

博士學位論文

植物のキチン応答における MAPK カスケード
活性化機構の解明

近畿大学大学院
農学研究科バイオサイエンス専攻
山田 健太

博士學位論文

植物のキチン応答における MAPK カスケード
活性化機構の解明

平成 29 年 1 月 10 日

近畿大学大学院

農学研究科バイオサイエンス専攻

山田 健太

目次

第 1 章 序論.....	1
第 2 章 シロイヌナズナのキチン応答における MAPK カスケード活性化機構	
1. 緒言.....	5
2. 実験方法.....	7
2-1. ベクターの作成.....	7
2-2. 植物材料と生育条件.....	9
2-3. MAPK 活性化解析.....	10
2-4. 酵母 Two-hybrid 法.....	10
2-5. <i>N. benthamiana</i> の葉における一過的発現.....	10
2-6. リコンビナントタンパク質の精製.....	11
2-7. <i>in vitro</i> リン酸化実験.....	11
3. 結果.....	12
3-1. CERK1 による PBL27 リン酸化解析.....	12
3-2. PBL27 と相互作用する MAPKKK の探索.....	13
3-3. 細胞内における PBL27 と MAPKKK5 との相互作用解析.....	16
3-4. PBL27 による MAPKKK5 のリン酸化解析.....	19
3-5. MAPKKK5 リン酸化部位の同定.....	20
3-6. CERK1-PBL27-MAPKKK5 リン酸化シグナル伝達機構の解析.....	22
3-7. MAPKKK5 による MKK4/5 のリン酸化解析.....	24
4. 考察.....	26
第 3 章 イネのキチン応答における MAPK カスケード活性化機構の解明	
1. 緒言.....	30
2. 実験方法.....	31
2-1. ベクターの作成.....	31
2-2. 酵母 Two-hybrid 法.....	33
2-3. 形質転換イネの作成.....	33
2-4. MAPK 活性化解析.....	33
2-5. 遺伝子発現解析.....	34
2-6. ROS 解析.....	34

2-7. <i>N. benthamiana</i> の葉における一過的発現.....	35
2-8. リコンビナントタンパク質の精製.....	35
2-9. <i>in vitro</i> リン酸化実験.....	35
3. 結果.....	36
3-1. OsRLCK185 と相互作用する MAPKKK の探索.....	36
3-2. キチン応答における OsMAPKKK11/18 機能解析.....	38
3-3. 細胞内における OsMAPKKK18 の局在解析.....	43
3-4. OsRLCK185 による OsMAPKKK18 リン酸化解析.....	45
3-5. OsMAPKKK18 と OsMKK4/5 との相互作用解析.....	46
4. 考察.....	47
第4章 総括.....	50
参考文献.....	52
謝辞	

第1章 序論

植物は環境中の細菌やカビ、ウイルスなどの病原体に常にさらされている。しかし、植物側は、体内への病原菌の侵入を検知し、速やかに防御応答を誘導することで、病原体による感染から身を守っている。植物の防御応答は、細胞膜上の受容体が、Pathogen-associated molecular patterns (PAMPs)と呼ばれる病原菌の構成成分を検知することによって引き起こされる(Jones & Dangl, 2006)。PAMPsによって誘導される防御応答は、Pattern-triggered immunity (PTI)と呼ばれ、活性酸素種(ROS)や抗菌性物質の生産、防御応答関連遺伝子の発現制御、細胞壁でのカロースの蓄積などが引き起こされる(図 1)(Jones & Dangl, 2006)。また植物は、病原菌の感染によって誘導される内在性のエリシターや自身の細胞壁断片を認識することによって防御応答を誘導する(Yamaguchi & Huffaker, 2011)。このような植物由来のエリシターは Damage-associated molecular patterns (DAMPs)と呼ばれ、PAMPs と同様の防御反応を示すことが知られている。PAMPs や DAMPs を認識する受容体は、Pattern-recognition receptors (PRRs)と呼ばれ、その多くは Receptor-like kinases (RLKs)、または Receptor-like proteins (RLPs) である(Macho & Zipfel, 2014)。RLKs は、細胞外に PAMPs などのリガンドを認識するためのドメインを、細胞内にはシグナル伝達にかかわるキナーゼドメインを持っている(Macho & Zipfel, 2014)。一方、RLPs は RLKs と同様に、リガンドの認識に関わるドメインを細胞外に持っているが、細胞内ドメインは欠損している(Macho & Zipfel, 2014)。

これまでに、様々な PAMPs について、特異的に認識する受容体が同定されている。シロイヌナズナ FLS2 は、細胞外ドメインに leucine-rich repeat (LRR)を持つ RLK であり、細菌のべん毛タンパク質を構成するペプチド断片である flg22 を認識する(Chinchilla et al., 2006)。また、FLS2 と同じ LRR-RLK である EFR は、翻訳伸長因子である EF-Tu のペプチド断片(elf18)を認識する受容体であることが知られている(Zipfel et al., 2006)。さらに、DAMPs として機能するペプチド断片として知られる Pep は、PAMPs に応答して誘導され、LRR-RLK である PEPR1/2 によって認識されることで防御応答を引き起こす (Yamaguchi & Huffaker, 2011)。また、LRR-RLK である BAK1 は、FLS2、EFR および PEPR の共受容体として機能していることが知られている(Macho & Zipfel, 2014)。FLS2 と BAK1 は、flg22 を認識する際に、細胞外ドメインを介してヘテロオリゴマーを形成し、細胞内のキナーゼドメインを介してお互いをリン酸化することで活性化していると考えられる(Chinchilla et al., 2007)。また、PEPR1/2 も Pep を認識する際に BAK1 と複合体を形成することが報告されており、受容体の活性化に必要であると考えられる(Tang et al., 2015)。

一方、糖質結合モジュールである lysine motif (LysM) を細胞外に持つシロイヌナズナ AtCERK1 および LYK5 は、真菌の細胞壁構成成分であるキチンの受容体として機能している (Liu et al., 2012; Cao et al., 2014)。また、LysM ドメインを持つ RLP である LYM1/LYM3 は、細菌由来のペプチドグリカンの認識において、AtCERK1 と協調的に働いていることが報告されている (Willmann et al., 2011)。AtCERK1 は LysM ドメインを持っているにもかかわらず、キチンやペプチドグリカンに対する結合能が非常に低いことから、共受容体がリガンドを直接認識し、AtCERK1 が細胞内へシグナルを伝達する役割を担っていると考えられる (Willmann et al., 2011; Cao et al., 2014)。

イネにおいてもシロイヌナズナと同様の機構でキチンおよびペプチドグリカンを認識している。AtCERK1 のオルソログである OsCERK1 は、LysM-RLP である CEBiP と複合体を形成することでキチン認識に機能している (Kaku et al., 2006; Shimizu et al., 2010)。また、AtLYM1/3 のオルソログである LYP4/6 は、ペプチドグリカンを直接認識し、OsCERK1 を介してシグナル伝達していることが報告されている (Liu et al., 2012)。OsCERK1 もまた、キチンやペプチドグリカンに対する結合能が低いことから、シロイヌナズナと同様に、共受容体がリガンドの認識を担っていると考えられる。このように、様々な PRR においてヘテロオリゴマーを形成することが報告されており、PAMPs 認識における共通の受容体活性機構であることが予想される。

リガンドを認識した PRR は、細胞内ドメインを介して下流へとシグナルを伝達する。PRR の下流では、mitogen-activated protein kinase (MAPK) カスケードと呼ばれるシグナル伝達系が重要な役割を果たしていることが知られている (Rasmussen et al., 2012)。MAPK カスケードは、MAPKK Kinase (MAPKKK) - MAPK Kinase (MAPKK) - MAPK から構成される、リン酸化を介したシグナル伝達モジュールである (図 1)。MAPK カスケードを構成する 3 種のタンパク質は、動物や酵母などの幅広い生物種において保存されており、シロイヌナズナにおいては、MAPKKK : 80、MAPKK : 10、MAPK : 20 の遺伝子がそれぞれ存在している (Jonak et al., 2002)。イネにおいても、MAPKKK : 75、MAPKK : 8、MAPK : 17 の遺伝子が存在しており、MAPK カスケードを介したシグナル伝達経路は非常に複雑なネットワークによって構成されていると予想される (Ichimura et al., 2002)。また、flg22 やキチンなどの様々な PAMPs に応答して、MAPK が活性化されることが知られており、MAPK カスケードが植物の防御応答に関わるシグナル伝達において非常に重要な役割を担っていると考えられる (Rasmussen et al., 2012)。

植物が PAMPs を認識することで防御応答を誘導する一方で、病原菌はエフェクターと呼ばれるタンパク質を宿主細胞内へ注入し、防御応答を抑制することで感染に有利な

状況を作り出している。病原菌は複数のエフェクターを保有しており、活性もさまざまである。宿主細胞内に注入されたエフェクターは、防御応答に関与する重要な因子を標的として、特異的にその働きを阻害する(図 1) (Cui et al., 2009)。これまでに様々なエフェクターが同定されており、そのエフェクターの持つ活性および阻害機構が明らかとなっている。*Pseudomonas syringae* の持つ AvrPtoB は、ユビキチンリガーゼとして機能し、FLS2 や EFR、CERK1 の分解を促進するとともに、キナーゼ阻害剤として BAK1 の活性を阻害することが報告されている (Gimenez-Ibanez et al., 2009; Abramovitch et al., 2006; Gohre et al., 2008; Cheng et al., 2011)。また、HopAO1 は、キナーゼ阻害剤として EFR の活性を阻害する(Macho et al., 2014)。これらのエフェクターによって、PAMPs によって誘導される MAPK の活性化が低下することも明らかとなっている。さらに、MAPK カスケードを直接標的とするエフェクターも報告されている。*Pseudomonas syringae* の HopAI1 は、MPK3/6 を脱リン酸化することによって、flg22 による防御応答を抑制する(Zhang et al., 2007)。このように、病原菌のエフェクターによって、MAPK の活性化が抑制されることから、MAPK カスケードが植物の防御応答に重要な役割を果たしていると考えられる。

MAPK カスケードは、植物の防御応答を誘導する上で非常に重要なシグナル伝達系であるが、PRR からのシグナルがどのように MAPK カスケードへ伝達されているかは明らかにされていなかった。そこで本研究では、シロイヌナズナとイネのキチン応答時における MAPK カスケードへのシグナル伝達機構を明らかにすることを目的とした。

