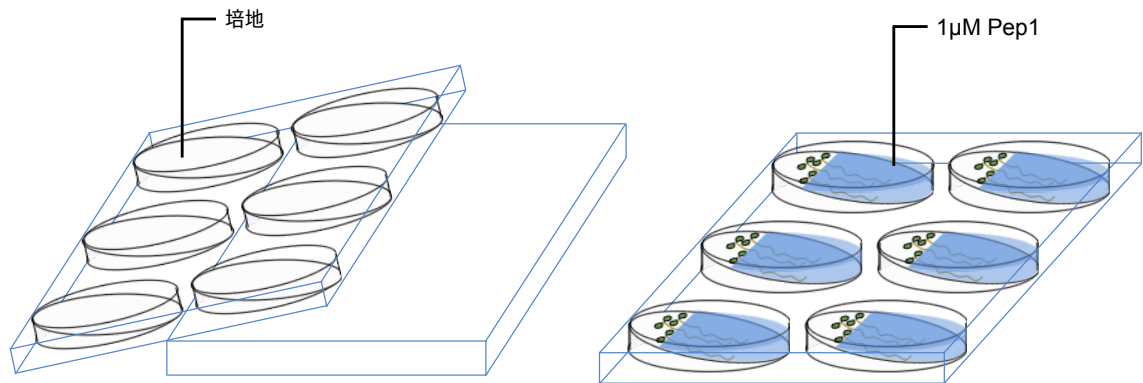


図2-1. 貧栄養条件培地の作成および Pep1 処理の方法

貧栄養条件培地を6ウェルプレートに加えた後、傾斜をつけて固まらせることで1 μM Pep1 処理時に植物の根の部分だけが Pep1 溶液に浸るようにした。

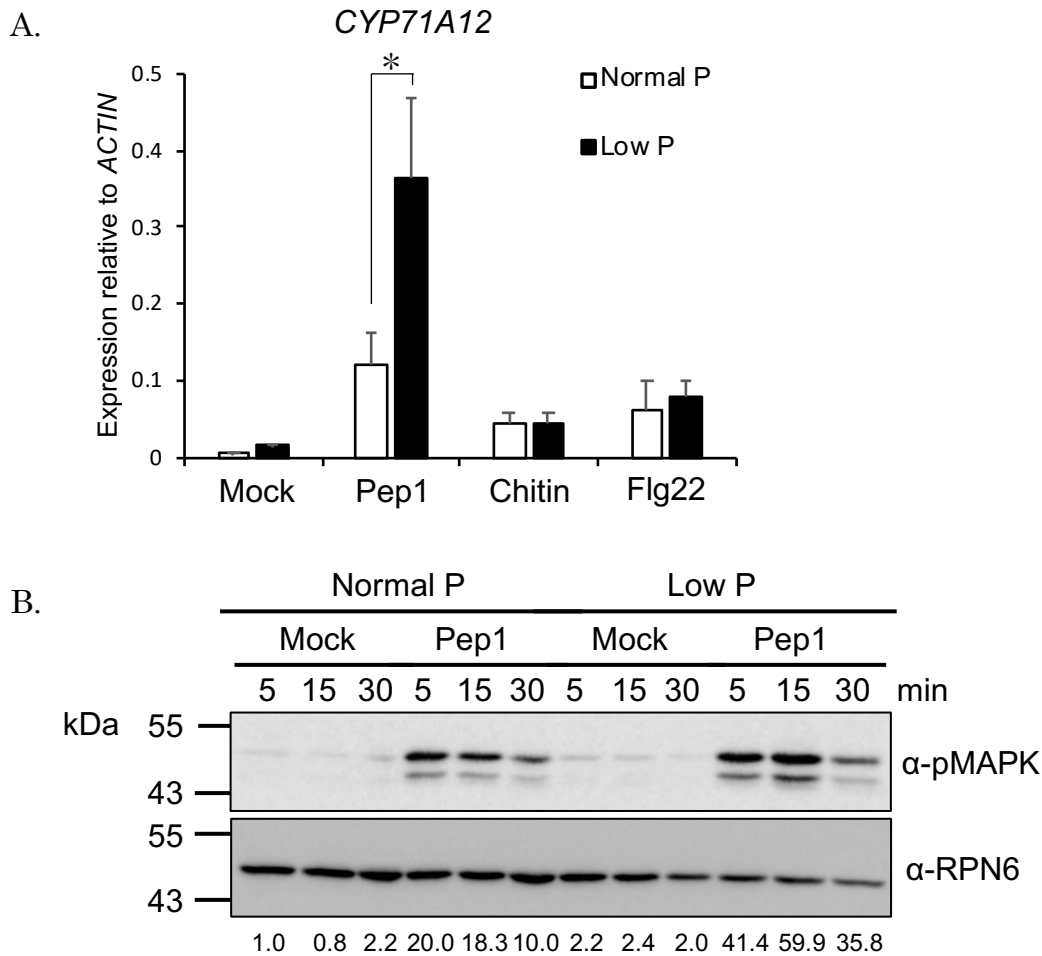
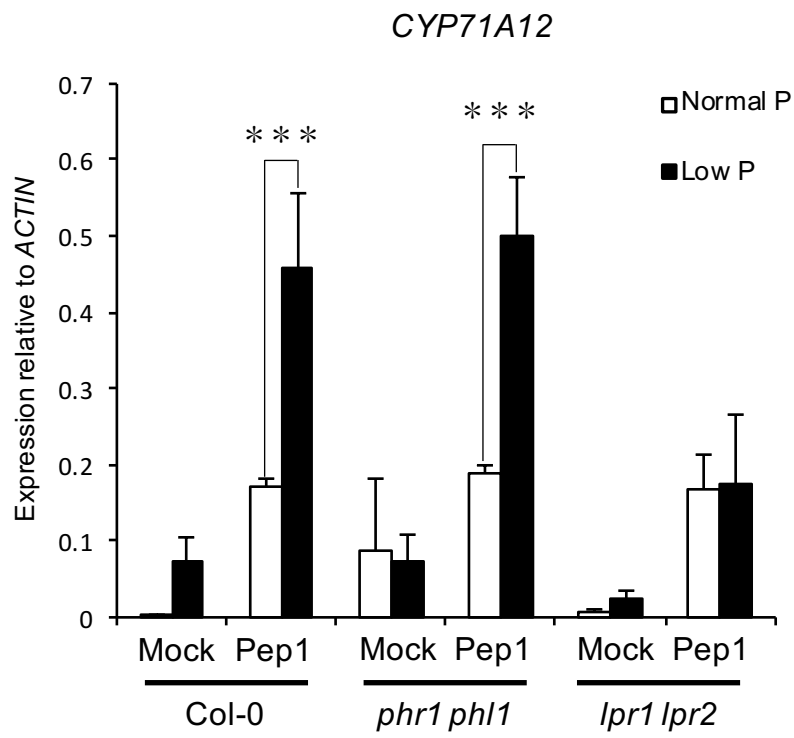


