

博士論文

イネの免疫制御ペプチドを介した微生物共生の制御

藤 雅子

奈良先端科学技術大学院大学

先端科学技術領域 植物免疫学研究室

(西條 雄介 教授)

2022年3月17日 提出

目次

1. 序論 P. 4
1-1 植物の免疫	
1-2 植物の内生 Pep ペプチドによる免疫調節	
1-3 植物による微生物共生の制御	
1-4 免疫を介した共生微生物叢の制御	
1-5 根圏の共生微生物叢	
1-6 本研究の目的と概要	
2. 材料と方法 P. 13
2-1 植物材料および栽培条件	
2-2 水耕栽培イネへのペプチド投与実験	
2-3 細菌株の接種試験	
2-4 RNA 抽出および RT-qPCR 解析	
2-5 メタ 16S シーケンス解析	
2-6 細菌のゲノム解析	
2-7 タンパク質の抽出とウェスタンブロッティング (WB) 解析	
2-8 MAPK 活性およびタンパク質間相互作用の解析	
2-9 活性化酸素種バースト応答の測定	
2-10 形質転換シロイヌナズナの作出	
3. 結果	
OsPep 受容体 OsPEPR1 の解析 P. 22
3-1 OsPep6 はリン依存的に防御応答遺伝子の発現を誘導する	
3-2 OsPep 応答には <i>OsPEPR1</i> が必要である	
3-3 <i>OsPEPR1</i> の導入シロイヌナズナは OsPep 応答性を獲得しなかった	
3-4 OsPEPR1 は OsSERK1/2 とリガンド依存的に複合体を形成し、MAPK を活性化 する	

OsPep-OsPEPR1 の成長促進機構 P. 26
3-5 OsPep6 はイネの成長促進機能を有する	
3-6 OsPep6 によるイネ成長促進効果は種子微生物に依存する	
3-7 OsPep6 は、種子の由来にかかわらず共生細菌叢の変化を誘導する	
3-8 共生細菌 <i>Sphingomonas sp.</i> (NB7) は、OsPep、 <i>OsPEPR1</i> 、 <i>OsCCaMK</i> 依存的にイネの成長を促進する	
3-9 <i>Shingomonas sp.</i> (NB7) のゲノム解析	
4. 考察 P. 33
4-1 OsPep-OsPEPR シグナル系による植物の免疫及び成長の制御	
4-2 Pep ペプチド受容機構の植物間比較	
4-3 OsPep を介した根の共生微生物叢の制御	
4-4 OsPep および既知の共生経路を介した細菌共生の制御	
4-5 総括	
5. 謝辞 P. 40
6. 参考文献 P. 41
7. 図 P. 50

1. 序論

1-1 植物の免疫

植物は、絶え間なくさまざまな感染性微生物（細菌・真菌・卵菌）にさらされながら生きている。植物は動物のように免疫に特化した細胞や獲得免疫系をもっておらず、個々の細胞が生来備えている免疫受容体によって病原体の認識を行い、防御応答を誘導する自然免疫系を発達させてきた（Ausubel 2005; Jones and Dangl 2006）。免疫受容体には大きく分けて細胞膜上の受容体、細胞質内の受容体の2種類が存在する。

細胞膜上の受容体はパターン認識受容体（Pattern recognition receptor ; PRR）と呼ばれ、微生物に特徴的な構成成分（Microbe-Associated Molecular Pattern ; MAMP）や植物自身の細胞異常を示すダメージシグナル（Damage-Associated Molecular Pattern; DAMP）を特異的に感知する免疫受容体が多数備わっている。これまで、細菌の鞭毛タンパク質フラジェリン、翻訳伸長因子 EF-Tu、ペプチドグリカン、リポ多糖（LPS）や、真菌の細胞壁構成成分キチンを始めとした多くの MAMP 及び対応する PRR が同定されており、MAMP を介して植物は微生物の存在を認識している（Boutrot and Zipfel 2017）。DAMP の認識は MAMP による防御応答の増幅に重要な役割を果たしている（Gust et al. 2017）。PRR による MAMP や DAMP の認識は、リガンドの種類によらず一連の防御応答を誘導し、免疫が高まった状態であるパターン誘導性免疫（Pattern-triggered immunity ; PTI）へと導く（Boller and Felix 2009; Couto and Zipfel 2016; Tang et al. 2017; Saijo et al. 2018）。PTI によって誘導される反応は、細胞質への Ca^{2+} の流入、活性酸素種（ROS）の産生、MAPK（Mitogen Activated Protein Kinase）経路の活性化、防御関連遺伝子の誘導、植物免疫制御ホルモンであるサリチル酸やエチレンの産生など多岐にわたる（Boller and Felix 2009; Couto and Zipfel 2016）。これらの防御応答の総和として PTI が成立すると考えられている。防御関連遺伝子にはサリチル酸応答性の PR 遺伝子（pathogenesis-related genes）や、ファイトアレキシンと総称される抗菌物質の生合成に関与するフェニルアラニンアンモニアリアーゼ PAL（Phenylalanine ammonia-lyase）遺伝子が含まれる。PRR は、リガンド特異性が異なるだけでなく、防御応答の誘導性や律速因子にも違いがあるものの、様々なリガンドインプットに対してほぼの一連の防御応答を誘導する。さらには複数の PRR が互いに相補・連携することで病原菌による妨害や環境変動に対してロバストに免疫を保つのに役立っている（Tang et al. 2017; Saijo et al. 2018）。PTI 機構は、非常に幅広い種の病原菌から共生菌を含む微生物の感染を制御する上で重要であり、植物の免疫システムの根幹をな

している。

これに対して、植物に感染する微生物は、多数の感染促進因子（毒素やエフェクターと総称されるタンパク質）を進化させており、それらを宿主組織・細胞内に注入して植物の PTI を抑制することで感染を成立させる（Thomma et al. 2011）。これらのエフェクターの存在自体が、植物免疫における PTI の重要性、及び植物感染におけるその打破の重要性を強く示唆している。植物は細胞内にも免疫受容体を有しており、それらがエフェクターを直接的または間接的に認識する。その多くは、ヌクレオチド結合ロイシンリッチリピートドメイン受容体（NB-LRR、もしくは NLR）である。NLR によるエフェクターの認識は、往々にして細胞死を伴う強力な防御応答を引き起こし、病原菌の感染を抑制する（エフェクター誘導性免疫、ETI）（Cui et al. 2015）。PTI と ETI では共通して一連の防御応答が誘導されるものの、PTI では一過的に、ETI では持続的に誘導される傾向がある。また、ETI は PTI と比較して病原菌によるシグナル攪乱を受けにくい、といった特徴がみられる。PRR と NLR が概ね共通の防御応答を活性化するメカニズムについては、両者のシグナル経路のクロストークが示唆されてきており（Tsuda et al. 2009; Tsuda and Katagiri 2010）、さらに最近の研究によって、両者の分子リンクの一端が明らかにされている（Pruitt et al. 2021; Ngou et al. 2021; Yuan et al. 2021）。

植物の免疫増強（抵抗性反応の誘導）は、一般的に成長に対して負の影響を与える（Huot et al. 2014; Lozano-Durán and Zipfel 2015）。免疫と成長のトレードオフに関して、免疫シグナルの増強に働く植物ホルモンシグナルの活性化が成長に負の影響を与えることも一つの大きな要因と考えられている（Bari and Jones 2009）。しかし、免疫増強が成長抑制につながる仕組みについてはよくわかっていない（Huot et al. 2014; Ning et al. 2017）。このような植物免疫に関する現在のパラダイムは、シロイヌナズナから得られた研究成果に大きく偏重している。しかしながら、単子葉植物かつ主要穀物のモデルとしてイネの研究が進み、シロイヌナズナとは異なる様式で植物ホルモンを介した免疫制御もなされていることが明らかとなってきた（De Vleeschauwer et al. 2013; Yang et al. 2013）。サリチル酸を例にあげると、植物種によってその産生・蓄積量、および応答性が異なる。双子葉類であるシロイヌナズナやタバコ（*Nicotiana tabacum*）ではサリチル酸の基底レベルが低いものの、病原菌感染時に大量に産生される。一方で、イネはサリチル酸を恒常的に高濃度で蓄積しており、病原菌感染時に顕著な蓄積量変化は見られない（Silverman 1995）。しかしながら、病原菌接種はサリチ

ル酸のシグナル伝達経路を活性化し、*OsNPR1* および *OsWRKY45* を介して防御応答が誘導される (Takatsuji et al. 2010)。したがって、シロイヌナズナに限定することなく多様な植物種を研究することは、植物の免疫機構や微生物共生機構を解明する上で重要であり、ひいては植物サイエンスの全体の進展に欠かせない。

1-2 植物の内生 Pep ペプチドによる免疫調節

近年、植物の DAMP をその性質により恒常型 Constitutive DAMPs (cDAMPs)、および誘導型 Inducible DAMPs (iDAMPs) の2つに分けて捉える考え方が提唱されている (Tanaka and Heil 2021)。cDAMPs には、細胞壁成分、細胞外 ATP、ヒストン、自身の DNA などが含まれており、本質的な機能に加えて、細胞ダメージによるそれらの断片化や局在異常が引き金となり、免疫シグナルとしての役割を果たす。普遍的な機能ゆえ、植物界全体、あるいは生物の界を超えて保存されている。一方、iDAMPs には Peps、システミン、RALFs などの免疫調節ペプチドが含まれ、細胞のダメージを受けた時に活性化され、免疫シグナルとしての機能をもつ。iDAMPs のシグナル機能は植物における界、科、属や種内に限定されるものが多く、界、科、属や種が異なる植物間では iDAMPs が認識されないことが往々にして起こる (後述の Pep ペプチドの認識における科特異性の例)。すなわち、ダメージに伴う反応のためのシグナルとして植物の分類群ごとに iDAMPs およびその受容機構が個別に進化してきたことが示唆されている (Tanaka and Heil 2021)。iDAMPs として分類されている免疫調節ペプチドの多くは、細胞のダメージを引き金に産生・放出が大きく増幅するものの、細胞がダメージを受けていない時、あるいは受ける前にも、一部が細胞外に分泌される。以上の知見から、近年、後生動物の免疫系で細胞間シグナルとして機能するペプチド群である「サイトカイン」に由来して、iDAMPs は植物の内在性の免疫調節ペプチドとして「ファイトサイトカイン」という名称でも呼ばれている (Hou et al. 2021)。

iDAMP のなかでも、Pep ペプチド (Plant elicitor peptide) はよく研究が進んでいる (Gust et al. 2017; Saijo et al. 2018)。シロイヌナズナにおいて単離された AtPep1 は 23 アミノ酸配列をもつ内因性エリシターペプチドであり、シロイヌナズナでは、互いに相同性の高い AtPep1-AtPep8 をそれぞれ有する全長 (前駆体) ペプチド 8 分子種が同定されている (Bartels and Boller 2015)。中には、MAMP の認識や病原菌感染によって発現が強く誘導される分子種もある (Lu et al. 2009)。これら AtPROPEP は N 末端に分泌シグナル配列を持たないため、細胞内に蓄積した後、膜ダメージにより細胞外に

放出される。C末端にある Pep エピトープがロイシンリッチリピート (LRR) 受容体キナーゼ (RK) である Pep 受容体 AtPEPR1 及び AtPEPR2 に DAMP として認識される (Yamaguchi and Huffaker 2011)。実際には、プロセッシング無しでも PROPEP の一定の放出が認められるものの、病原菌の感染や宿主の細胞死によって、その放出及びプロセッシングが促進されることが示されている (Yamada et al. 2016)。シロイヌナズナに 2 分子種存在する Pep 受容体 AtPEPR1/AtPEPR2 はリガンド認識後、直ちに LRR-RK 共受容体である BAK1 や他の SERK ファミリー分子種と複合体を形成して、シグナル制御を行い、PTI に特徴的な免疫応答を引き起こす。PEPR 系は、通常互いに拮抗的に働くことが多いサリチル酸経路及びジャスモン酸/エチレン経路を同時に活性化し、MAMP シグナルを増幅するように働く (Huffaker and Ryan 2007; Ross et al. 2014) (Fig. 1-1)。

PROPEP および PEPR のホモログは、重要作物種を含む、アブラナ科、イネ科、マメ科、ナス科などの高等植物に広く存在している (Huffaker et al. 2006; Lori et al. 2015)。イネには 6 つの *OsPROPEPs* および 2 つの *OsPEPRs* の配列がゲノム上にアノテートされている (Fig. 1-2)。しかしながら、PEPR による Pep ペプチドの認識は科特異的であり、PEPR と Pep ペプチドが科ごとに分化してきた可能性が示唆される。例えば、トウモロコシの *ZmPep* ペプチドはイネ科のみ、ダイズの *GmPep* ペプチドはマメ科のみでエリシター活性を示す一方、イネやダイズはシロイヌナズナの *AtPep* ペプチドに応答しない (Huffaker et al. 2013)。PEPR 受容体の配列や Pep 応答性は科レベルでの分化が見られるものの、受容体下流のシグナル制御メカニズムや防御応答における機能は科を超えて高く保存されていることが伺われる (Lori et al. 2015)。実際、Pep-PEPR はシロイヌナズナにとどまらず、作物の耐病性を強化し得る可能性を持っている。トウモロコシの *ZmPep1* は病原性真菌に対して、*ZmPep3* は食害虫に対してそれぞれ防御応答を増強するとの報告や (Huffaker et al. 2011, 2013)、ダイズの *GmPep1*、*GmPep2* および *GmPep3* を種子に前処理することで植物の防御応答が活性化され、寄生性の線虫の繁殖が抑制されるとの報告がある (Lee et al. 2018)。この知見を応用して、*Bacillus subtilis* を線虫の存在時に特異的にジャガイモの *StPep* ペプチドを産生するように改変し、ジャガイモに共生させることで、線虫被害を低減させる技術も研究されている (Zhang and Gleason 2020)。当研究室でも、*OsPEPR1* を高発現したイネにおいて植食性昆虫の唾液成分による防御応答が増強されることが示されている (Shinya et al. 2018)。

一方で、Pep-PEPR は環境適応や成長といった免疫以外のプロセスを調節する役割も持つことが示唆されている。まず、環境適応の観点では、最近の研究から AtPROPEP3 が高塩条件で誘導され、その過剰発現や AtPep3 の投与が塩ストレス耐性に寄与することが明らかになっている (Nakaminami et al. 2018; Loo et al. 2021)。塩ストレスにより、Na⁺が有害な濃度まで細胞内に蓄積すると、ROS の蓄積をもたらし、細胞死を引き起こす (Bose et al. 2014; Ambastha et al. 2017)。このことから、塩ストレスによる細胞ダメージに伴い DAMP が産生され、塩ストレス応答を調節している可能性が考えられる。次に成長の観点では、シロイヌナズナにおいて、*AtPEPR1* および *AtPEPR2* の過剰発現体は土壌栽培下において根の生育を促進することや (Huffaker et al. 2006)、*AtPep1* 投与は暗所において植物の老化を促進すること (Gully et al. 2015) が報告されている。本研究室における栄養応答に着目した知見からも、Pep 応答がリン欠乏応答シグナルにより増強されることや、*AtPEPR1/AtPEPR2* 経路がおそらく免疫応答とは独立してリン枯渇応答に貢献していることが示唆されている (李, 博士論文 2020)。他にも、根の細胞タイプ特異的に *AtPEPR1/AtPEPR2* を発現させた実験系から、根毛において *AtPEPR2* を発現させることで *Pep1* 応答に伴う成長抑制を回避しつつ、根の免疫を活性化できることが明らかになっている (Okada et al. 2021)。

以上のように、iDAMPs に属する Pep ペプチドが免疫応答や耐病性以外の多岐にわたる生理機能を有することが示唆される知見はあるものの、それらの機能がどのように発現されるのか、また互いにどのように関連するのかについては不明な点が多い。Pep ペプチドを含めた DAMP シグナル系は、様々な環境ストレスにさらされた際に、細胞ダメージに対応して防御応答の規模を調節するシステムとして植物の成長とストレス耐性のバランスや恒常性の制御に関わっている可能性が推察される。

1-3 植物による微生物共生の制御

健康な植物には膨大な微生物叢 (真正細菌、古細菌、真菌等の微生物群) の中には、植物の成長や環境適応において重要な役割を担うものも存在する (Berendsen et al. 2012)。これらの共生微生物は、植物の免疫システムを軽度に刺激し全身の病害抵抗性を高めることで、病原微生物からの植物保護にも寄与していると考えられている (Hacquard et al. 2017)。微生物叢の研究の進展により、植物とその共生微生物叢を一つのホロビオント、すなわち植物の機能単位として捉えることの有効性が認知されつつあるものの (Brunel et al. 2020)、微生物叢の複雑さゆえ、植物側の微生物群集を制

御するメカニズムに関する知識はまだ限られている。実験室レベルで植物と共生微生物の関係を解析する手法としては、1対1での接種実験が主流であることも一つの要因となっている。

共生微生物の例として、陸上の8割以上の植物と共生関係を築きリン酸を供給する糸状菌として菌根菌が、マメ科植物と共生関係を築き窒素源を供給する細菌として根粒菌がよく研究されている。それぞれ菌側のMyc因子、およびNod因子が、植物のLysM型の膜受容体によって認識されると、細胞内Ca²⁺濃度の周期的な変動（カルシウムスパイク）がおこる。カルシウムスパイクの下流では、カルシウム/カルモジュリン依存性キナーゼ（CCaMK）を始めとした、一連の共通共生遺伝子にコードされた共生シグナル制御因子が活性化される（Oldroyd 2013）。マメ科植物は菌根共生と根粒共生のどちらも行うため、共生シグナルの研究によく用いられる。CCaMKを欠損したミヤコグサ変異体では、菌根菌および根粒菌の感染率がいずれも低下することから、CCaMKは菌根共生と根粒共生において共通で重要な遺伝子である（Horváth et al. 2011）。CCaMKは緑藻のゲノムには存在せず、コケ植物から高等植物に渡る陸上植物に広く存在することから、植物の陸上進出にともなって獲得された遺伝子と考えられている。ただし、アブラナ科は菌根共生をほとんどしないことが知られており、進化の過程でCCaMKを欠損したと考えられている（Wang et al. 2015）。シロイヌナズナにおいては低リン条件で共生する糸状菌 *Colletotrichum tofieldiae* の例も報告されているが（Hiruma et al, 2016）、アブラナ科が菌根共生に頼ることなく低リン土壌環境に適応する仕組みについてはいまだに謎が多い。また、共生の成立には環境因子も大きく影響することが知られており、リンが十分にある土壌や湛水条件では菌根菌との共生が強く阻害される（Balzergue et al. 2013）。また、菌根菌の共生したイネでは食害虫および土壌感染性の病原性真菌に対する抵抗性が下がることも報告されており（Bernaola et al. 2018）、菌根菌の感染は宿主植物の免疫シグナル系に影響を与えている可能性が示唆される。なお、イネにおいてもCCaMKが保存されており、菌根共生において中核遺伝子として機能している（Gutjahr et al. 2008）。しかしながら、根粒形成を行わないイネにおいて、菌根共生率の低い湛水条件下でCCaMKが微生物共生に果たす役割はよくわかっていない。

1-4 免疫を介した共生微生物叢の制御

PRR によって認識される MAMP は、病原微生物に限らず非病原性の微生物にも広く保存されているため、MAMP のみで病原菌と非病原菌を識別することは困難であると考えられる。興味深いことに、菌根菌や根粒細菌のような共生微生物も病原微生物と同様に、MAMP 変異による宿主認識の回避に加えて、エフェクター等を利用した PTI シグナル系の攪乱によって植物に感染している様子が明らかになってきている (Gourion et al. 2015; Plett and Martin 2015; Zipfel and Oldroyd 2017; Miwa and Okazaki 2017)。そのことから、MAMP 受容体の新規導入や植物免疫システムの強化は、宿主植物に適応した共生微生物の集団 (叢)、さらには共生に依存した植物の成長や恒常性に甚大な影響を与える可能性が容易に推測される。しかしながら、植物免疫が共生微生物 (叢) の制御に果たす役割やその分子機構を示した研究は非常に少ない。

近年の次世代シーケンシング (NGS) 技術の発展に起因し、メタ rRNA 16S、メタゲノム、メタトランスクリプトームといったハイスループットなオミックス解析が可能となった。これらの技術によって人間や環境サンプルにおける微生物の多様性や機能に迫る研究が多くなされている。例えば、ヒトの腸内細菌叢を構成する細菌種や細菌数が減少し多様性が低下した状態は *Dysbiosis* とよばれており、肥満、炎症性腸疾患、喘息、心血管疾患などの疾患との関連性が示唆されている。*Dysbiosis* は主に抗生物質の投与や偏った食事、病原体感染といった外因性、および遺伝的な免疫異常などの内因性の原因によって引き起こされると考えられている (Levy et al. 2017)。植物においても MAMP 受容体および小胞輸送制御因子 *MIN7* の四重変異体 (*min7 fls2 efr cerk1; mfec*) において、葉の細菌叢の構成が変化することが細菌叢メタ 16S rRNA 解析から明らかになり、さらには葉の黄化が観察されるという *Dysbiosis* 様の現象がみられた (Chen et al. 2020)。この報告は、植物の免疫異常が植物の共生細菌叢ひいては健康の異常につながることを示し、学問的な価値が高い。なお、植物の各組織によって微生物叢の構成は異なり (Kim and Lee 2020)、また免疫制御もシュートと根では異なることが示唆されており (Chuberre et al. 2018)、植物は組織ごとに局所的な外的環境 (水分量や微生物の存在量など) の変化にあわせて免疫を調整していることも、組織によって微生物叢の構成が異なる要因の一つと考えられる。

1-5 根圏の共生微生物叢

各組織の中でも特に根は、多様性に富んだ微生物を大量に有する土壌と常に接して

いる。根から分泌される有機物や無機物は、土壌の化学的・栄養的組成を変化させ、さらには微生物叢にも影響を与えることがわかっている。植物の根および隣接する土壌に生息する根圏微生物叢は、土壌微生物叢とは大きく異なっていることから (Edwards et al. 2015, 2018)、植物は根圏において特定の微生物と選択的に共生関係を築いていることが示唆される。圃場栽培のイネにおいては、地理的な場所、栽培方法、根の組織、植物の遺伝型 (品種) によっても共生微生物の構成が異なることもわかっている (Edwards et al. 2015)。これまで、植物側の研究によって、植物の制御下にある根圏の共生微生物叢が、土壌栄養中の栄養素である窒素、鉄、リンの宿主側への取り込みやその後の利用効率を増加させることが明らかになってきた (Song et al. 2021)。例えば、窒素利用効率が異なるインディカイネとジャポニカイネの遺伝的集団を用いた研究から、窒素利用効率と細菌叢プロファイルに相関性があることが示された。さらに、逆遺伝学的アプローチによって、硝酸トランスポーター *NRT1.1B* が窒素利用効率の高いインディカイネ型の細菌叢を形成するために必要であることが示された (Zhang et al. 2019)。同様に、植物のリン酸枯渇応答制御因子 *PHR1* はリン枯渇ストレス下で細菌叢を変化させる。さらに *PHR1* はリン枯渇条件において微生物誘導性の植物免疫システムを抑制することで、栄養枯渇応答を優先させることが示唆された (Castrillo et al. 2017)。もう一つの例として、鉄欠乏下において根から分泌される鉄キレート剤であるクマリンが、有用な細菌叢を集めることに働き、植物の鉄吸収を助けることが示された (Stringlis et al. 2018; Harbort et al. 2020)。ただし、これらを含む多くの研究において微生物叢に関しては群集構造プロファイリングにとどまっており、個々の微生物および微生物叢の生理機能やそれをもたらす分子機構に関しては不明な点が多い。

また、植物の種子には発芽や生存のための栄養が豊富に含まれており、種子にもバクテリア、菌類、ウイルスなどの微生物が付着している (Shade et al. 2017; Nelson 2018; Eyre et al. 2019)。植物の一生で、芽生えは、病原体や環境ストレスに対して極めて脆弱である。そのため、植物は発芽の初期段階から種子微生物といち早く共生関係を構築することで、病原体からの保護や初期成長に役立てていることが考えられる。しかし、種子微生物叢の根圏での役割について明らかにした研究は少ない。その理由として種子微生物叢の幼植物への定着を解析する実験系自体があまり整っていないことが挙げられる。具体的には、① 複雑な要因が絡む土壌環境で生育した植物に内生する細菌のメタ 16S シーケンス解析は安定した結果が得られにくいことや、② 種子微生物を土壌と切り離してトレースすることが難しいこと、③ 種子微生物叢を解析す

るには多様な微生物を有する植物種の種子が適している一方でシロイヌナズナの種子微生物叢は極めて貧困である、などが考えられる。このため、種子由来の微生物(叢)との共生に関する解析を進めるためには、これらの実験上の課題を克服した実験系の構築が必要である。

1-6 本研究の目的と概要

植物は絶え間なくさまざまな病原体微生物(細菌・真菌・卵菌)にさらされながら生きており、生まれながらにもつ自然免疫システムを駆使して微生物を制御している。本研究では、細胞異常を示すダメージシグナルとして免疫を活性化する内生の OsPep ペプチドについて研究を進めてきた。シロイヌナズナでは AtPep の投与は主根伸長を抑制する一方で(Krol et al. 2010)、イネの芽生えでは成長促進効果が顕著に現れるという予備的な結果を当研究室が得ていたからである。この結果から、免疫制御 OsPep ペプチドは免疫活性化のみならず、多岐にわたる生理機能を有することが示唆された。そこで、イネにおける OsPep ペプチドの役割を明らかにするとともに、その制御機構の解明を進めることを目的として研究を行った(Fig. 1-3)。

本研究によって、イネの免疫調節に働く Pep-PEPR システムが根系拡張を伴うバイオマス増加機能を持つことが明らかとなった。また、イネの芽生えにおいて種子由来の細菌叢を解析する実験系を確立し、OsPep-OsPEPR シグナル系の活性化に伴う微生物叢の変化を解析した。同系を活用することで、OsPep 投与によって共生細菌叢が栄養条件依存的に変化することが明らかとなった。さらに、イネから単離された細菌株について、イネ接種実験による植物成長促進菌のスクリーニングを行い、OsPep 及び OsPEPR1 依存的にイネの成長を促進する *Sphingomonas sp.*株(NB7)を同定した。以上の結果から、OsPep-OsPEPR シグナルを介した根系拡張機能は、共生微生物に依存しており、*Sphingomonas* 属菌がその一端を担っている可能性が示された。