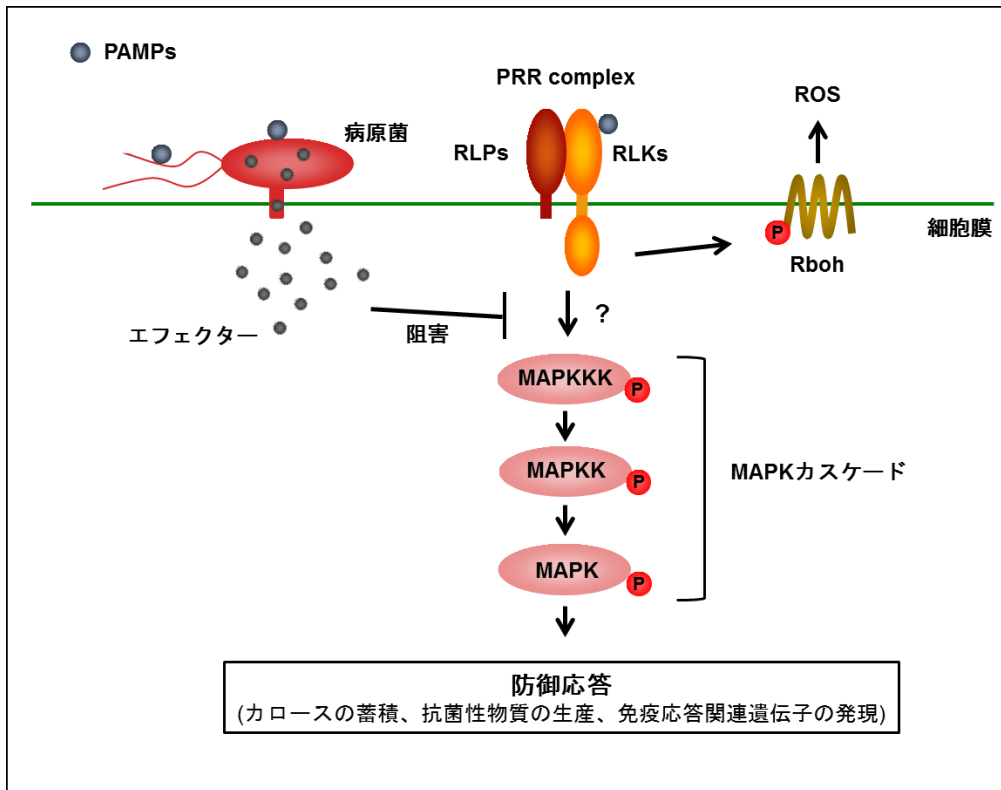


図 1. 植物の免疫応答誘導モデル

PAMPs を認識した PRR は細胞内にシグナルを伝達し、Rboh を介した ROS 生産や抗菌性物質の生産などの防御応答を誘導する。また、PRR の下流では、MAPK カスケードが重要なシグナル伝達経路として機能している。一方病原菌は、エフェクタータンパク質を宿主細胞内へ注入し、植物側の因子の働きを阻害することで、防御応答を抑制する。

第2章 シロイヌナズナのキチン応答における MAPK カスケード活性化機構

1. 緒言

MAPK カスケードは、PRR の下流で機能する重要なシグナル伝達モジュールとして知られているが、PRR からのシグナルがどのように MAPK カスケードへ伝達されているかは明らかになっていない(Couto & Zipfel., 2016)。シロイヌナズナでは、flg22 や elf18、キチンなどの PAMPs によって、MAPK である MPK3/4/6/11 の活性化が誘導されることが知られている(Rasmussen et al., 2012)。これまでに、MPK4 の上流には MAPKK である MKK1/2 が機能していることが報告されている。さらに、flg22 によって誘導される MPK4 の活性化には MAPKKK である MEKK1 が必要であることも明らかとなっており、FLS2 の下流では、MEKK1-MKK1/2-MPK4 から構成される MAPK カスケードが機能していることを示している(図 2-1) (Asai et al., 2002)。一方、MPK3/6 の上流では MKK4/5 が機能していることが知られている(Rasmussen et al., 2012)。しかし、MEKK1 は MPK3/6 の活性化には関与しないことが報告されており、MKK4/5-MPK3/6 の上流で機能する MAPKKK は同定されていない(図 2-1) (Suarez-Rodriguez et al., 2007)。

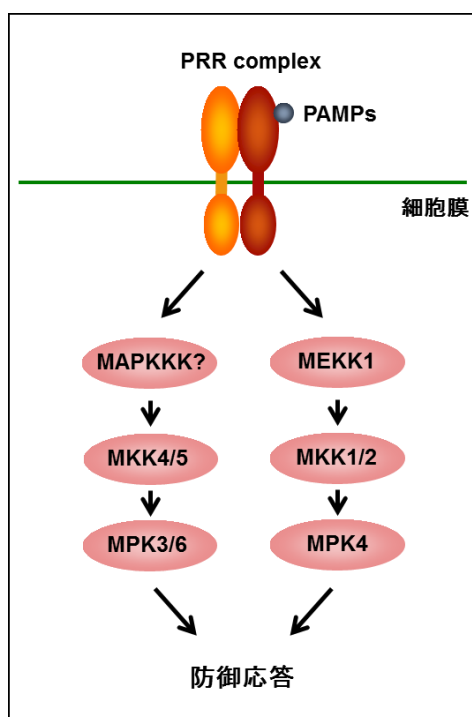


図 2-1. シロイヌナズナの免疫応答におけるシグナル伝達経路

PRR の下流では、MEKK1-MKK1/2-MPK4 および MKK4/5-MPK3/6 から構成される 2 つの MAPK カスケードが機能している。しかし、MKK4/5 の上流で機能する MAPKKK は同定されていない。

近年、Receptor-like cytoplasmic kinase (RLCK)ファミリーに属するタンパク質が、PRR の下流におけるシグナル伝達に重要な役割を担っていることが明らかとなってきた。シロイヌナズナの RLCK の一つである BIK1 は、flg22 や elf18、Pep の応答に関与していることが知られている。BIK1 は FLS2/BAK1 や EFR/BAK1 と共に複合体を形成し、flg22 および elf18 に応答してリン酸化される (Lu et al., 2010; Zhang et al., 2010; Liu et al., 2013)。また、BSK1 や PBL1 などの RLCK も flg22 に応答してリン酸化されることが報告されている (Lu et al., 2010; Zhang et al., 2010)。さらに、FLS2 や EFR によってリン酸化された BIK1 が、NADPH オキシダーゼである RBOHD をリン酸化することで、免疫応答における ROS 生産を直接制御していることが明らかとなった (Kadota et al., 2014; Li et al., 2014)。これらのことから、RLCK が受容体から細胞内への情報伝達を担う重要な因子であると考えられる。しかし、*BIK1* や *PBL1* の機能欠損変異体では、flg22 に応答した MAPK の活性化に影響が見られないことから、MAPK カスケードへのシグナル伝達には他の因子が関与していると考えられる (Lu et al., 2010; Zhang et al., 2010)。また、PEPR1/2 の下流においても、Pep によって MAPK の活性化が誘導されることが知られている (Yamaguchi & Huffaker., 2011)。Pep 応答において、*bik1/pbl1* 二重欠損変異体では MAPK の活性化が低下していることから、PEPR から MAPK へのシグナル伝達にはこれらの RLCK が関与していることを示している (Yamada et al., 2016a)。

シロイヌナズナにおけるキチン認識は、受容体である CERK1/LYK5 複合体が担っている。また、CERK1/LYK5 の下流では、キチンに応答した MAPK の活性化が誘導される (Miya et al., 2007)。このことから、CERK1/LYK5 からのシグナルは MAPK カスケードへ伝達されていると考えられるが、そのメカニズムは明らかになっていない。我々はこれまでに、RLCK ファミリーに属する PBL27 が CERK1 によるシグナル伝達に重要な役割を果たしていることを明らかにしている (Shinya et al., 2014)。*pbl27* 機能欠損変異体では、キチンに応答した MAPK の活性化が低下したことから、キチンシグナル伝達経路において、PBL27 が CERK1 と MAPK カスケードを繋ぐ因子であることが示唆された (Shinya et al., 2014)。そこで本章では、PBL27 と相互作用する MAPKKK の同定を行い、キチンシグナル伝達経路における機能を明らかにすると共に、MAPK カスケードの活性化機構を明らかにすることを目的とした。

2. 実験方法

2-1. ベクターの作成

それぞれの DNA 断片を、表 2-1 に示したプライマーを用いた PCR によって増幅した。増幅した DNA 断片を、pENTR/D-TOPO (Invitrogen) に導入した。PBL27、MAPKKK5、MKK4、MKK5 の各アミノ酸置換変異体は、表 2-1 に示したプライマーを用いた PCR による site-directed mutagenesis 法により作成した。タンパク質発現用ベクターとして、pENTR/D-TOPO に導入した DNA 断片を制限酵素処理によって切り出し、pCold ベクター (Takara) に導入した。*Nicotiana benthamiana* を用いた一過的発現系に用いるベクターとして、pENTR/D-TOPO に導入した MAPKKK5 を pGWB5 へ、PBL27 を pGWB14 へ LR クロナーゼ (Invitrogen) を用いた LR 反応により導入した (Nakagawa et al., 2007)。また、BiFC 解析用のベクターとして、MAPKKK5 を pDEST-GWVYNE へ、PBL27 を pDEST-GWVYCE へそれぞれ LR 反応により導入した (Gehl et al., 2009)。酵母 Two-hybrid 法に用いるベクターとして、MAPKKK5 を pVP16 (prey)、PBL27 を pBTM116 (bait) へそれぞれ LR 反応により導入した。

表 2-1 ベクター作成に用いたプライマー配列

ベクター構築

プライマー名	配列(5'-3')
BIK1-F	CACCATGGGTTCTTGCTTCAGTTCTC
BIK1-R	CTACACAAGGTGCCTGCCAAAAGG
PBL27-F	CACCATGAGTGGGTGTTTGCCTTG
PBL27 Δ stop-R	GTCATTTGTA CTATCAAAGCTG
pMAPKKK5-F	CACCGCATCGTTAAGTATGTTGTTACTTC
pMAPKKK5-R	GAGAAGAAGAAGGAGACGAGAACGAG
MAPKKK5-Full-F	CACCATGCGTTGGCTTCCGCAAATC
MAPKKK5-Full Δ stop-R	AAGGTGATCTGAAGTGACGCCCG
MAPKKK5-Full-R	TCAAAGGTGATCTGAAGTGACGCC

酵母 Two-hybrid 法

プライマー名	配列(5'-3')
PBL27-F	CACCATGAGTGGGTGTTTGCCTTG
PBL27-R	TCAGTCATTTGTA CTATCAAAGCTG
MAPKKK5-F	CACCATGCGTTGGCTTCCGCAAATCT

MAPKKK5-R	CTAAAGGTGATCTGAAGTGAC
MAPKKK5-N-R	CTACTGGGAATTCATTGGGAATGA
MAPKKK5-KD-F	CACCCCGAGGTTGTCTACTGATGTT
MAPKKK5-KD-R	CTATTGAGAGACATCACTGTTGC
MAPKKK5-C-F	CACCATGGCATCTATGTTGCTAGAACACCGGTT