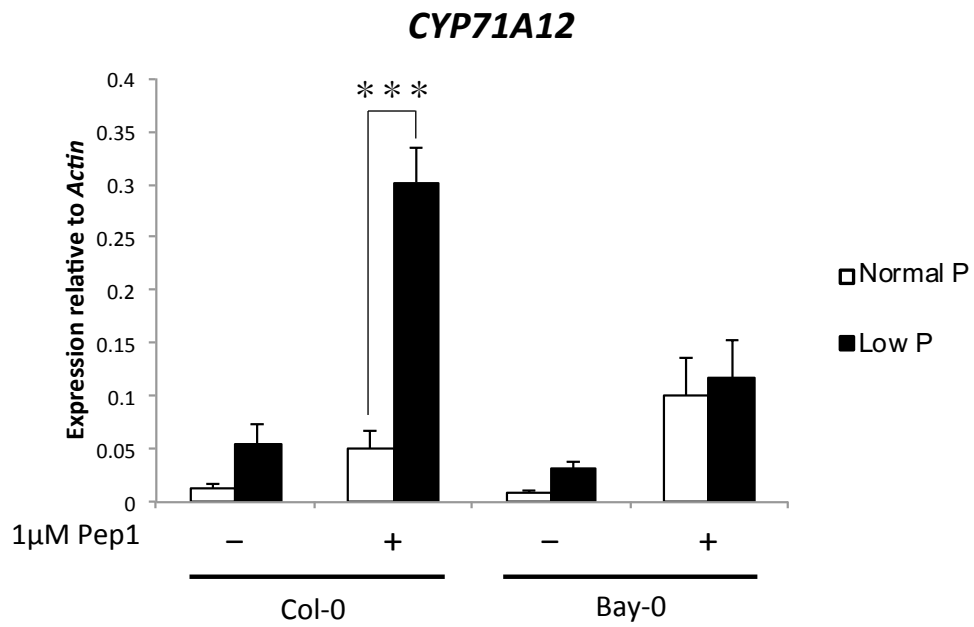
図3-1. リン欠乏条件下では Pep1 処理による防御応答遺伝子の発現と MAPK の活性化が増強する

- A. 標準栽培条件で 7 日、リン欠乏条件において 3 日生育した植物に対しそれぞれの MAMP (Chitin もしくは Flg22) および DAMP (Pep1) (1 μ M) を処理し 6 時間後の *CYP71A12* 遺伝子の発現量を植物の *ACTIN* 遺伝子を基準にして qRT-PCR を用いて調べた。同様の結果が独立した 3 回の実験から得られた。
* : $p < 0.05$ (Two-tailed T-test)
- B. 標準栽培条件で 7 日、リン欠乏条件で 3 日生育した植物に対し 1 μ M Pep1 を処理し各時間における MAPK の活性化 (リン酸化 MAPK) をウェスタンブロッティングにより調べた。ローディングコントロールとして RPN6 を用いた。下の数値は pMAPK のバンド濃度を定量化した数字を RPN6 のそれで割った後、リン十分条件の Mock 処理後 5 分の数値で標準化したものである。同様の結果が独立した 3 回の実験から得られた。

A.



B.



C.

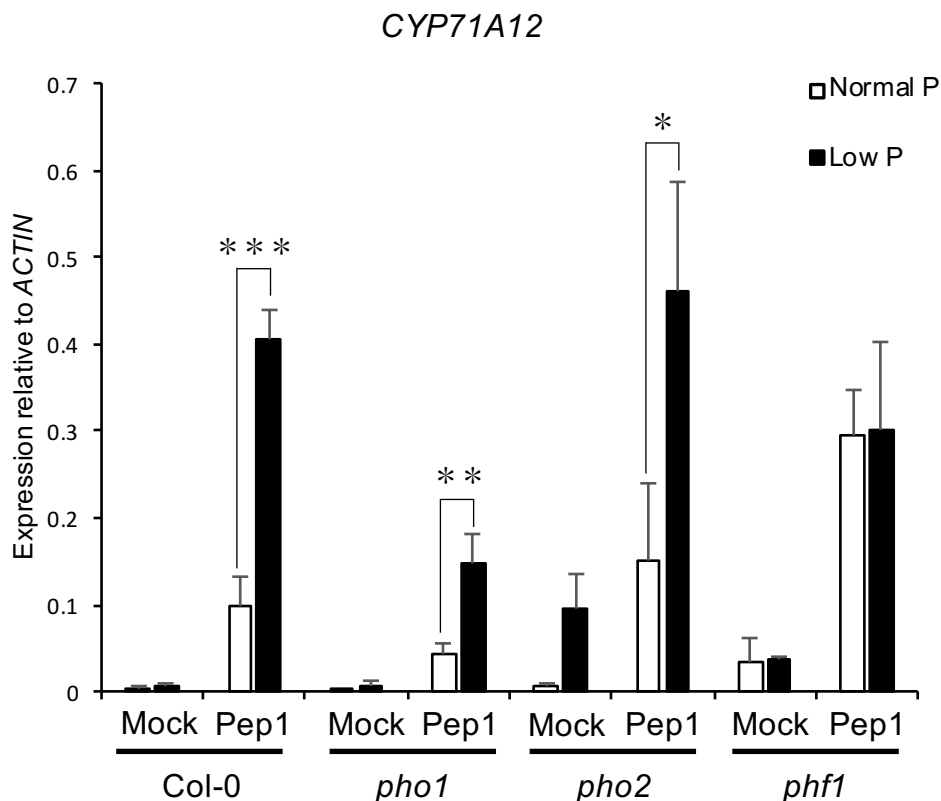
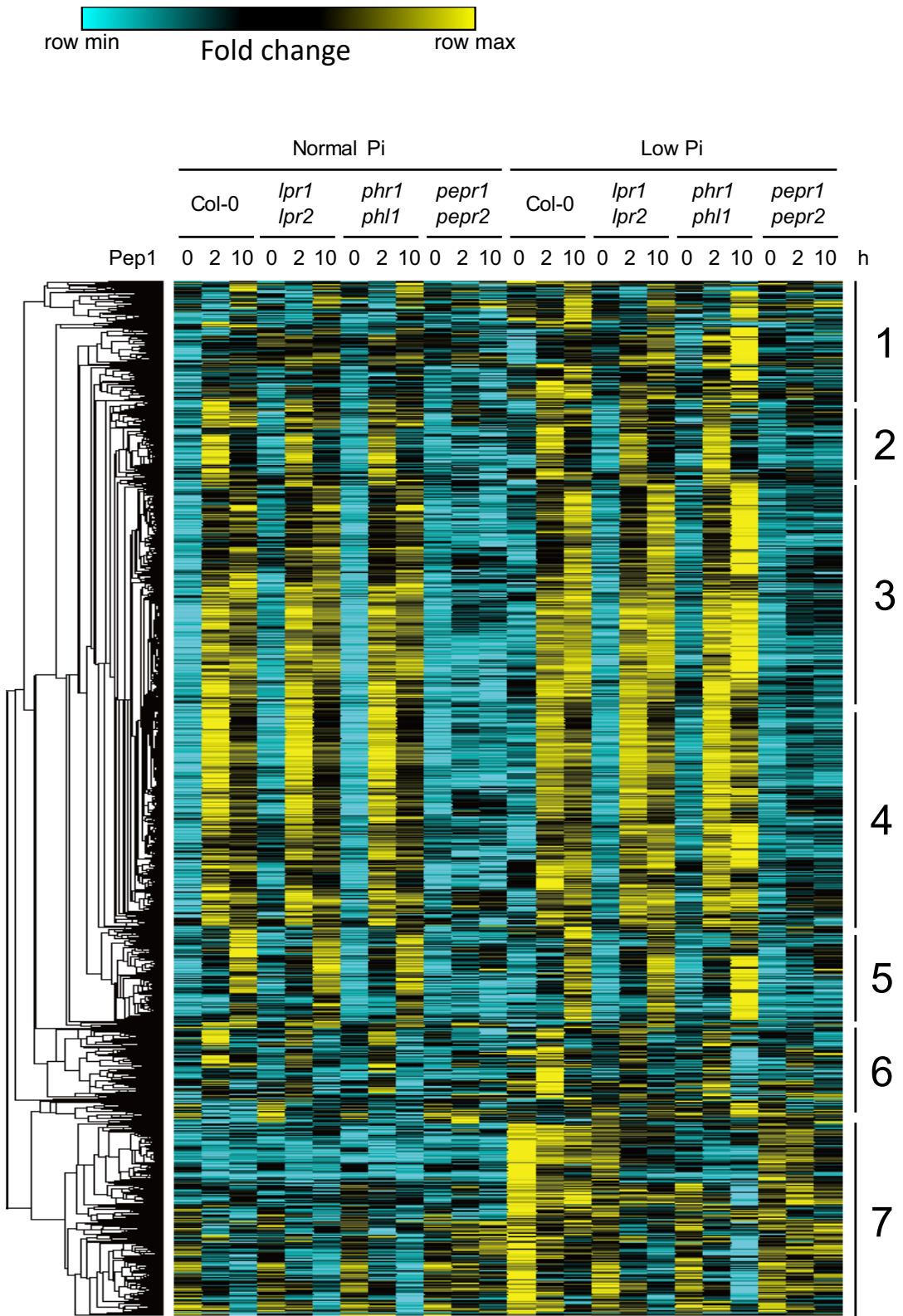