2. 材料と方法

2-1 植物材料および栽培条件

イネ栽培品種である日本晴 (*Oryza sativa* L. cv. Nipponbare) を野生型として用いた。収穫・乾燥後に、4°Cで保管し、使用直前に脱えいをした。菌叢解析には、当大学の温室 (25-30°C, 明期 10 時間/暗期 14 時間) および日本各地の野外圃場 (京都府、宮城県、静岡) で収穫された日本晴の種子を用いた。京都府産の種子のうち、施肥圃場および無施肥圃場 (20 年以上無施肥でイネを継続栽培) については隣接する各圃場でイネを栽培して収穫したものをを用いた。

形質転換体である OsPEPR1 の高発現体植物 (Shinya et al. 2018) および OsPEPR1 の CRISPR-Cas9 ノックアウト植物体 (本研究で作出、Fig. 2-1) は、それぞれのバイナリーベクターを導入したアグロバクテリウムを、日本晴の胚盤由来カルスに感染させることにより、共同研究者の石崎琢磨博士 (JIRCAS) の協力により作出された。ccamk 変異体 (ccamk-2) は、TOS17 挿入系統 (Ikeda et al. 2011、東北大学 南澤究博士より分譲) の種子を京都府産の無施肥圃場で栽培・収穫したものをを用いた。

2-2 水耕栽培イネへのペプチド投与実験

種子微生物存在下での播種は、脱えいした種子を防カビ剤である 0.25% GF ベンレート水和剤溶液 (住友化学、有効成分: ベノミル) に浸漬させ、24 時間暗期、28°C で吸水させて行った。完全滅菌播種は、20% 次亜塩素酸ナトリウムで 1 時間殺菌処理した後、滅菌水で十分に洗浄し、23 時間暗期、28°C で吸水させて行った。50 ml チューブに提示濃度の OsPeps (Table 2-1) を添加した水耕液をいれ (Table 2-1, 2-2)、水面に園芸用鉢底ネットを浮かべた。水耕液には、200 μ M (+ Pi) または 20 μ M (- Pi) KH₂PO₄ のものを使用した。吸水種子を鉢底ネットの上に各チューブ 5 粒静置し、地上部は空中にとどまり根のみが水中に伸びる状態でイネを栽培した。チューブの上部はラップで封をして、人工気象器 (32°C, 明期 14 時間/暗期 10 時間) で 4 日間または 7 日間栽培した (Fig. 2-2)。

2-3 細菌株の接種試験

野外水田圃場で生育し、表面殺菌されたイネの根から単離された細菌株を接種実験に用いた。単離菌のグリセロールストックから 2 ml の NB もしくは R2A 液体培地に植菌し、28°C で約 24 時間振盪培養 (前培養) した。100 μ l の培養液を 5 ml の新た

な培地に加え、さらに一晚培養した（本培養）。菌濁液を遠心分離（2000×g、15分、20°C）後、上澄みを捨て、OD₆₀₀ = 0.1 となるように滅菌水を加えて菌懸濁液を調製した。

接種に用いた種子は上述の方法で、防カビ剤もしくは20%次亜塩素酸ナトリウムで処理した。その後、滅菌水に浸漬した状態で2日間吸水させた（途中1回水交換）。育成ポットは、オートクレーブ済みの植物培養用プラントボックス

（75×75×100 mm、VWR）を上下に重ねて使用した。水耕液（上記の組成）に寒天 9 g/L を加えることで育成寒天培地とし、オートクレーブ後にプラントボックスに 100 mL 入れた。寒天が固まる直前に、菌懸濁液 1 mL および 1 μM OsPep6 を混合した。寒天が完全に固まった後、1ボックスにつき9個ずつ種子を播種した。その後、人工気象器（30°C、明期 14 時間/暗期 10 時間）で7日間栽培した（Fig. 2-3）。さらに、7日間栽培したイネの根を用いて、細菌数（CFU）の測定を行った。10 mM MgCl₂ でイネの根をすり潰し、破碎液から段階希釈により希釈液を調製した。R2A 寒天培地に希釈液を塗布し、28°C で3日間培養してコロニー形成数（CFU）を測定した。

2-4 RNA 抽出および RT-qPCR 解析

植物体サンプルを液体窒素で瞬間凍結し、ステンレスビーズを用いて凍結破碎した。Plant RNA Purification Reagent（Thermo Fisher）を用いて RNA を抽出した。その後、PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser（Takara）を用いて逆転写反応を行い、cDNA を合成した。作製した cDNA をテンプレートに Power SYBR Green PCR Master Mix（Life technologies）と任意のプライマー（Table 2-3）を用いて、Thermal Cycler Dicer（Takara）で RT-qPCR を行なった。遺伝子発現量は比較 Ct 法を用いて算出した。手順はメーカーのプロトコルに従った。

2-5 メタ 16S シーケンス解析

防カビ剤で処理した野生型イネ種子を 1 μM OsPep6 を含む水耕液に播種した。4 日後、根を滅菌水ですすぎ、植物体から根を切り離し、3 個体以上の根を集めて 1 サンプルとして液体窒素により瞬間凍結させた。サンプルを凍結破碎し、NucleoSpin® Soil（MACHERRY-NAGEL）を用いて微生物の DNA を抽出した。その後、KOD FX Neo（TOYOBO）と 515 forward、806 reverse プライマー（Table 2-3）を用いて、タッ

チダウン PCR によって細菌および古細菌の 16S rRNA 遺伝子領域を増幅した。プライマーおよび PCR サイクルは、Edwards et al. 2015 を参考にした。アガロースゲル電気泳動で目的の DNA のバンドを切り出し、ゲル/PCR 抽出キット (Fast Gene) を用いて精製した。以下の手順では、Illumina Miseq のプロトコル (https://support.illumina.com/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf) に従ってサンプル DNA を調製し、MiSeq Reagent Kit V3 を用いて Miseq でペアエンドシーケンスを行った。Miseq によってシーケンスした配列は、Utami et al. (2018) の方法を参考に、Yuniar Devi Utani 博士の協力のもと、解析を行った。DADA2 v1.10.0 パッケージ (Callahan et al. 2016) を用いて、トリミングおよびフィルタリングし、増幅配列の相違 (amplicon sequence variants; ASVs) に基づいて分類した。得られた ASV 配列は、SINA v1.2.11 (Pruesse et al. 2012) およびデータベース SILVA SSURef NR99 release 132 (Quast et al. 2012) を用いて、 $\geq 80\%$ の相同性に基づき系統的に分類した。ASV 配列のうち、真核生物、ミトコンドリア、プラスチドに由来する配列およびデータベース配列に照合されなかった配列は解析から除いた。菌叢の多様性解析には、QIIME v.1.9.1 (Caporaso et al. 2010) と、R パッケージ *vega* および *ggplot2* を用いた。なお、メタ 16S rRNA 解析では細菌および古細菌の配列が含まれているが、本研究では一般的な呼称に則り便宜上、細菌叢解析と呼ぶ。

2-6 細菌のゲノム解析

細菌 NB7 株のグリセロールストックから 2 ml の R2A 液体培地に植菌し、28°C で約 24 時間振盪培養 (前培養) した。100 μ l の培養液を 5 ml の新たな培地に加え、さらに一晩培養した (本培養)。1.5 ml の菌濁液を遠心 (2000 \times g、15 分、20°C) し、沈殿した菌体から NucleoSpin® Micronial DNA (MACHERRY-NAGEL) を用いて、ゲノム DNA を抽出した。抽出した DNA をゲノム解析に供し (株式会社生物技研)、GridION (ロングリード) および DNBSEQ (ショートリード) を用いたハイブリッドアセンブリにより、全長コンティグ配列を取得した。その後、NCBI に登録されている菌種から Average nucleotide identity (ANI) に基づく近縁種の探索を行った。系統樹は、NB7 株と *Sphingomonas* 27 種、Outgroup として *Zymomonas mobilis* を加えた計 29 株で RaxML-NG v1.1.0 [6] を用いて作成した。29 株に共通する 235 のマーカー遺伝子を選出し、アミノ酸配列を用いて系統樹を作成した。1000 回の bootstrap により *blanch support value* を算出した。

2-7 タンパク質の抽出とウェスタンブロッティング (WB) 解析

すべて下記の方法で植物タンパク質を抽出し、ウェスタンブロッティング解析に供して目的タンパク質の検出を試みた。植物の生重量あたり 2 µl/mg 量の Co-IP buffer (50 mM Tris-HCl (pH7.5)、150 mM NaCl、2 mM EDT (pH7.5)、10% glycerol、0.5% NP40、cOmplete protease inhibitor cocktail (Roche)) を加えて溶出した。その後、14000 rpm、4°C、15 分間の遠心分離を行い、上清を回収してタンパク質抽出液とした。

検出する目的タンパク質の分子量に合わせた濃度のアクリルアミドを含んだゲルを用いて SDS-PAGE を行った。ゲル中の泳動されたタンパク質は、Criterion Blotter (BIO-RAD) を用いて PVDF メンブレン (Merck Millipore) へ転写した。転写後のメンブレンは、0.01% TBST (10 mM Tris-HCl (pH7.5)、150 mM NaCl、0.01% Tween-20) を溶媒とした 2%スキムミルク溶液中で、室温 1 時間ブロッキング反応を行った後、4°Cで一晩かけて目的タンパク質を特異的に認識する一次抗体と反応させた (Table 2-4)。その後、メンブレンの洗浄を 0.01% TBST で 5 分ずつ 3 回を行い、任意の二次抗体を含むスキムミルク溶液に室温で 1 時間反応させた。その後、ImageQuant LAS4000 (富士フイルム株式会社) を用いて、検出試薬 Chemi-lumi One L (ナカライテスク株式会社) とメンブレンを反応させることで、目的タンパク質の検出を試みた。

2-8 MAPK 活性およびタンパク質間相互作用の解析

タバコの約 4 週齢の成熟葉に、目的コンストラクトを発現するアグロバクテリウム *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101 を打ち込んだ。菌濁液は OD₆₀₀ = 1.0 に調製したものを用い、複数のコンストラクトを発現させる場合は等量の菌濁液を混合した。2 日後に任意のペプチドを葉に打ち込み、20 分もしくは 30 分後に、葉をサンプリングして凍結した。サンプルを破砕し、生重量の 2 倍量の 2×SDS-sample buffer と混合し、55°Cで 30 分間加熱した (Input サンプル)。残りの上清を 10 µl の Anti-FLAG M2 magnetic beads 懸濁液 (Sigma) と混合し、4°Cで 1 時間穏やかに攪拌した。8000×g、4°C、1 分間遠心し、磁気スタンドで Magnetic beads を固定して上清を取り除いた。1 ml の Wash buffer (50 mM Tris-HCl (pH 5.7)、150 mM NaCl、10% glycerol、0.5% Triton X-100) を加え、転倒混和で Magnetic beads を再懸濁した。

8000×g、4°C、1 分間遠心し、磁気スタンドで Magnetic beads を固定して上清を取り除いた。洗浄は合計 2 回行った。30 µl の 1×SDS sample buffer を加え、magnetic beads を再懸濁した。8000×g、25°C、1 分間遠心し、磁気スタンドで Magnetic beads を固定して上清を回収した (IP サンプル)。Input サンプルと IP サンプルに含まれるタンパク質をウェスタンブロッティング解析に供した。

2-9 活性化酸素種バースト応答の測定

イネについては 50 ml チューブ内で栽培した約 2 週齢の芽生えの完全展開葉を 3 x 3 mm、または 3 x 6 mm 長にカッターで切断した組織片を、タバコについては約 4 週齢の成熟葉から直径 4 mm のコルクボーラーでくり抜いた組織片をリーフディスクとして用いた。96 well プレートにおいて、各 well 200 µl の滅菌水上に、リーフディスク 1 枚を一晩浮かせることで傷害応答に伴う ROS 産生を鎮静化させた。滅菌水を取り除き、150 µl の反応液 (500 µM ルミノール誘導体 L12、10 µg/ml HRP、および任意のペプチド) と注入した。マイクロプレートリーダー (Tristar LB941 ベルトールド社) を用いて、L12 がペルオキシダーゼを触媒として過酸化水素と反応する際の発光を測定した。1 処理区あたり 6~12 枚のリーフディスクを用いた。

2-10 形質転換シロイヌナズナの作出

シロイヌナズナの形質転換は、アグロバクテリウムを介した Floral dip 法 (Clough and Bent, 1990) を参考に行った。目的のコンストラクトをエレクトロポレーション法によって導入した *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101 (pMP90) を、抗生物質を含む 2*YT (16 g/l Tryptone、10 g/l yeast extract、5 g/l NaCl) で一晩培養した。培養した菌液を、5000 rpm、5 分間の遠心分離を行い、菌体を集菌し上清を除去した。沈殿した菌体を 5% (w/v) スクロースに再懸濁し、洗浄する作業を 2 回行った。次に、Silwet L-77 を 0.05% (w/v) の濃度となるように加えた菌懸濁液を花芽および脇芽に浸透させて、高湿度下で一晩静置した。その後、生育させた植物体から T1 種子を回収した。それぞれのコンストラクトについて、薬剤耐性を持つ T1 形質転換植物体 30-50 ラインを選別し、さらに T2 種子をそれぞれ回収した。T2 世代では、薬剤耐性個体が 3:1 に分離するラインを一遺伝子座への挿入ラインとみなして 7-8 ラインほど選別し、T3 種子をそれぞれ回収した。

Table 2-1 イネ栽培用の培地組成と終濃度

試薬	+ Pi	- Pi
CaSO ₄ · 2H ₂ O	1.5 mM	1.5 mM
KNO ₃	3.75 mM	3.75 mM
MgSO ₄ · 7H ₂ O	3.75 mM	3.75 mM
NH ₄ NO ₃	600 μM	600 μM
KH ₂ PO ₄	200 μM	20 μM
Na ₂ SiO ₃ · 9H ₂ O	100 μM	100 μM
Fe(III)-EDTA	50 μM	50 μM
KCl	50 μM	50 μM
H ₃ BO ₃	2.5 μM	2.5 μM
MnSO ₄ · 5H ₂ O	2 μM	2 μM
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	2 μM	2 μM
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.5 μM	0.5 μM
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.5 μM	0.5 μM
NiSO ₄ · 6H ₂ O	1.0 μM	1.0 μM
MES	2.5 mM	2.5 mM
KOH	0 μM	180 μM

(最終 pH 6.4 – 6.5)

Table 2-2 使用した合成ペプチド

Peptide name	Peptide sequence (N to C)
OsPep1	ARLRPKPPGNPREGSGGNGGHHH
OsPep2	DDSKPTRPGAPAEGSGGNGGAIH
OsPep3	ADSAPQRPGSPAEGAGGNGGAVH
OsPep4	RAMPRSERPVLREGNGGKGGAAHH
OsPep5	ADSAPQRPGAPAEGAGGNGGDVH
OsPep6	ADSAPQRPGAPAEGAGGNGGAVH
flg22	QRLSTGSRINSAKDDAAGLQIA

Table 2-3 使用したプライマー

Primer name	Primer sequence (5' to 3')
For amplicon PCR	
515 forward_adapter	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA
806 reverse_adapter	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACA-GGGACTACHVGGGTWTCTAAT
For RT-qPCR	
OsUBQ forward	AACCAGCTGAGGCCCAAGA
OsUBQ reverse	ACGATTGATTTAACCAGTCCATGA
OsPROPPEP6 forward	CGATCGGACATCGGAGTGAG
OsPROPPEP6 reverse	AGTTAGATCGACCACAGCCAC
OsPEPR1 forward	ATACAGCTACGGCGTCATACTC
OsPEPR1 reverse	TCGCAGACGAGTTCGATTTG
OsPR5 forward	CAACAGCAACTACCAAGTCGTCTT
OsPR5 reverse	CAAGGTGTCGTTTTATTCATCAACTTT
OsPAL forward	AGCACATCTTGGAGGGAAGCT
OsPAL reverse	GCGCGGATAACCTCAATTTG

Table 2-4 使用した抗体

Antibody name	Resource	Dilution
抗 FLAG 抗体	Sigma	1:2000
抗 HA 抗体	Sigma	1:2000
抗 GFP 抗体	Clontech	1:2000
抗活性化 MAPK 抗体	Cell Signaling Technology	1:2000
抗マウス二次抗体 HRP 標識	Cell Signaling Technology	1:5000
抗ウサギ二次抗体 HRP 標識	Cell Signaling Technology	1:5000

3. 結果

OsPep-OsPEPR シグナル系

3-1 OsPep6 はリン依存的に防御応答遺伝子の発現を誘導する

PRR がリガンドを認識して数時間～24 時間後には、*PR* 遺伝子や *PAL* 遺伝子の発現が誘導される。そこで、播種 3 日後の芽生えに 1 μ M OsPep6 を投与し、12 時間後に、*OsPR5*、*OsPAL*、及び *OsPROPEP6* の発現を根において RT-qPCR 解析で調べた。その結果、*OsPR5*、*OsPAL* の発現は、リン十分条件 (+ Pi) においては OsPep6 応答性が見られなかった一方で、リン欠乏条件 (- Pi) においては OsPep6 投与区で増加した。両条件において *OsPROPEP6* の発現は確認されたが、ともに OsPep6 応答性は見られなかった (Fig. 3-1A)。

シロイヌナズナでは、*PEPR* や *PROPRP* の発現が根において組織特異性を示すことが知られている (Okada et al. 2021)。上記の解析では根全体を対象としたため、*OsPROPEP6* の OsPep 応答性が見られなかった可能性も考えられた。そこで、根を分裂領域、伸長領域、分化領域 (根端から 2 mm, 2-7 mm, それより上部) の 3 つに分けて *OsPROPEP6* 及び *OsPEPR1* の発現解析を行ったところ、両遺伝子ともに根の分化領域での発現が高かったものの OsPep 応答性は認められなかった (Fig. 3-1B)。

以上より、発芽後直後の芽生えへの OsPep6 投与は、特に低リン条件において防御応答を誘導することが示唆された。しかしながら、イネでは Pep 投与による *PROPEP* 遺伝子の誘導はシロイヌナズナの *PROPEP2*, *PROPEP3* ほどは顕著には起こらないことが伺われた。

3-2 OsPep 応答には *OsPEPR1* が必要である

次に、OsPep 受容体 *OsPEPR* の役割について解析を行った。Pep 配列を含む前駆体ペプチド *PROPEP* と Pep 受容体 *PEPR* は、イネを含む被子植物において広く保存されている (Lori et al. 2015)。イネのゲノム上には 2 つの *OsPEPR* 候補遺伝子

(*OsPEPR1/OsPEPR2*) がアノテーションされている (Huffaker et al. 2013)。本来 OsPep 応答性 (OsPep1-OsPep6 の認識能) を持たない *N. benthamiana* 葉において、アグロバクテリウム法によって *OsPEPR1-GFP* を一過的に発現させると OsPep 応答性を付与できる一方で *OsPEPR2-GFP* では付与出来ない (Shinya et al. 2018)。*OsPEPR2* はリガンド結合部位である LRR ドメインの配列に欠失があり、OsPep 認識能を持たない偽受容体であると考えられている。そこで、イネにおいて、受容体 *OsPEPR1* の

ノックアウトが OsPep 応答に及ぼす影響を調べた。

CRISPR-Cas9 システムを用いて *OsPEPR1* 欠損変異体 (*Ospepr1-ko*) を本研究において作出し、ROS バーストを指標に OsPep 応答性を調べた。イネにおける ROS 産生の測定は、リーフディスクを用いた方法では技術的に難しく (Desaki et al. 2019)、培養細胞を用いて行われることが一般的である。本実験では、液体培地で栽培した約 2 週齢のイネ芽生えの完全展開葉から作成したリーフディスクを用いることで ROS 産生が簡便かつ安定的に測定可能であることを見出し、この条件で実験を行った。

flg22 誘導性の ROS バーストは、*Ospepr1-ko* において野生型と同レベルであったことから、*Ospepr1-ko* は PTI における ROS バースト誘導能そのものは保持していることが確かめられた (Fig. 3-2A)。6 つの OsPep ペプチドのうち、野生型では OsPep3、OsPep6、及び OsPep2 の投与によって ROS バーストが誘導された一方で、*Ospepr1-ko* ではいずれの OsPep に対しても有意な誘導が見られなかった (Fig. 3-2B, C)。

以上の結果より、イネにおいて *OsPEPR1* が OsPep 応答に必要であることが示され、単一の受容体 *OsPEPR1* のみで OsPep を認識している可能性が強く示唆された。

3-3 *OsPEPR1* の導入シロイヌナズナは OsPep 応答性を獲得しなかった

Pep の認識は植物の種を越えても起こり得るものの、それは同一科内に限定される (Lori et al. 2015)。実際、*N. benthamiana* (ナス科) はシロイヌナズナ (アブラナ科) やイネ (イネ科) 由来の Pep ペプチドを認識できない。しかし、*N. benthamiana* に、シロイヌナズナの *AtPEPR1* やイネの *OsPEPR1* を導入すると、それぞれ対応するリガンドを認識し、ROS バーストなどの防御応答を誘導する能力を獲得する。このように受容体を移入するだけで、本来非感受性の植物に MAMP/DAMP リガンドの認識能を付与できることが報告されている (Boutrot and Zipfel 2017)。そこで、シロイヌナズナに *OsPEPR1* を導入し、植物種間での PEPR 機能の互換性を検証した。

野生型 (Col-0) および *Atpepr1 pepr2* 変異体を背景に *OsPEPR1* 遺伝子を導入したシロイヌナズナを作出して植物の Pep 応答性を評価した。まず、T2 の成熟葉を用いて RT-qPCR によって *OsPEPR1* の発現レベルを測定し、*OsPEPR1* 遺伝子を恒常的に高発現している植物体を選抜した (Fig.3-3A)。野生型と *Atpepr1 pepr2* 変異体背景のそれぞれ 8 ラインの成熟葉を用いて、ROS バーストを指標に OsPep 応答性を調べた。ペプチドは、結果 3-2 で示した通り、OsPep の中で最も応答性の高かった OsPep6 を代表として用いた。内生 *AtPEPR* の存在下では *AtPep1* 応答性は確認できたものの、OsPep6 応答性を獲得したラインはなかった。*Atpepr1 pepr2* 変異体背景にお

いても OsPep6 応答性を獲得したものはなかった (Fig.3-3B, C)。

以上の結果から、タバコとは異なり、シロイヌナズナでは *OsPEPR1* を導入するだけではシグナル機能には不十分であることが示唆された。すなわち、PRR の互換性は、必ずしもどの植物種間でも成立するわけではないことが示された。

3-4 *OsPEPR1* は *OsSERK1/2* とリガンド依存的に複合体を形成し、MAPK を活性化する

OsPEPR1 による免疫シグナル活性化メカニズムの解明を進める第一歩として、*OsPEPR1* と *OsSERK1/2* の共受容体候補である SERK ファミリーメンバーとのタンパク質間相互作用を解析した。シロイヌナズナでは、*AtPEPR1* は共受容体 *BAK1* と Pep リガンド依存的に複合体を形成し、MAPK カスケードなど下流の防御応答を活性化する (Yamada et al. 2016)。*BAK1* のホモログとしてイネでは *OsSERK1* および *OsSERK2* が同定されており、*BAK1* とアミノ酸配列の高い相同性が見られる

(McAndrew et al. 2014)。*PEPR* と同じく LRR-RK である *Xa21* 受容体は、*Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae* (*Xoo*) 細菌由来のチロシンスルフィル化 RaxX ペプチドを認識して病原抵抗性を誘導するが (Pruitt et al. 2015)、リガンド非依存的に *OsSERK2* と複合体を形成するとの報告がある (Chen et al. 2014)。一方、*OsPEPR1* を含めて他の LRR 型 PRR についての報告はなく、イネにおいて LRR 型 PRR と SERK の受容体複合体形成がリガンド依存的に起こるかどうかを議論するにも情報が極めて乏しい状況であった。

そこで、アグロバクテリウムを介した *N. benthamiana* 葉への一過的遺伝子発現系を用いて、*OsPEPR1*、*OsSERK1*、および *OsSERK2* を共発現させ、共免疫沈降法 (co-IP) によりタンパク質相互作用を解析した。その結果、*OsPEPR1* は *OsSERK1* および *OsSERK2* と *OsPep6* 投与区において特異的に相互作用していることが示された。さらに、*OsPEPR1*-*OsSERK2* 複合体形成条件において、*OsPep6* による MAPK リン酸化 (活性化) が誘導されており、同複合体がシグナル機能を有していることも示唆された (Fig. 3-4A, C)。次に、*OsPEPR1* はシロイヌナズナ *BAK1* と相互作用するかどうか、同様に co-IP 解析により検証した。その結果、*OsSERK2* と比べると弱いものの、*OsPep6* 投与区で *OsPEPR1* と *BAK1* との相互作用が確認された。しかしながら、*OsPep6* 投与にもかかわらず、MAPK の活性化は見られなかったことから、*OsPEPR1*-*AtBAK1* 複合体はシグナル不活型の複合体であることが示唆された (Fig. 3-4B, C)。*N. benthamiana* では *OsPEPR1* 単体の導入でも *OsPep* 応答性を獲得

することから (Shinya et al. 2017)、AtBAK1 は OsPEPR1 との相互作用もしくは細胞死抑制経路など他の経路 (Yasuda et al. 2017) を介して、OsPEPR1 による免疫シグナルの活性化を阻害していることが示唆された。

以上により、OsPEPR1 は、OsSERK1 および OsSERK2 とリガンド依存的に複合体を形成し、MAPK を活性化する能力を有することが明らかになった。一方で、OsPEPR1 と BAK1 の複合体は MAPK 活性化を誘導しないことから、少なくとも *N. benthamiana* の葉において、シロイヌナズナ BAK1 は OsPEPR1 の共受容体として機能できないことが推察された。イネとシロイヌナズナでは PEPR がパートナーSERK 分子種とともにそれぞれ分化した結果、互換性を失っていることが示唆された。この結果は、シロイヌナズナへの *OsPEPR1* 導入が OsPep 応答を獲得しなかった上記の結果とも合致する。

OsPep-OsPEPR1 の成長促進機構

3-5 OsPep6 はイネの成長促進機能を有する

Pep ペプチドは、免疫制御以外にも異なる生理機能を有することが示唆されている。そこで、OsPeps ペプチドをイネ芽生えに投与した際に起こる形態変化に着目した。イネ種子を、農業でも通常用いられている防カビ剤（後述）で1日間処理し、もともと付着している細菌が残存する条件で、各1 μM OsPep を含む水耕液中で発芽させ、4日後に表現型を解析した。その結果、OsPep1-OsPep6 のいずれを投与した場合も、シュートと根の両方で成長促進効果が見られた (Fig. 3-5A)。OsPep ペプチドの中で、特に OsPep6 が根系の拡張を伴う根系構造の変化を顕著に誘導したため、以降は OsPep6 を用いて解析を進めた。