タンパク質発現

プライマー名	配列(5'-3')
Kpn1-PBL27-F	CACCGGTACCATGAGTGGGTGTTTGCCTTG
Sal1-PBL27-R	CAGCTGTCAGTCATTTGTACTATCAAAGCTG
Nde1-MAPKKK5-Full-F	CACCCATATGATGCGTTGGCTTCCGCAAATC
Sal1-MAPKKK5-Full-R	GTCGACTCAAAGGTGATCTGAAGTGACGCC
Sal1-MAPKKK5-N-R	GTCGACTCACTGGGAATTCATTGGGAATGAATC
Nde1-MAPKKK5-KD-F	CACCCATATGTGGAAGAAAGGGAAGCTAATAGG
Sal1-MAPKKK5-KD-R	GTCGACTCATAGGAACCGGTGTTCTAGCA
Nde1-MAPKKK5-C-F	CACCCATATGATGGCATCTATGTTGCTAGAACACC
Nde1-MKK4-F	CACCCATATGAGACCGATTCAATCGCCTC
Xho1-MKK4-R	CTCGAGCTATGTGGTTGGAGAAGAAGACGAG
Nde1-MKK5-F	CACCCATATGAAACCGATTCAATCTCCTTC
Xho1-MKK5-R	CTCGAGCTAAGAGGCAGAAGGAAGAGGACG

Site-directed mutagenesis

プライマー名	配列(5'-3')
PBL27 ^{K112E} -F	ATAGTAGCTGTTGAACAGCTTGATCGAAAC
PBL27 ^{K112E} -R	TCGATCAAGCTGTTCAACAGCTACTATCTG
PBL27 ^{S244, T245, T250A} -F	AACACATGTGGCTGCTCGTGTGAT
PBL27 ^{S244, T245, T250A} -R	AATAACCATAAGCGCCCATCACACGAGC
MAPKKK5 ^{K375M} -F	TGTGTGCGATGATGGAAGTTGAGCTATTTTC
MAPKKK5 ^{K375M} -R	GGAAATAGCTCAACTTCCATCATCGCACAC
MAPKKK5 ^{S617A, S622A} -F	CCAACCTCACCAGCTAACAGTGATGTCGCTCAATTA
MAPKKK5 ^{S617A, S622A} -R	TTAAATAATTGAGCGACATCACTGTTAGCTGGTGAG G
MAPKKK5 ^{S658A, S660A} -F	TCCTCAGAGGCTGAAGCTGGGCAACAG
MAPKKK5 ^{S658A, S660A} -R	CTGCTGTTGCCAGCTTCAGCCTCTGAG

MAPKKK5 ^{T677A, S685A} -F	CTAACAGGAGCTGTGAACCGTCTGTCTCCTCGTGC TACTCTGGA
MAPKKK5 ^{T677A, S685A} -R	CCTCCAGAGTAGCACGAGGAGACAGACGGTTCACA GCTCCTGTTA
MKK4 ^{K108R} -F	GTGATATACGGTAACCACGAGGAGACT
MKK4 ^{K108R} -R	CTCGTGGTTACCGTATATCACTCTAAGTGC
MKK4 ^{T224A, S230A} -F	CTTGGCTCAGGCTATGGATCCGTGTAATGCTTCTG TTGG
MKK4 ^{T224A, S230A} -R	GGTTCCAACAGAAGCATTACACGGATCCATAGCCT GAGCC
MKK5 ^{K99R} -F	GTGATTTACGGAAACCACGAAGATACCG
MKK5 ^{K99R} -R	CTTCGTGGTTTCCGTAAATCACTCTGAGAGC
MKK5 ^{T215A, S221A} -F	GGCACAAGCTATGGATCCTTGTAAATGCTTCTGTTG G
MKK5 ^{T215A, S221A} -R	CCAACAGAAGCATTACAAGGATCCATAGCTTGTGC C

2-2. 植物材料と生育条件

シロイヌナズナの植物を明所:16時間、暗所:8時間のサイクルで生育した。T-DNA挿入による *mapkkk5* 機能欠損変異体 (*mapkkk5-1* (SAIL_1219_E11), *mapkkk5-2* (SALK_122847))は、Arabidopsis Biological Resource Centerから得た。形質転換植物を作成するために、MAPKKK5のプロモーターにMAPKKK5のcDNAを繋いだコンストラクト (*pMAPKKK5::MAPKKK5*) および MAPKKK5^{6xA} のcDNAを繋いだコンストラクト (*pMAPKKK5::MAPKKK5^{6xA}*)をpENTR/D-TOPOへクローニングし、pGWB10へLR反応により導入した。MAPKKK5を導入したpGWB10を *Agrobacterium tumefaciens* (EHA101)へエレクトロポレーション法により形質転換した。形質転換した *Agrobacterium*の菌液をつぼみにかけ、*mapkkk5-1*に感染させた。

2-3. MAPK 活性化解析

シロイヌナズナの種子を、1%スクロースと0.1%アガロースを含むMGRL培地に播種し、明所：16時間、暗所：8時間のサイクルで8日間生育した。植物体を、10 μ M キチン ((GlcNAc)₇)を含むMGRL液体培地に浸した。処理後の植物体を液体窒素で凍らせた。回収した植物体を破碎し、抽出Buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 10% glycerol, 5 mM DTT, 2.5 mM NaF, 1.5 mM Na₃VO₄, 1 \times complete EDTA-free protease inhibitor cocktail (Roche), 2% (v/v) IGEPAL CA-630 (MP Biomedicals))に懸濁し、タンパク質を抽出した。MAPKの活性化は、抗 p44/42 MAPK抗体を用いたウエスタンブロッティングにより解析した。

2-4. 酵母 Two-hybrid 法

MAPKKKを導入した pVP16 および PBL27 を導入した pBTM116 を酵母 (L40) に形質転換した。形質転換した酵母を選抜するために、生育に必要なウラシル、トリプトファン、ロイシンを含まない培地 (-UWL)上で、30 $^{\circ}$ C、3日間生育した。生育が見られたコロニーを、-UWL 液体培地で培養し、菌液をヒスチジン合成阻害剤である 3-AT (3-amino-1,2,4-triazol)を加えた-UWLH 培地(ヒスチジンを含まない)にスポットした後、30 $^{\circ}$ C、3日間生育させた。

2-5. *N. benthamiana* の葉における一過的発現

PBL27 および MAPKKK5 を導入したベクターを *Agrobacterium tumefaciens* (C58)に形質転換した。形質転換した *Agrobacterium* を液体培養した後、遠心分離によって菌を回収した。回収した菌を懸濁 Buffer (10 mM MgCl₂, 10 mM MES-NaOH (pH5.6))に懸濁し、150 μ M アセトシリンゴンを加え、暗所で3時間静置した。4週齢の *N. benthamiana* を使用し、1ml 針無しシリンジを用いて、菌液を葉の裏側から浸潤させた。

アグロバクテリウムを感染させた葉をコルクボーラーでくり抜き、液体窒素で凍らせた。凍らせた葉をステンレスビーズで破碎し、抽出 Buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 10% glycerol, 5 mM DTT, 2.5 mM NaF, 1.5 mM Na₃VO₄, 1 \times complete EDTA-free protease inhibitor cocktail (Roche), 2% (v/v) IGEPAL CA-630 (MP Biomedicals))で懸濁した後、氷上で1時間静置した。その後、10000 rpm、4 $^{\circ}$ C、5分間遠心分離し、上清をタンパク質抽出液として回収した。

膜画分を回収するために、液体窒素で凍らせた葉を破碎した後、抽出 Buffer (20 mM Tris-HCl (pH7.5), 0.33 M スクロース, 1 mM EDTA, 1 \times complete EDTA-free protease inhibitor cocktail (Roche), 0.1%メルカプトエタノール)で懸濁した。懸濁液を 2000 g、

4°C、5 分間遠心分離し、上清を回収した(全画分)。回収した上清を 36000rpm、4°C、1 時間遠心分離し、上清を可溶性画分として回収した。沈殿を、膜抽出 Buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 10% glycerol, 5 mM DTT, 2.5 mM NaF, 1.5 mM Na₃VO₄, 1x complete EDTA-free protease inhibitor cocktail (Roche), 2% (v/v) IGEPAL CA-630 (MP Biomedicals))で懸濁し、氷上で 1 時間静置した。その後、15000rpm、4°C、10 分間遠心分離し、上清を膜画分として回収した。回収したタンパク質は、各抗体を用いたウエスタンブロッティングにより検出した。

2-6. リコンビナントタンパク質の精製

PBL27、MAPKKK5、MKK4、MKK5 を導入した pCold ベクターを大腸菌に形質転換し、低温誘導により発現させた。誘導後の大腸菌を回収し、抽出 Buffer (80 mM Tris-HCl (pH 7.5), 4 mM EDTA, 4 mM DTT, 150 mM NaCl, 1x complete EDTA-free protease inhibitor cocktail (Roche))に懸濁した後、超音波破碎した。GST を融合したタンパク質は、glutathione sepharose 4B (GE Healthcare)で精製し、50 mM グルタチオンで溶出した。

2-7. *in vitro* リン酸化実験

反応 Buffer (50 mM HEPES (pH 7.6), 10 mM MgCl₂, 100 μM ATP, 1 mM DTT)に、精製したリコンビナントタンパク質をそれぞれ 1 μg ずつ加えた。リン酸化反応は、反応 Buffer に 0.4 μl (4 μCi)の[γ-³²P] ATP を加え、25°Cで 1 時間反応させた。溶液に 6x サンプル Buffer (350 mM Tris-HCl, 35 mM DTT, 30%グリセリン, 60 mM DTT, 60 μM ブロモフェノールブルー(BPB))を 1x になるように加え、室温で 10 分間静置し、リン酸化反応を停止させた。反応後のサンプルを、ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離した。リン酸化によるバンドは、FLA-7000 imaging analyzer (FujiFilm)を用いて検出した。

3. 結果

3-1. CERK1 による PBL27 リン酸化解析

我々はこれまでに、キチン認識受容体として知られる CERK1 と相互作用する細胞内因子として、RLCK である PBL27 (At5g18610) を同定した(Shinya et al., 2014)。CERK1 による PBL27 の活性化機構を明らかにするために、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ を用いた *in vitro* リン酸化解析を行った。解析を行うにあたり、GST を融合した OsCERK1 の細胞内ドメイン (OsCERK1:IC) および PBL27 のタンパク質を、大腸菌発現系を用いて作成した。また、PBL27 は自己リン酸化活性を持っているため、ATP 結合部位である Lys-112 を Glu に置換することで活性を失くした変異体(PBL27^{K112E})を用いた。解析の結果、CERK1 の細胞内ドメインが PBL27 を直接リン酸化することが明らかになった(図 2-2 A) (Shinya et al., 2014)。

RLCK ファミリーに属するシロイヌナズナ BIK1 やイネの OsRLCK185 はそれぞれ、受容体である FLS2/BAK1 および OsCERK1 によって、活性化ループ内に保存されている 3 つの Ser/Thr 残基がリン酸化される (Lu et al., 2010; Zhang et al., 2010; Yamaguchi et al., 2013)。このことから、PBL27 もまた、CERK1 によって活性化ループがリン酸化されると考えられた。BIK1 や OsRLCK185 とのアミノ酸配列を比較した結果、PBL27 の Ser-244、Thr-245、Thr-250 が CERK1 によってリン酸化されると予想された(図 2 B)。そこで、これらのアミノ酸残基を Ala に置換した変異体(PBL27^{K112E, 3xA})を作出し、*in vitro* におけるリン酸化実験を行った。その結果、PBL27^{K112E, 3xA} では CERK1 によるリン酸化が顕著に低下した(図 2-2 C)。これらのことから、PBL27 は CERK1 によって直接リン酸化されることで活性化すると考えられる。