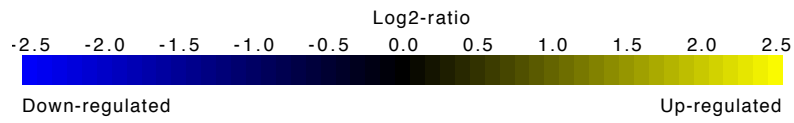
図3-2. LPR1/LPR2 はリン欠乏条件における Pep1 応答の増強に必要である

- A. 標準栽培条件で7日、リン欠乏条件において3日生育した植物に対し1 μM Pep1 を処理し6時間後の *CYP71A12* 遺伝子の発現量を qRT-PCR を用いて調べた。
同様の結果が独立した3回の実験から得られた。
*** : $p < 0.005$ (Two-tailed T-test)
- B. 標準栽培条件で7日、リン欠乏条件において3日生育した植物に対し1 μM Pep1 を処理し6時間後の *CYP71A12* 遺伝子の発現量を qRT-PCR を用いて調べた。
同様の結果が独立した3回の実験から得られた。
*** : $p < 0.005$ (Two-tailed T-test)
- C. 標準栽培条件で7日、リン欠乏条件下において3日生育した植物に対し1 μM Pep1 を処理し6時間後の遺伝子発現量を qRT-PCR を用いて調べた。
同様の結果が独立した3回の実験から得られた。
* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.005$ (Two-tailed T-test)

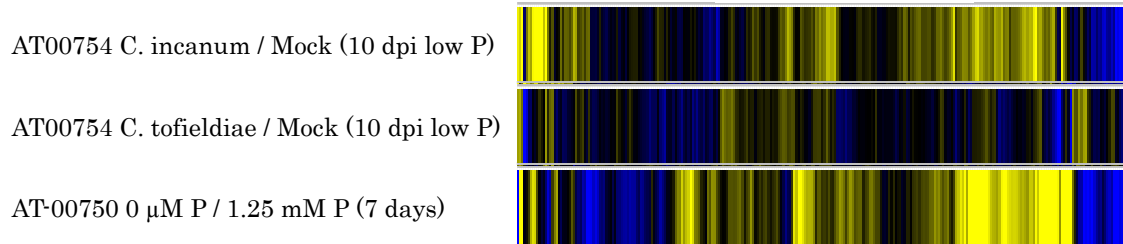
A.



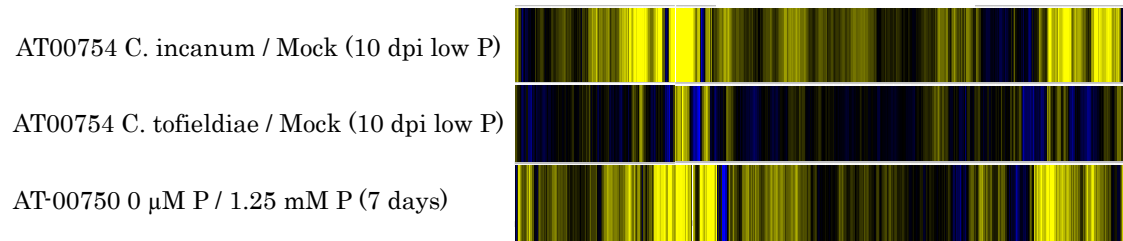
B.