続いて、生重量を指標として成長促進効果の OsPep6 濃度依存性を検証した。終濃度 0、0.01、0.1、1、10 μM の OsPep6 処理区を用意し、シュートと根の生重量を比較した。その結果、植物体あたりの生重量は 0.1~10 μM で有意な増加が見られた。よって、OsPep6 は、他の PTI 関連の防御応答とほぼ同じように 0.1 μM 前後から顕著な誘導効果を示すことが明らかになった。さらに、OsPep6 が生重量増加を示すペプチド濃度には閾値が存在し、閾値以上では同レベルでの生重量増が保持され、10 μM の高濃度でも成長阻害にはつながらないことが示された (Fig. 3-5B)。

興味深いことに、OsPep による形態変化はリン欠乏応答に見られる根系構造の変化 (Shahzad and Amtmann 2017) に酷似していた。OsPep 投与植物を精査したところ、リン欠乏応答に特徴的な主根伸長の抑制、側根の数・密度・伸長の増加、及び根毛の増加を伴っていた。根における OsPep 誘導性の防御応答はリン濃度に影響されることから (Fig. 3-1A)、OsPep の成長促進・根系構造改変機能のリン濃度依存性について調査した。OsPep6 処理をリン十分 (+Pi; 200 μM) またはリン欠乏 (-Pi; 20 μM) KH_2PO_4 の水耕液中で行い、主根から出現した側根の本数を測定することで OsPep6 による根系変化の定量化を試みた。その結果、側根の本数は -Pi での OsPep6 投与区で最大となったが、OsPep6 は +Pi でも -Pi でも顕著に側根数を増加させることがわかった (Fig. 3-5C)。

したがって、OsPep 投与は、免疫活性化の際に往々にして見られる生育阻害を引き起こさず、むしろ根系の生重量増加を伴う構造変化を誘導することが示された。PEPR 受容体の生育促進機能については土壤栽培シロイヌナズナで報告があるものの、Pep ペプチドによる生育促進機能は新規な現象であり、イネでは Pep ペプチド投与による生育阻害を緩和・抑制する仕組みが背景にあると推察された。

3-6 OsPep6 によるイネ成長促進効果は種子微生物に依存する

Pep ペプチドが免疫活性化ペプチドであること、並びに防カビ剤で処理した種子に細菌が残存していることから、OsPep の植物成長促進機能と種子由来の細菌（叢）との関係性に興味を持たれた。そこで、OsPep6 投与による成長促進効果の細菌依存性を検証した。

本研究で用いた防カビ剤であるベノミル水和剤は、いもち病菌 (*Magnaporthe oryzae*) やばか苗病菌 (*Gibberella fujikuroi*) といった真菌性の病原菌の伝染源となる保菌種子の消毒剤として、農業的にも一般的に用いられている (Kimura and Ogawa 2005)。ベノミル水和剤で1日間処理した種子を寒天培地に静置すると1-3日で種子の周りに細菌らしきコロニーが多数形成された (Fig. 3-6A)。一方、20%次亜塩素酸ナトリウムで1時間種子を処理すると、寒天培地に静置しても細菌らしきコロニーは形成されないため、完全に滅菌されたと考えられた。

よって、種子殺菌法として、① Fig. 3-5 と同様に防カビ剤のみで1日間処理、もしくは② 20%次亜塩素酸ナトリウム1時間（完全滅菌）に続いて滅菌水23時間処理、③ 完全滅菌種子（②）に加えて防カビ剤処理の種子（①）を1粒添加する処理区、を用意し比較した (Fig. 3-6B)。③で1粒添加した防カビ処理種子は胚を加熱したピンセットで焼き殺しており、同種子自身は発芽しないものの、種子細菌の供給ソースとして働くことが期待された。OsPep 投与4日後、①では先述の結果と一致して、根系の拡張、及び根とシュートともに生重量の増加が見られ、植物体あたりの生重量が有意に増加した。対照的に②では、OsPep による根系の拡張は見られず、根及び植物体あたりの生重量が減少に転じた。③では②と異なり、生重量は減少しなかった (Fig. 3-6C)。したがって、完全無菌条件においては、シロイヌナズナ等における Pep ペプチドと同様に、OsPep6 もイネの成長阻害効果を示すことがわかった。一方、種子由来の細菌の存在下では成長阻害効果が緩和され、むしろ成長促進につながることを示唆された。なお、OsPep 投与なし区においては、完全滅菌種子に比べると、種子微生物の存在下では、植物生重量は低下した。

3-7 OsPep6 は、種子の由来にかかわらず共生細菌叢の変化を誘導する

OsPep6 成長促進効果には種子由来の細菌が関与していることが示唆されたため、種子由来で芽生えの根に形成される細菌叢に OsPep6 が与える影響を解析した。防カ

ビ剤処理した野生型種子を 1 μ M OsPep6 を含む水耕液（リン十分、またはリン欠乏）に播種し、4 日後の根表層・根内の細菌叢をメタ 16Sr RNA 解析によって調べた。得られた配列情報をもとに、任意で定めた値以上の相同性を示すリードを解析上の「種」とみなしてクラスタリングすることによって、微生物の種類や相対存在量を示した。

細菌 OTU（Operational taxonomic Unit, $\geq 97\%$ の DNA 配列相同性）に基づいてリードを分類し、全リード数における各属のリード数の割合（相対量、relative abundance）をサンプルごとに集計した。その結果、+ Pi では、OsPep6 投与区と対照区（mock）のいずれにおいても、*Pseudomonas* 属、*Massilia* 属および未分類の *Rhizobiaceae* 科の細菌が高い割合を占めていた。ところが、- Pi では、OsPep6 の有無で異なる属の細菌が高い割合を占めており、優占細菌属にも顕著な差異が認められた。mock では *Pseudomonas* 属、*Paenibacillus* 属および *Massilia* 属の割合が高かった一方で、OsPep6 投与区では *Sphingomonas* 属、*Xanthomonas* 属、および未分類の *Burkholderiaceae* 科の割合が高かった（Fig.3-7）。

さらに、OTU よりも分解能が高い ASV（Amplicon Sequence Variant, $\geq 99\%$ の DNA 配列相同性）を用いて、主座標分析（PCoA）解析によって各処理区の細菌叢の群集構造全体の類似性を解析した。いずれのサンプルもおおよそ 100 種類の ASV が検出された。+ Pi において OsPep6 投与区と対照区（mock）の細菌叢は近似した位置にプロットされたものの、- Pi においては両者が完全に相違した位置にプロットされた（Fig.3-8A）。OsPep6 は、特にリン欠乏条件において根の共生細菌叢の群集構造を著しく変化させることが示唆された。次に、シャノン指数を用いた細菌叢の多様度（Alpha Diversity）を解析したところ、-Pi 条件では+Pi 条件と比較して細菌叢の多様性が低下すること、さらに OsPep6 投与は菌多様性の回復に一定の効果があることが示された（Fig.3-8B）。

以上の結果から、予想どおり、防カビ剤で処理した種子を水耕栽培させたイネの根には多様な細菌が生息していること、並びに特にリン欠乏条件において OsPep6 投与は共生細菌叢の優先菌種や群集構造を大きく変化させることが明らかになった。また、本実験系は、防カビ剤処理により真菌の増殖を抑えつつ、発芽後植物において種子由来の細菌叢を解析する上で有効であると考えられた。

上記の結果から、OsPep6 による成長促進効果や根系の改変に共生細菌が関与している可能性が示唆された。本実験系では細菌を人為的に接種しておらず、栽培環境下で種子にもともと生息している（もしくは付着している）細菌がそのまま微生物

ソースとなっている。種子細菌叢は種子の栽培・収穫歴を反映しているため、上記の仮説が正しければ種子細菌叢の違いが OsPep6 応答性にも影響を与える可能性も考えられた。そこで、上記の実験で用いた種子（当大学の温室で収穫）に加えて、異なる環境の野外圃場で栽培・収穫された種子（いずれも日本晴）も用いて、リン欠乏条件で OsPep6 処理実験を行った。調査した 4 種類の野外圃場由来の種子のうち、3 種類について、OsPep6 による成長促進効果が認められた (Fig.3-9A)。よって、野外圃場の施肥レベルや他の環境条件・栽培地域の差異に関わらず、少なくとも同品種に関しては、リン欠乏条件において OsPep6 を投与すると概して成長促進につながることを示唆された。

その解釈として、次の三つの可能性が考えられた。①本実験に用いた種子が栽培・収穫環境の違いにかかわらず、親世代において例えば植物免疫による選抜の結果、共通の種子細菌叢を保持している可能性、②もともとの種子細菌叢が異なっている場合、OsPep6 投与は同様の細菌叢形成を誘導する可能性、さらには③分類的には異なる細菌叢であっても OsPep6 投与は細菌叢に同様に植物成長促進機能を発現させる可能性である。これらの可能性を検証するため、異なる栽培環境で収穫された種子をメタ 16S rRNA 解析に供して細菌叢を調べた。PCoA 解析によって、圃場ごとに種子細菌叢 (mock 区) は別々の位置にプロットされ、OsPep6 によっておのおののプロット位置が変化した (Fig.3-9B)。また、いずれの圃場由来の種子にも共通して、4 ASVs (*Paenibacillus*, *Sphingomonas*, 及び *Enterobacteriaceae* の 2 菌種) が OsPep 投与区でのみ検出された (Fig.3-10)。

以上から、少なくとも野生型 (日本晴) においては、栽培環境条件が異なれば収穫種子の細菌叢の群集構造に有意な差異が見られること、並びにその相違に関わらず OsPep6 投与はその群集構造を大きく変えることが示され、芽生えの生重量増加との関連性が示唆された。また、おそらく栽培歴の違いを反映して、細菌叢の群集構造 (全体像) が大きく異なる種子サンプルの間で、OsPep6 投与によって相対存在比が増加する特定の菌種が共通して存在することも明らかになった。

3-8 *Shingomonas* sp. (NB7) は、OsPep、OsPEPR1、OsCCaMK 依存的にイネの成長を促進する

OsPep6 による成長促進効果は種子由来の細菌に依存することが示唆されたものの、それをもたらす菌種あるいは細菌叢の群集構造は不明のままであった。そこ

で、本研究室で所有する単離共生細菌株ライブラリから、イネの接種試験によって上記の OsPep6 効果に影響を与える細菌株を同定することで、OsPep-OsPEPR システムの成長促進機構に迫る糸口を得ようと考えた。

具体的には、OsPep6 投与が成長促進効果を示さない完全滅菌種子において、接種することで OsPep6 が成長促進（生重量を指標）に働くようになる細菌株のスクリーニングを進めた。スクリーニング系として、安定的に効率よく菌株をスクリーニングするのに適した寒天培地での菌接種系を採用した。寒天培地を用いることで、根系の構造も可視的に評価することが可能になった。まず、同条件においても OsPep6 投与が種子微生物の存在下では植物生重量を増加させ、非存在下では増加させないことを確認した (Fig.3-11A)。なお、完全滅菌種子に比べると、種子微生物の存在下では、OsPep 投与の有無にかかわらず、植物生重量は低下した (Fig.3-11A)。

次に、本研究室において京都の施肥圃場および無施肥圃場で栽培されたイネの根から単離された細菌約 400 株について一次スクリーニングを行った。それらの中には、イネの生重量に変化を起こさない菌株や、むしろ減少させる菌株 (*Kosakonia sacchari*) も存在した (Fig.3-11B)。有用菌候補 約 30 株については 2 次・3 次スクリーニングを行い、その中から OsPep6 投与時にイネの生重量を増加させる細菌を 1 株 (以降、NB7 と呼ぶ) 得た (Fig.3-12A)。NB7 接種によるイネ生重量増加は、完全滅菌種子では OsPep 投与区においてのみ有意に起こり、*ospepr1* 変異体では失われたことから、*OsPEPR1* による OsPep 認識に依存して起こることが明らかになった

(Fig.3-12B)。なお、野生型において OsPep6 と NB7 の同時供給によって生育促進が観察される NB7 接種 7 日後に、根の細菌量を測定したところ、OsPep6 投与による影響は見られなかった。表面殺菌した根においても、OsPep6 投与の有無で有意差は見られなかった (Fig.3-13)。この結果から、OsPep6 存在下で見られた NB7 接種 (イネ生育促進) 効果は、根圏および根内において同菌の増殖が変化したことによるものではないことが示唆された。

次に、防カビ剤で処理した種子を用いて、種子細菌叢存在下での NB7 の接種効果を調べた。野生型では OsPep6 の単独投与区および NB7 の単独接種区においてイネ生重量が増加したものの、OsPep6 と NB7 の同時供給による相加効果は見られなかった (Fig.3-14A)。種子細菌叢存在下においても、無菌条件と同様に OsPep6 投与区での NB7 によるイネ生重量増加は *ospepr1* 変異体では失われ、*OsPEPR1* 依存性が示された (Fig.3-14B)。興味深いことに、OsPep6 非投与区 (対照区) においても NB7 接種効果は *ospepr1* 変異体で失われたことから (Fig.3-14B)、NB7 が内生の OsPep および *OsPEPR1* を介してイネの成長促進に働く可能性が示唆された。

以上により、種子細菌叢の有無いずれにおいても、OsPep-PEPR1 経路を介して植物の成長を促進する共生細菌 NB7 が同定された。

上記の結果、OsPep-PEPR1 シグナル系が微生物共生の制御を介してイネの成長促進に働くことが示唆されたため、既知の共生制御経路との関係性に興味を持たれた。そこで、OsPep6 投与に依存した NB7 の接種効果が見られる完全無菌種子を用いて、同効果におけるイネの共生制御因子の役割を検証した。興味深いことに、NB7 によるイネの生重量増加は、OsPep6 の投与の有無にかかわらず *ccamk* 変異体では見られなかった (Fig.3-15A)。よって、菌根共生や根粒共生と同様に共通共生経路が介在している可能性が示唆された。次に、リーフィディスクを用いた ROS の産生を指標として、OsPep6 による防御応答への *ccamk* 変異の影響を調べた。OsPep6 誘導性の ROS バーストは、*ccamk* において野生型と同レベルであった (Fig.3-15B)。したがって、上記の ROS バーストは根ではなく葉の防御応答ではあるものの、CCaMK は OsPep による共生制御に必要である一方で免疫制御においては必要ではないことが示唆された。すなわち、OsPEPR1 シグナル系において、免疫制御経路と共生制御経路が CCaMK 要求性に関して分離される可能性が強まった。

3-9 *Shingomonas* sp. (NB7) のゲノム解析

細菌 NB7 の分類情報を得ることを目的に、16s rRNA の V3-V4 領域の約 760 bp の DNA 配列をサンガーシーケンス法によって決定した。BLAST 検索したところ、NB7 は *Sphingomonas* 属の一種と推定された。NB7 は R2A 寒天培地上で *Sphingomonas* 属に特徴的な黄色い色のコロニーを形成する (Fig.3-16A)。また、NB7 は京都府宇治市にある優良無施肥圃場で栽培されたイネの根から単離された細菌である。同菌は互いに隣接する無施肥・有施肥圃場において実施したイネ根のメタ 16S シークエンス解析においても検出されており、無施肥圃場においてイネの生育初期～中期に根内の相対存在比が高かった (Fig. 3-16B)。

さらに、完全長ゲノムシーケンス解析を行い、NB7 の全長コンティグ配列を取得した。NCBI (National Center for Biotechnology Information) のデータベース上には 601 種のゲノムが *Sphingomonas* 属として登録されており、その中から Average nucleotide identity (ANI) に基づく近縁種の探索を行った。ANI については、同一性 95~96%以上で同一種と判断する手法が広く用いられている (Jain et al. 2018; Chun et al. 2018)。近縁種として *S. azotifigens*、*S. trueperi*、*S. pituitosa*、*S. elodea* が挙げられた。

が、最も ANI が高かった *S. azotifigens* NBRC 15497 でも ANI は 89.03% だった。現在報告されている *Sphingomonas* ゲノムはいずれも NB7 と ANI が 90% 未満であることから、NB7 株は新種の可能性が高い (Fig. 3-16C)。また、NB7 と *Sphingomonas* 27 種、Outgroup に *Zymomonas mobilis* を加えた計 29 株で RaxML-NG v1.1.0 [6] を用いて系統樹を作成した。作成に際しては 29 株に共通する 235 のマーカー遺伝子を選出し、アミノ酸配列を系統樹の作成に用いた。1000 回の bootstrap により branch support value を算出した (Fig. 3-17)。近縁なクレードに位置する *S. azotifigens*、*S. trueperi* は、窒素固定能を持つことが報告されている (Xie and Yokota 2006; Xu et al. 2018)。しかしながら、NB7 は *nifH* をはじめとする nitrogenase 関連遺伝子は有していなかったことから、自ら窒素固定はしていないものと考えられる。以上の通り、NB7 は、OsPep による成長促進機能の一端を担う、*Sphingomonas* 属の新規共生細菌株として同定された。

4. 考察

4-1. OsPep-OsPEPR シグナル系による植物の免疫及び成長の制御

Pep ペプチド及び受容体 PEPR を介したシグナル系は、防御応答を活性化し、病害抵抗性・耐虫性を増強することがシロイヌナズナやダイズ、トウモロコシなどの種子植物において報告されている (Huffaker et al. 2006, 2013; Lee et al. 2018)。本研究によって、イネにおいても Pep-PEPR シグナル系が、葉での ROS の産生や、根におけるリン欠乏下での防御応答遺伝子の発現誘導など、免疫活性化機能を有することが確認された (Fig. 3-1, 3-2)。しかし、イネにおいては細菌叢存在下において免疫活性化に伴う生育阻害が顕著に見られず、むしろストレス条件下で植物の生育を保持する方向に働くことが示唆された (Fig. 3-5)。植物の成長と免疫は概して拮抗する関係にあることが知られており、OsPep-OsPEPR シグナル系が成長と免疫の両立に働いていることの発見の意義は大きい。

Pep ペプチドを含めた DAMP シグナル系は、病原菌に限らず、様々な環境ストレスによって生じる細胞ダメージに対応するシステムとして働くと考えられている。DAMP シグナルは、ストレスや恒常性破綻の指標としてストレス防御応答を誘導するとともに恒常性を回復するためにも働くと考えられる。Pep に限らず、病原菌の感染時に誘導される内在性の免疫調節ペプチドの多くは、病原菌を撃退して防御応答を収束するに伴ってその量が減る。これは、免疫シグナルの減衰とともに、いち早く生育を回復させることにつながる。このようにして、動物のサイトカインと同様に、細胞同士で情報を伝達し、免疫の活性化レベルを調節することで免疫機能および恒常性バランスを保つ役割を担っていると考えられ、最近ではファイトサイトカインと呼ばれることも多い (Hou et al. 2021)。OsPep は、共生微生物の感染または機能発現を調節することで、特に環境ストレスの存在下で植物の生育を促進する一面も持つ可能性が示唆される。

Pep リガンドは、PROPEP の N 末端には分泌シグナルが存在しないため、PROPEP もしくは Pep エピトープを含むプロセシング産物が膜ダメージ部分から細胞外に放出され、それが同一細胞もしくは隣接細胞の細胞膜上にある PEPR に認識されると考えられている。しかしながら、本研究では、イネにおいて細胞ダメージに伴い OsPROPEP の発現や OsPep の放出が誘導されるという証拠が得られておらず、DAMP として機能しているのかについては疑問が残る。単純なダメージ放出 DAMP

モデルに当てはまらない、未同定の Pep 放出経路が関与する可能性も考えられる。共生細菌 NB7 の成長促進効果が、OsPep の投与無しでも *OsPEPR1* に依存するという結果 (Fig. 3-12, 3-13) から、同菌が細胞ダメージを起こさずに宿主 PEPR シグナルを活性化する可能性も考えられる。PEPR シグナル系による共生制御は、細胞ダメージに依存した免疫活性化メカニズムとは異なるメカニズムが関与することも推察され、今後の分子制御メカニズムの解明が待たれる。

OsPep6 投与によるイネの成長促進効果は、リン欠乏ストレスに加えて塩ストレス条件でも見られ、OsPep-OsPEPR1 シグナル系は、生育を保持する形でストレス耐性を強化する役割があると考えられる (藤、修士論文 2019)。興味深いことに、防御応答関連遺伝子の誘導はリン欠乏条件で顕著に増大する一方で、根の成長促進 (根生重量の増加) はリン欠乏条件でもリン十分条件でも同等に見られた (Fig. 3-5B, 3-5C)。また、OsPep 投与によってイネのシュート生重量あたりのリン酸濃度は増加しない (藤、修士論文 2019) ことも、成長促進効果がリン栄養条件に依存しないことと合致している。したがって、OsPep6 の免疫活性化機能・共生菌叢制御機能と、成長促進機能とではリン栄養依存性が異なっており、少なくともこの差異が生じる部分については両者で異なるメカニズムが介在していると予想される。

リンや窒素のように、植物の成長において重要でありながらも欠乏しやすい栄養素は、植物と微生物との相互作用に大きな影響を及ぼす (Parniske 2008; Vega et al. 2015; Hacquard et al. 2016; Castrillo et al. 2017) ことから、植物は栄養条件に応じて免疫応答を調節している可能性が推測される。栄養が乏しい飢餓状態の細胞では、膜ダメージ等の物理化学的な変化が生じやすく、DAMP の放出が増すことも考えられる。さらに、栄養飢餓状態をもたらす微生物こそ病原菌であるという考えに立てば、「栄養欠乏シグナル」が病原菌感染のサインとして免疫シグナル制御に関与している可能性も予想される。リン欠乏シグナルが OsPep-PEPR 免疫シグナル系の増強に働く分子メカニズムの解明を進めることで、栄養情報に基づく免疫の制御機構に迫る上で有効なブレークスルーが得られることも期待される。

4-2. Pep ペプチド受容機構の植物間比較

シロイヌナズナやダイズ、トウモロコシでは、いずれも 2 つの *PEPR* 受容体遺伝子がゲノム上に保存されており、それらが冗長的に Pep リガンドの認識に働く

(Lori et al. 2015)。シロイヌナズナでは、葉においては *AtPEPR1* が *AtPep* 応答への貢献度が高い（遺伝子欠損による影響が大きい）ものの（Yamaguchi et al. 2006, 2010; Krol et al. 2010）、*AtPep* 感受性を完全に失うためには両受容体遺伝子のダブルノックアウトが必要である（Yamaguchi et al. 2010）。イネと同じく単子葉類であるトウモロコシにおいても、*ZmPep3* による葉の虫害応答において *ZmPEPR2* と比べて *ZmPEPR1* が強く寄与しているものの、*ZmPEPR1/ZmPEPR2* の機能は冗長的である（Poretsky et al. 2020）。一方、本研究で、イネにおいては、*OsPEPR1* の単独ノックアウトで *OsPep* 感受性を失うことが示された（Fig. 3-2）。*OsPEPR2* は偽受容体であるにしても、共受容体や他のシグナル制御因子と相互作用して *OsPEPR1* シグナル伝達に影響を及ぼす可能性は否定できないものの、同じ単子葉植物であってもトウモロコシとイネでは *PEPR* 遺伝子の重複性が異なることが示唆される。

OsPEPR1 の免疫制御機能と共生制御機能、また植物成長制御機能は、同一のシグナルアウトプットなのか、あるいは異なるシグナルアウトプットなのかについて疑問が残る。イネにおいて LysM 型受容体キナーゼ *OsCERK1* は、防御応答と共生の両者の起動に寄与しており、*oscerk1* 変異体では菌根菌の感染が根の表層で停止してしまう（Miyata et al. 2014）とともに、キチン防御応答も完全に欠損する（Kouzai et al. 2014）。*OsCERK1* と複合体を形成する GPI アンカー型受容体 *CEBiP* はキチン誘導性の防御応答にのみ必須である一方で、菌根共生に際して *OsCERK1* は *OsMYR1* (*NFR5*; Nod Factor Receptor 5 のイネオースログ) と複合体を形成する（He et al, 2019; Zhang et al, 2021）。このように、*OsCERK1* は複合体の構成因子を変えることにより、防御応答と共生応答を切り替えている。*OsPEPR1* も複合体の構成因子を変えることにより、シグナル経路を選択している可能性がある。今後、*OsPep* 応答に必要な遺伝子の同定や *OsPEPR1* 相互作用タンパク質の同定などを進めることで、*OsPEPR1* のシグナル制御因子や共受容体の同定から上記の問題の解明につながる事が期待される。

4-3. *OsPep* を介した根の共生微生物叢の制御

イネ発芽種子への *OsPep* 投与は、芽生えの免疫活性化及び根系拡張に加えて、種子由来の細菌叢の群集構造を変化させることが明らかになった（Fig. 3-7, 3-8）。また、リン欠乏条件における *OsPep* の成長促進機能の発現が細菌に依存する可能性、さらには元々の種子細菌叢の違いに関わらず、*OsPep* が植物成長促進型（もしくは調和型）の細菌叢の形成を推進する可能性が示唆された（Fig. 3-9）。共生微生物叢の

機能解析手法の一つとして、植物に単離細菌株集団 (SymCom) を混合接種することで、制御環境下で細菌叢の動態や接種効果を解析する研究も盛んに行われている (Kremer et al. 2018)。本研究で確立した実験系は、細菌を人為的に接種することなく栽培環境下で種子にもともと生息している (もしくは付着している) 細菌をソースとして、根に共生細菌叢が形成される様子をトレースすることを可能にした。本研究と並行して、私も所属研究室チームに参画して進めてきた、野外圃場イネの根共生細菌叢の解析では各サンプルで約 5000 ~ 10000 ASV が検出されたのに対して、本実験系では 100 ASV 以下にとどまっていた。野外土壌栽培の根に比べると単純な系であり、そのため OsPep6 の成長促進機能や細菌叢改変機能が明瞭かつ安定的に検出できた可能性がある。

シロイヌナズナでは、無菌培地上で AtPep を投与すると主根伸長が抑制されることが複数の論文で報告されている (Krol et al. 2010; Poncini et al. 2017; Okada et al. 2021)。一方、*AtPREPR1* および *AtPREPR2* の高発現体は、土壌栽培では根の生育が促進される (Huffaker et al. 2006)。しかしながら、表現型の報告にとどまっており、分子メカニズムや AtPep による成長促進機能に関する報告はない。イネにおいては OsPep による成長促進機能が共生微生物に依存するという本結果 (Fig. 3-6, 3-11A) を踏まえると、シロイヌナズナにおいて AtPep 投与 (無菌培地) と *AtPEPR* 過剰発現 (有菌土壌栽培) が生育に及ぼす一見相反する影響も、微生物の存在の有無で説明できる可能性がある。また、リン栄養条件が OsPep による共生微生物叢の組成変化に大きく影響することをイネで示した通り、PEPR による生育促進型の共生菌叢構築機能や植物成長促進機能は、土壌栄養条件など環境条件にも依存することも示唆される。