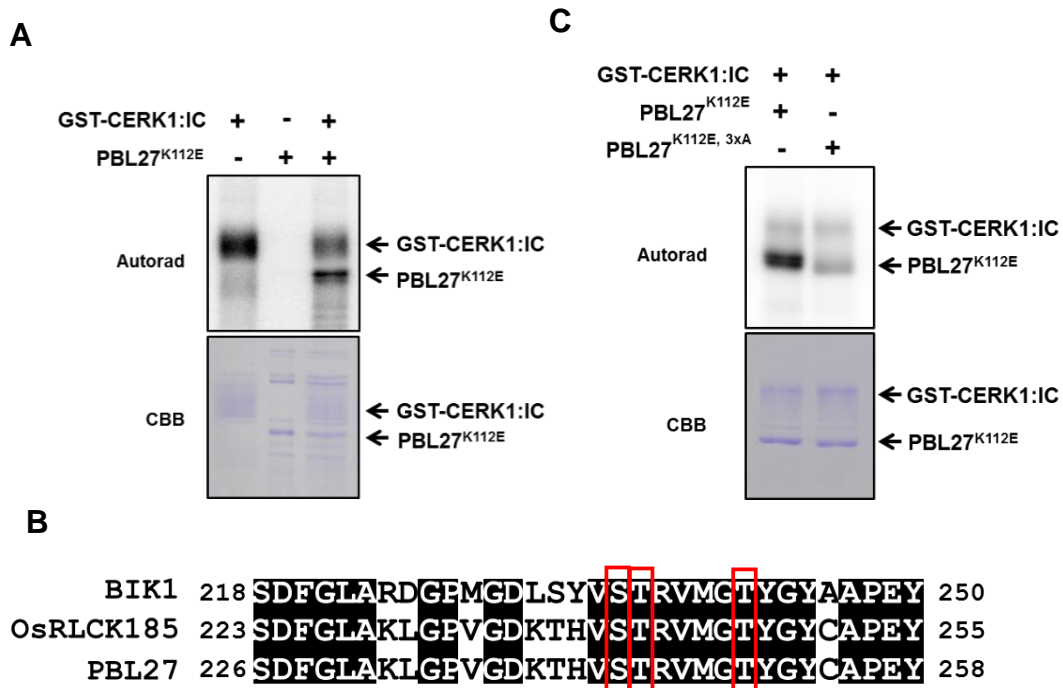


図 2-2. CERK1 による PBL27 リン酸化解析

GST タグを融合した CERK1 と PBL27 を、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP を含む Buffer 中で反応させ、オートラジオグラフィーにより解析した。

- A) *in vitro* において、CERK1 は PBL27 を直接リン酸化する。
- B) RLCK の活性化ループのアミノ酸配列の比較。BIK1 および OsRLCK185 において受容体からリン酸化されるアミノ酸残基を赤枠で示した。これらのアミノ酸は PBL27 においても保存されている。
- C) PBL27 の活性化ループ内の Ser/Thr を Ala に置換すると、CERK1 によるリン酸化が低下する。IC : 細胞内ドメイン、CBB: Coomassie brilliant blue.

3-2. PBL27 と相互作用する MAPKKK の探索

pbl27 機能欠損変異体では、キチンに応答した MAPK の活性化が低下することから、PBL27 が MAPK カスケードの最上流に位置する MAPKKK へ直接シグナルを伝達していることが示唆された (Shinya et al., 2014)。そこで、酵母 Two-hybrid 法を用いて、PBL27 と相互作用する MAPKKK の同定を試みた。香川大学の市村和也准教授から分譲して頂いたベクターを用いて、MEKK ファミリーに属する 21 個の MAPKKK と PBL27 との相互作用解析を行った。また、解析に用いた MAPKKK は、全長 (FL) および、N 末端ドメイン、キナーゼドメイン (KD)、C 末端ドメインに分けられていた。MAPKKK が導入された

pVP16 (prey)、PBL27が導入されたpBTM116 (bait)の各ベクターを酵母に形質転換し、ヒスチジン合成阻害剤である5 mM 3-ATを加えた-UWLH培地上で培養した。その結果、MAPKKK3 (At1g53570)のKDおよびMAPKKK5 (At5g66850)のC末端ドメインとPBL27を形質転換した酵母において、培地上での生育が認められた (図2-3)。これは、MAPKKK3およびMAPKKK5がPBL27と相互作用することを示している。

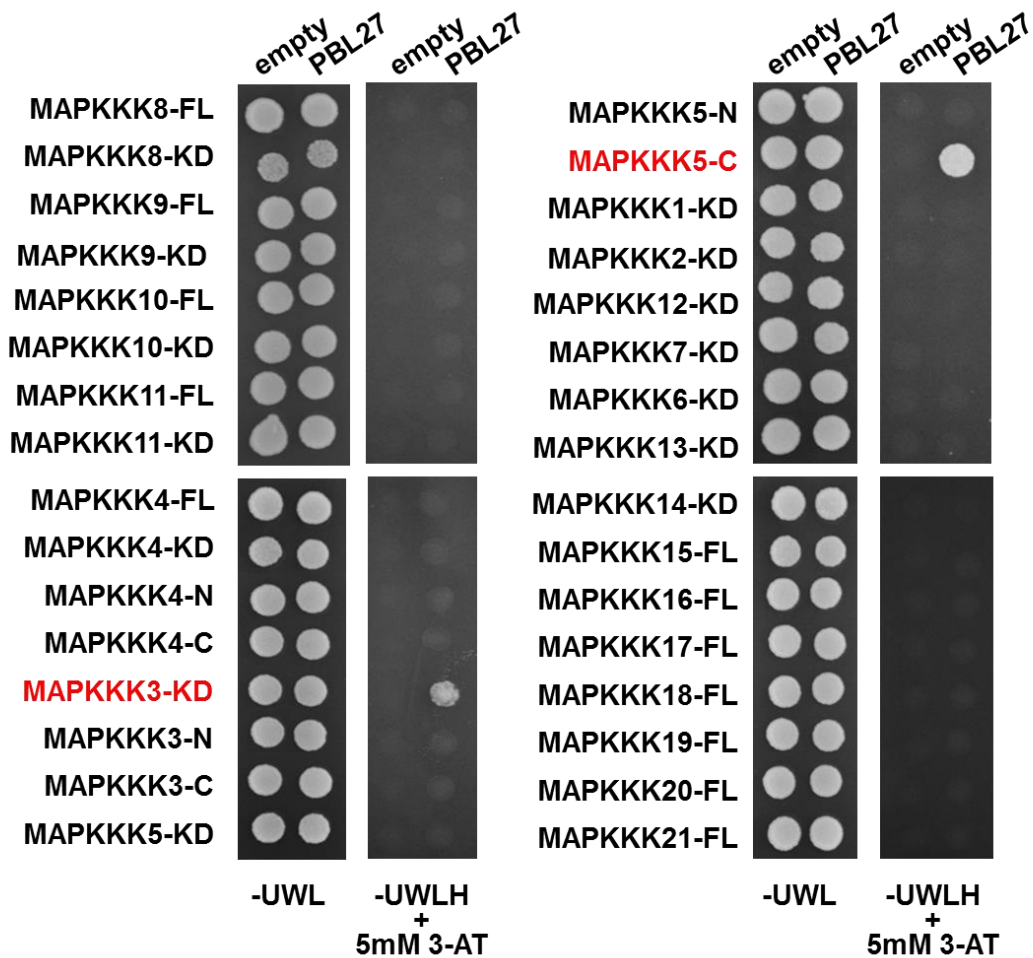
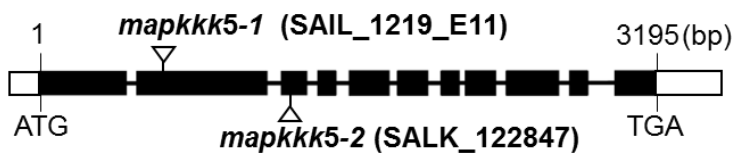


図 2-3. 酵母 Two-hybrid 法による PBL27 と MAPKKK との相互作用解析

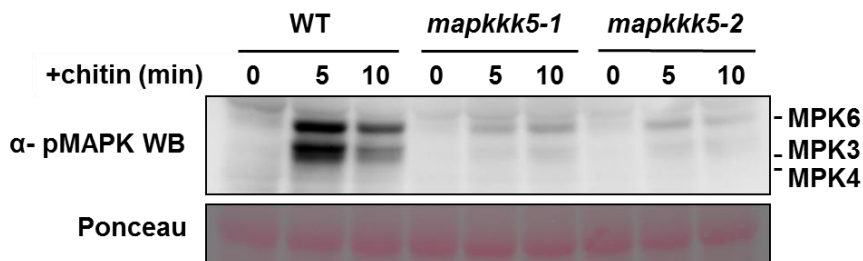
MAPKKK を pVP16 (prey)、PBL27 を pBTM116 (bait)にそれぞれ導入し、酵母に形質転換した。形質転換した酵母を、5 mM 3-AT(ヒスチジン合成阻害剤)を加えた-UWLH (U:ウラシル、W:トリプトファン、L:ロイシン、H:ヒスチジンを含まない培地)上で生育させた。FL:全長 N:N 末端ドメイン KD:キナーゼドメイン C:C 末端ドメイン

次に、MAPKKK5がキチン応答に関与しているかどうかを調べるために、T-DNAが挿入された *mapkkk5* 機能欠損変異体を2系統作出した (*mapkkk5-1* (SAIL_1219_E11), *mapkkk5-2* (SALK_122847))。 *mapkkk5-1* は2番目のエクソンに、 *mapkkk5-2* は三番目のエクソンにT-DNAが挿入されていた(図2-4 A)。これらの変異体にキチンを処理し、処理後0分、5分、10分におけるMAPKの活性化を、MAPKのリン酸化抗体を用いたウエスタンブロッティングにより解析した。野生型(WT)では、キチン処理後にMAPKのリン酸化レベルの上昇が見られた(図2-4 B)。これに対して、 *mapkkk5* 機能欠損変異体では、2つの系統の両方でMPK3/4/6のリン酸化が顕著に低下していた (図2-4 B)。一方、 *mapkkk3* 機能欠損変異体ではMAPKの活性化レベルに有意な差は見られなかった (図2-4 C)。以上の結果から、MAPKKK5はキチンシグナル伝達に重要な役割を果たしており、PBL27がCERK1からのシグナルをMAPKKK5へ伝達していることが示唆された。