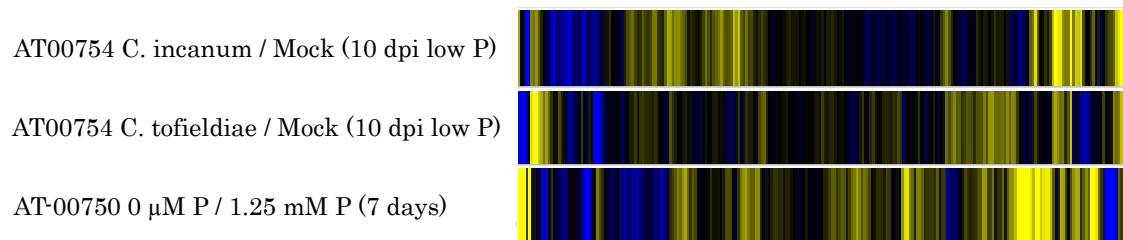
Cluster 1



Cluster 3



Cluster 6



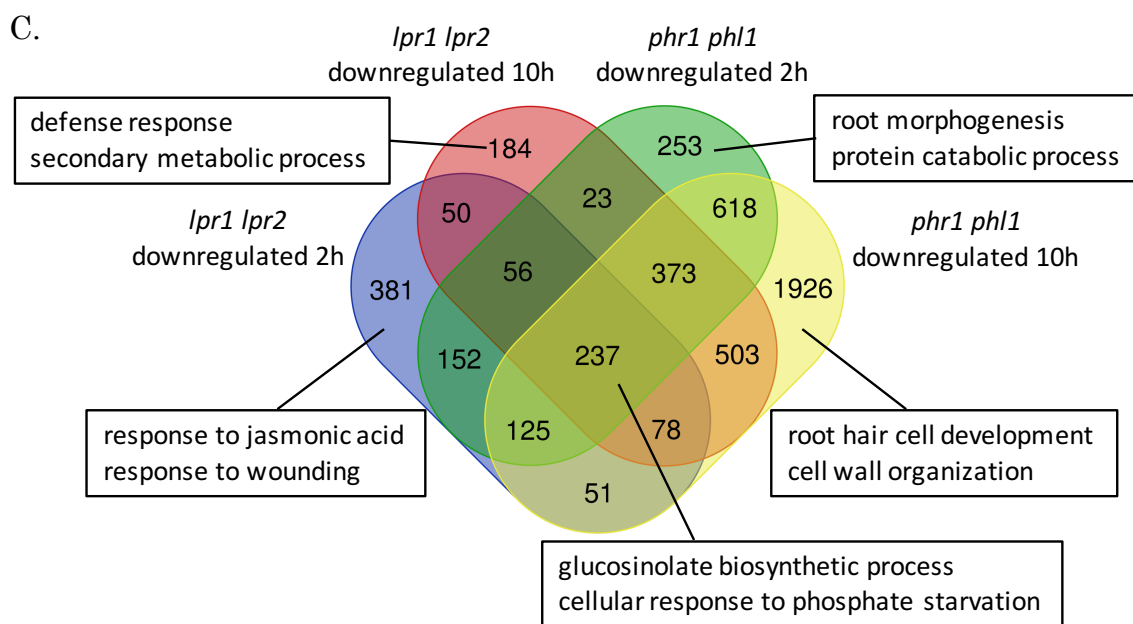


図3-3. PSR 関連変異体を活用したトランスクリプトーム解析

標準栽培条件で7日、リン欠乏条件下において3日生育した植物に対し $1 \mu\text{M}$ Pep1 を処理し 2, 10 時間後の植物サンプルの根を回収しトランスクリプトーム解析に供した。

- A. RNA-seq から得られた情報を元に、リン十分条件における野生型植物の Mock 処理時と比較して Pep1 応答時に有意に発現が上昇していた 1829 遺伝子群、リン十分条件と比較してリン欠乏条件下で有意に発現が上昇した 1113 遺伝子群、さらには、Pep1 処理時に *pepr1 pepr2* 変異体と比較して野生型植物で有意に発現が上昇していた 2076 遺伝子群を抽出した。野生型植物のリン十分条件での Mock 処理時 (0h) の値を基準として Fold change を算出しヒートマップで可視化した。
- B. ヒートマップにおいてリン欠乏条件下で発現が上昇する Pep1 応答遺伝子の *Ci* または *Ct* 感染時の発現量およびリン欠乏条件下での発現量を、Genevestigator を用いて調べた。*Ci* または *Ct* 感染時の発現量は Genevestigator の Hacquard et al. 2016 のデータを参照した。リン欠乏条件下での発現量は Sun et al. 2016 を参照した。
- C. *phr1 phl1* および *lpr1 lpr2* においてリン十分条件とリン欠乏条件それぞれにおいて Pep1 処理後の各タイムポイントで有意に ($p < 0.05$) 発現が低下した遺伝子を選び、ベン図を作成した。その後 GO 解析を行った。