4-4. OsPep および既知の共生経路を介した細菌株との共生

メタ 16S シーケンス解析は、微生物の分類群に基づいた情報が得られる利点がある一方で、アンプリコン (PCR 増幅) に用いた 16S rRNA の部分配列のみではその詳細な分類や生理機能はわからない (Levy et al. 2018)。また、同じ配列を持つ近縁な菌であっても、一方は共生菌、他方は病原菌として働くケースも報告されている (Hacquard et al. 2016)。そのため、共生微生物の機能を明らかにするには、単離菌の機能解析 (特に宿主植物での接種試験) を行うことが重要である。本研究では植物成長促進菌 *Sphingomonas sp.* (NB7) を得た (Fig. 3-12)。これまでに *Sphingomonas*

属細菌において、植物の成長促進機能や病害抑制機能を有するものが報告されている。オーキシンやジベレリンといった植物ホルモン様物質を産生することで植物の生育を促進したり (Asaf et al. 2018)、根系を改変させることで乾燥ストレスを緩和したり (Asaf et al. 2017; Luo et al. 2019)、病原細菌との競合により病原菌から植物を保護したりする機能である (Innerebner et al. 2011; Vogel et al. 2012)。NB7 も OsPep-PEPR1 の経路を介して、これらの機能を誘導する可能性が考えられる。また、*Sphingomonadales* 目はイネの植物齢を判定する機械学習において、初期ステージの判定に重要な OTU として挙げられている (Santos-Medellín et al. 2021)。リン欠乏下での OsPep6 投与によって芽生えにおいて相対存在比が増加する *Sphingomonas* 属 NB7 に関しても、圃場では生育初期ステージで相対存在比が高く、さらには有施肥圃場と比較して無施肥圃場において相対存在比が高い (Fig. 3-16B)。よって、イネの植物齢や栄養条件を判定する上で NB7 が指標菌として有用であること、さらにはイネの貧栄養土壌への適応に貢献している可能性も期待される。

興味深いことに、菌根共生および根粒共生の共通共生制御因子である *CCaMK* の欠損変異体では、NB7 の成長促進効果は見られなかった (Fig. 3-15)。野外圃場でのイネ根の共生微生物叢において、*ccamk* 変異体では野生型に比べて *Sphingomonadales* 目の存在比が低いことが報告されており、*OsCCaMK* 遺伝子が *Sphingomonadales* 目との共生制御に関与する可能性が示唆されている (Ikeda et al. 2011)。一方、実験室条件では *ccamk* による共生細菌構成の変化はほとんど観察されていない (Ikeda et al. 2011)。しかしながら、このデータは解析精度の低い手法で得られたものであり、本研究室でも詳細な共生微生物叢解析を現在行っているところである。なお、*CCaMK* は植物の陸上進出に伴い獲得された遺伝子と推測されており、高等植物に広く保存されているものの、アブラナ科は *CCaMK* を含む共通共生経路の遺伝子群を欠損している (Wang et al. 2015)。OsPep6 成長促進機能が細菌依存性であり、NB7 がその一翼を担う可能性は示唆されたものの、OsPep6 誘導性の共生微生物叢変化が果たす役割や、OsPep6 及び NB7 によるイネ成長促進メカニズムの大部分、および両者の関係性は不明のままである。その解明の一助として、本学の峠隆之博士、渡邊むつみ博士に依頼し、NB7 接種の有無における根の代謝成分解析 (LC/MS) を行ったところ、*OsPEPR1* 依存的に NB7 接種区で特異的に増加する根の代謝成分ピーク (未同定) が検出された (補足資料-1)。したがって、NB7 に応答した植物、もしくは植物からのシグナルを受けた菌、あるいは両者の共同作業により、特定の代謝物が産生

されている可能性が考えられる。また、OsPep6 投与は根圏および根内の NB7 の増殖には寄与しないことから (Fig.3-14)、OsPep6 は共生細菌の生理活性調節に働くことが予想される。上記の代謝産物は、植物の成長促進物質として、あるいは植物-共生細菌間のコミュニケーションを担うシグナル因子として働く可能性がある。

今後、NB7 以外にも、OsPep6 投与によって相対存在比が増加する他の菌株や逆に減少する菌株に着目し、本研究と同様に機能解析を進めることで、OsPep による共生細菌叢シフトの生物学的意義の解明につながると期待される。また、シロイヌナズナは共通共生経路を欠損していることもあり、植物免疫系に関して最も進んだ知見を、菌根共生や根粒共生の研究で蓄積された共生制御機構に関する知見と融合させて免疫-共生のシグナルクロストーク機構の解明に活かすことが困難である。そのため、イネにおいて OsPep-PEPR 免疫制御シグナル系と共通共生経路が機能的に連携している可能性を示唆した本研究の意義は大きい。今後、本研究が足がかりとなって、OsPEPR の共生制御機能における CCaMK を始めとした共通共生経路の役割や両経路のシグナルクロストーク機構の解明が進むことも期待される。また、シロイヌナズナは種子微生物叢も貧弱であり、本系は、種子微生物叢が植物の発芽後成長や共生微生物叢形成に果たす役割を解析する上でも有効なモデルを提供できると考えている。

4-5 総括

植物微生物相互作用に関する研究は、主に特定の実験室環境条件において行われてきたため、植物の生存や作物生産にも重要な、環境変動が植物微生物相互作用に及ぼす影響についてはよくわかっていなかった。植物・微生物・環境因子の関係性の重要性は植物病原体相互作用において古くから提唱されてきており (Disease triangle; Scholthof 2007)、それを共生微生物 (叢) に拡張して分子メカニズムを解明することは学術的にも社会的にも非常に重要である。本研究では、植物 (イネ) を材料に、環境 (リン欠乏・十分条件) で、微生物 (種子由来の微生物叢) が織りなす三者間相互作用の役割や制御機構について、OsPep-PEPR シグナル系に着目して迫った。免疫活性化ペプチド Pep の新たな機能として「根系の成長促進機能」と「共生微生物叢の制御機能」を見い出し、両者を関連づけることができた (Fig. 4-1, 4-2)。Pep-PEPR システムは高等植物に広く保存されている。しかしながら、シロイヌナズナとイネでは、植物ホルモンの濃度や応答性、シグナル伝達経路や形態形成メ

カニズム、さらには種子微生物叢など、様々な相違点があり、その結果、根の Pep 応答に大きな違いが生じていると考えられる。よって、本研究を発展させることで、シロイヌナズナで得られた知見に偏重して構築された現在のパラダイムに再考を迫る一助となることも期待される。

植物と微生物の相互作用を人為的に操作することが可能になれば、植物のゲノム情報を改変することなく、さまざまな新しい表現型を生み出すことが可能である。

「植物の遺伝子型×マイクロバイオータ」の統合的なアプローチは、社会ニーズに合ったオーダーメイド植物を迅速に作る上で有効な手法として期待される (Wei and Jousset 2017)。本研究を応用することで、イネの育苗に際して、種子に OsPep を (もしくは相乗効果を示す微生物と共に) 投与することで、生育調和・推進型の微生物叢形成を助長し、健全な育苗につながるといった農業的利用も期待される。

5. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始ご指導、ご鞭撻を賜りました西條雄介教授、Yuniar Devi Utami 博士、晝間敬准教授、舘田知佳助教、安達広明助教、安田盛貴博士、田島由理博士に深く感謝申し上げます。また、研究に関する助言を賜りましたアドバイザー教員の梅田正明教授、吉田聡子教授に感謝申し上げます。

また、本研究に用いたイネ形質転換植物を作出してくださった国際農林水産業研究センターの藤田泰成博士および石崎琢磨博士、イネの種子を分譲して頂いた国立遺伝学研究所の佐藤豊博士、NPO 法人 無施肥無農薬栽培調査研究会の栗田光雄様、東北大学の南澤究博士、経塚淳子博士、菌叢解析のサポートをいただいた東京工業大学の本郷裕一博士、*Sphingomonas sp.* のゲノム解析のサポートをしていただいた遺伝学研究所の村上匠博士、単離菌の接種実験についてご助言をいただいた Chinese Academy of Sciences の Yang Bai 博士、イネの貧栄養土壌栽培をご指導いただいた小八重善裕博士、*N. benthamiana* の一過的遺伝子発現系を用いた OsPEPR1 複合体の解析をご教授いただいた UC Davis の Dinesh-Kumar 教授、代謝成分解析を引き受けていただいた奈良先端科学技術大学院大学の峠隆之博士、渡邊むつみ博士に感謝申し上げます。

さらに、研究プロジェクトを一緒に遂行してくれた西條研究室の清水幸子氏、有年由紗氏、今井俊介氏、切田澄礼氏、木戸将太氏に感謝申し上げます。また研究を支えてくださった玉置優子氏、松原美絵氏ならびに研究室の皆様感謝申し上げます。

2022 年 3 月 17 日

植物免疫学研究室

藤 雅子

6. 参考文献

- Ambastha V, Sopory SK, Tiwari BS, Tripathy BC (2017) Photo-modulation of programmed cell death in rice leaves triggered by salinity. *Apoptosis* 22:41–56. doi: 10.1007/s10495-016-1305-7
- Asaf S, Khan AL, Khan MA, et al (2018) Complete genome sequencing and analysis of endophytic *Sphingomonas* sp. LK11 and its potential in plant growth. *3 Biotech* 8:. doi: 10.1007/s13205-018-1403-z
- Asaf S, Khan AL, Khan MA, et al (2017) Osmoprotective functions conferred to soybean plants via inoculation with *Sphingomonas* sp. LK11 and exogenous trehalose. *Microbiol Res* 205:135–145. doi: 10.1016/j.micres.2017.08.009
- Ausubel FM (2005) Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved? *Nat Immunol* 6:973–979. doi: 10.1038/ni1253
- Balzergue C, Chabaud M, Barker DG, et al (2013) High phosphate reduces host ability to develop arbuscular mycorrhizal symbiosis without affecting root calcium spiking responses to the fungus. *Front Plant Sci* 4:1–15. doi: 10.3389/fpls.2013.00426
- Bari R, Jones JDG (2009) Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Mol Biol* 69:473–488. doi: 10.1007/s11103-008-9435-0
- Bartels S, Boller T (2015) Quo vadis, Pep? Plant elicitor peptides at the crossroads of immunity, stress, and development. *J Exp Bot* 66:5183–5193. doi: 10.1093/jxb/erv180
- Berendsen RL, Pieterse CMJ, Bakker PAHM (2012) The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends Plant Sci* 17:478–486. doi: 10.1016/j.tplants.2012.04.001
- Bernaola L, Cosme M, Schneider RW, Stout M (2018) Belowground Inoculation With Arbuscular Mycorrhizal Fungi Increases Local and Systemic Susceptibility of Rice Plants to Different Pest Organisms. *Front Plant Sci* 9:1–16. doi: 10.3389/fpls.2018.00747
- Boller T, 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. doi: 10.1146/annurev.arplant.57.032905.105346
- Bose J, Rodrigo-Moreno A, Shabala S (2014) ROS homeostasis in halophytes in the context of salinity stress tolerance. *J Exp Bot* 65:1241–1257. doi: 10.1093/jxb/ert430
- Boutrot F, Zipfel C (2017) Function , Discovery , and Exploitation of Plant Pattern Recognition Receptors for Broad-Spectrum Disease Resistance. *Annu Rev Phytopathol* 55:257–286
- Brunel C, Pouteau R, Dawson W, et al (2020) Towards Unraveling Macroecological Patterns in Rhizosphere Microbiomes. *Trends Plant Sci* 25:1017–1029. doi: 10.1016/j.tplants.2020.04.015
- Callahan BJ, Mcmurdie PJ, Rosen MJ, et al (2016) DADA2: High resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat Methods* 13:581–583. doi: 10.1038/nmeth.3869.DADA2

- Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, et al (2010) QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods* 7:335–336. doi: 10.1038/nmeth.f.303.QIIME
- Castrillo G, Teixeira PJPL, Paredes SH, et al (2017) Root microbiota drive direct integration of phosphate stress and immunity. *Nature* 543:513–518. doi: 10.1038/nature21417
- Chen T, Nomura K, Wang X, et al (2020) A plant genetic network for preventing dysbiosis in the phyllosphere. *Nature* 580:653–657. doi: 10.1038/s41586-020-2185-0
- Chen X, Zuo S, Schwessinger B, et al (2014) An XA21-associated kinase (OsSERK2) regulates immunity mediated by the XA21 and XA3 immune receptors. *Mol Plant* 7:874–892. doi: 10.1093/mp/ssu003
- Chuberre C, Plancot B, Driouich A, et al (2018) Plant immunity is compartmentalized and specialized in roots. *Front Plant Sci* 871:1–13. doi: 10.3389/fpls.2018.01692
- Chun J, Oren A, Ventosa A, et al (2018) Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes. *Int J Syst Evol Microbiol* 68:461–466. doi: 10.1099/ijsem.0.002516
- Couto D, Zipfel C (2016) Regulation of pattern recognition receptor signalling in plants. *Nat Rev Immunol* 16:537–552. doi: 10.1038/nri.2016.77
- Cui H, Tsuda K, Parker JE (2015) Effector-triggered immunity: From pathogen perception to robust defense. *Annu Rev Plant Biol* 66:487–511. doi: 10.1146/annurev-arplant-050213-040012
- De Vleeschauwer D, Gheysen G, Höfte M (2013) Hormone defense networking in rice: Tales from a different world. *Trends Plant Sci* 18:555–565. doi: 10.1016/j.tplants.2013.07.002
- Desaki Y, Shimada H, Takahashi S, et al (2019) Handmade leaf cutter for efficient and reliable ROS assay. *Plant Biotechnol* 36:275–278. doi: 10.5511/plantbiotechnology.19.0921a
- Edwards J, Johnson C, Santos-Medellín C, et al (2015) Structure, variation, and assembly of the root-associated microbiomes of rice. *Proc Natl Acad Sci* 112:E911–E920. doi: 10.1073/pnas.1414592112
- Edwards JA, Santos-Medellín CM, Liechty ZS, et al (2018) Compositional shifts in root-associated bacterial and archaeal microbiota track the plant life cycle in field-grown rice. *PLoS Biol* 16:1–28. doi: 10.1371/journal.pbio.2003862
- Eyre AW, Wang M, Oh Y, Dean RA (2019) Identification and characterization of the core rice seed microbiome. *Phytobiomes J* 3:148–157. doi: 10.1094/PBIOMES-01-19-0009-R
- Gourion B, Berrabah F, Ratet P, Stacey G (2015) Rhizobium-legume symbioses: The crucial role of plant immunity. *Trends Plant Sci* 20:186–194. doi: 10.1016/j.tplants.2014.11.008
- Gully K, Hander T, Boller T, Bartels S (2015) Perception of Arabidopsis AtPep peptides, but not bacterial elicitors, accelerates starvation-induced senescence. *Front Plant Sci*. doi: 10.3389/fpls.2015.00014

- Gust AA, Pruitt R, Nürnberger T (2017) Sensing Danger: Key to Activating Plant Immunity. *Trends Plant Sci* 22:779–791. doi: 10.1016/j.tplants.2017.07.005
- Gutjahr WC, Banba M, Croset V, et al (2008) Arbuscular Mycorrhiza–Specific Signaling in Rice Transcends the Common Symbiosis Signaling Pathway. *The Plant Cell*, Vol. 20:2989–3005. doi: 10.1105/tpc.108.062414
- Hacquard S, Kracher B, Hiruma K, et al (2016) Survival trade-offs in plant roots during colonization by closely related beneficial and pathogenic fungi. *Nat Commun* 7:11362. doi: 10.1038/ncomms11362
- Hacquard S, Spaepen S, Garrido-Oter R, Schulze-Lefert P (2017) Interplay Between Innate Immunity and the Plant Microbiota. *Annu Rev Phytopathol* 55:565–589
- Harbort CJ, Hashimoto M, Inoue H, et al (2020) Root-Secreted Coumarins and the Microbiota Interact to Improve Iron Nutrition in Arabidopsis. *Cell Host Microbe* 28:825–837.e6. doi: 10.1016/j.chom.2020.09.006
- He J, Zhang C, Dai H, et al (2019) A LysM Receptor Heteromer Mediates Perception of Arbuscular Mycorrhizal Symbiotic Signal in Rice. *Mol Plant* 12:1561–1576. doi: 10.1016/j.molp.2019.10.015
- Hiruma K, Gerlach N, Sacristán S, et al (2016) Root Endophyte *Colletotrichum tofieldiae* Confers Plant Fitness Benefits that Are Phosphate Status Dependent. *Cell* 165:464–474. doi: 10.1016/j.cell.2016.02.028
- Horváth B, Yeun LH, Domonkos Á, et al (2011) *Medicago truncatula* IPD3 is a member of the common symbiotic signaling pathway required for rhizobial and mycorrhizal symbioses. *Mol Plant-Microbe Interact* 24:1345–1358. doi: 10.1094/MPMI-01-11-0015
- Hou S, Liu D, He P (2021) Phytocytokines function as immunological modulators of plant immunity. *Stress Biol* 1:1–14. doi: 10.1007/s44154-021-00009-y
- Huffaker A, Dafoe NJ, Schmelz EA (2011) ZmPep1, an Ortholog of Arabidopsis Elicitor Peptide 1, Regulates Maize Innate Immunity and Enhances Disease Resistance. *PLANT Physiol* 155:1325–1338. doi: 10.1104/pp.110.166710
- Huffaker A, Pearce G, Ryan CA (2006) An endogenous peptide signal in Arabidopsis activates components of the innate immune response. *Proc Natl Acad Sci* 103:10098–10103
- Huffaker A, Pearce G, Veyrat N, et al (2013) Plant elicitor peptides are conserved signals regulating direct and indirect antiherbivore defense. *Proc Natl Acad Sci* 110:5707–5712. doi: 10.1073/pnas.1214668110
- Huffaker A, Ryan CA (2007) Endogenous peptide defense signals in Arabidopsis differentially amplify signaling for the innate immune response. *Proc Natl Acad Sci* 104:10732–10736
- Huot B, Yao J, Montgomery BL, He SY (2014) Growth–Defense Tradeoffs in Plants: A Balancing Act to Optimize Fitness. *Mol Plant* 7:1267–1287. doi: 10.1093/mp/ssu049
- Ikeda S, Okubo T, Takeda N, et al (2011) The Genotype of the Calcium/Calmodulin-

- Dependent Protein Kinase Gene (CCaMK) Determines Bacterial Community Diversity in Rice Roots under Paddy and Upland Field Conditions. *Appl Environ Microbiol* 77:4399–4405. doi: 10.1128/AEM.00315-11
- Innerebner G, Knief C, Vorholt JA (2011) Protection of *Arabidopsis thaliana* against leaf-pathogenic *Pseudomonas syringae* by *Sphingomonas* strains in a controlled model system. *Appl Environ Microbiol* 77:3202–3210. doi: 10.1128/AEM.00133-11
- Jain C, Rodriguez-R LM, Phillippy AM, et al (2018) High throughput ANI analysis of 90K prokaryotic genomes reveals clear species boundaries. *Nat Commun* 9:1–8. doi: 10.1038/s41467-018-07641-9
- Jones JDG, Dangl JL (2006) The plant immune system. *Nature* 444:323–329. doi: 10.1038/nature05286
- K. Kimura, Ogawa M (2005) Disease control of rice blast of seedlings with benomyl drench. *JpnJPhytopathol* 71:111–118
- Kim H, Lee YH (2020) The rice microbiome: A model platform for crop holobiome. *Phytobiomes J* 4:5–18. doi: 10.1094/PBIOMES-07-19-0035-RVW
- Kouzai Y, Mochizuki S, Nakajima K, et al (2014) Targeted gene disruption of OsCERK1 reveals its indispensable role in chitin perception and involvement in the peptidoglycan response and immunity in rice. *Mol Plant-Microbe Interact* 27:975–982. doi: 10.1094/MPMI-03-14-0068-R
- Kremer JM, Paasch BC, Rhoeds D, et al (2018) FlowPot axenic plant growth system for microbiota research. *bioRxiv*. doi: <https://doi.org/10.1101/254953>
- Krol E, Mentzel T, Chinchilla D, et al (2010) Perception of the *Arabidopsis* Danger Signal Peptide 1 Involves the Pattern Recognition Receptor At PEPR1 and Its Close Homologue At PEPR2. *J Biol Chem* 285:13471–13479. doi: 10.1074/jbc.M109.097394
- Lee MW, Huffaker A, Crippen D, et al (2018) Plant elicitor peptides promote plant defences against nematodes in soybean. *Mol Plant Pathol* 19:858–869. doi: 10.1111/mpp.12570
- Levy A, Conway JM, Dangl JL, Woyke T (2018) Elucidating Bacterial Gene Functions in the Plant Microbiome. *Cell Host Microbe* 24:475–485. doi: 10.1016/j.chom.2018.09.005
- Levy M, Kolodziejczyk AA, Thaiss CA, Elinav E (2017) Dysbiosis and the immune system. *Nat Rev Immunol* 17:219–232. doi: 10.1038/nri.2017.7
- Loo EP-I, Tajima Y, Yamada K, et al (2021) Recognition of microbe/damage-associated molecular patterns by leucine-rich repeat pattern recognition receptor kinases confers salt tolerance in plants. *MPMI* doi.org/10.1094/MPMI-07-21-0185-FI
- Lori M, Van Verk MC, Hander T, et al (2015) Evolutionary divergence of the plant elicitor peptides (Peps) and their receptors: Interfamily incompatibility of perception but compatibility of downstream signalling. *J Exp Bot* 66:5315–5325. doi: 10.1093/jxb/erv236
- Lozano-Durán R, Zipfel C (2015) Trade-off between growth and immunity: Role of brassinosteroids. *Trends Plant Sci* 20:12–19. doi: 10.1016/j.tplants.2014.09.003

- Lu X, Tintor N, Mentzel T, et al (2009) Uncoupling of sustained MAMP receptor signaling from early outputs in an Arabidopsis endoplasmic reticulum glucosidase II allele. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:22522–22527. doi: 0907711106
[pii]10.1073/pnas.0907711106
- Luo Y, Wang F, Huang Y, et al (2019) *Sphingomonas* sp. Cra20 increases plant growth rate and alters rhizosphere microbial community structure of Arabidopsis thaliana under drought stress. *Front Microbiol* 10:. doi: 10.3389/fmicb.2019.01221
- McAndrew R, Pruitt R. N., Kamita S. G., et al (2014) Structure of the OsSERK2 leucine-rich repeat extracellular domain. *Acta Cryst. D*70, 3080-3086, doi: 10.1107/S1399004714021178
- Miwa H, Okazaki S (2017) How effectors promote beneficial interactions. *Curr Opin Plant Biol* 38:148–154. doi: 10.1016/j.pbi.2017.05.011
- Miyata K, Kozaki T, Kouzai Y, et al (2014) The bifunctional plant receptor, OsCERK1, regulates both chitin-triggered immunity and arbuscular mycorrhizal symbiosis in rice. *Plant Cell Physiol* 55:1864–1872. doi: 10.1093/pcp/pcu129
- Nakaminami K, Okamoto M, Higuchi-Takeuchi M, et al (2018) AtPep3 is a hormone-like peptide that plays a role in the salinity stress tolerance of plants. *Proc Natl Acad Sci* 115:5810–5815. doi: 10.1073/pnas.1719491115
- Nelson EB (2018) The seed microbiome: Origins, interactions, and impacts. *Plant Soil* 422:7–34. doi: 10.1007/s11104-017-3289-7
- Ngou BPM, Ahn HK, Ding P, Jones JDG (2021) Mutual potentiation of plant immunity by cell-surface and intracellular receptors. *Nature* 592:110–115. doi: 10.1038/s41586-021-03315-7
- Ning Y, Liu W, Wang G (2017) Balancing Immunity and Yield in Crop Plants. *Trends Plant Sci* 22:1069–1079. doi: 10.1016/j.tplants.2017.09.010
- Okada K, Kubota Y, Hirase T, et al (2021) Uncoupling root hair formation and defence activation from growth inhibition in response to damage-associated Pep peptides in Arabidopsis thaliana. *New Phytol* 229:2844–2858. doi: 10.1111/nph.17064
- Oldroyd GED (2013) Speak, friend, and enter: Signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nat Rev Microbiol* 11:252–263. doi: 10.1038/nrmicro2990
- Parniske M (2008) Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nat Rev Microbiol* 6:763–775. doi: 10.1038/nrmicro1987
- Plett JM, Martin F (2015) Reconsidering mutualistic plant-fungal interactions through the lens of effector biology. *Curr Opin Plant Biol* 26:45–50. doi: 10.1016/j.pbi.2015.06.001
- Poncini L, Wyrsh I, Tendon VD, et al (2017) In roots of Arabidopsis thaliana, the damage-associated molecular pattern AtPep1 is a stronger elicitor of immune signalling than flg22 or the chitin heptamer. *PLoS One* 12:1–21. doi: 10.1371/journal.pone.0185808
- Poretsky E, Dressano K, Weckwerth P, et al (2020) Differential activities of maize plant

- elicitor peptides as mediators of immune signaling and herbivore resistance. *Plant J* 104:1582–1602. doi: 10.1111/tpj.15022
- Pruesse E, Peplies J, Glöckner FO (2012) SINA: Accurate high-throughput multiple sequence alignment of ribosomal RNA genes. *Bioinformatics* 28:1823–1829. doi: 10.1093/bioinformatics/bts252
- Pruitt RN, Locci F, Wanke F, et al (2021) The EDS1–PAD4–ADR1 node mediates Arabidopsis pattern-triggered immunity. *Nature* 598:495–499. doi: 10.1038/s41586-021-03829-0
- Pruitt RN, Schwessinger B, Joe A, et al (2015) The rice immune receptor XA21 recognizes a tyrosine-sulfated protein from a Gram-negative bacterium. *Sci Adv* 1:1–12. doi: 10.1126/sciadv.1500245
- Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, et al (2012) The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res* 41:D590–D596. doi: 10.1093/nar/gks1219
- Ross A, Yamada K, Hiruma K, et al (2014) The Arabidopsis PEPR pathway couples local and systemic plant immunity. *EMBO J* 33:62–75. doi: 10.1002/embj.201284303
- Saijo Y, Loo EP, Yasuda S (2018) Pattern recognition receptors and signaling in plant-microbe interactions. *Plant J* 93:592–613. doi: 10.1111/tpj.13808
- Santos-Medellín C, Liechty Z, Edwards J, et al (2021) Prolonged drought imparts lasting compositional changes to the rice root microbiome. *Nat Plants* 7:1065–1077. doi: 10.1038/s41477-021-00967-1
- Scholthof KBG (2007) The disease triangle: Pathogens, the environment and society. *Nat Rev Microbiol* 5:152–156. doi: 10.1038/nrmicro1596
- Shade A, Jacques MA, Barret M (2017) Ecological patterns of seed microbiome diversity, transmission, and assembly. *Curr Opin Microbiol* 37:15–22. doi: 10.1016/j.mib.2017.03.010
- Shahzad Z, Amtmann A (2017) Food for thought: how nutrients regulate root system architecture. *Curr Opin Plant Biol* 39:80–87. doi: 10.1016/j.pbi.2017.06.008
- Shinya T, Yasuda S, Hyodo K, et al (2018) Integration of danger peptide signals with herbivore-associated molecular pattern signaling amplifies anti-herbivore defense responses in rice. *Plant J* 94:626–637. doi: 10.1111/tpj.13883
- Silverman P (1995) Salicylic Acid in Rice. *Plant Physiol* 108:633–639. doi: 10.1016/S0140-6736(00)33035-5
- Song S, Liu Y, Wang NR, Haney CH (2021) Mechanisms in plant-microbiome interactions: lessons from model systems. *Curr Opin Plant Biol* 62:102003. doi: 10.1016/j.pbi.2021.102003
- Stringlis IA, Yu K, Feussner K, et al (2018) MYB72-dependent coumarin exudation shapes root microbiome assembly to promote plant health. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115:E5213–E5222. doi: 10.1073/pnas.1722335115