A



B



C

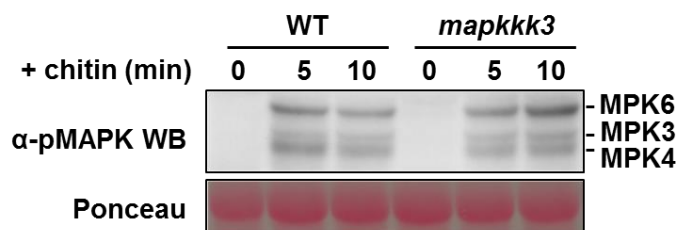


図 2-4. *mapkkk3* および *mapkkk5* 機能欠損変異体における MAPK 活性化解析

- A) MAPKKK5 の遺伝子構造モデル。T-DNA の挿入位置は矢印で示している。黒の Box はエキソンを示す。
- B) *mapkkk5* 機能欠損変異体におけるキチン応答時の MAPK 活性化解析。*mapkkk5-1* (SAIL_1219_E11), *mapkkk5-2* (SALK_122847) の 2 系統において、キチン処理後 0 分、5 分、10 分のサンプルを、MAPK リン酸化抗体を用いたウエスタンブロッティングにより解析した。
- C) *mapkkk3* 機能欠損変異体におけるキチン応答時の MAPK 活性化解析

3-3. 細胞内における PBL27 と MAPKKK5 との相互作用解析

MAPKKK5 の細胞内局在を解析するために、GFP を融合した MAPKKK5 に、カリフラワーモザイクウイルス 35S(CaMV35S)プロモーターを繋いだコンストラクトを作成した。アグロバクテリウムを用いて、*Nicotiana benthamiana* の葉で MAPKKK5-GFP を一過的に発現させ、感染 38 時間後の葉から膜画分と可溶性画分を回収し、ウエスタンブロッティングによるタンパク質の検出を行った。可溶性画分と膜画分を分離できているかを確認するために、細胞膜に局在するアクアポリンである PIP1 の抗体を用いたウエスタンブロッティングを行った。その結果、膜画分でのみ PIP1 が検出された(図 2-5 A)。また、アスコルビン酸ペルオキシダーゼである細胞質局在型 EAP1 は、可溶性画分でのみ検出されたことから、各画分を分離できていることが確認できた(図 2-5 A)。次に、抗 GFP 抗体を用いたウエスタンブロッティングを行った結果、MAPKKK5-GFP は可溶性画分と膜画分の両方で検出された(図 2-5 A)。また、MAPKKK5-GFP を発現させた葉を用いて、GFP の蛍光観察を行った結果、細胞質と細胞膜で蛍光が見られた(図 2-5 B)。さらに、1 M NaCl を処理し、原形質分離を引き起こした後に再度観察を行った結果、細胞壁から剥がれた細胞膜上で強い蛍光が見られた(図 2-5 B)。これらの結果から、MAPKKK5 は細胞質と細胞膜の両方に局在すると考えられる。

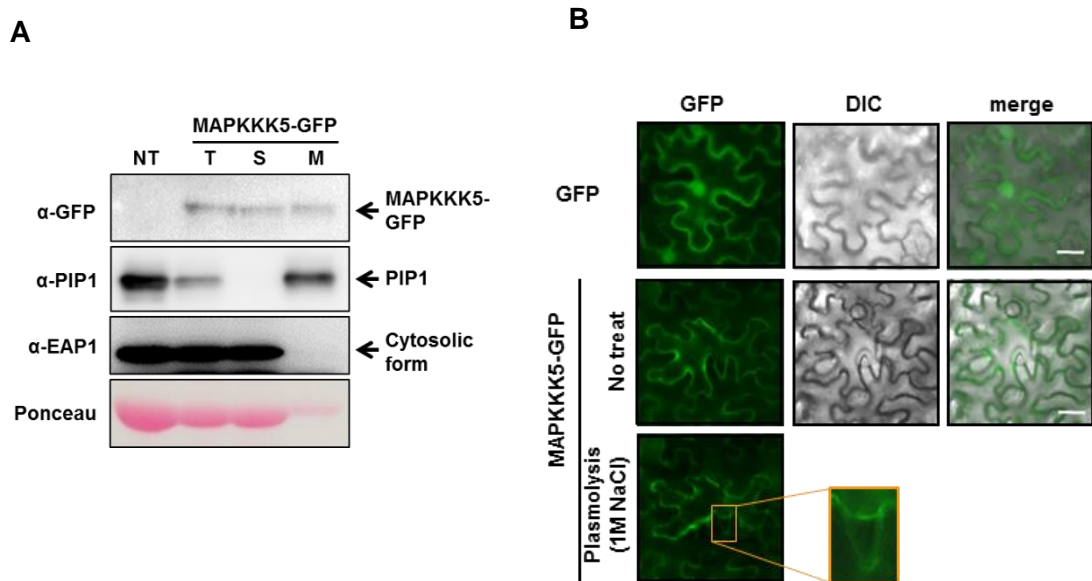


図 2-5. MAPKKK5 の細胞内局在解析

- A) ウェスタンブロッティングによる MAPKKK5-GFP の検出。*N.benthamiana* の葉にアグロバクテリウムを感染させ、感染後 38 時間の葉からタンパク質を抽出した。PIP1 は膜マーカー、EAP1 は細胞質マーカーとして使用した。
T:全画分 S:可溶性画分 M:膜画分
- B) MAPKKK5-GFP の蛍光観察。アグロバクテリウムの感染後 38 時間で観察した。原形質分離は 1 M NaCl の処理によって誘導した。Scale bar=50 μm

細胞内における相互作用解析を行うために、*N.benthamiana* の葉において HA タグを付加した PBL27 と MAPKKK5-GFP および GFP をそれぞれ共発現させ、ウェスタンブロッティングによりタンパク質の検出を行った。その結果、MAPKKK5-GFP と共発現することで PBL27-HA のタンパク質量が著しく減少することが分かった(図 2-6 A)。そこで、MAPKKK5 の ATP 結合部位として予想される Lys-375 を Met に置換した、不活性型 MAPKKK5 (MAPKKK5^{K375M}) を作出した。MAPKKK5^{K375M}-GFP との共発現では、PBL27-HA のタンパク質量の低下は見られなかった(図 2-6 A)。そこで、MAPKKK5^{K375M} を用いて、bimolecular fluorescence complementation (BiFC) 法による PBL27 との細胞内相互作用解析を行った。蛍光タンパク質である Venus の N 末端側を MAPKKK5^{K375M}、C 末端側を PBL27 に融合させたコンストラクト(MAPKKK5^{K375M}-Vn : PBL27-Vc) を作成した。アグロバクテリウムを用いて、これらのタンパク質をタバコの葉で一過的に発現させた後、蛍光観察を行った。その結果、PBL27-Vc と MAPKKK5^{K375M}-Vn を共発現さ

せた細胞において Venus の蛍光が見られた(図 6 B)。さらに、1 M NaCl を処理した後に再度観察を行った結果、原形質分離により剥がれた細胞膜上で強い蛍光が見られた(図 2-6 B)。一方、FLS2/BAK1 の下流で機能する BIK1 と MAPKKK5^{K375M} を共発現させた細胞では蛍光は見られなかった(図 2-6 B)。これらの結果から、MAPKKK5 と PBL27 は細胞膜上で特異的に相互作用することが明らかになった。

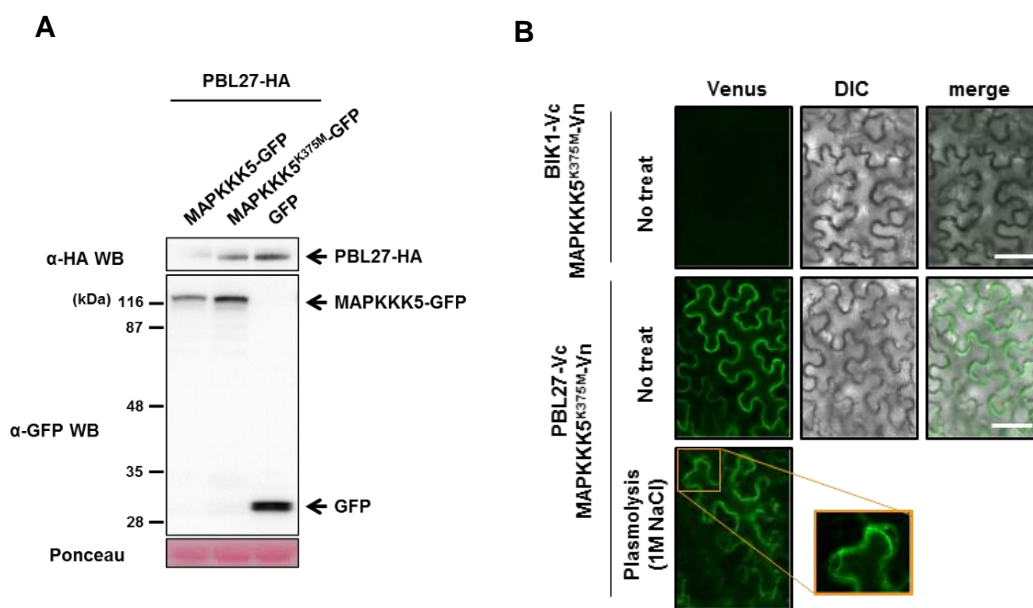


図 2-6. *in vivo* における PBL27 と MAPKKK5 相互作用解析

- A) MAPKKK5-GFP と共発現させた際の PBL27-HA タンパク質量。MAPKKK5-GFP を発現させると PBL27-HA のタンパク質量が減少する。
- B) BiFC 法による PBL27 と MAPKKK5 の相互作用解析。アグロバクテリウムを感染後 38 時間で観察を行った。Scale bar=50 μm

図 2-7. PBL27 による MAPKKK5 リン酸化解析

- A) MAPKKK5 のモデル図。N:N 末端ドメイン KD:キナーゼドメイン C:C 末端ドメイン
- B) 酵母 Two-hybrid 法による PBL27 と MAPKKK5 の相互作用解析。2 mM 3-AT を含む-UWLH 培地上で酵母を生育した。
- C) PBL27 による MAPKKK5 リン酸化解析。GST タグを融合した PBL27 および MAPKKK5 の各ドメインのタンパク質を、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ を含む Buffer 中で反応させ、オートラジオグラフィにより解析した。CBB: Coomassie brilliant blue

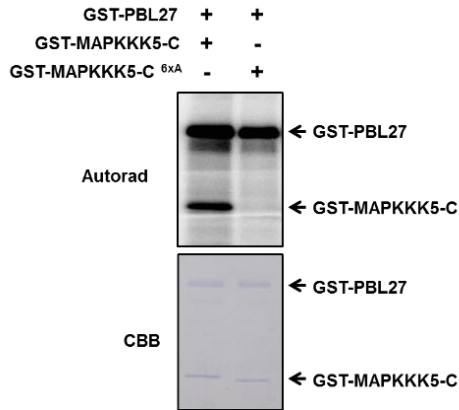
3-5. MAPKKK5 リン酸化部位の同定

PBL27 による MAPKKK5 の活性化機構を明らかにするために、MAPKKK5 のリン酸化部位の同定を試みた。MAPKKK5 の C 末端ドメインと PBL27 のリコンビナントタンパク質を *in vitro* において反応させ、質量分析計を用いて解析を行った結果、6 つのアミノ酸残基をリン酸化部位として同定した(図 2-8 A)。同定した 6 つのアミノ酸残基をすべて Ala に置換した変異体(MAPKKK5-C^{6xA})を作成し、*in vitro* におけるリン酸化実験を行った。その結果、変異を加えていない MAPKKK5-C と比較して、MAPKKK5-C^{6xA} では PBL27 によるリン酸化が著しく低下した(図 2-8 B)。PBL27 による MAPKKK5 のリン酸化が、キチンによって誘導される免疫応答に重要かどうかを明らかにするために、*mapkkk5* 機能欠損変異体に *MAPKKK5^{6xA}* 遺伝子を導入した植物体 (*MAPKKK5^{6xA}/mapkkk5*) を作成した。*MAPKKK5^{6xA}/mapkkk5* では、キチンによる MAPK の活性化が顕著に低下していた(図 2-8 C)。これらの結果から、PBL27 による MAPKKK5 のリン酸化が、キチン応答に重要な役割を果たしていることが明らかになった。また、同定した 6 つのアミノ酸残基を一つずつ Ala に置換した変異体を作成し、*in vitro* において PBL27 によるリン酸化を解析した結果、Ser-622 を Ala に置換した変異体において、リン酸化レベルの低下が見られた(図 2-8 D)。このことから、MAPKKK5 Ser-622 が PBL27 によるリン酸化に特に重要なアミノ酸残基であると考えられる。