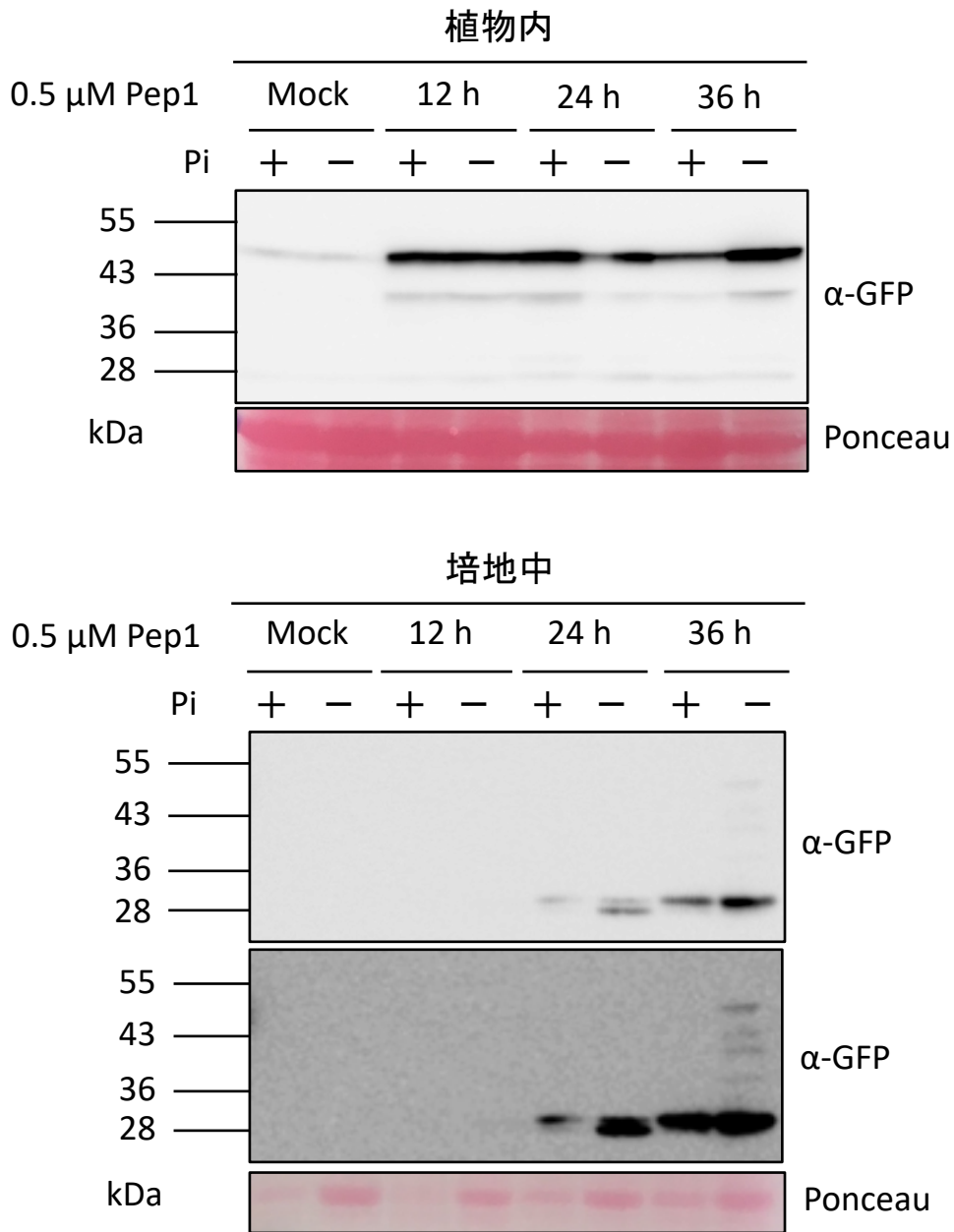


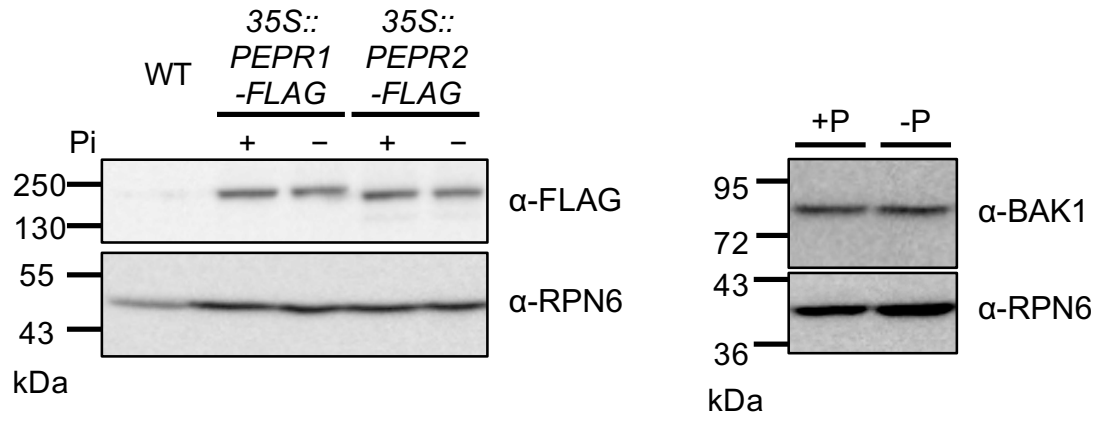
図3-4. リン欠乏条件では PROPEP3 の放出量が増加する

標準栽培条件で 7 日、リン十分液体培地において 10 日生育した後、培地をリン十分またはリン欠乏液体培地と交換し、24 時間後に植物に対し 0.5 μ M Pep1 を処理し各時間後のサンプルに対し GFP 抗体を用いたウェスタンブロットティングによる解析を行った。

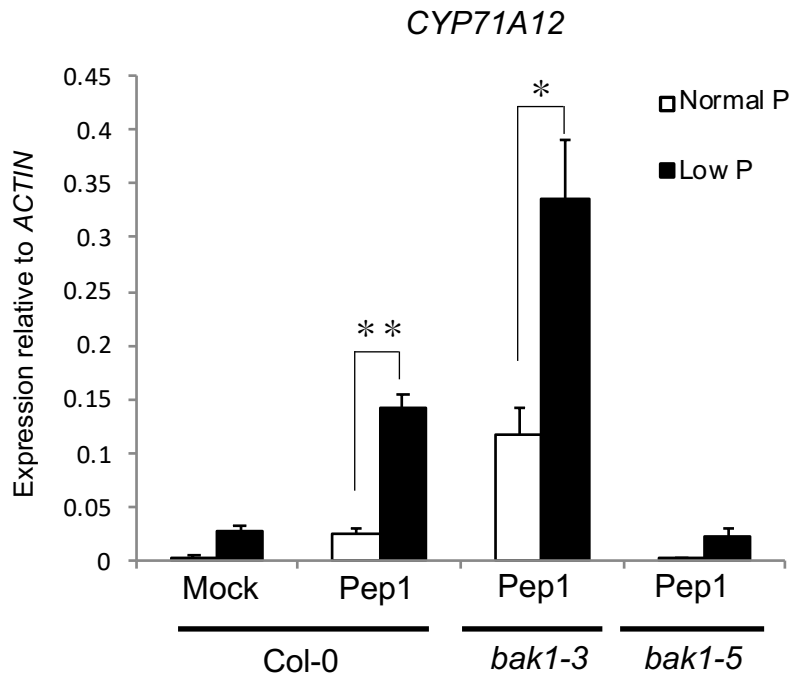
露光時間を長くすると培地中のサンプルにも全長の PROPEP3 が検出された（中段）。

同様の結果が独立した 3 回の実験から得られた。

A.



B.



C.

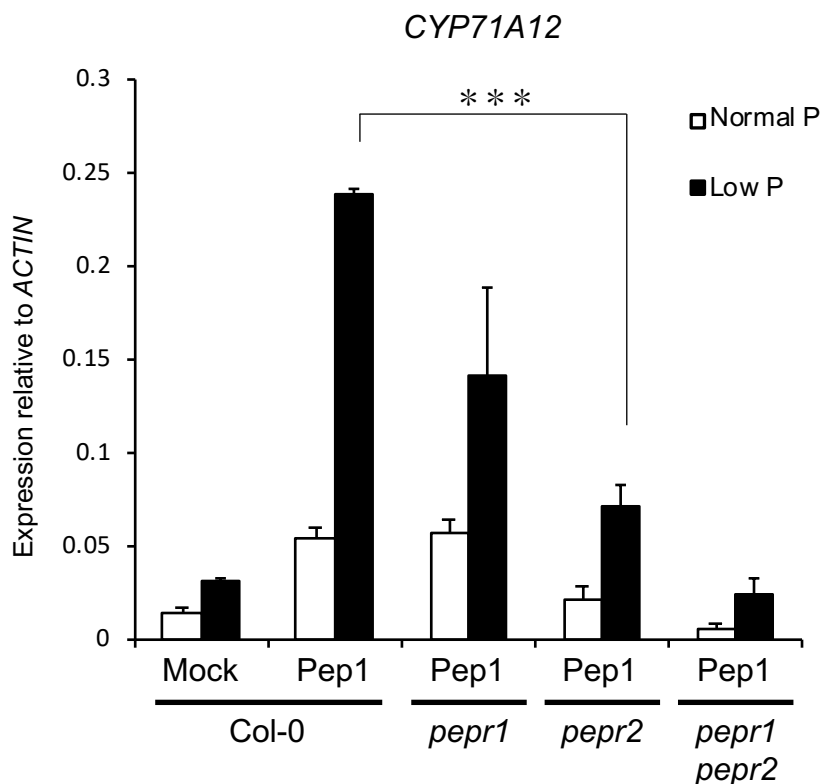


図3-5. リン欠乏条件における PEPR-BAK1 複合体の解析

- A. 標準栽培条件で 7 日、リン欠乏条件において 3 日生育した植物の根を回収し FLAG 抗体を用いたウェスタンブロッティングによる解析を行った。
同様の結果が独立した 3 回の実験から得られた。
- B. 標準栽培条件で 7 日、リン欠乏条件下において 3 日生育した植物に対し 1 μ M Pep1 を処理し 6 時間後の *CYP71A12* 遺伝子の発現量を qRT-PCR を用いて調べた。
同様の結果が独立した 3 回の実験から得られた。
* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$ (Two-tailed T-test)
- C. 標準栽培条件で 7 日、リン欠乏条件下において 3 日生育した植物に対し 1 μ M Pep1 を処理し 6 時間後の *CYP71A12* 遺伝子の発現量を qRT-PCR を用いて調べた。
同様の結果が独立した 3 回の実験から得られた。
*** : $p < 0.005$ (Two-tailed T-test)