- Sun X, Wang G (2011) Genome-Wide Identification, Characterization and Phylogenetic Analysis of the Rice LRR-Kinases. *PLoS One* 6:e16079. doi: 10.1371/journal.pone.0016079
- Takatsuji H, Jiang CJ, Sugano S (2010) Salicylic acid signaling pathway in rice and the potential applications of its regulators. *Japan Agric Res Q* 44:217–223. doi: 10.6090/jarq.44.217
- Tanaka K, Heil M (2021) Damage-Associated Molecular Patterns (DAMPs) in Plant Innate Immunity: Applying the Danger Model and Evolutionary Perspectives. *Annu Rev Phytopathol* 59:53–75. doi: 10.1146/annurev-phyto-082718-100146
- Tang D, Wang G, Zhou J-M (2017) Receptor Kinases in Plant-Pathogen Interactions: More Than Pattern Recognition. *Plant Cell* 29:618–637. doi: 10.1105/tpc.16.00891
- Thomma BPHJ, Nürnberger T, Joosten MHAJ (2011) Of PAMPs and Effectors: The Blurred PTI-ETI Dichotomy. *Plant Cell* 23:4–15. doi: 10.1105/tpc.110.082602
- Tsuda K, Katagiri F (2010) Comparing signaling mechanisms engaged in pattern-triggered and effector-triggered immunity. *Curr Opin Plant Biol* 13:459–465. doi: 10.1016/j.pbi.2010.04.006
- Tsuda K, Sato M, Stoddard T, et al (2009) Network properties of robust immunity in plants. *PLoS Genet* 5:e1000772. doi: 10.1371/journal.pgen.1000772
- Utami YD, Kuwahara H, Murakami T, et al (2018) Phylogenetic diversity and single-cell genome analysis of “melainabacteria”, a non-photosynthetic cyanobacterial group, in the termite gut. *Microbes Environ* 33:50–57. doi: 10.1264/jsme2.ME17137
- Vega A, Canessa P, Hoppe G, et al (2015) Transcriptome analysis reveals regulatory networks underlying differential susceptibility to *Botrytis cinerea* in response to nitrogen availability in *Solanum lycopersicum*. *Front Plant Sci* 6:1–17. doi: 10.3389/fpls.2015.00911
- Vogel C, Innerebner G, Zingg J, et al (2012) Forward genetic in planta screen for identification of plant-protective traits of *Sphingomonas* sp. strain Fr1 against *Pseudomonas syringae* DC3000. *Appl Environ Microbiol* 78:5529–5535. doi: 10.1128/AEM.00639-12
- Wang JP, Munyampundu JP, Xu YP, Cai XZ (2015) Phylogeny of plant calcium and calmodulin-dependent protein kinases (CcaMKs) and functional analyses of tomato CcaMK in disease resistance. *Front Plant Sci* 6:1–15. doi: 10.3389/fpls.2015.01075
- Wei Z, Jousset A (2017) Plant breeding goes microbial. *Trends Plant Sci*. doi: 10.1016/j.tplants.2017.05.009
- Xie CH, Yokota A (2006) *Sphingomonas azotifigens* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the roots of *Oryza sativa*. *Int J Syst Evol Microbiol* 56:889–893. doi: 10.1099/ijs.0.64056-0
- Xu J, Kloepper JW, Huang P, et al (2018) Isolation and characterization of N₂-fixing bacteria from giant reed and switchgrass for plant growth promotion and nutrient uptake. *J Basic*

- Microbiol 58:459–471. doi: 10.1002/jobm.201700535
- Yamada K, Yamashita-Yamada M, Hirase T, et al (2016a) Danger peptide receptor signaling in plants ensures basal immunity upon pathogen-induced depletion of BAK1. *EMBO J* 35:46–61. doi: 10.15252/embj
- Yamada K, Yamashita-Yamada M, Hirase T, et al (2016b) Danger peptide receptor signaling in plants ensures basal immunity upon pathogen-induced depletion of BAK1. *Eur Mol Biol Organ J* 35:46–61. doi: 10.15252/embj
- Yamaguchi Y, Huffaker A (2011) Endogenous peptide elicitors in higher plants. *Curr Opin Plant Biol* 14:351–357. doi: 10.1016/j.pbi.2011.05.001
- Yamaguchi Y, Huffaker A, Bryan AC, et al (2010) PEPR2 is a second receptor for the Pep1 and Pep2 peptides and contributes to defense responses in Arabidopsis. *Plant Cell* 22:508–522. doi: 10.1105/tpc.109.068874
- Yamaguchi Y, Pearce G, Ryan CA (2006) The cell surface leucine-rich repeat receptor for AtPep1, an endogenous peptide elicitor in Arabidopsis, is functional in transgenic tobacco cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:10104–10109. doi: 10.1073/pnas.0603729103
- Yasuda S, Okada K, Saijo Y (2017) A look at plant immunity through the window of the multitasking coreceptor BAK1, *Current Opinion in Plant Biology*, 38:10-18, doi:10.1016/j.pbi.2017.04.007
- Yang DL, Yang Y, He Z (2013) Roles of plant hormones and their interplay in rice immunity. *Mol Plant* 6:675–685. doi: 10.1093/mp/sst056
- Yuan M, Jiang Z, Bi G, et al (2021) Pattern-recognition receptors are required for NLR-mediated plant immunity. *Nature* 592:105–109. doi: 10.1038/s41586-021-03316-6
- Zhang C, He J, Dai H, et al (2021) Discriminating symbiosis and immunity signals by receptor competition in rice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 118:2–9. doi: 10.1073/pnas.2023738118
- Zhang J, Liu YX, Zhang N, et al (2019) NRT1.1B is associated with root microbiota composition and nitrogen use in field-grown rice. *Nat Biotechnol* 37:676–684. doi: 10.1038/s41587-019-0104-4
- Zhang L, Gleason C (2020) Enhancing potato resistance against root-knot nematodes using a plant-defence elicitor delivered by bacteria. *Nat Plants* 6:625–629. doi: 10.1038/s41477-020-0689-0
- Zipfel C, Oldroyd GED (2017) Plant signalling in symbiosis and immunity. *Nature* 543:328–336. doi: 10.1038/nature22009
- 李 泰洪 (2020) 『リン栄養情報に基づく植物の免疫制御』奈良先端科学技術大学 大学 博士論文

藤 雅子 (2019) 『イネの免疫制御ペプチドを介した環境適応機構の解析』 奈良先端
科学技術大学院大学 修士論文

7. 図

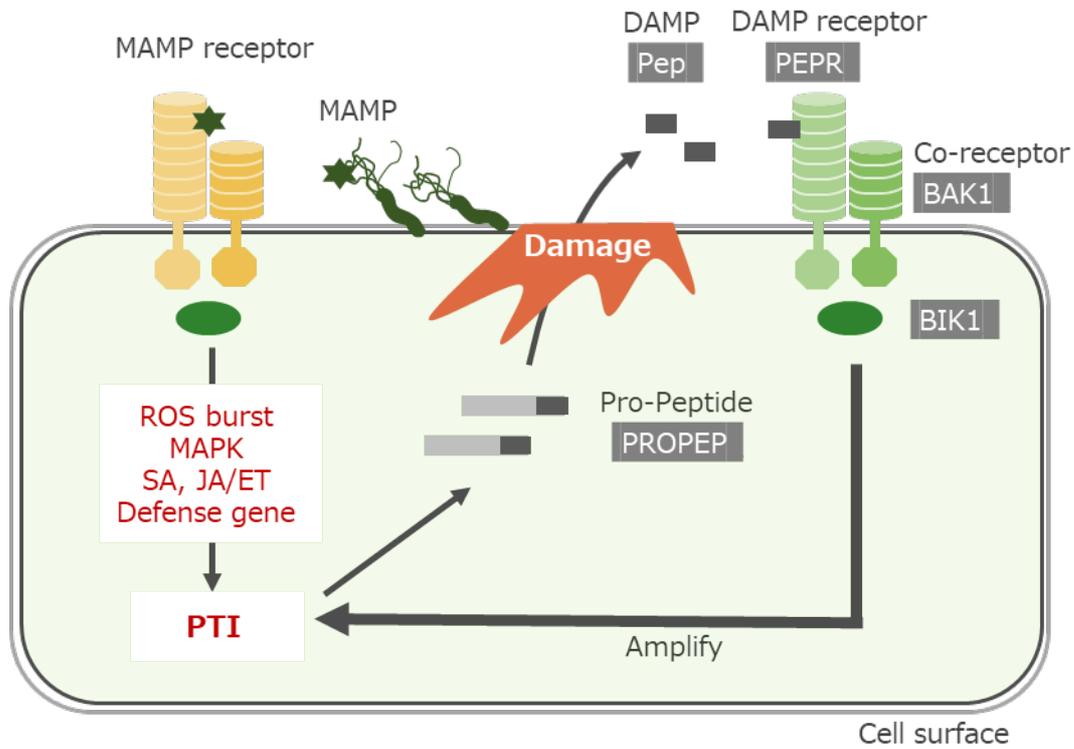


Fig. 1-1 シロイヌナズナにおけるパターン受容体を介した免疫活性化

細胞膜に存在するパターン認識受容体（PRR）は微生物の構成成分 MAMP や植物自身の細胞異常を示すダメージシグナル DAMP を認識すると一連の防御応答を誘導し、免疫が高まった状態である PTI へと導く。PROPEP ペプチドの C 末端部分にはエリシター活性を有する Pep エピトープが存在し、細胞の膜ダメージ部位から放出されると DAMP として細胞膜上の PEPR に認識されると考えられている。PEPR は共受容体 BAK1 や細胞内キナーゼ BIK 1 と複合体を形成して下流のシグナル制御を行うことで、防御応答の増幅に働く。

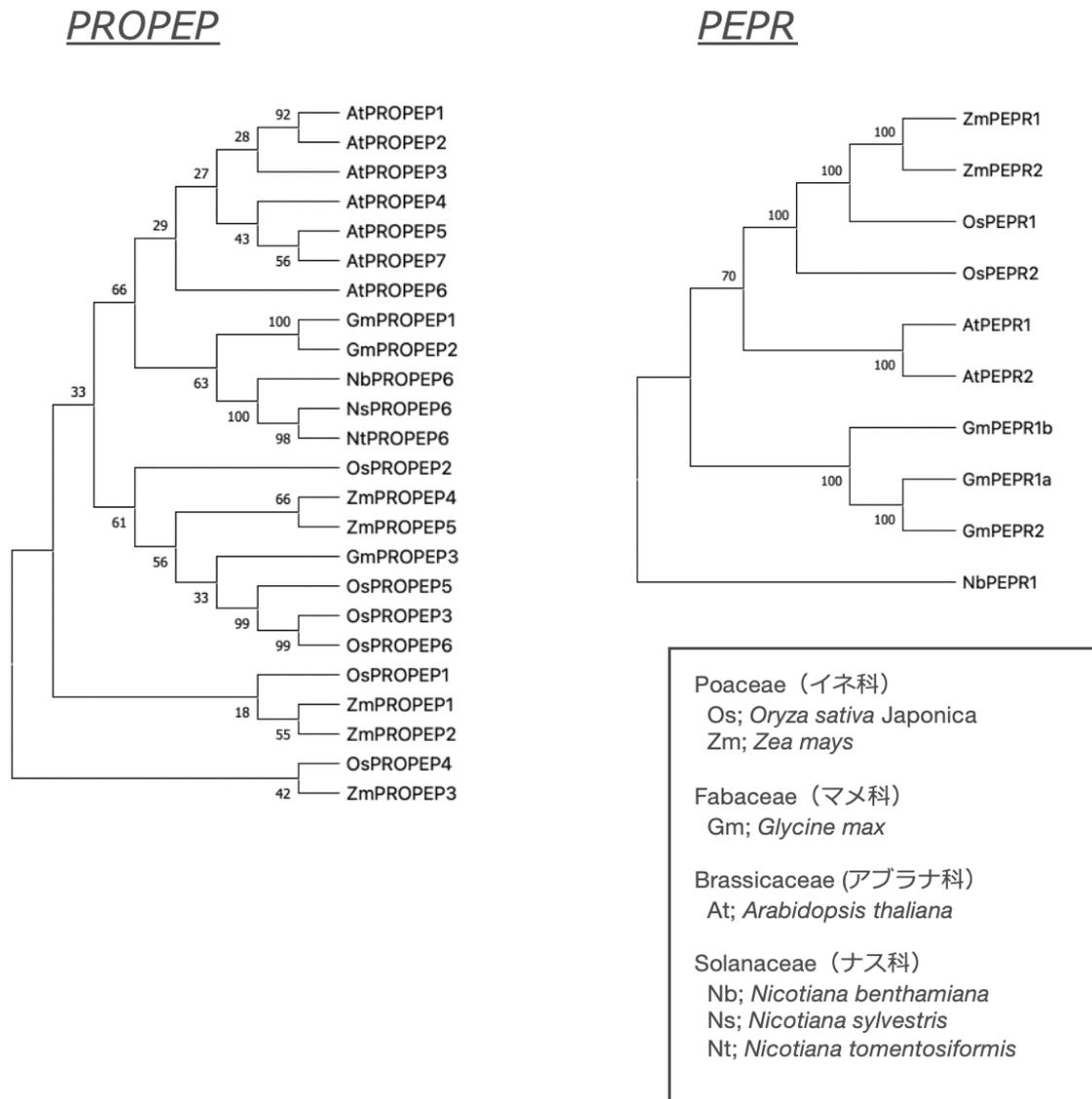


Fig. 1-2 イネのゲノム遺伝子に保存されている **Pep-PEPR** ファミリー

Pep ペプチドと Pep 受容体 PEPR を介した免疫制御システムは、高等植物に広く保存されている。イネのゲノムには 6 つの *OsPROPEPs* と 2 つの *OsPEPRs* 遺伝子がアノテーションされている。Pep-PEPR の認識特異性は科特異的であり、イネの Pep はイネ科以外では認識されない。MEGA_11.0.10 を用いて bootstrap 値=500 で、PROPEP 及び PEPR についてアミノ酸配列に基づく分子系統解析を行うと、植物の科ごとに近い系統関係に分類された。

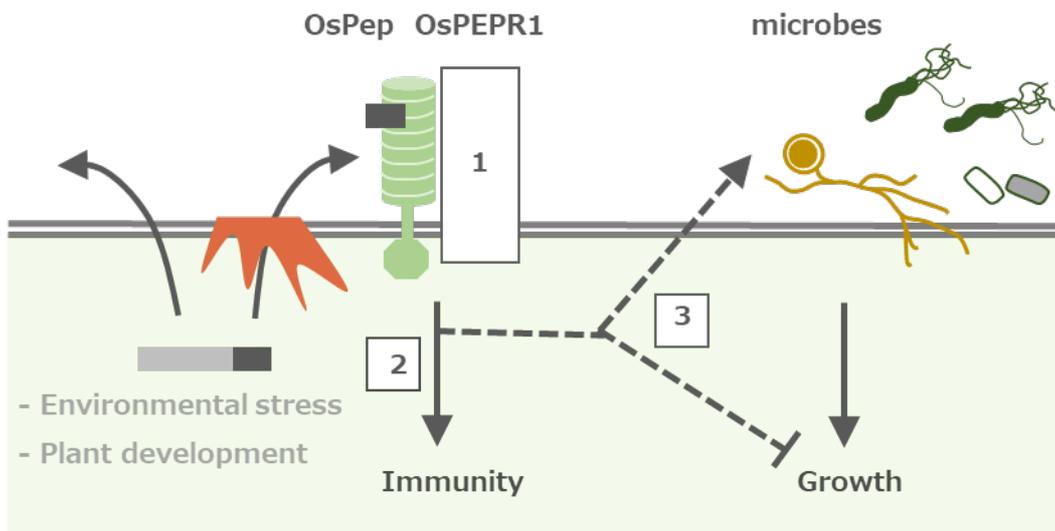


Fig. 1-3 イネの OsPep-OsPEPR を介した成長促進機能と微生物叢制御機能（仮説）

本研究では、初めに OsPep 応答における OsPEPR の役割とシグナル制御機構に迫った（図中の 1, 2）。続いて、OsPep 成長促進機能を補助する共生細菌の同定に続いて共生の実態や分子機構に迫った（図中の 3）。

```

          *           *           *           *           *           *           *           *           *
901 CTGGGTTTATTGAGAAACCTCTCAACTTTTACTTTCTGAGAACTCACTTTCTGGGCCAATTCCCTCCTGAGATAGGTAAGTCCAGTTGCTGGTGTGGC 1000
   |||
CTGGGTTTATTGAGAAACCTCTCTCAACTTTTACTTTCTGAGAACTCACTTTCTGGGCCAATTCCCTCCTGAGATAGGTAAGTCCAGTTGCTGGTGTGGC
          *           *           *           *           *           *           *           *           *
1001 TGGAGTTGGATGCAAACCAGCTCAATGGCACTGTTCCCTAAAGAGCTGGCAAATCTGAGAAAATTGGAGAACTCTTTCTGTTTGA AAAACCGCCTCATT-G 1099
   |||
TGGAGTTGGATGCAAACCAGCTCAATGGCACTGTTCCCTAAAGAGCTGGCAAATCTGAGAAAATTGGAGAACTCTTTCTGTTTGA AAAACCGCCTCATTG
          *           *           *           *           *           *           *           *           *
1100 GGGAGTTCCTGAGGATATTTGGAGCATCAAGAGCCTGCAAAGTGCCTTATCTATGAAAACAGTTTTACTGGGAGGCTACCTCCAGTGCTAGCTGAGCT 1199
   |||
GGGAGTTCCTGAGGATATTTGGAGCATCAAGAGCCTGCAAAGTGCCTTATCTATGAAAACAGTTTTACTGGGAGGCTACCTCCAGTGCTAGCTGAGCT
          *           *           *           *           *           *           *           *           *

```

Fig. 2-1 本研究で作出した *OsPEPR1* 変異体の配列情報

上段は *OsPEPR1* 遺伝子のコーディングシーケンス (CDS)、下段は本研究で作出した CRISPR-Cas9 ノックアウト変異体の配列を示す。変異体では、1098 番目に一塩基の挿入 (T) が確認された。

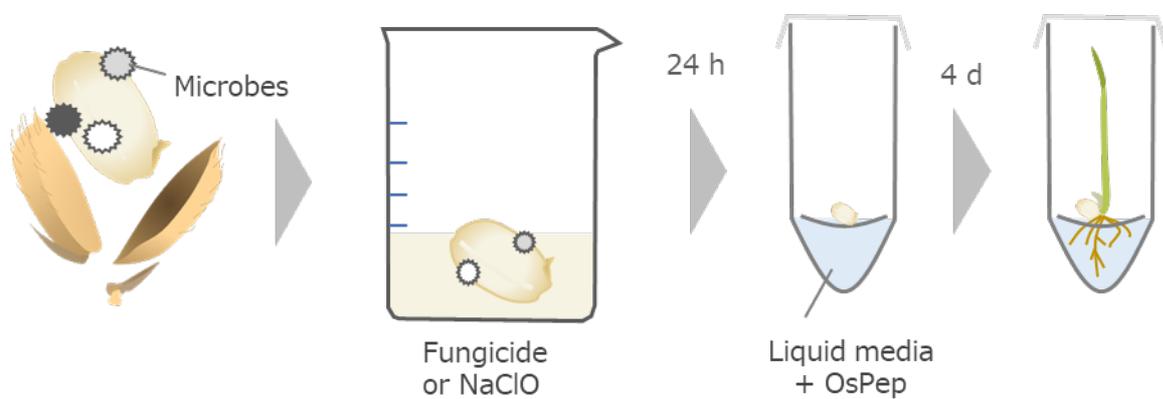


Fig. 2-2 水耕栽培イネへのペプチド投与の実験方法

脱えいしたイネ種子を防カビ剤、もしくは次亜塩素酸で処理した後、24 時間滅菌水を吸水させた。50 ml チューブに適当な濃度の OsPep を含む水耕液をいれ、水面に園芸用鉢底ネットを浮かべた。ネット上に種子 5 粒を播種し、4 日後に植物体を表現型解析および細菌叢解析に用いた。

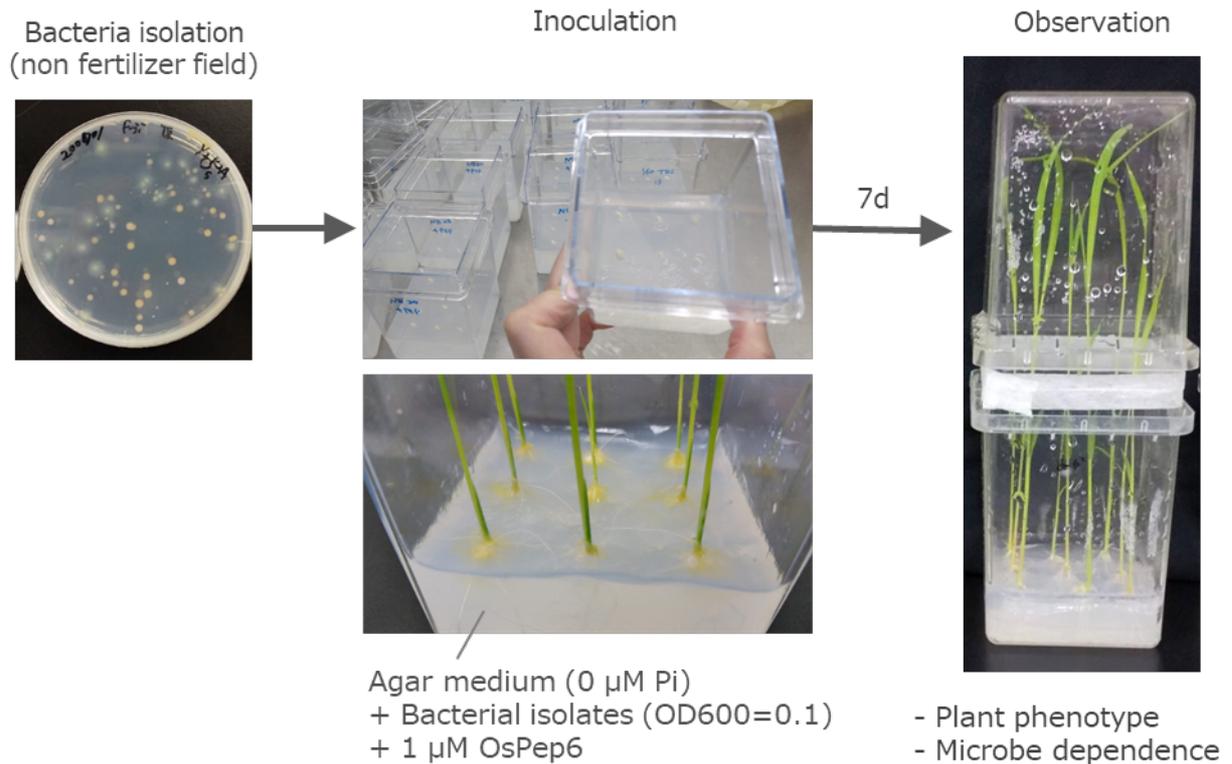


Fig. 2-3 寒天栽培イネへのペプチド投与および菌接種の実験方法

脱えいしたイネ種子を防カビ剤、もしくは次亜塩素酸で処理した後、24時間滅菌水を吸水させた。プラスチック容器に100 mlの寒天培地を流し込み、固化する直前に細菌培養液および適当な濃度のOsPepを混和した。培地上に種子9粒を播種し、7日後に植物体を表現型解析に用いた。