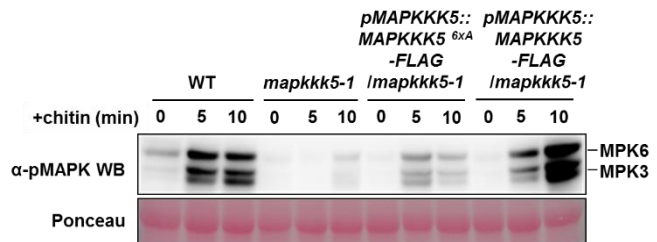
A

598 SMLLEHRFLK NSLQPTSPSN SDVSQLFNGM NITEPSSRRE KPNFKLDQVP
 648 RARNMTSSES ESGOQQQQQQ YRSPDLTGTV NRLSPRSTLE AIPSPCPSQR
 698 PKPSSSDRRR TGVTSDDL

B



C



D

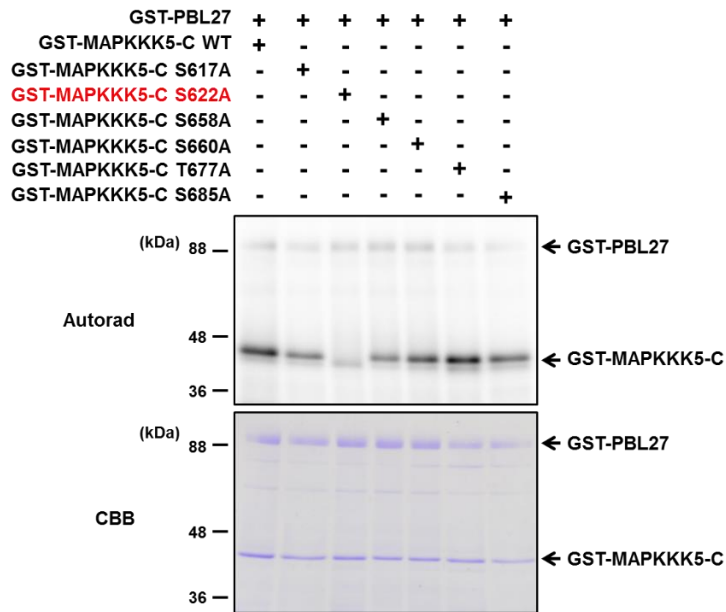


図 2-8. MAPKKK5 リン酸化部位の同定

- A) MAPKKK5-C 末端ドメインのアミノ酸配列。赤文字で示したアミノ酸残基が今回同定されたリン酸化部位を示している。
- B) PBL27 による MAPKKK5-C^{6xA} リン酸化解析。リン酸化部位をすべて Ala に置換することで、PBL27 によるリン酸化が著しく低下する。

- C) MAPKKK5^{6xA}を導入した *mapkkk5* 機能欠損変異体におけるキチン応答時の MAPK 活性化解析。キチン処理後 0 分、5 分、10 分における MAPK のリン酸化を、MAPK のリン酸化抗体を用いたウエスタンブロッティングにより解析した。
- D) 各リン酸化部位を Ala に置換した MAPKKK5 における *in vitro* リン酸化解析。S622A 変異体において PBL27 によるリン酸化が顕著に低下している。

3-6. CERK1-PBL27-MAPKKK5 リン酸化シグナル伝達機構の解析

酵母を用いた解析において、PBL27 と全長の MAPKKK5 との相互作用は見られなかった(図 2-9 A)。また、MAPKKK5 の N 末端ドメインのみを欠損させたコンストラクトである、MAPKKK5-KD:C と相互作用しないことが明らかになった(図 2-9 A)。次に、GST を融合した MAPKKK5-KD:C タンパク質を大腸菌内で発現させ、プロテアーゼ処理によって GST タグを切断した MAPKKK5-KD:C を作成した。作成したタンパク質を用いて、*in vitro*におけるリン酸化実験を行った結果、PBL27 は MAPKKK5 の C 末端ドメインをリン酸化するのに対し、MAPKKK5-KD:C へのリン酸化は見られなかった(図 2-9 B)。これらの結果から、MAPKKK5 の KD が PBL27 と MAPKKK5 の C 末端ドメインとの相互作用を阻害している可能性が示唆された。キチン応答時において、PBL27 は CERK1 によって直接リン酸化されることが明らかになっている(図 2-2 A,B) (Shinya et al., 2014)。このことから、CERK1 による PBL27 のリン酸化が、MAPKKK5 へのリン酸化に必要であることが考えられた。そこで、CERK1 の細胞内ドメインのタンパク質を用いて、*in vitro*におけるリン酸化解析を行った。その結果、CERK1 存在下においてのみ、PBL27 による MAPKKK5-KD:C のリン酸化が見られた(図 2-9 B)。また、MAPKKK5 のリン酸化部位をすべて Ala に置換した MAPKKK5-KD:C^{6xA} では PBL27 によるリン酸化は見られなかったことから、MAPKKK5 の C 末端ドメインに特異的なリン酸化であると考えられる(図 2-9 B)。図 2-2 に示したように、CERK1 は PBL27 の活性化ループをリン酸化する。このことから、PBL27 は CERK1 によってリン酸化されることで活性化し、PBL27 の活性化状態が MAPKKK5 の C 末端ドメインとの相互作用およびリン酸化に重要であると考えられる。

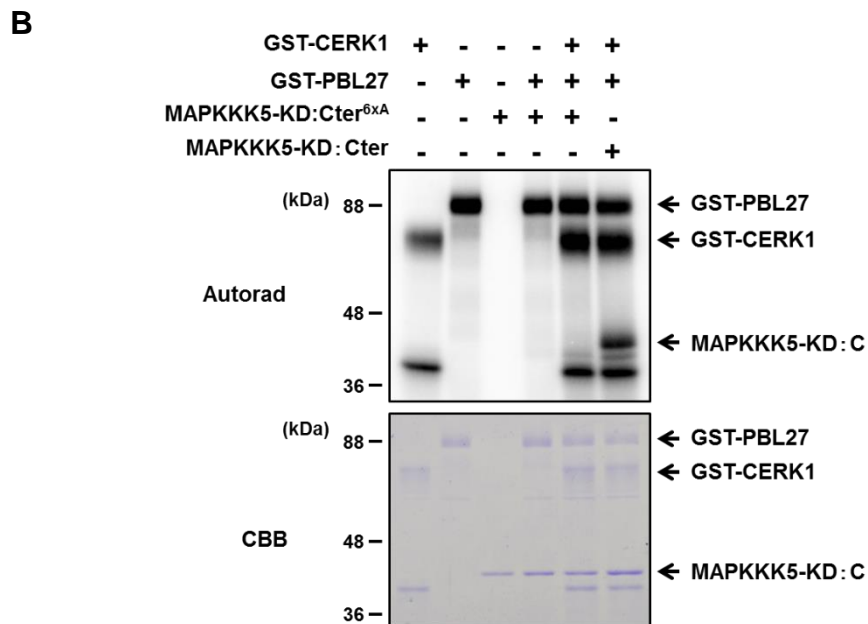
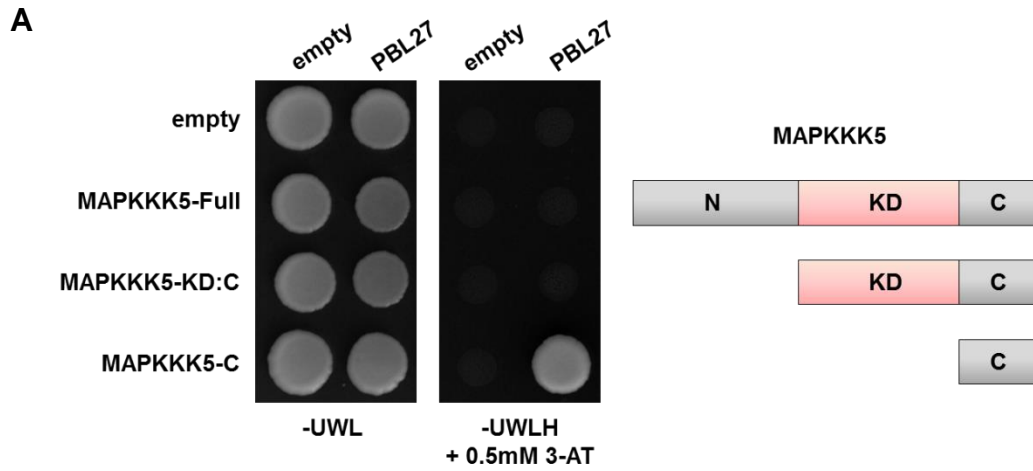


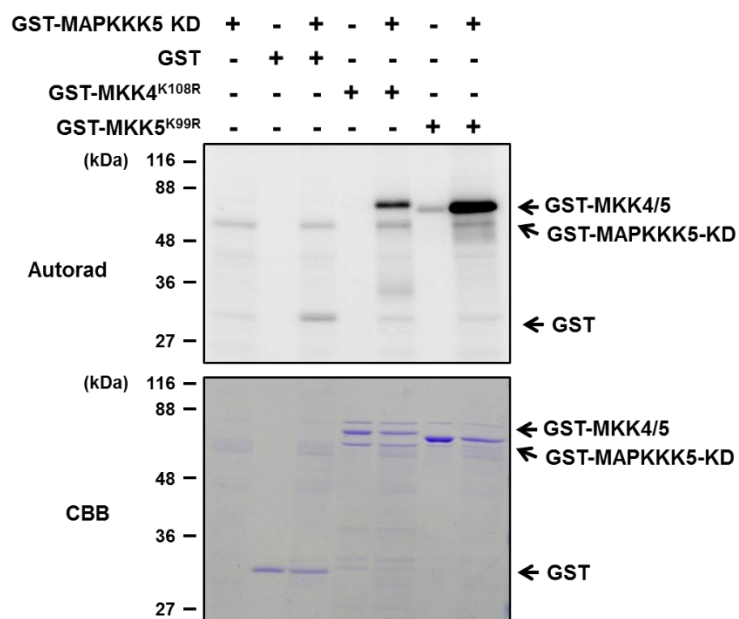
図 2-9. CERK1-PBL27-MAPKKK5 リン酸化シグナル伝達機構の解析