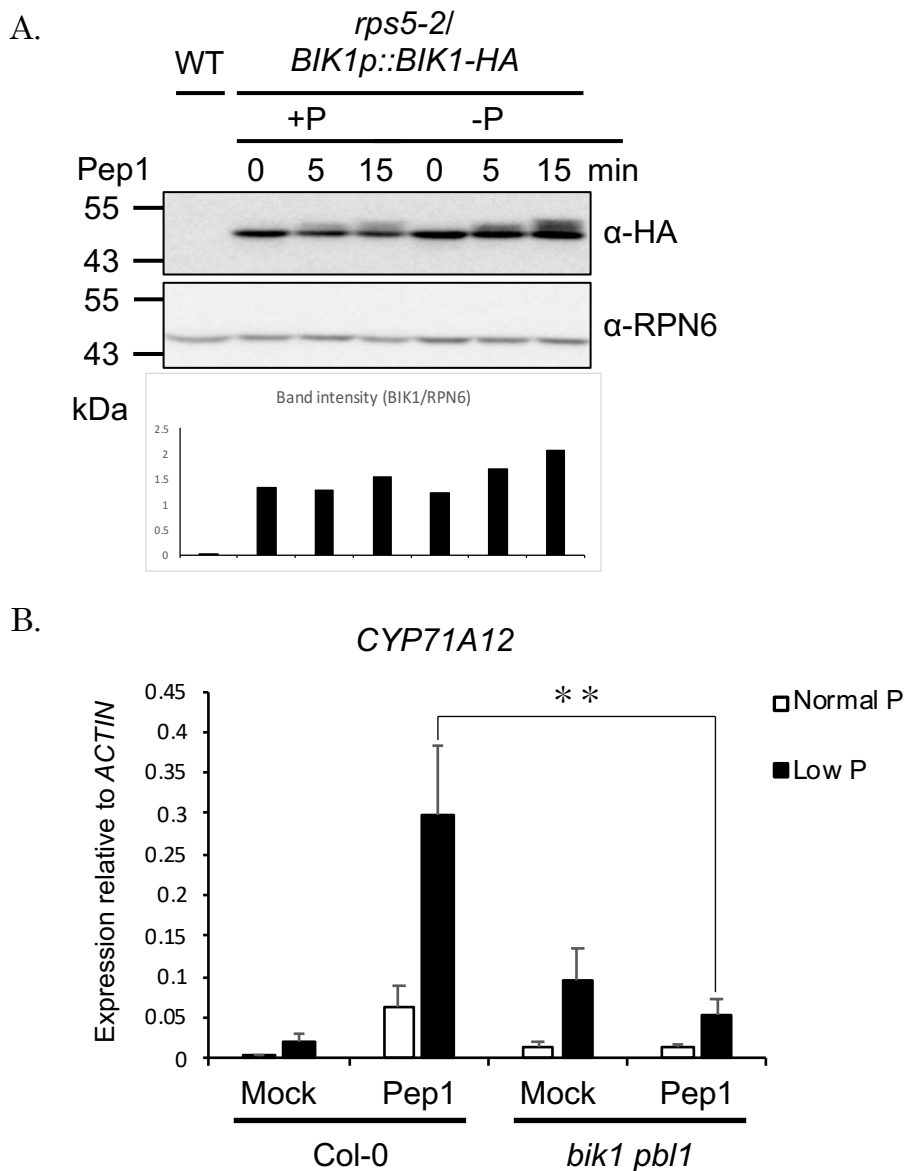


図3-6. リン欠乏条件での Pep1 応答の増強は BIK1 を介する

- A. 標準栽培条件で 7 日、リン欠乏条件において 3 日生育した植物に対し 1 μ M Pep1 を処理し各時間後のサンプルに対し HA 抗体を用いたウェスタンブロットティングによる解析を行った。同様の結果が独立した 3 回の実験から得られた。
- B. 標準栽培条件で 7 日、リン欠乏条件下において 3 日生育した植物に対し 1 μ M Pep1 を処理し 6 時間後の *CYP71A12* 遺伝子の発現量を qRT-PCR を用いて調べた。同様の結果が独立した 3 回の実験から得られた。
 ** : $p < 0.01$ (Two-tailed T-test)

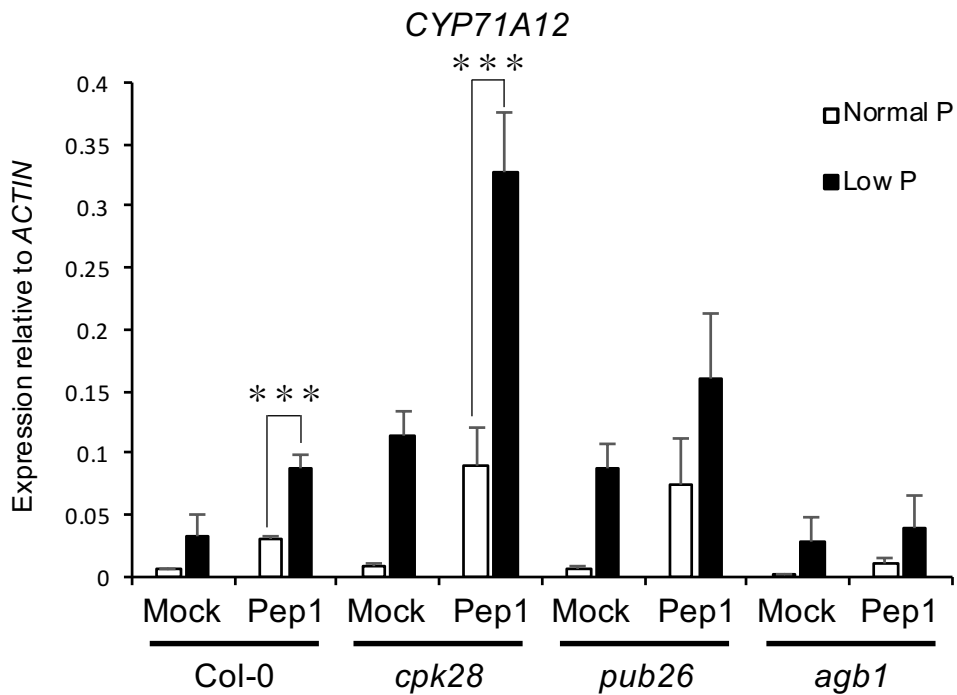


図3-7. BIK1 の安定性制御はリン欠乏条件での Pep1 応答の増強の要因ではない

標準栽培条件で 7 日、リン欠乏条件において 3 日生育した植物に対し 1 μM Pep1 を処理し 6 時間後の *CYP71A12* 遺伝子の発現量を qRT-PCR を用いて調べた。