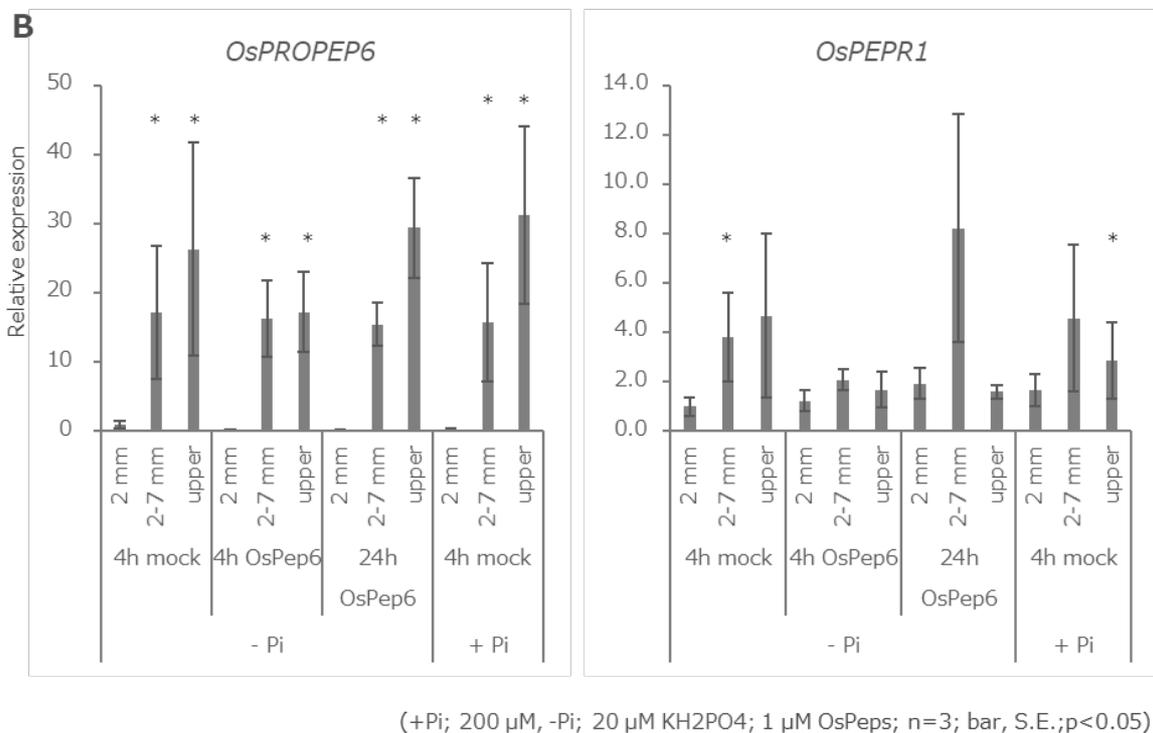
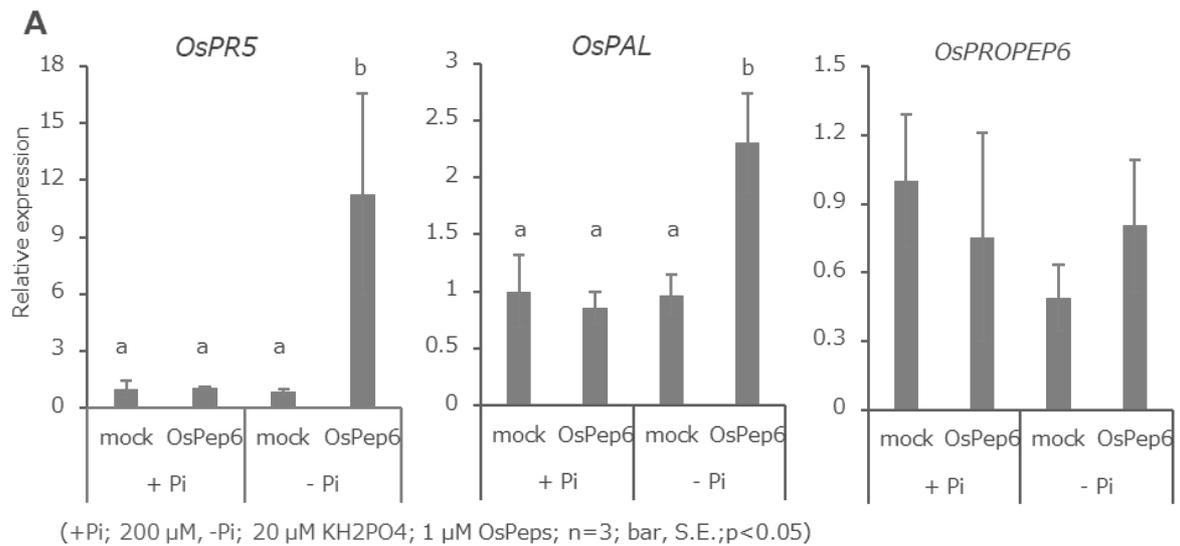


Fig. 3-1 OsPep6 は低リン条件下で防御応答遺伝子を誘導する

OsPep6 投与後の根から Total RNA を抽出し、RT-qPCR によって遺伝子発現を解析した。相対発現レベル (Relative expression) は、各遺伝子について *OsUBQ* で標準化し、対照区 [+ Pi, mock] の値を 1 として算出した。y 軸誤差範囲は標準誤差を示す。

(A) OsPep6 投与 12 時間後の根を用いて、防御関連遺伝子である *OsPR5*、*OsPAL* および *OsPROPEP6* の遺伝子発現を解析した。異なるアルファベットは処理区間での Tukey 検定における有意差を示す (n=3; p<0.05)。(B) OsPep6 投与 4、24 時間後の根を用いて、*OsPROPEP6* および *OsPEPR1* の遺伝子発現を解析した。根の先端を 2 mm, 2-7 mm, 7 mm よりも上部の 3 つの部位に分けて解析に用いた。アスタリスクは T 検定における有意差を示す (n=3; *, p<0.05)。

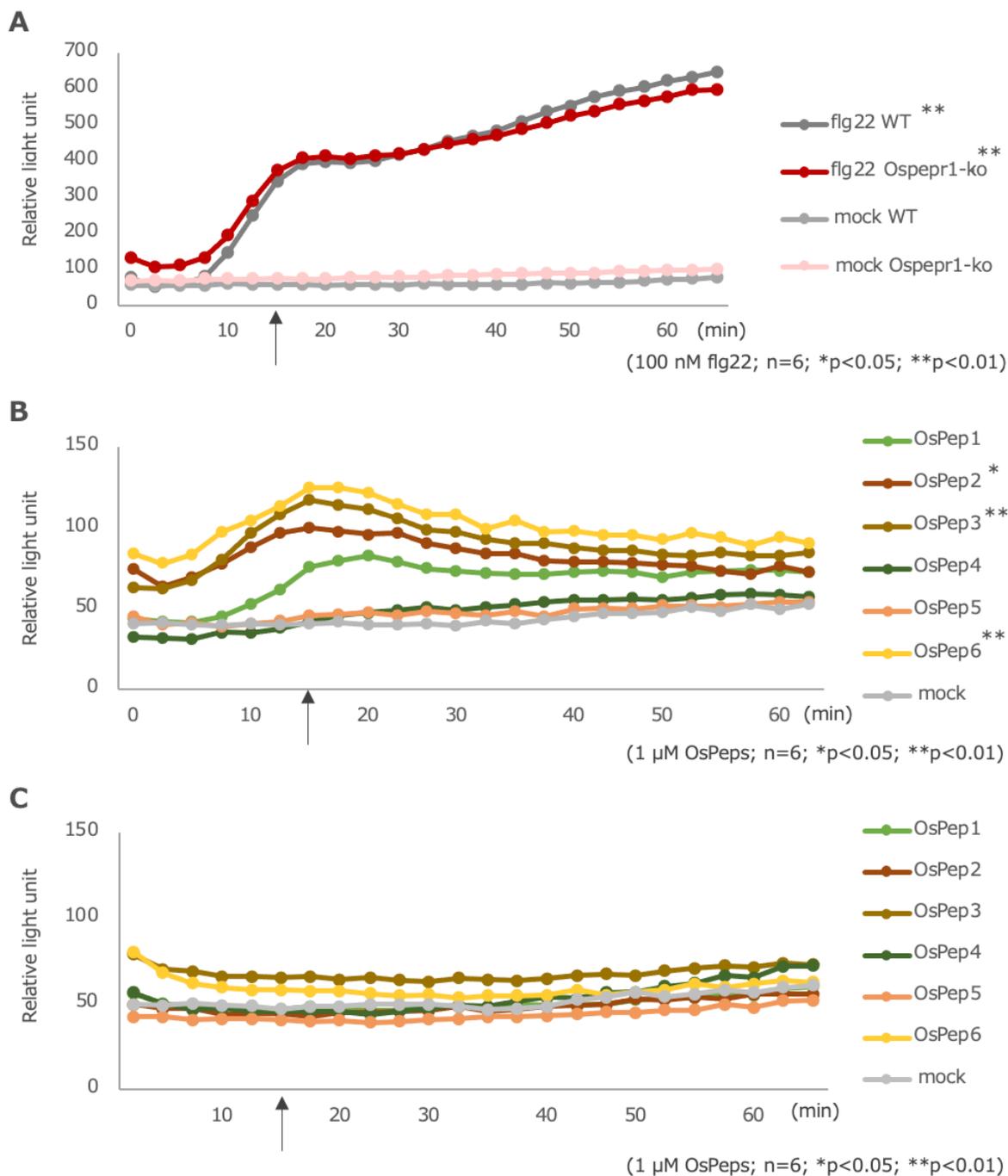


Fig. 3-2 *Ospepr1* 欠損変異体は、OsPeps 誘導性の ROS の産生能を失う

イネの芽生えからリーフディスクを作成し、任意のペプチドを含むルミノール溶液を投与し、発光量を指標に ROS の産生を測定した。アスタリスクは矢印で示した反応開始 15 分後において、water 区との T 検定での有意差を示している (n=6; *p<0.05; **p<0.01)。

- (A) 野生型イネ葉に 100 nM flg22 を投与した。
- (B) 野生型イネ葉に 1 μM OsPep1~OsPep6 を投与した。
- (C) *ospepr1* イネ葉に 1 μM OsPep1~ OsPep6 を投与した。

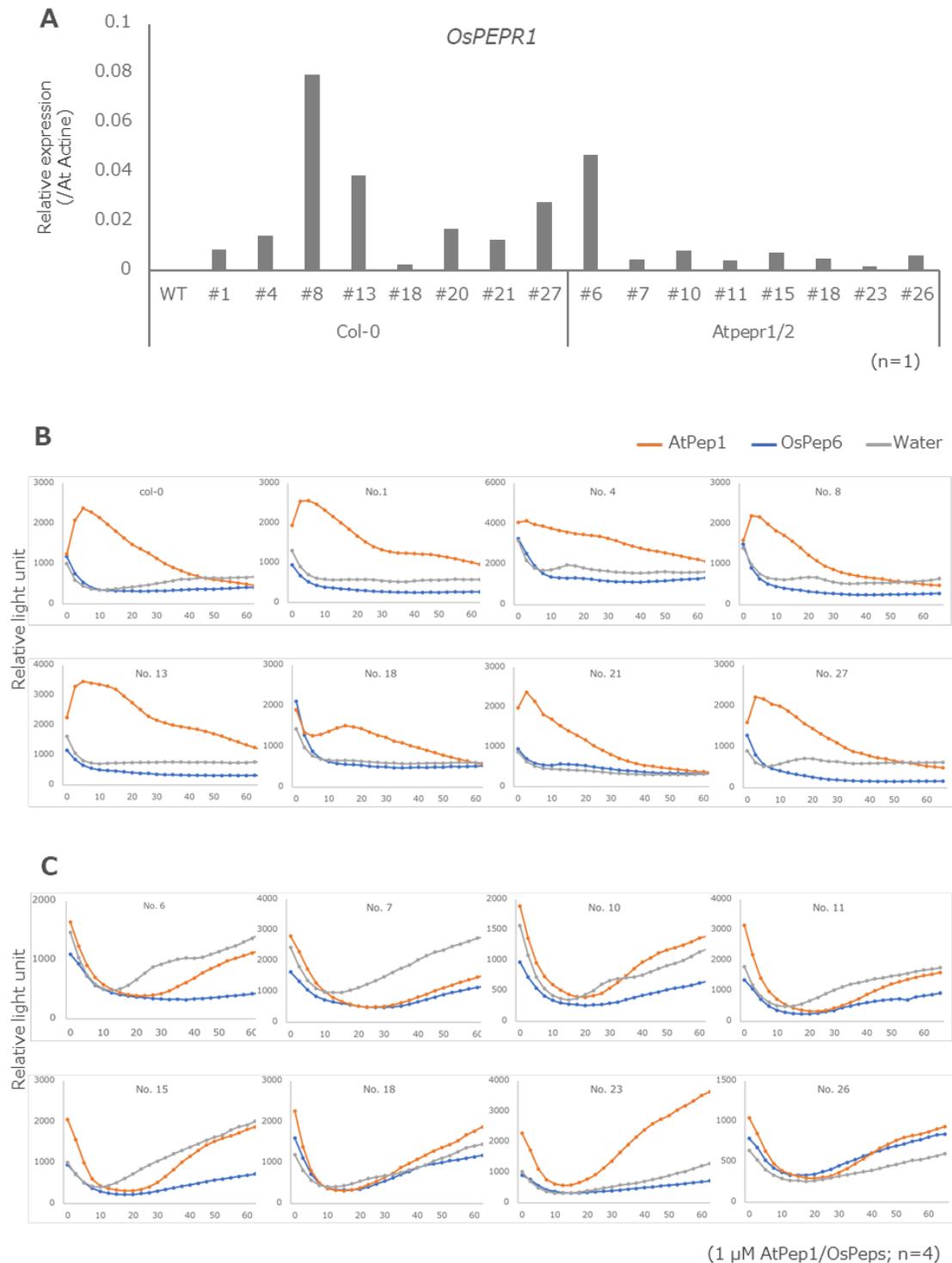


Fig. 3-3 *OsPEPR1* 導入シロイヌナズナは *OsPep6* 誘導性の ROS を産生しない

(A) 野生型 (Col-0) および *Atpepr1/2* 変異体を背景に *OsPEPR1* を恒常的に発現するように導入したシロイヌナズナの T2 の成熟葉を用いて、RT-qPCR によって *OsPEPR1* の発現レベルを測定した。相対発現レベルは、シロイヌナズナの *Actin* で標準化することで算出した (n=1)。

(B) (C) 上記の成熟葉のリーフディスクを用いて、AtPep1 および OsPep6 ペプチドを含むルミノール溶液を投与し、発光量を指標に ROS の産生を測定した。(B) は野生型、(C) は *Atpepr1/2* 背景に *OsPEPR1* を導入した植物を用いた (n=6)。

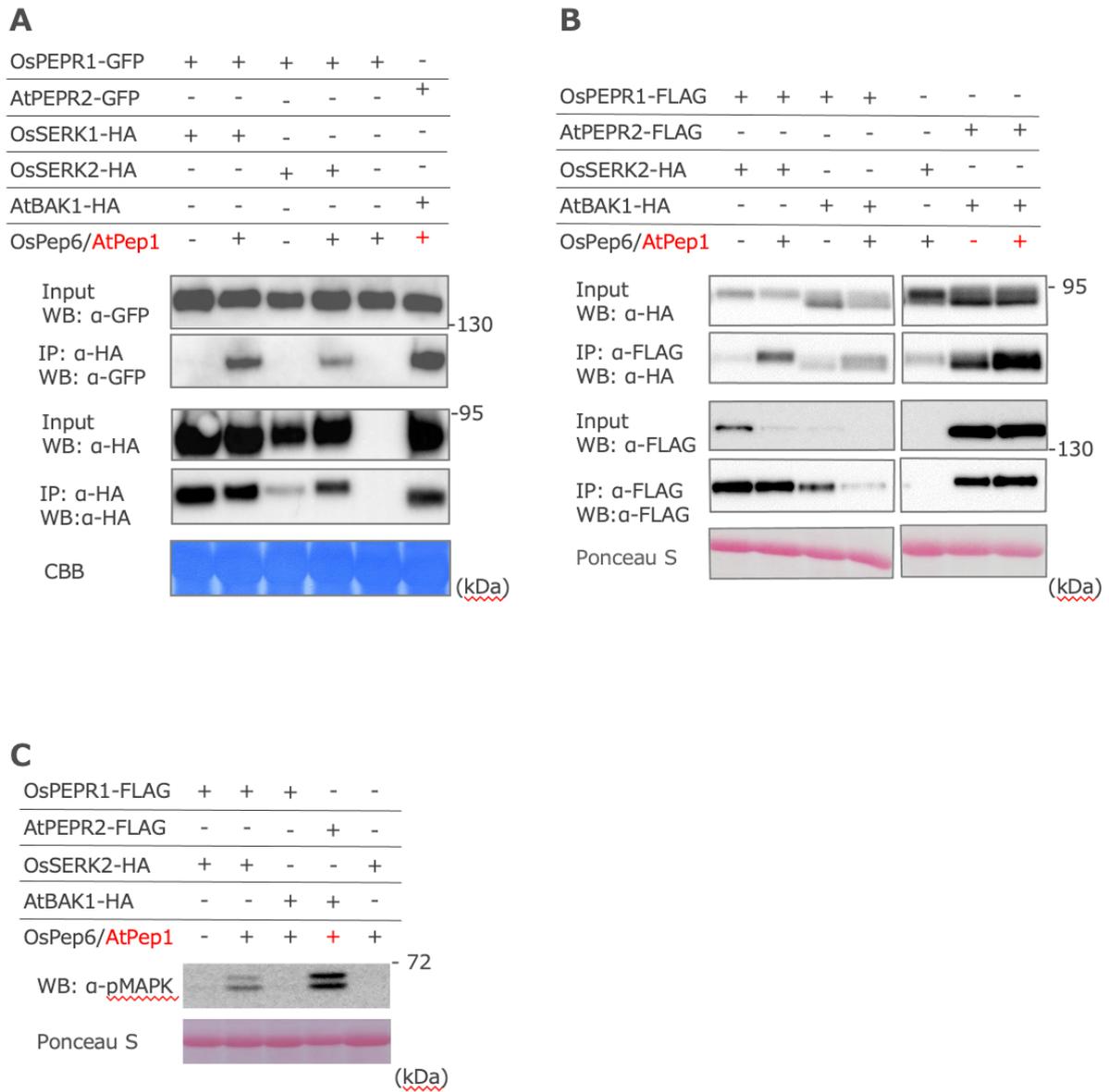


Fig. 3-4 OsPEPR1 は共受容体候補 OsSERK1/2 とタンパク質相互作用し、MAPK を活性化する
 アグロバクテリウムを用いた遺伝子の一過的発現系により、目的のタンパク質をタバコ *N. benthamiana* の成熟葉に発現させた。1 μ M Peps を処理後、タンパク質を抽出した。
 (A) (B) 共免疫沈降法によるタンパク質相互作用の解析。1 μ M Peps 処理 30 分後にサンプリングした。A は抗 HA 抗体、B は抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降を行った。
 (C) WB による pMAPK の活性化の解析。1 μ M Peps 処理 15 分後にサンプリングした。

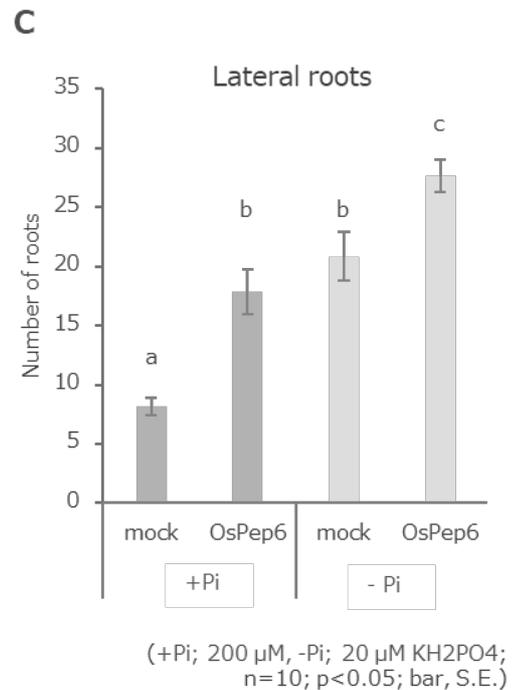
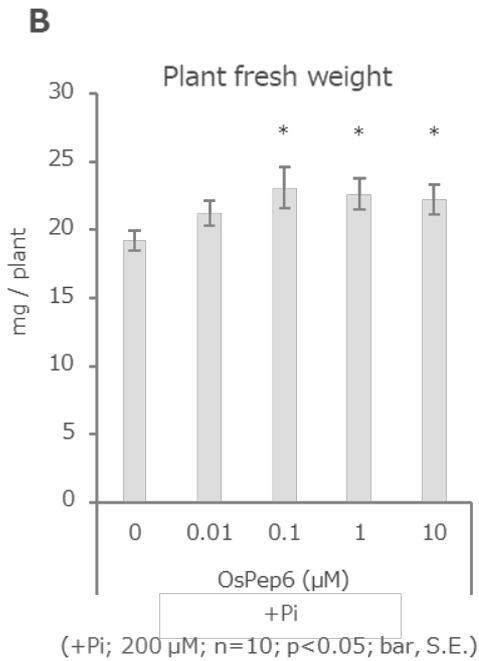
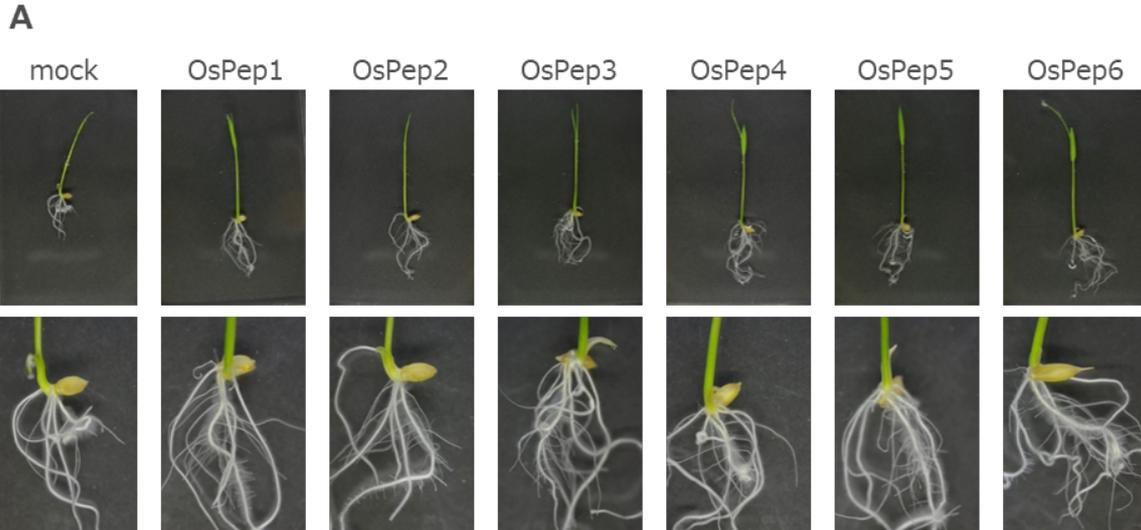


Fig. 3-5 芽生えへの OsPep 投与は根系を拡張させる

防カビ剤で 1 日間処理した野生型イネ種子を各 OsPep を含む水耕液に播種し、4 日後に表現型を解析した。

(A) 1 μM OsPep 投与 4 日後の表現型。それぞれの写真上段は植物体全体、下段は拡大した根系部分を示す。

(B) 生重量変化と OsPep6 濃度の関係性。アスタリスクは 0 μM 区との T 検定での有意差を示している (n=10; *p<0.05)。

(C) 主根から出現した側根の植物体あたりの本数。異なるアルファベットは処理区間での Tukey 検定における有意差を示す (n=10; p<0.05)。

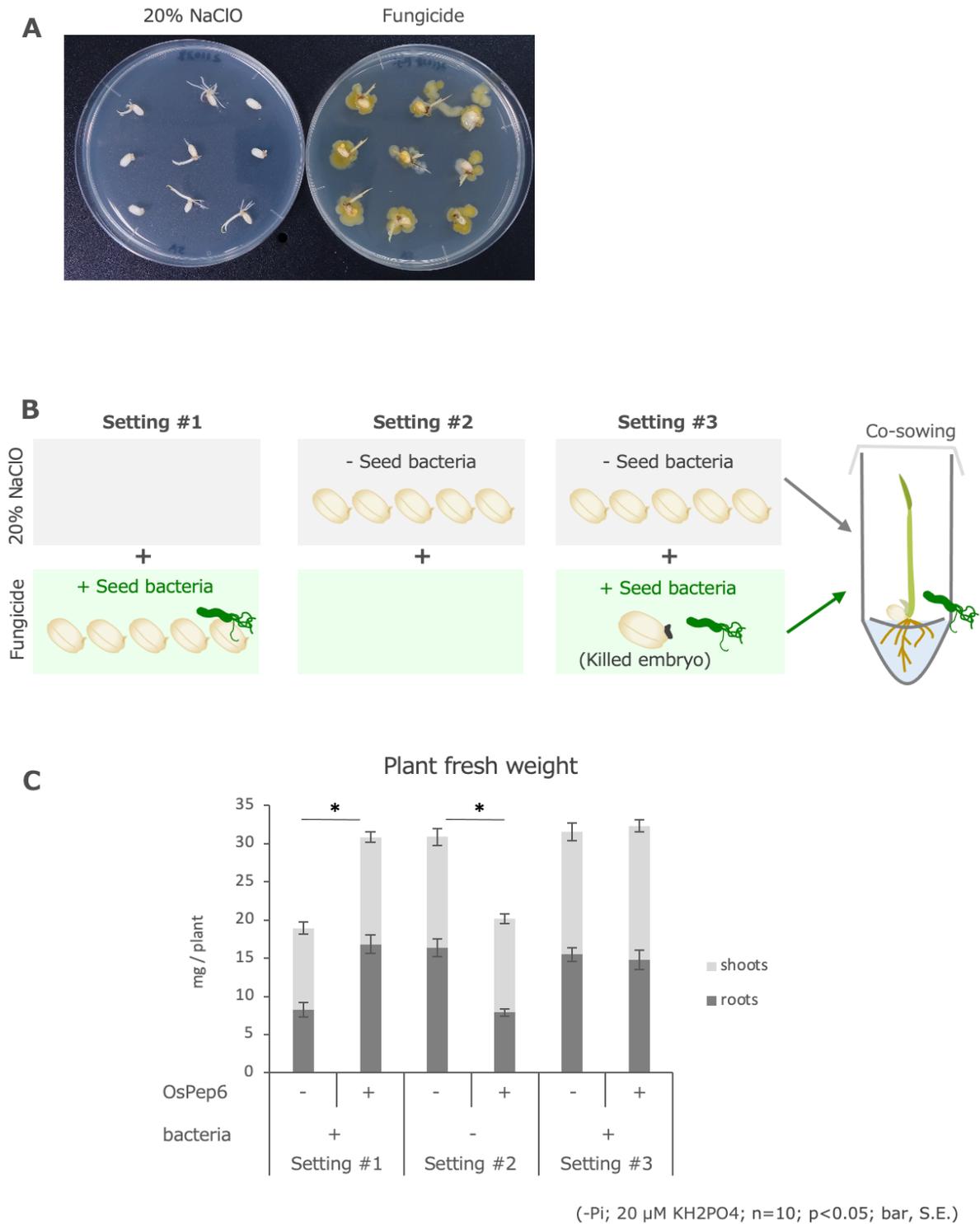
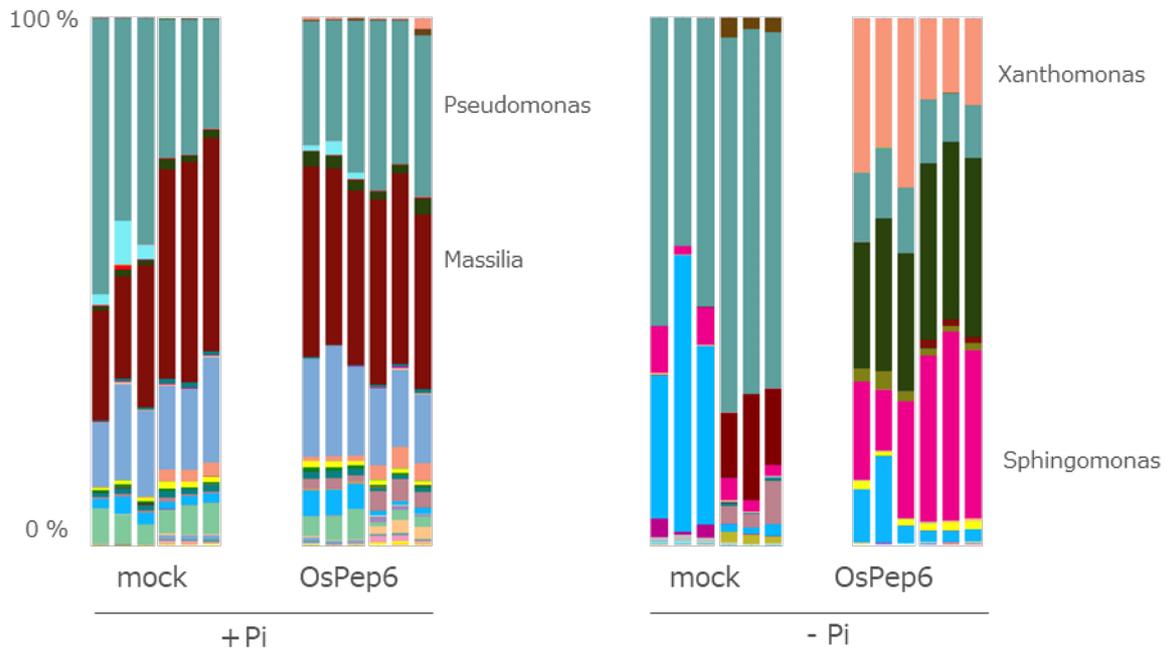