- A) (左) 酵母 Two-hybrid 法による PBL27 と MAPKKK5 の相互作用解析。0.5 mM 3AT を含む-UWLH 培地上で酵母を生育した。(右)解析に用いた MAPKKK5 のモデル図。
- B) *in vitro* における PBL27 による MAPKKK5-KD:C リン酸化解析。CERK1 と PBL27 がともに存在する場合のみ MAPKKK5-KD:C がリン酸化される。

3-7. MAPKKK5 による MKK4/5 のリン酸化解析

MKK4/5 は、MPK3/6 の上流で機能する MAPKK であることが知られている。(Rasmussen et al., 2012)。mapkkk5 機能欠損変異体において、キチン応答時の MPK3/6 の活性化が低下していたことから、MKK4/5 が MAPKKK5 の下流で機能することが考えられた。そこで、MAPKKK5 が MKK4/5 をリン酸化するかどうかを調べるために、*in vitro* リン酸化解析を行った。MAPKKK5 の全長タンパク質を作成することができなかったため、GST タグを融合した MAPKKK5-KD を使用した。また、MKK4/5 のリン酸化活性を失くした不活性化型 MKK4/5 (MKK4^{K108R}/MKK5^{K99R}) に GST を融合したタンパク質を作成し、解析に用いた。解析の結果、MAPKKK5-KD 存在下において、MKK4/5 がともにリン酸化されることが明らかになった(図 2-10 A)。MAPKK には S/TxxxxxS/T モチーフが高く保存されており、モチーフ内の 2 つの Ser および Thr 残基がリン酸化されることによって活性化することが報告されている(Ichimura et al., 2002)。MKK4/5 においてもこの活性化モチーフが高く保存されている。そこで、活性化モチーフ内の Ser/Thr 残基を Ala に置換した変異体を作成し、*in vitro* におけるリン酸化解析を行った。その結果、Ala 置換した MKK4/5 では共に、MAPKKK5 によるリン酸化が顕著に低下していた(図 2-10 B)。これらの結果から、MAPKKK5 は、MKK4/5 の活性化モチーフに保存された Ser/Thr 残基を特異的にリン酸化していると考えられる。

A



B

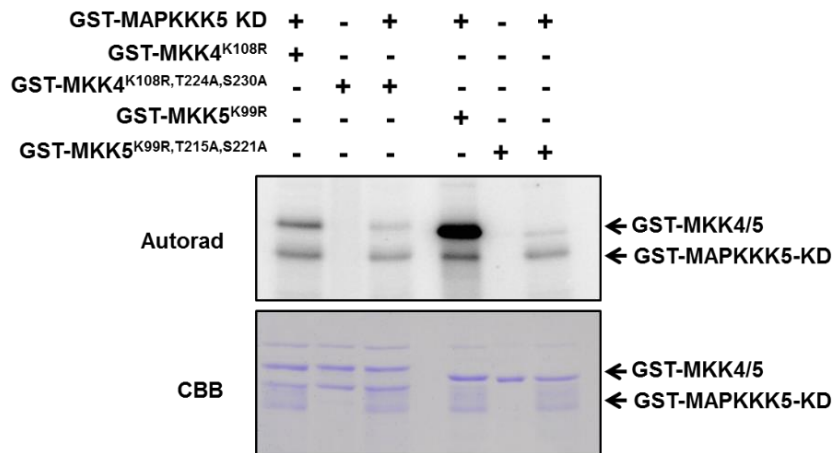


図 2-10. MAPKKK5 による MKK4/5 リン酸化解析

- A) MAPKKK5-KD による MKK4/5 リン酸化解析。MKK4/5 は自己リン酸化活性も持つため、活性を失くした変異体(MKK4^{K108R}, MKK5^{K99R})を解析に用いた。
- B) 活性化モチーフ内の Ser/Thr 残基を Ala に置換した変異体では、MAPKKK5-KD によるリン酸化が著しく低下する。

4. 考察

MAPK カスケードは、植物の免疫応答において重要なシグナル伝達系であることが知られている。これまでに、flg22 やキチンなどの様々な PAMPs に応答して、MAPK の活性化が誘導されることが報告されているが、PRR から MAPK カスケードへどのようにシグナルが伝達されているかは明らかにされていなかった。シロイヌナズナでは、キチンの認識受容体として CERK1/LYK5 複合体が機能していることが知られている (Liu et al., 2012; Cao et al., 2014)。我々はこれまでに、RLCK ファミリーに属する PBL27 が CERK1 と相互作用し、キチンに応答した MAPK の活性化に重要な役割を果たしていることを明らかにしている (Shinya et al., 2014)。本研究において、PBL27 と相互作用する MAPKKK として MAPKKK5 を同定した(図 2-3)。mapkkk5 機能欠損変異体では、pbl27 機能欠損変異体と同様に、キチンによって誘導される MAPK の活性化が顕著に低下していた(図 2-4)。この結果から、MAPKKK5 はキチンシグナル伝達経路で機能する主要な MAPKKK であると考えられる。また、PBL27 は MAPKKK5 の C 末端ドメインを特異的にリン酸化することが明らかになった(図 2-7 C)。質量分析による解析の結果、PBL27 によるリン酸化部位として、MAPKKK5-C 末端ドメインの 6 つのアミノ酸を同定した(図 2-8 A)。これらのアミノ酸残基をすべて Ala に置換した MAPKKK5 遺伝子を導入した植物体では、キチンに応答した MAPK の活性化が低下した(図 2-8 C)。このことは、PBL27 が MAPKKK5 をリン酸化することによって MAPK カスケードへシグナルを伝達していることを示している。RLCK である BIK1/PBL1 は、Pep 受容体である PEPR1/2 によってリン酸化されることで防御応答を誘導することが報告されている (Liu et al., 2013)。また、bik1/pbl1 機能欠損変異体では、Pep によって誘導される MAPK の活性化が低下することが明らかになった(Yamada et al., 2016a)。これらのことから、受容体と MAPK カスケードを繋ぐ因子として、RLCK が機能していると考えられる。一方、BIK1/PBL1 は、FLS2 や BAK1 の下流でも機能していることが知られている(Lu et al., 2010; Zhang et al., 2010)。しかし、これらの変異体では、flg22 および elf18 による MAPK の活性化に影響が見られない。このことから、FLS2 や EFR の下流における MAPK カスケードへのシグナル伝達には、未同定の RLCK が機能している可能性が考えられる。

酵母を用いた相互作用解析において、PBL27 は全長の MAPKKK5 および MAPKKK5-KD:C と相互作用を示さなかった(図 2-9 A)。また、*in vitro*において、PBL27 は MAPKKK5-KD:C をリン酸化しなかったが、CERK1 存在下においてのみ、MAPKKK5-KD:C のリン酸化が見られた(図 2-9 B)。このことは、MAPKKK5 のリン酸化には、CERK1 による

PBL27 の活性化が必要であることを示している。実際、PBL27 の活性化ループ内に保存された 3 つの Ser/Thr 残基を Ala に置換した変異体では、CERK1 によるリン酸化が低下していたことから、PBL27 は CERK1 によってリン酸化されることで活性化すると考えられる。また、キナーゼの持つ活性化ループは、リン酸化されることによって構造変化が起こり、基質との親和性が上昇することが知られている(Huse & Kuriyan, 2002)。このことから PBL27 が CERK1 によってリン酸化されることで、MAPKKK5 の C 末端ドメインとの親和性が上昇しているのではないかと考えられる。

in vitro における解析の結果、MAPKKK5-KD が MKK4/5 をリン酸化することが明らかになった (図 2-10 A)。このことは、MAPKKK5 が MKK4/5 に直接シグナルを伝達していることを示している。また、MAPKK は、活性化ループに保存された S/TxxxxS/T モチーフ内の Ser/Thr がリン酸化されることで活性化することが知られている(Ichimura et al., 2002)。実際に、MKK4/5 の S/TxxxxS/T モチーフに保存された Ser/Thr を Asp に置換した疑似リン酸化変異体(MKK4^{DD}/MKK5^{DD})が、MAPK のリン酸化活性を上昇させることが報告されている (Ren et al., 2002)。MKK4/5 のモチーフ内に保存された Ser/Thr を Ala に置換した変異体では、MAPKKK5 によるリン酸化が顕著に低下した(図 2-10 B)。これらのことから、キチンシグナル伝達経路における MKK4/5 の活性化は、MAPKKK5 からのリン酸化によって引き起こされていると考えられる。

N.benthamiana を用いた BiFC 法による相互作用解析の結果、PBL27 と MAPKKK5 が細胞膜上で相互作用していることが明らかになった(図 2-6 B)。また、シロイヌナズナのプロトプラストを用いた BiFC 解析においても、PBL27 と MAPKKK5 が細胞膜上で相互作用することが明らかになっている(Yamada et al., 2016b)。PBL27 は、CERK1 と細胞膜上で相互作用することが明らかとなっている(Shinya et al., 2014)。このことから、CERK1/LYK5-PBL27-MAPKKK5 のシグナル伝達は細胞膜上で行われていると考えられる。一方で、シロイヌナズナのプロトプラストを用いた、共免疫沈降法(Co-IP)による相互作用解析の結果、キチンを処理すると、PBL27 と MAPKKK5 の相互作用が見られなくなることが分かった(Yamada et al., 2016b)。さらに、プロトプラストを用いた BiFC 解析の結果、MAPKKK5 と MKK4/5 が細胞質で相互作用することも明らかになっている(Yamada et al., 2016b)。これらの結果から、PBL27 によってリン酸化された MAPKKK5 は、PBL27 から離れて細胞質へと移行し、MKK4/5 へシグナルを伝達しているのではないかと予想される。しかし、MAPKKK5 の局在がキチン応答によって変化するかどうかは明らかになっていない。

mapkkk5 機能欠損変異体では、MPK3/6 に加えて MPK4 の活性化の低下が見られた

(図 2-4 B)。このことから、MAPKKK5 が MPK4 の上流でも機能していることが示唆された。MPK4 の上流では、MAPKK である MKK1/2 が機能していることが報告されている(Asai et al., 2002)。プロトプラストにおける BiFC 解析の結果、MAPKKK5 と MKK1 との相互作用は認められなかったのに対し、MKK2 と細胞質で相互作用することが明らかになった(Yamada et al., 2016b)。また、*in vitro* におけるリン酸化解析の結果、MAPKKK5 による MKK2 の弱いリン酸化が見られた。しかし、MKK2 の活性化モチーフ内の Ser/Thr 残基を Ala に置換することによる、MAPKKK5 からのリン酸化の影響は見られなかった(Yamada et al., 2016b)。このため、MAPKKK5 が MKK1/2 を直接活性化しているかについては明らかにすることができなかった。これらの結果から、キチンシグナル伝達経路では、MAPKKK5 が MKK1/2 以外の MAPKK を介して、MPK4 の活性を制御している可能性が考えられる。

pbl27 機能欠損変異体では、キチンに応答した MAPK の活性化が低下する一方で、*flg22* による MAPK の活性化が、野生型と比較して僅かに上昇する(Shinya et al., 2014)。また、*mapkkk5* 機能欠損変異体でも、*flg22* による MAPK の活性化の上昇が見られた(Yamada et al., 2016b)。このことから、MAPKKK5 が *flg22* シグナル経路における MAPK カスケードに対して抑制的に機能していることが示唆された。シロイヌナズナでは、MAPKKK である MKKK7 が FLS2/BAK1 複合体と相互作用し、*flg22* 応答に対するネガティブレギュレーターとして機能していることが報告されている (Mithoe et al., 2016)。このことから、MAPKKK5 も MKKK7 と同様に、FLS2/BAK1 の下流では MAPK に対するネガティブレギュレーターとして機能している可能性が考えられる。