*** : $p < 0.005$ (Two-tailed T-test)

同様の結果が独立した 3 回の実験から得られた。

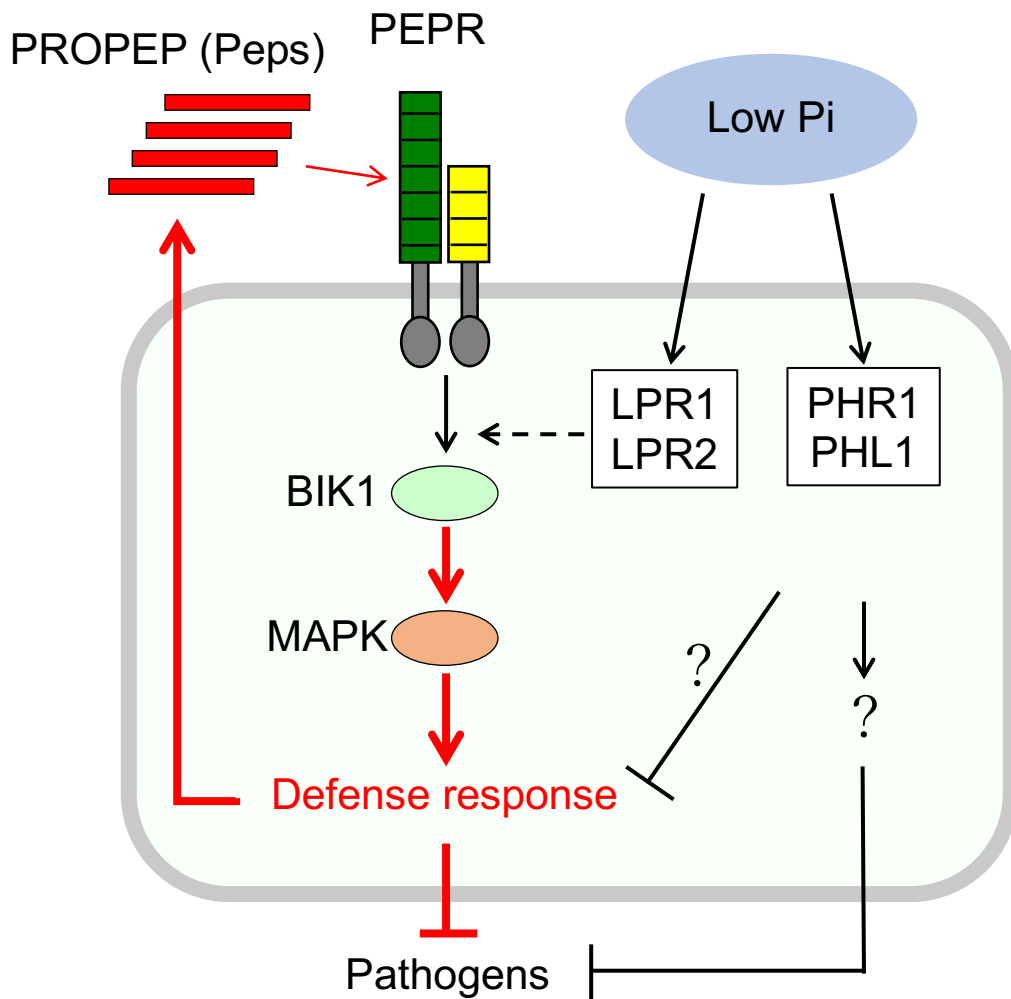


図4-1. 本研究のまとめ図

リン欠乏条件での Pep1 応答の増強にはリン欠乏環境の認識に関与する LPR1/LPR2 が必要であることが新たに判明した。一方で、PHR1/PHL1 は LPR1/LPR2 によって正に制御される Pep1 応答性遺伝子群の発現を負に制御することが明らかになった。リン欠乏条件において PEPR シグナル系は、PROPEP リガンドの放出量の増大、および、BIK1 の増強によりシグナル系全体が増強されると考えられる。実際に、LPR-PEPR 経路がリン欠乏条件における病原菌抵抗性に必要であることが明らかになっている (田中 修論 2018)。興味深いことに、リン欠乏条件での病原菌抵抗性における LPR-PEPR の貢献は、*phr1 phl1* 変異体条件で顕著に認められる。これは、PHR1/PHL1 による負の制御が解除された条件で、LPR-PEPR の貢献がより顕著になったためか、もしくは、PHR1/PHL1 を介したシグナル系も寄与しているためであることが想定される。

謝辞

本研究を行うにあたり、終始ご指導下さった西條雄介教授、晝間敬助教に心からお礼申し上げます。

また、研究に関する助言を頂きましたアドバイザー教員の梅田正明教授、伊藤寿朗教授に深く感謝致します。

実験に関するサポートや助言をいただいた田島由理特任助教、安田盛貴博士に心から感謝いたします。

*lpr1 lpr2*の種子を分譲してくださった Thierry Desnos 博士 (CEA Cadarache)、*phr1 phl1*の種子を分譲してくださった Javier Paz-Ares 博士 (CSIC)、*BIK1p::BIK1-HA*, *cpk28*, *pub26*, *agb1*の種子を分譲してくださった Jian-Min Zhou 博士 (NIBS Beijing) に感謝致します。

未発表データを提供してくださった田中碧氏、井上拓磨氏に感謝致します。

最後に、苦楽を共に実験に励んだ植物免疫学研究室の皆様に心から感謝致します。

参考文献

1. Balzergue, C. *et al.* Low phosphate activates STOP1-ALMT1 to rapidly inhibit root cell elongation. *Nat. Commun.* **8**, (2017).
2. Bauer, Z., Gómez-Gómez, L., Boller, T. & Felix, G. Sensitivity of Different Ecotypes and Mutants of *Arabidopsis thaliana* toward the Bacterial Elicitor Flagellin Correlates with the Presence of Receptor-binding Sites. *J. Biol. Chem.* **276**, 45669–45676 (2001).
3. Bustos, R. *et al.* A central regulatory system largely controls transcriptional activation and repression responses to phosphate starvation in *Arabidopsis*. *PLoS Genet.* **6**, (2010).
4. Carrión, V. J. *et al.* Pathogen-induced activation of disease-suppressive functions in the endophytic root microbiome. *Science (80-.).* **366**, 606–612 (2019).
5. Castrillo, G. *et al.* Root microbiota drive direct integration of phosphate stress and immunity. *Nature* **543**, 513–518 (2017).
6. Cheng, C. *et al.* Plant immune response to pathogens differs with changing temperatures. *Nat. Commun.* **4**, 1–9 (2013).
7. Delhaize, E. & Randall, P. Characterization of a Phosphate-Accumulator Mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **107**, 207–213 (1995).
8. Dodds, P. N. & Rathjen, J. P. Plant immunity: Towards an integrated view of plant–pathogen interactions. *Nat. Rev. Genet.* **11**, 539–548 (2010).

9. Feng, F. *et al.* A Xanthomonas uridine 5' -monophosphate transferase inhibits plant immune kinases. *Nature* **485**, 114–118 (2012).
10. Garrido-Oter, R. *et al.* Modular Traits of the Rhizobiales Root Microbiota and Their Evolutionary Relationship with Symbiotic Rhizobia. *Cell Host Microbe* **24**, 155-167.e5 (2018).
11. Gómez-Gómez, L. & Boller, T. FLS2: An LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in Arabidopsis. *Mol. Cell* **5**, 1003–1011 (2000).
12. González, E., Solano, R., Rubio, V., Leyva, A. & Paz-Ares, J. PHOSPHATE TRANSPORTER TRAFFIC FACILITATOR1 is a plant-specific SEC12-related protein that enables the endoplasmic reticulum exit of a high-affinity phosphate transporter in Arabidopsis. *Plant Cell* **17**, 3500–3512 (2005).
13. Gruber, B. D., Giehl, R. F. H., Friedel, S. & von Wirén, N. Plasticity of the Arabidopsis root system under nutrient deficiencies. *Plant Physiol.* **163**, 161–179 (2013).
14. Gutiérrez-Alanís, D. *et al.* Phosphate Starvation-Dependent Iron Mobilization Induces CLE14 Expression to Trigger Root Meristem Differentiation through CLV2/PEPR2 Signaling. *Dev. Cell* **41**, 555-570.e3 (2017).
15. Hacquard, S. *et al.* Survival trade-offs in plant roots during colonization by closely related beneficial and pathogenic fungi. *Nat. Commun.* **7**, (2016).
16. Hander, T. *et al.* Damage on plants activates Ca²⁺-dependent metacaspases for release of immunomodulatory peptides. *Science (80-)*. **363**, (2019).