Fig. 3-6 OsPep 投与による生重量の増加の有無は、種子の処理方法によって異なる

(A) 防カビ処理後の種子には細菌が残存している。防カビ処理後の種子を R2A 培地上に 3 日間室温で静置した。

(B) 共播種実験の実験スキーム。種子の処理方法によって 3 種類の Setting を準備して実験を行った。Setting #3 の防カビ処理種子は、胚を加熱したピンセットで焼き殺し、発芽を阻害させた。

(C) 1 μ M OsPep 投与 4 日後の生重量。アスタリスクは比較区間における T 検定での有意差を示している (n=10; *p<0.05)。



Taxonomy (Genus)

- : Pseudomonas
 - : Xanthomonas
 - : Massilia
 - : Sphingomonas
- : Asticcacaulis
 - : Paenibacillus
 - : Bosea
 - : Chryseobacterium
- : Unclassified Rhizobiaceae
 - : Unclassified Rhodanobacteriaceae
 - : Unclassified Burkholderiaceae
 - : Unclassified Enterobacteriaceae

(+Pi; 200 μ M, -Pi; 20 μ M KH₂PO₄)
(n= 6 ; p<0.05)

Fig. 3-7 OsPep6 投与はリン濃度依存的にイネ根の細菌叢を変化させる (細菌の属の割合)

細菌 OTU ごとにリードを分類し、属ごとの割合を集計した結果を示す。防カビ剤で 1 日間処理した野生型イネ種子を 1 μ M OsPep6 を含む水耕液に播種して 4 日後、根圏・根内の細菌叢をメタ 16S シーケンス解析に供した。リン酸濃度 200 μ M (+Pi) または 20 μ M (-Pi) KH₂PO₄ の水耕液を使用した (n=6)。

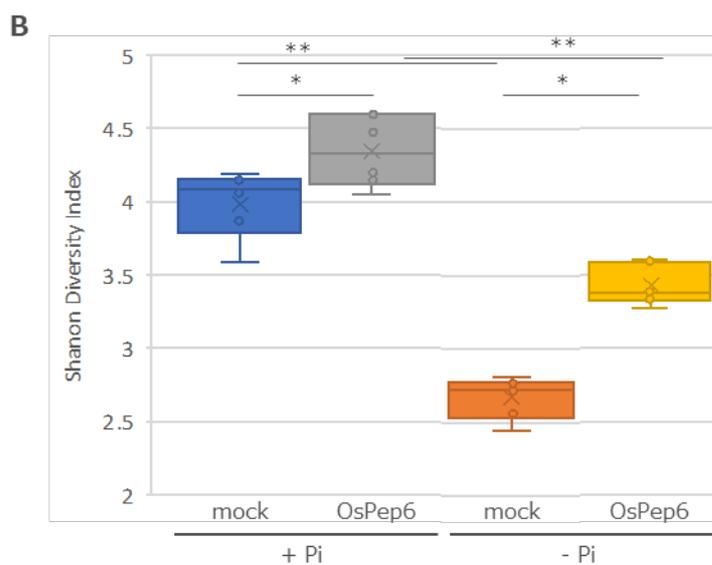
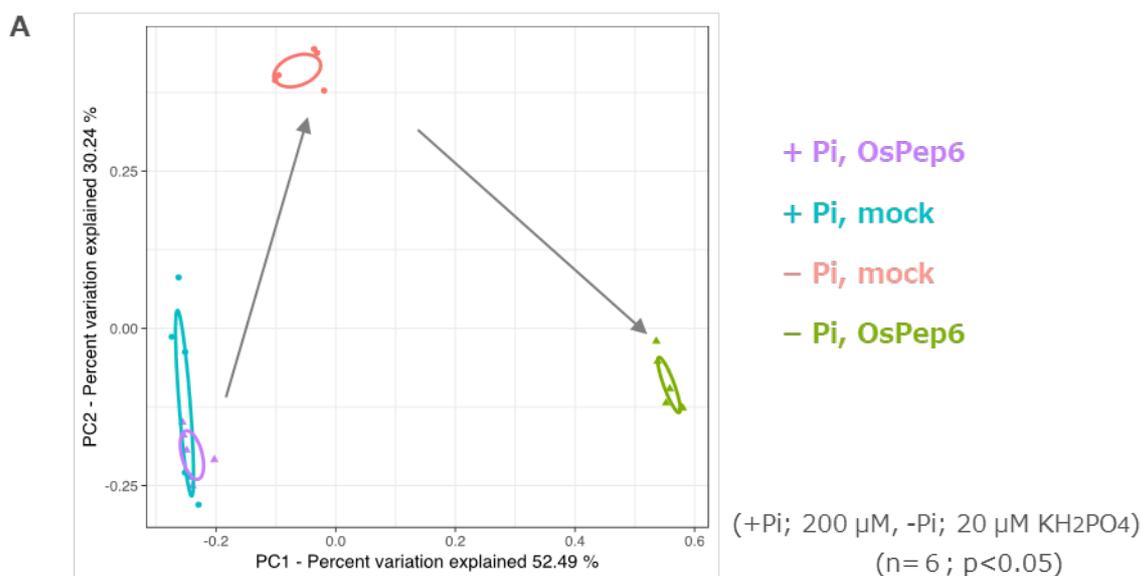


Fig. 3-8 OsPep6 投与はリン濃度依存的にイネ根の細菌叢変化させる (PCoA 解析、多様性指標)

防カビ剤で 1 日間処理した野生型イネ種子を 1 μ M OsPep6 を含む水耕液に播種して 4 日後、根圏・根内の細菌叢をメタ 16S シーケンス解析に供した。リン酸濃度 200 μ M (+Pi) または 20 μ M (-Pi) KH_2PO_4 の水耕液を使用した (n=6)。

(A) 主座標分析 (PCoA) 解析による各処理区の細菌叢構造の相関図を示す。グラフ中の楕円は、95% 水準におけるサンプルの誤差範囲を示す。

(B) シャンノン指数を用いた細菌叢の多様性の度合い。アスタリスクは比較区間における T 検定での有意差を示している (*p<0.05; **p<0.01)

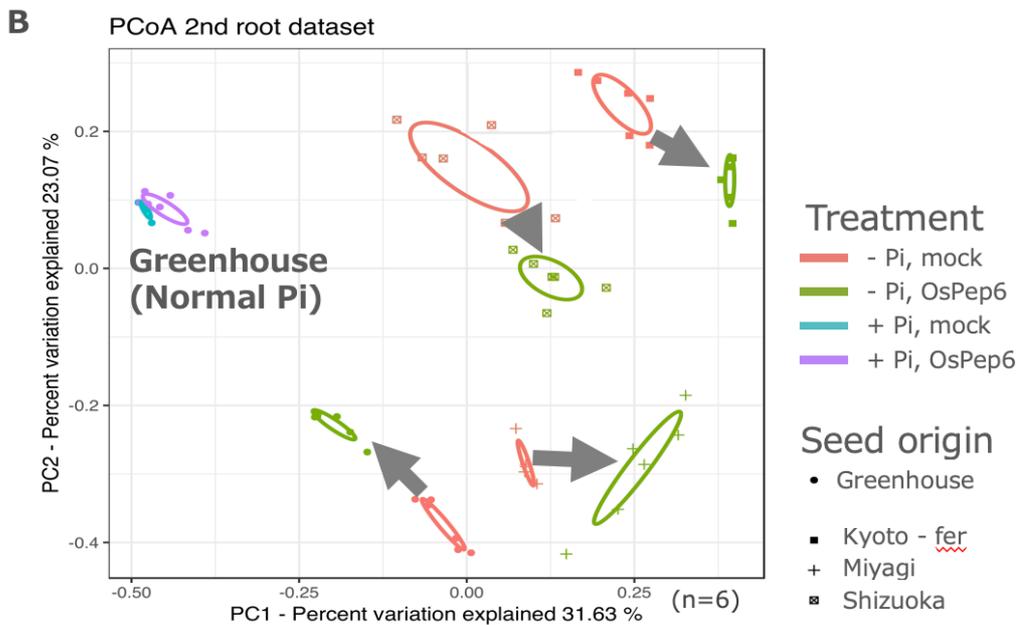
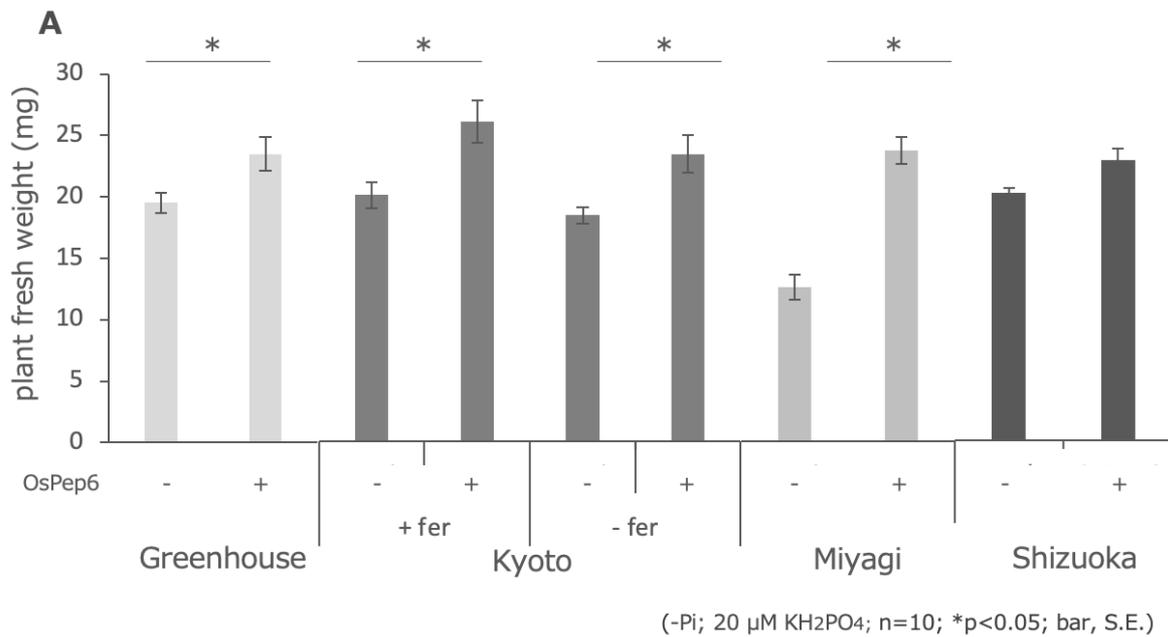


Fig. 3-9 OsPep 投与によるイネ生重量と細菌叢変化は異なる圃場由来の種子でも見られる

防カビ剤で 1 日間処理した野生型イネ種子を 1 μ M OsPep6 を含む水耕液に播種して 4 日後、根圏・根内の細菌叢をメタ 16S シーケンス解析に供した。リン酸濃度 200 μ M (+ Pi) または 20 μ M (- Pi) KH_2PO_4 の水耕液を使用した。

(A) 1 μ M OsPep 投与 4 日後の生重量。アスタリスクは比較区間における T 検定での有意差を示している (n=6; *p<0.05)。

(B) 主座標分析 (PCoA) 解析による各処理区の細菌叢構造の相関図 (n=6)。

ASV_0065	['Bacteria', 'Firmicutes', 'Bacilli', 'Bacillales', 'Paenibacillaceae', 'Paenibacillus']
ASV_0083	['Bacteria', 'Proteobacteria', 'Alphaproteobacteria', 'Sphingomonadales', 'Sphingomonadaceae', 'Sphingomonas']
ASV_0118	['Bacteria', 'Proteobacteria', 'Gammaproteobacteria', 'Enterobacteriales', 'Enterobacteriaceae']
ASV_0137	['Bacteria', 'Proteobacteria', 'Gammaproteobacteria', 'Enterobacteriales', 'Enterobacteriaceae']

Fig. 3-10 異なる圃場由来の種子に共通して OsPep 投与区で検出された 4 ASVs

mock 区では検出されず、OsPep 投与区でのみ検出された ASVs のうち、異なる圃場由来(Fig. 3-9B) に共通する細菌 ASVs が 4 つ存在した。

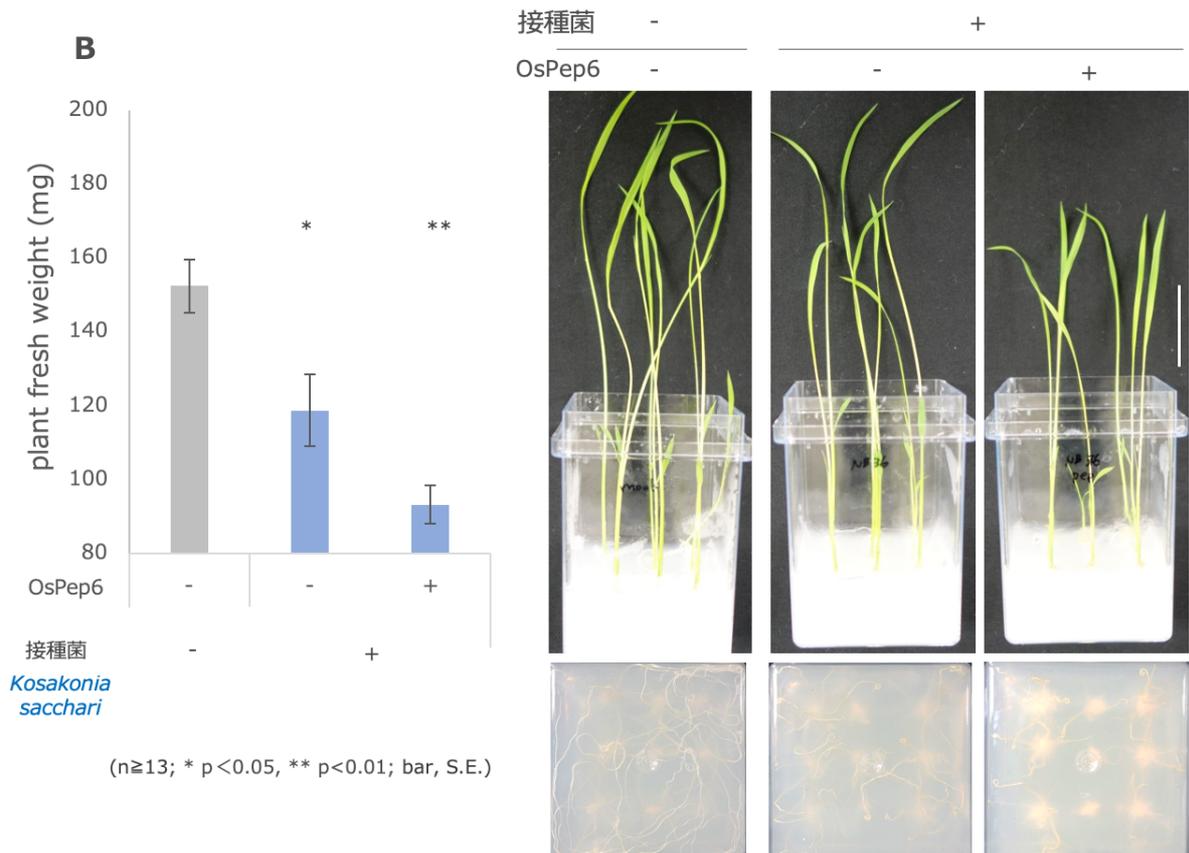
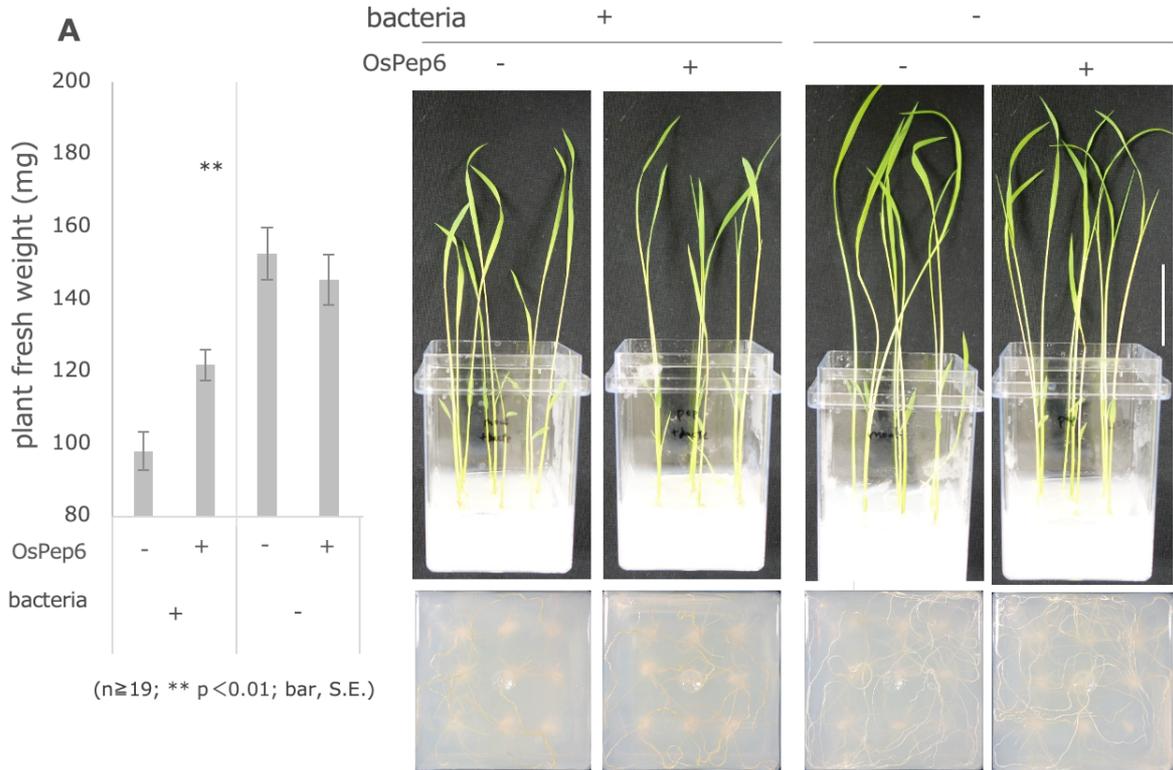


Fig. 3-11 寒天培地を用いたスクリーニング系を確立した

(A) 防カビ剤で処理した種子を種子細菌叢が存在する条件、次亜塩素酸ナトリウムで処理した種子を無菌条件として、1 μ M OsPep6 を混合した寒天培地で7日間生育させ生重量を指標に解析を行った。アスタリスクは細菌叢あり、なしそれぞれの条件における mock との T 検定での有意差を示している ($n \geq 19$; $**p < 0.01$)。写真中の白い bar は 5 cm を示す。

(B) 次亜塩素酸ナトリウムで処理した種子を用いた無菌条件で、細菌株のスクリーニングを行った。細菌株の中には、*Kosakonia sacchari* の例のように植物の生重量を減少させるものもあった。アスタリスクは接種細菌なしの mock との T 検定での有意差を示している ($n \geq 13$; $*p < 0.05$, $**p < 0.01$)。写真中の白い bar は 5 cm を示す。

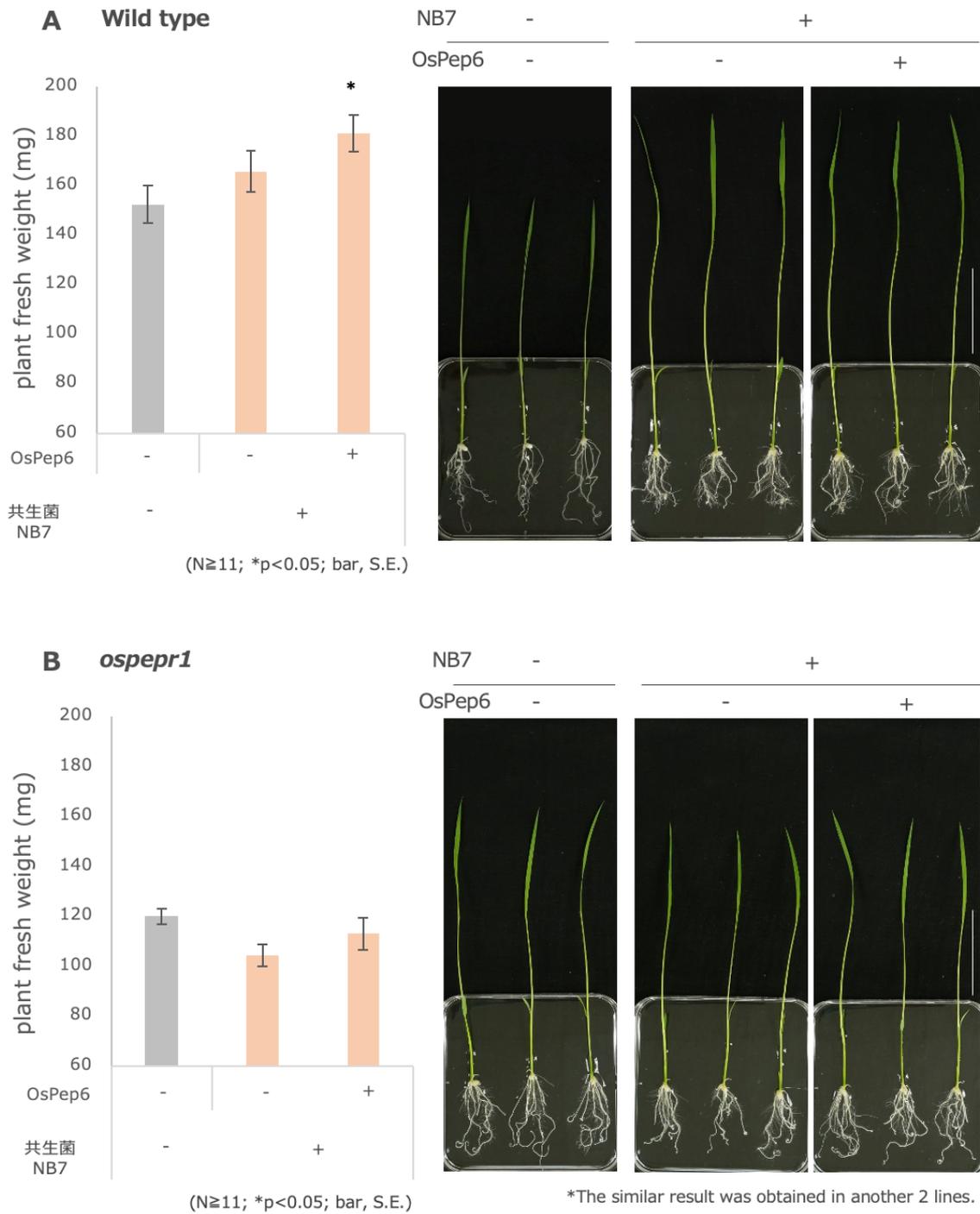


Fig. 3-12 無菌条件での OsPep6 投与時にイネの生重量を増加させる細菌株 (NB7) を見出した

次亜塩素酸ナトリウムで処理した種子を用いた無菌条件で、細菌株のスクリーニングを行った。アスタリスクは非接種区 (mock) と比較して T 検定での有意差を示している ($n \geq 11$; $*p < 0.05$, $**p < 0.01$)。写真中の白い bar は 5 cm を示す。

(A) 野生型では、NB7 および OsPep との共投与時に有意に生重量が増加する。

(B) *ospepr1* では、野生型でみられた生重量増加はみられない。

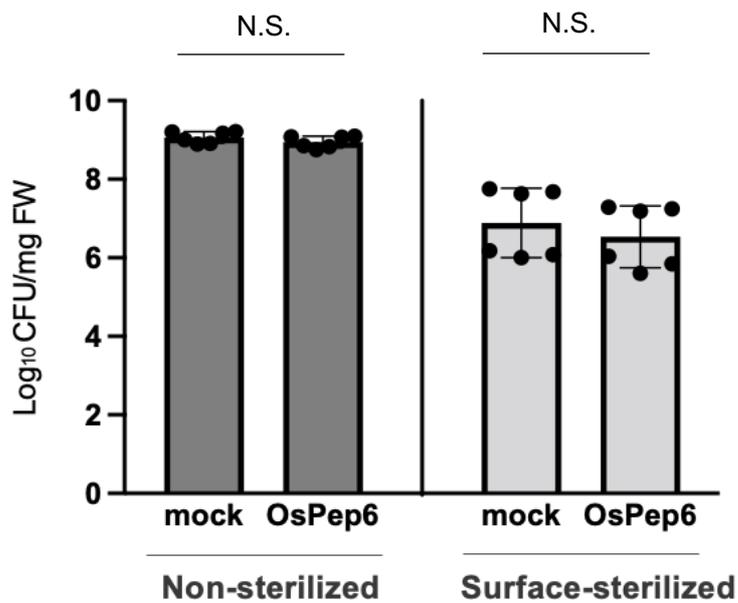


Fig. 3-13 共生細菌株 NB7 接種 7 日後におけるイネ根の菌体数

次亜塩素酸ナトリウムで処理した種子を用いた無菌条件で、OsPep6 および NB7 をイネに投与し、7 日後に根を回収した。根の表面殺菌なし区 (Non-sterilized) は根を滅菌水で洗ったものを、表面殺菌区 (Surface-sterilized) は 70% EtOH で 1 分間リンスし、3 回滅菌水で洗ったものを、平板希釈法を用いたコロニー計算に使用した (CFU)。独立した 2 回の実験を合算して示す。N.S. はそれぞれの対象区 (mock) と比較して、T 検定での有意差がないことを示す (n=6; p<0.05)。