17. Hiruma, K. Roles of plant-derived secondary metabolites during interactions with pathogenic and beneficial microbes under conditions of environmental stress. *Microorganisms* **7**, (2019).
18. Hiruma, K. *et al.* Root Endophyte Colletotrichum tofieldiae Confers Plant Fitness Benefits that Are Phosphate Status Dependent. *Cell* **165**, 464–474 (2016).
19. Huffaker, A., Pearce, G. & Ryan, C. A. An endogenous peptide signal in Arabidopsis activates components of the innate immune response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 10098–10103 (2006).
20. Huffaker, A. & Ryan, C. A. Endogenous peptide defense signals in Arabidopsis differentially amplify signaling for the innate immune response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 10732–10736 (2007).
21. Jacob, F., Vernaldi, S. & Maekawa, T. Evolution and conservation of plant NLR functions. *Front. Immunol.* **4**, 1–16 (2013).
22. Jones, J. D. G. & Jeffery L. Dangl. The plant immune system. *Nature* **444**, 323–329 (2006).
23. Kunze, G. *et al.* The N terminus of bacterial elongation factor Tu elicits innate immunity in Arabidopsis plants. *Plant Cell* **16**, 3496–3507 (2004).
24. Liu, T. *et al.* Chitin-induced dimerization activates a plant immune receptor. *Science (80-.).* **336**, 1160–1164 (2012).
25. Liu, T. Y., Lin, W. Y., Huang, T. K. & Chiou, T. J. MicroRNA-mediated surveillance of phosphate transporters on the move. *Trends Plant Sci.* **19**, 647–655 (2014).

26. Liu, Z. *et al.* BIK1 interacts with PEPRs to mediate ethylene-induced immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 6205–6210 (2013).
27. Luna, E. *et al.* Callose deposition: A multifaceted plant defense response. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **24**, 183–193 (2011).
28. Maekawa, S. *et al.* The carbon/nitrogen regulator ARABIDOPSIS TOXICOS EN LEVADURA31 controls papilla formation in response to powdery mildew fungi penetration by interacting with SYNTAXIN OF PLANTS121 in arabidopsis. *Plant Physiol.* **164**, 879–887 (2014).
29. Miura, K. *et al.* The Arabidopsis SUMO E3 ligase SIZ1 controls phosphate deficiency responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 7760–7765 (2005).
30. Miya, A. *et al.* CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 19613–19618 (2007).
31. Monaghan, J. & Zipfel, C. Plant pattern recognition receptor complexes at the plasma membrane. *Curr. Opin. Plant Biol.* **15**, 349–357 (2012).
32. Mora-Macías, J. *et al.* Malate-dependent Fe accumulation is a critical checkpoint in the root developmental response to low phosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114**, E3563–E3572 (2017).
33. Müller, J. *et al.* Iron-Dependent Callose Deposition Adjusts Root Meristem Maintenance to Phosphate Availability. *Dev. Cell* **33**, 216–230 (2015).
34. Nakamura, Y. Phosphate starvation and membrane lipid remodeling in seed plants. *Prog. Lipid Res.* **52**, 43–50 (2013).

35. Park, H. C. *et al.* Pathogen associated molecular pattern (PAMP)-triggered immunity is compromised under C-limited growth. *Mol. Cells* **38**, 40–50 (2014).
36. Poirier, Y., Thoma, S., Somerville, C. & Schiefelbein, J. A mutant of *Arabidopsis* deficient in xylem loading of phosphate. *Plant Physiol.* **97**, 1087–1093 (1991).
37. Rubio, V. *et al.* A conserved MYB transcription factor involved in phosphate starvation signaling both in vascular plants and in unicellular algae. *Genes Dev.* **15**, 2122–2133 (2001).
38. Schwessinger, B. *et al.* Phosphorylation-dependent differential regulation of plant growth, cell death, and innate immunity by the regulatory receptor-like kinase BAK1. *PLoS Genet.* **7**, (2011).
39. Shen, W., Liu, J. & Li, J.-F. Type-II Metacaspases Mediate the Processing of Plant Elicitor Peptides in *Arabidopsis*. *Mol. Plant* **12**, 1524–1533 (2019).
40. Sun, L., Song, L., Zhang, Y., Zheng, Z. & Liu, D. *Arabidopsis* PHL2 and PHR1 act redundantly as the key components of the central regulatory system controlling transcriptional responses to phosphate starvation. *Plant Physiol.* **170**, 499–514 (2016).
41. Svistoonoff, S. *et al.* Root tip contact with low-phosphate media reprograms plant root architecture. *Nat. Genet.* **39**, 792–796 (2007).
42. Thibaud, M. C. *et al.* Dissection of local and systemic transcriptional responses to phosphate starvation in *Arabidopsis*. *Plant J.* **64**, 775–789 (2010).

43. Tintor, N. *et al.* Layered pattern receptor signaling via ethylene and endogenous elicitor peptides during Arabidopsis immunity to bacterial infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 6211–6216 (2013).
44. Wan, J. *et al.* A LysM receptor-like kinase plays a critical role in chitin signaling and fungal resistance in Arabidopsis. *Plant Cell* **20**, 471–481 (2008).
45. Wang, J. *et al.* A Regulatory Module Controlling Homeostasis of a Plant Immune Kinase. *Mol. Cell* **69**, 493-504.e6 (2018).
46. Wang, X. *et al.* The function of LPR1 is controlled by an element in the promoter and is independent of SUMO E3 ligase SIZ1 in response to Low Pi stress in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol.* **51**, 380–394 (2010).
47. Yamada, K. *et al.* The Arabidopsis CERK 1-associated kinase PBL 27 connects chitin perception to MAPK activation . *EMBO J.* **35**, 2468–2483 (2016).
48. Yamada, K. *et al.* Danger peptide receptor signaling in plants ensures basal immunity upon pathogen-induced depletion of BAK 1 . *EMBO J.* **35**, 46–61 (2016).
49. Yu, K. *et al.* Rhizosphere-Associated Pseudomonas Suppress Local Root Immune Responses by Gluconic Acid-Mediated Lowering of Environmental pH. *Curr. Biol.* **29**, 3913-3920.e4 (2019).
50. Zhang, H., Huang, L., Hong, Y. & Song, F. BOTRYTIS-INDUCED KINASE1, a plasma membrane-localized receptor-like protein kinase, is a negative regulator of phosphate homeostasis in Arabidopsis thaliana. *BMC Plant Biol.* **16**, 13–15 (2016).

51. Zhang, J. *et al.* Receptor-like cytoplasmic kinases integrate signaling from multiple plant immune receptors and are targeted by a *Pseudomonas syringae* effector. *Cell Host Microbe* **7**, 290–301 (2010).
52. Zipfel, C. *et al.* Perception of the Bacterial PAMP EF-Tu by the Receptor EFR Restricts *Agrobacterium*-Mediated Transformation. *Cell* **125**, 749–760 (2006).