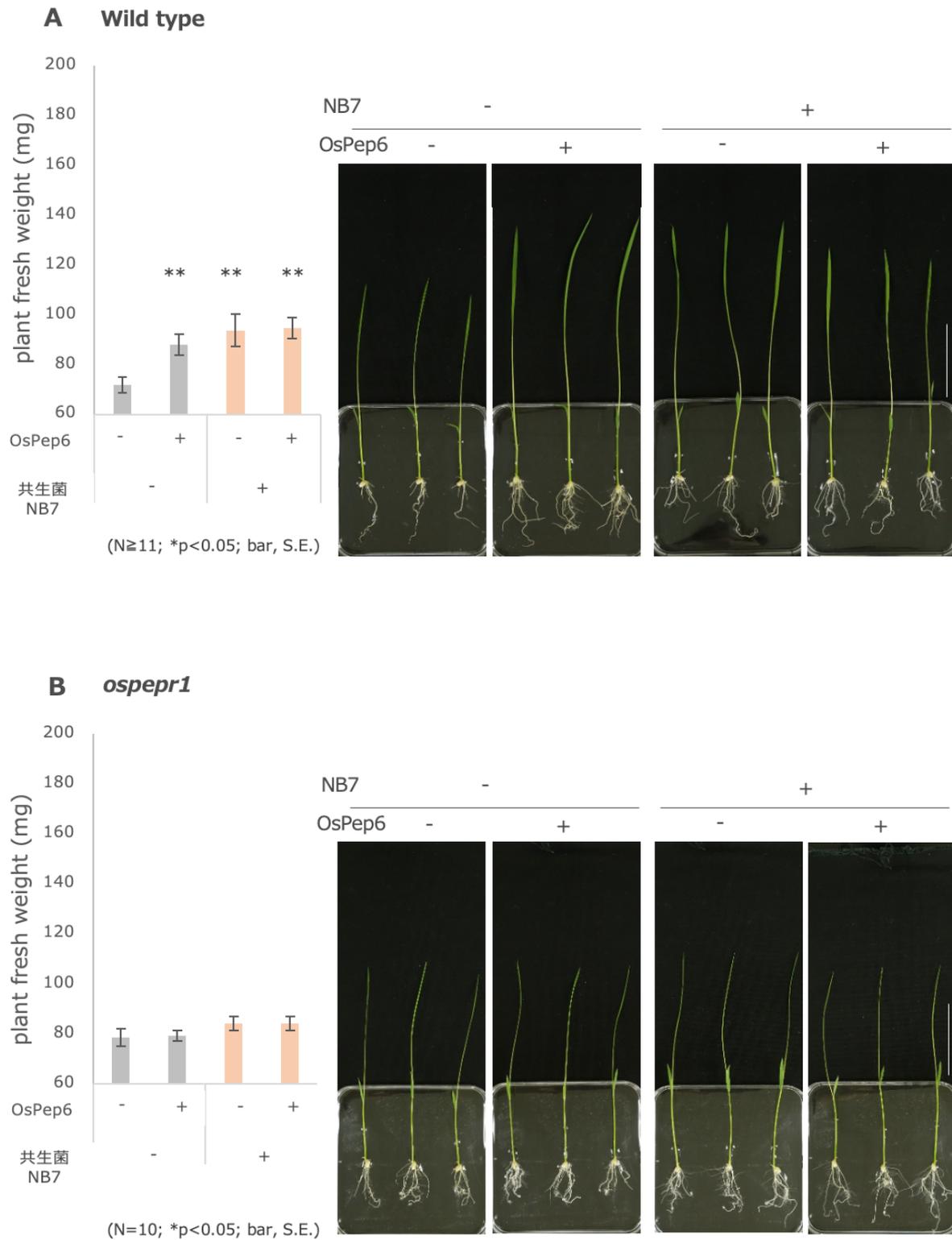


Fig. 3-14 種子細菌叢存在下での OsPep6 または NB7 の投与は単独で生重量増加につながる

防カビ剤で処理した種子を用いた種子細菌叢存在下で、NB7 による生育の影響を評価した。アスタリスクは接種細菌なしの mock との T 検定での有意差を示している (**p<0.01)。写真中の白い bar は 5 cm を示す。

(A) 野生型では、NB7 または OsPep の単体の投与時でも有意に生重量が増加する (n≥11)。

(B) *Ospepr1* では、野生型でみられた生重量増加はみられない (n=11)。

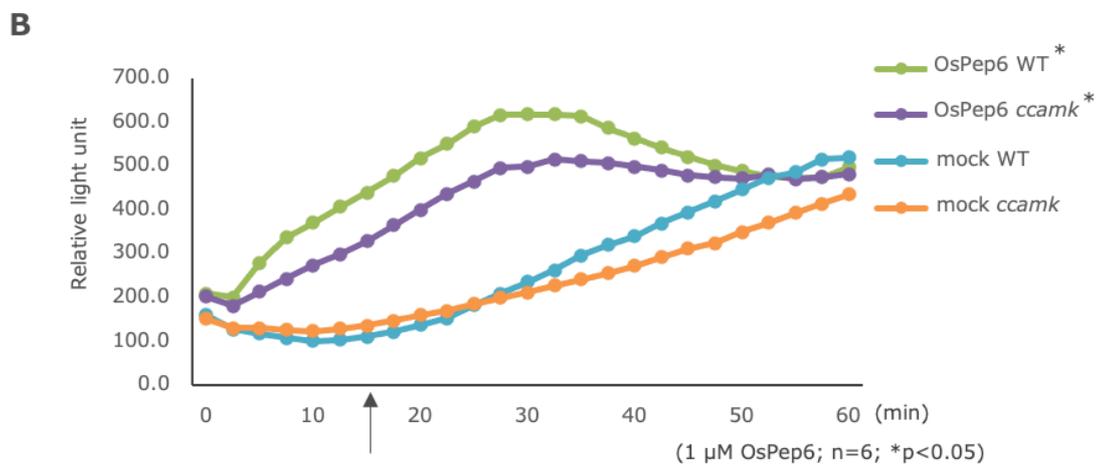
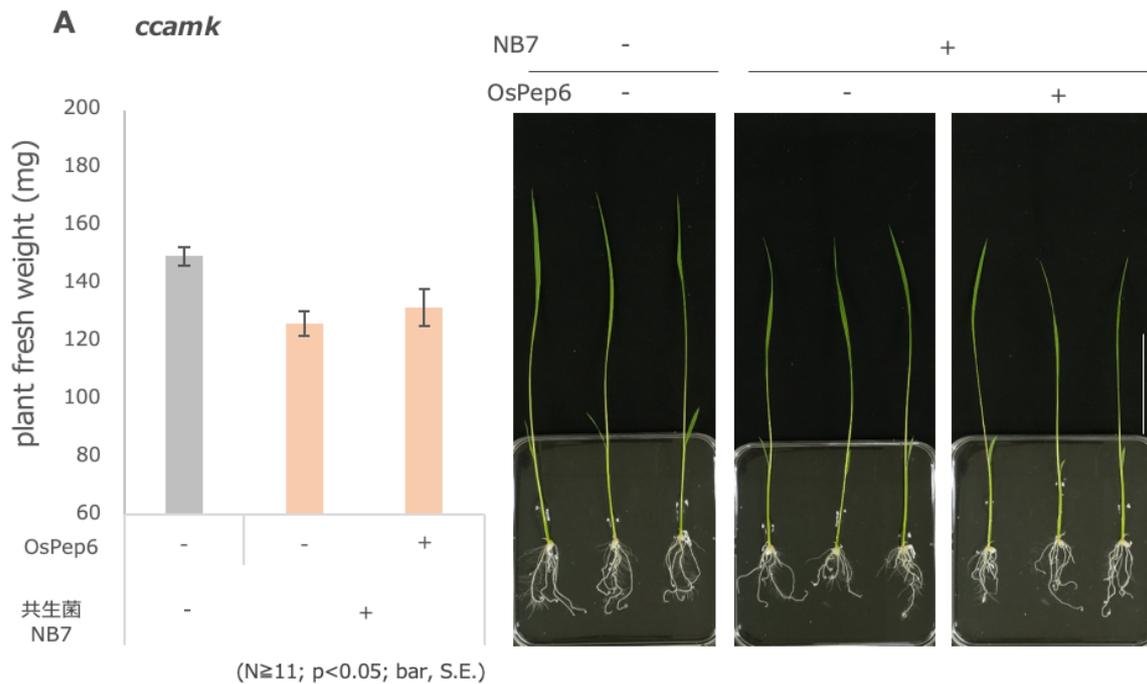
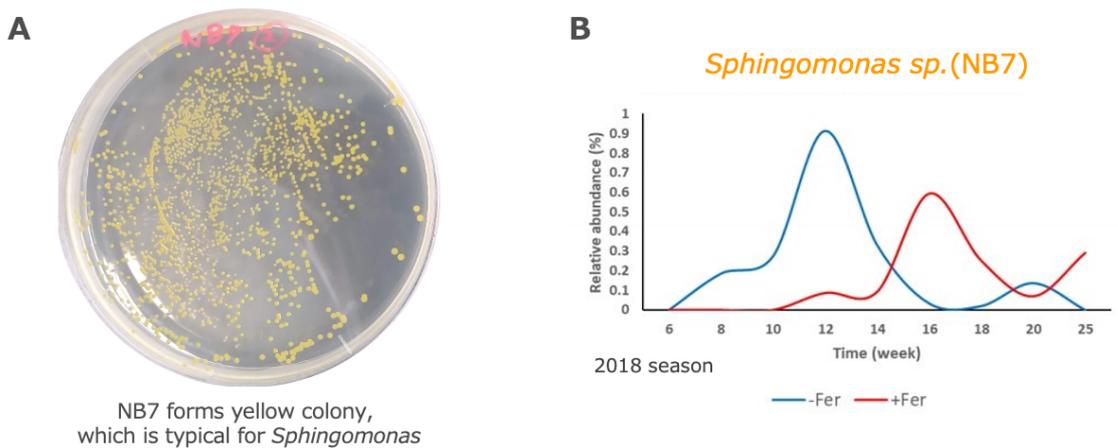


Fig. 3-15 *ccamk* 変異体では、OsPep6 と NB7 によるイネ生重量の増加は見られないが、OsPep6 による防御応答は見られる。

(A) 次亜塩素酸ナトリウムで処理した *ccamk* 欠損変異体の種子を用いた無菌条件で、NB7 による生育の影響を評価した。T 検定での有意差 (p<0.05) は見られなかった。写真中の白い bar は 5 cm を示す (n \geq 11)。

(B) イネの芽生えからリーフディスクを作成し、OsPep6 を含むルミノール溶液を投与し、発光量を指標に ROS の産生を測定した。アスタリスクは矢印で示した反応開始 15 分後において、water 区との T 検定での有意差を示している (n=6; **p<0.05)。



C

Strain	RefSeq accession	Assembly status	Genome size	# CDS	GC cont.	ANI (%)
<i>Sphingomonas sp.</i> NB7	-	Complete	4,505,919	4,022	67.58	-
<i>S. azotifigens</i> NBRC 15497	GCF_002091475.1	Contig	5,145,744	4,617	67.3	89.03
<i>S. trueperi</i> DSM 7225	GCF_011927635.1	Scaffold	4,619,715	4,204	67.4	88.17
<i>S. elodea</i> ATCC 31461	GCF_000226955.1	Contig	4,124,388	3,792	67.4	88.06
<i>S. pituitosa</i> NBRC 102491	GCF_001598435.1	Contig	4,743,156	4,309	67.1	87.80

Fig. 3-16 *Sphingomonas sp.* (NB7) の細菌株情報

(A) R2A 培地上でのコロニー形成の様子。

(B) 野外圃場で生育したイネの根に共生する NB7 の相対存在割合。無施肥圃場 (-fer) では播種約 12 週目、施肥圃場 (+fer) では播種約 16 週目に相対存在比のピークが見られた。

(C) Average nucleotide identity (ANI)に基づく近縁種の探索を行い、ANI 上位 4 種の情報をまとめた。最も ANI が高かったのは *S. azotifigens* NBRC 15497 の 89.03%だった。

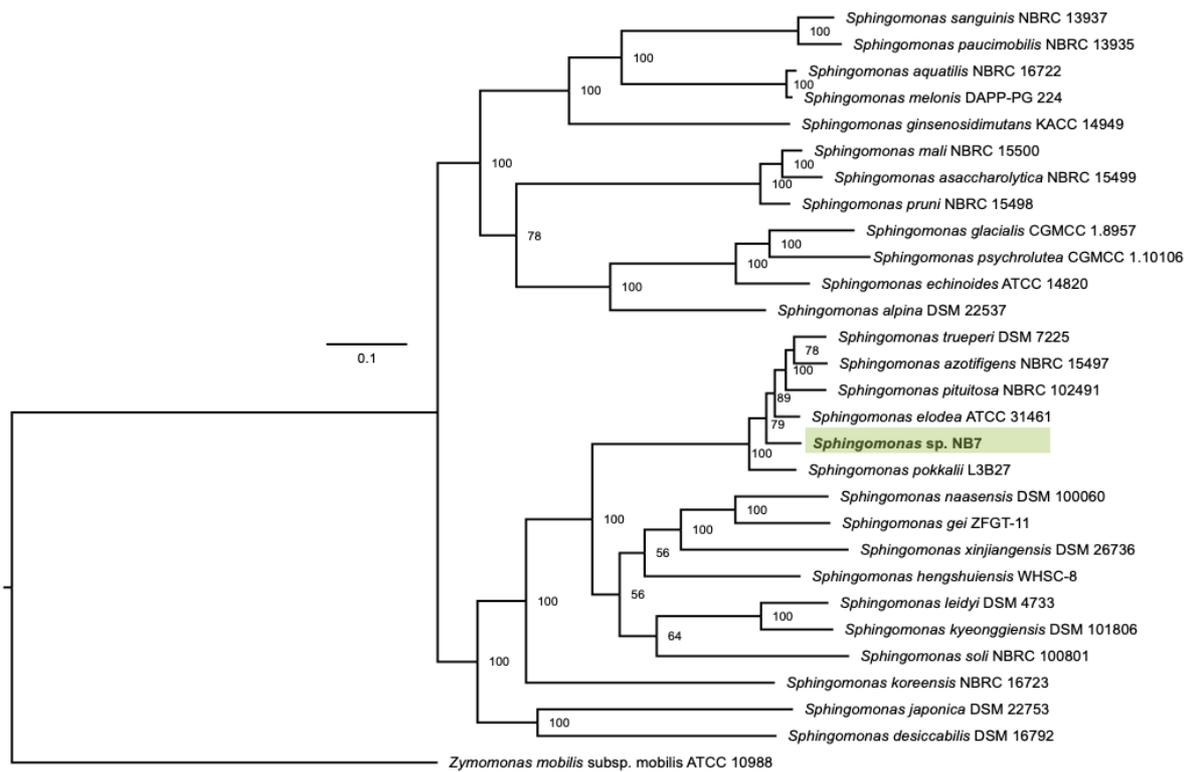


Fig. 3-17 *Sphingomonas* 属内における B7 株の系統位置

NB7 株と *Sphingomonas* 27 種、Outgroup に *Zymomonas mobilis* を加えた計 29 株で系統樹を作成した。29 株に共通する 235 のマーカー遺伝子を選出し、アミノ酸配列を系統樹の作成に用いた。1000 回の bootstrap により branch support value を算出した。

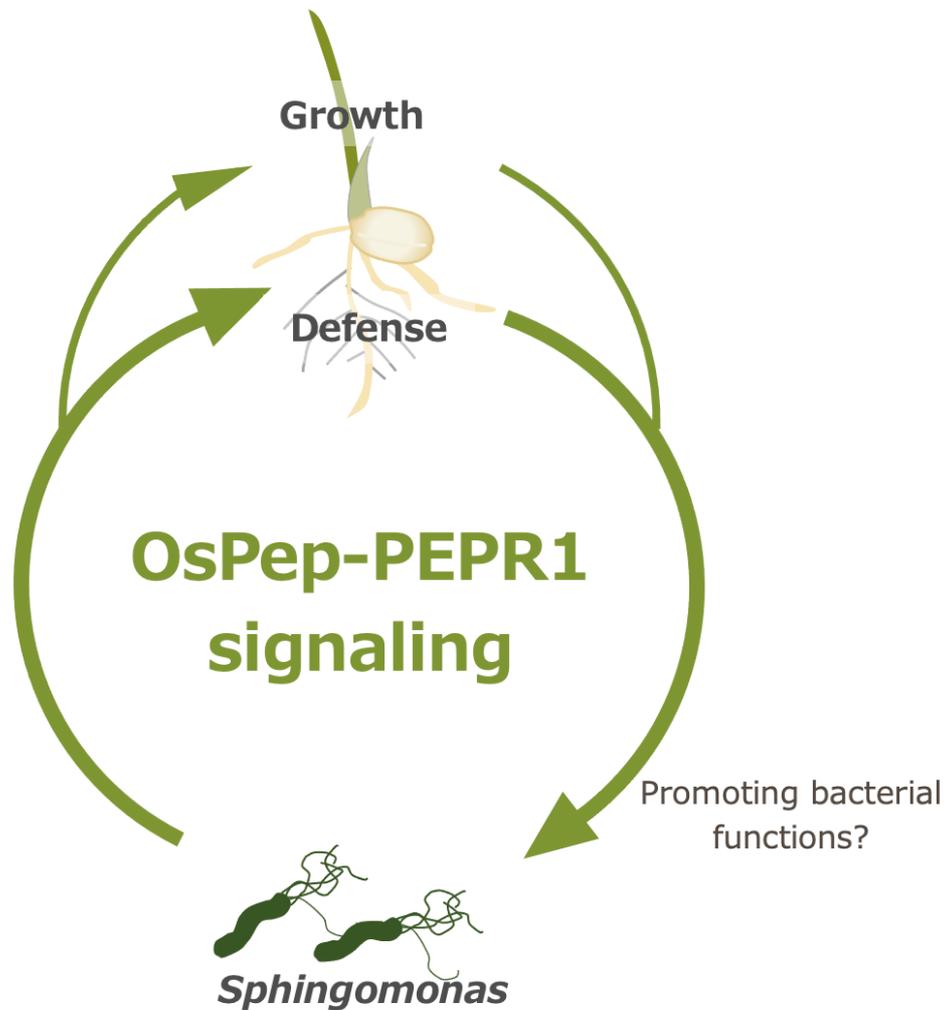


Fig. 4-1 まとめ図; OsPep-PEPR シグナルを介した微生物叢の制御

OsPep-OsPEPR シグナルは、防御応答の活性化、共生微生物叢の構成変化および植物成長の促進に働くことを本研究で明らかにした。根系拡張機能をともなう成長促進機能は種子由来の共生微生物に依存しており、その一端を担う *Sphingomonas* 属菌の一種を本同定した。

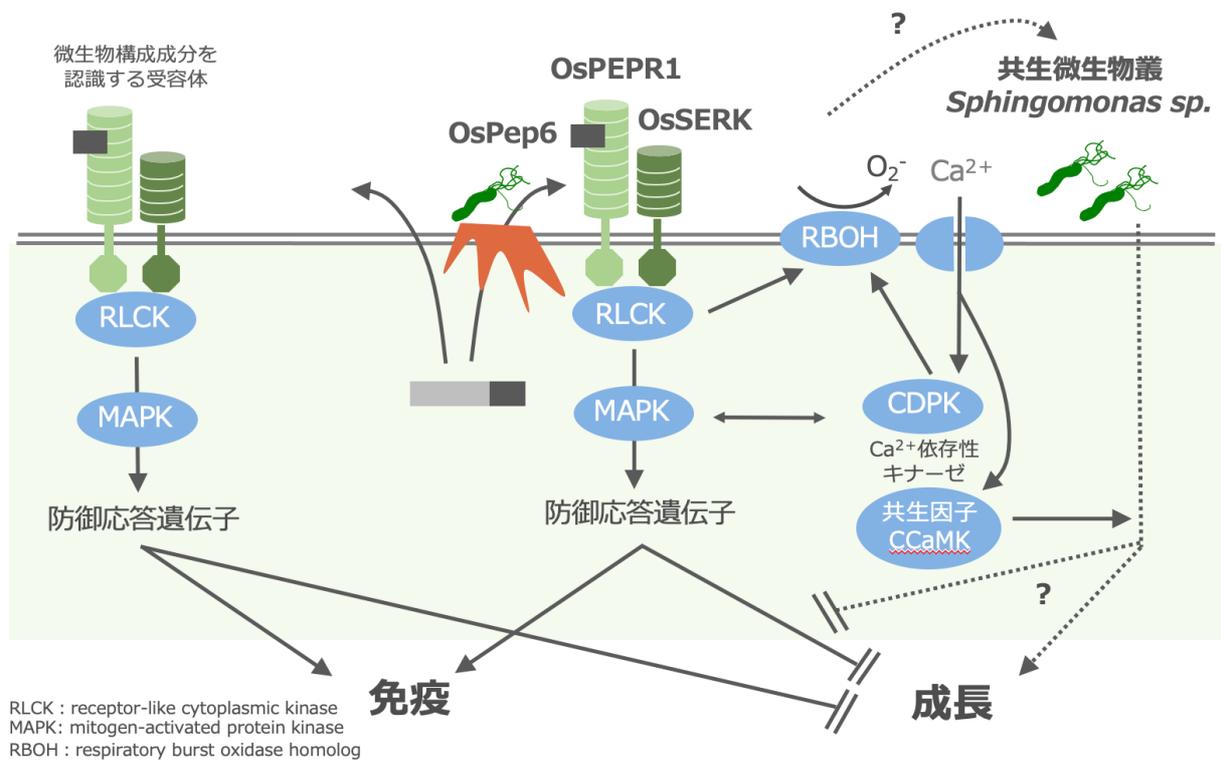
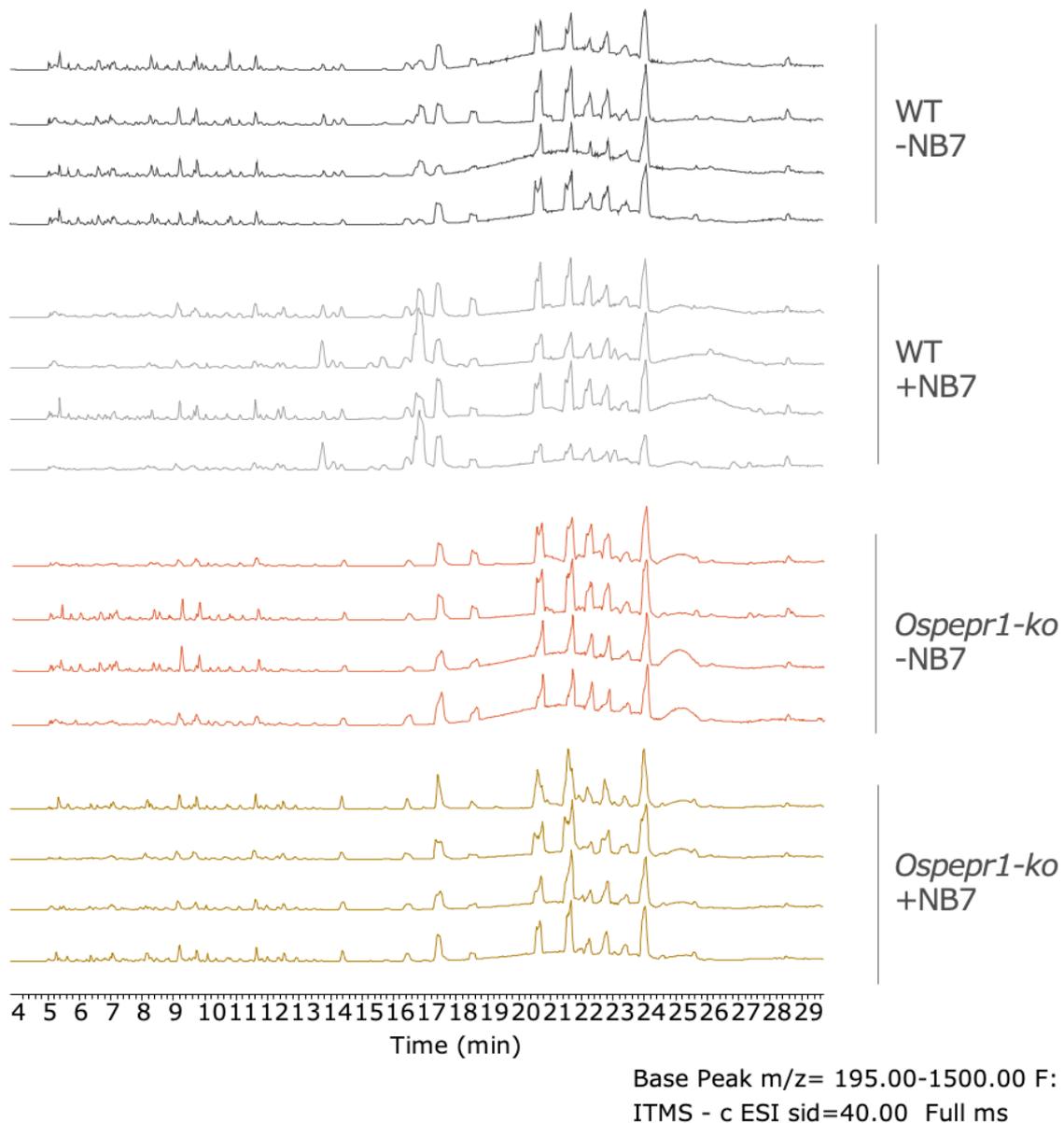


Fig. 4-2 まとめ図; OsPep-PEPR シグナルを介した免疫と成長のバランス制御

OsPep6 ペプチドが OsPEPR1 受容体によって認識されると、OsPEPR1 は共受容体である OsSERKs と複合体を形成することを明らかにした。受容体下流では、活性酸素種生成酵素タンパク質 RBOH を介して活性化酸素種 ROS の産生、MAPK の活性化、防御応答遺伝子の発現上昇を介して免疫が高まった状態となる。

一連の OsPep-PEPR1 シグナルは、未知の経路を介して共生微生物叢の機能に働きかけ、共通共生経路が連携して貧栄養条件におけるイネの共生制御、ひいては成長促進に寄与していることが示唆された。共通共生経路の重要因子である CCaMK は、ROS の産生にも必要な Ca²⁺ 依存性キナーゼの一種であり、免疫と共生のシグナルの密接な関係性が窺える。

今後、本研究で同定した成長促進の一端を担う細菌 *Sphingomonas* 属菌を用いて、植物の生理応答や微生物機能の解析を行うことで、免疫と成長のバランス制御の解明につながると期待される。



補足資料-1 NB7 接種区により特定の根の代謝成分（未同定）が増加した

次亜塩素酸ナトリウムで処理した種子を用いた無菌条件で、野生型および *Ospepr1-ko* に *OsPep6* を投与し、NB7 接種の有無における根の代謝成分解析（LC/MS）を行った。クロマトグラフの全体像を示す。各処理区 4 サンプルを解析した (n=4)。

(解析；本学 峠隆之博士、渡邊むつみ博士の協力)