今回の結果から、シロイヌナズナのキチン応答において、CERK1/LYK5-PBL27-MAPKKK5-MKK4/5-MPK3/6 から構成される、リン酸化を介したシグナル伝達系が機能していることが明らかになった。また、PBL27 を含む RLCK が受容体から MAPK カスケードへのシグナル伝達に重要な役割を果たしていることが示唆された。MAPK カスケードは、植物の防御応答だけでなく形態形成やホルモン応答においても重要な役割を果たしている。MAPKKK である YODA は、胚発生や気孔の形成において重要な因子であることが知られている(Bergmann et al., 2004; Musielak et al., 2014)。気孔の形成は、RLK である ERECTA ファミリー受容体が、ペプチドホルモンである EPFs を認識することで制御される (Lee et al., 2012)。これまでに、ERECTA の下流では、YODA-MKK4/5-MPK3/6 から構成される MAPK カスケードが機能していることが報告されている(Wang et al., 2007)。また、胚発生におけるシグナル伝達経路において、YODA の上流では RLCK である SSP が機能しており、YODA の活性化に関与していると考えられて

いる(Musielak et al., 2014)。これらのことから、植物の生育に関わる幅広い応答において、受容体と MAPK カスケードを繋ぐ因子として RLCK が機能している可能性が考えられる。

第3章 イネのキチン応答における MAPK カスケード活性化機構の解明

1. 緒言

イネにおけるキチン認識において、OsCERK1/CEBiP 複合体が受容体として機能している(Kaku et al., 2006; Shimizu et al., 2010)。また、OsCERK1/CEBiP の下流では、OsMKK4-OsMPK3/6 で構成される MAPK カスケードが機能していることが報告されている(Kishi-Kaboshi et al., 2010)。Osmpk6 機能欠損変異体や、恒常的活性型の OsMKK4 (OsMKK4^{DD})を一過的に発現させたイネの細胞では、モミラクトンを含むジテルペン型のファイトアレキシン合成に関わる遺伝子群の発現が大きく変動することが報告されている(Kishi-Kaboshi et al., 2010)。このことから、OsMKK4-OsMPK3/6 を介したシグナル伝達経路が、キチンに誘導される防御応答に重要であると考えられる。しかし、OsMKK4 の上流で機能する MAPKKK は同定されていない。

我々はこれまでに、OsCERK1/CEBiPの下流で機能する細胞内因子として、PBL27のイネのオルソログであるOsRLCK185を同定している。OsRLCK185はOsCERK1の細胞内ドメインと相互作用し、キチンに応答してリン酸化される (Yamaguchi et al., 2013)。また、OsRLCK185がキチンに応答したMAPKの活性化を制御していることも明らかとなっている (Yamaguchi et al., 2013)。一方で、イネ白葉枯病菌 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo))の持つエフェクターであるXopY (Xoo1488)は、OsRLCK185を標的としてイネの防御応答を抑制する (Yamaguchi et al., 2013)。XopYは、OsCERK1によるOsRLCK185へのリン酸化を阻害し、下流のMAPKの活性化を抑制している(Yamaguchi et al., 2013)。このことから、イネのキチンシグナル伝達経路において、OsRLCK185が非常に重要な役割を果たしていると考えられる。また、BIK1のイネのオルソログであるOsRLCK176が、CERK1/CEBiPの下流でキチンに応答したOsMPK3/6の活性化を制御していることが報告されている(Ao et al., 2014)。これらの結果から、OsRLCK185/OsRLCK176がCERK1/CEBiPからのキチンシグナルを、OsMKK4-OsMPK3/6から構成されるMAPKカスケードへ伝達していると考えられた。また、イネのOsRLCK185、OsMKK4およびOsMPK3/6がそれぞれ、シロイヌナズナのPBL27、MKK4およびMPK3/6とオルソログの関係にあることから、イネとシロイヌナズナでは同様のキチンシグナル伝達経路が保存されていると考えられた。そこで本章では、イネのキチンシグナル伝達経路で機能するMAPKKKを同定し、OsRLCK185によるMAPKカスケードの活性化メカニズムを明らかにすることを目的とした。

2. 実験方法

2-1. ベクターの作成

それぞれの DNA 断片を、表 3-1 に示したプライマーを用いた PCR によって増幅した。増幅した DNA 断片を、pENTR/D-TOPO (Invitrogen)に導入した。OsMAPKKK11 のアミノ酸置換変異体は、表 3-1 に示したプライマーを用いた PCR による site-directed mutagenesis 法により作成した。タンパク質発現用ベクターとして、pENTR/D-TOPO に導入した DNA 断片を制限酵素処理によって切り出し、pCold ベクター(Takara)に導入した。*N.benthamiana* を用いた一過的発現系に用いるベクターとして、pENTR/D-TOPO に導入した *OsMAPKKK18* を LR 反応により pGWB5 へ導入した(Nakagawa et al., 2007)。また、BiFC 解析用のベクターとして、*OsMAPKKK18* を pDEST-GWVYNE へ、*OsRLCK176* および *OsRLCK185* を pDEST-GWVYCE へそれぞれ LR 反応により導入した(Gehl et al., 2009)。酵母 Two-hybrid 法に用いるベクターとして、*OsRLCK185/176* を pBTM116 (bait)、*OsMKK4/5* を pVP16 (prey)、*OsMAPKKK11/18* を pVP16 と pBTM116 へそれぞれ LR 反応により導入した。RNAi による発現抑制変異体を作成するために、*OsMAPKKK11* と *OsMAPKKK18* それぞれの DNA 断片を PCR により増幅した。増幅した DNA 断片を PCR により結合し、pENTR/D-TOPO に導入した後、LR 反応により pANDA へ導入した(Miki and Shimamoto, 2004)。

表 3-1 ベクター作成に用いたプライマー

ベクター構築

プライマー名	配列(5'-3')
OsRLCK185-F	CACCATGGGCTGCTTTCCGTGCTTC
OsRLCK185-R	TTACTCATTGTACTATCAAAGCTGCC
OsRLCK185 Δ stop-R	CTCATTGTACTATCAAAGCTGCC
OsRLCK176-F	CACCATGGGGAATTGCTGGGGCGCCAAGAT
OsRLCK176-R	TTAAACCAGCCTCGCATTGCGGGCTTC
OsRLCK176 Δ stop-R	AACCAGCCTCGCATTGCGGGCTTC
OsMAPKKK11 full-F	CACCATGCCATTAACCCTACGC
OsMAPKKK11 full-R	TTAGAACAGAGCCTCCTTTTC
OsMAPKKK18 full-F	CACCATGCGGTGGTGGGAAGCGCTC
OsMAPKKK18 full-R	TTAGGTAGGCAGCTCGTCATGCTTC
OsMAPKKK18 full Δ stop-R	GGTAGGCAGCTCGTCATGCTTC

酵母 Two-hybrid 法

プライマー名	配列(5'-3')
OsMAPKKK11 Nter-R	TTACTGACCAGCCACTGAGG
OsMAPKKK11 KD-F	CACCCCAAATTATTCCCAG
OsMAPKKK11 KD-R	TTACGCAAATGAATGTATGGAACC
OsMAPKKK11 Cter-F	CACCGCAAGTGAGCTGTTGGAGCATC
OsMAPKKK18 Nter-R	TTACTGACCAGCCATTGAGGGTGC
OsMAPKKK18 KD-F	CACCCCAAAGTTGTTCCCGGAG
OsMAPKKK18 KD-R	TTAAGTGGGAGAATGTAAAGCACTG
OsMAPKKK18 Cter-F	CACCGCAAGCAAGTTGCTGGAGC
OsMKK4-F	CACCATGCGACCGGGCGGGCCGC
OsMKK4-R	TCATGACGGAGGCGGTGCGA
OsMKK5-F	CACCATGCGTGCGGGCGACATGCCGGGGCG
OsMKK5-R	TCACGACGATGGCGGGCGGGCGGCGA

タンパク質発現

プライマー名	配列(5'-3')
NdeI-OsMAPKKK11 full-F	CACCCATATGCCATTAACCTACGCGCACG
HindIII-OsMAPKKK11 full-R	CGAAGCTTTTAGAACAGAGCCTCCTTTTC
HindIII-OsMAPKKK11-Nter-R	AAGCTTTTACTGACCAGCCACTGAGG
NdeI-OsMAPKKK11-KD-F	CACCCATATGCCAAAATTATTCCCAG
HindIII-OsMAPKKK11-KD-R	AAGCTTTTACGCAAATGAATGTATGGAACC
NdeI-OsMAPKKK11-Cter-F	CACCCATATGGCAAGTGAGCTGTTGGAGCATC
NdeI-OsMAPKKK18 full F	CACCCATATGCGGTGGTGAAGCGCTC
HindIII-OsMAPKKK18 full-R	AAGCTTTTAGGTAGGCAGCTCGTCATGC
HindIII-OsMAPKKK18-Nter-R	AAGCTTTTACTGACCAGCCATTGAGGGTGC
NdeI-OsMAPKKK18-KD-F	CACCCATATGCCAAAGTTGTTCCCGGAG
HindIII-OsMAPKKK18-KD-R	AAGCTTTTAAGTGGGAGAATGTAAAGCACTG
NdeI-OsMAPKKK18-C-F	CACCCATATGGCAAGCAAGTTGCTGGAGC

Site-directed mutagenesis

プライマー名	配列(5'-3')
OsMAPKKK18 ^{K416R} -F	CTCTGTGTGCCATGCGCGAGGTCAACATAATTC
OsMAPKKK18 ^{K416R} -R	CTATGTTGACCTCGCGCATGGCACACAGAGC

RNAi

プライマー名	配列(5'-3')
RNAi. OsMAPKKK11-F	CACCTTGCAAACCTCTCAGCGTAGTC
RNAi. OsMAPKKK11-R	TTTGGCCTTGGCATGATTGTTAGTGCA
RNAi. OsMAPKKK18-F	GCACTAACAATCATGCCAAGGCCAAATG
RNAi. OsMAPKKK18-R	CTAACCCCTAAATAATATCTTACAAAGG

2-2. 酵母 Two-hybrid 法

それぞれの遺伝子を導入した pVP16 および pBTM116 を酵母 (L40) に形質転換した。形質転換した酵母を選抜するために、生育に必要なウラシル、トリプトファン、ロイシンを含まない培地 (-UWL) 上で、30°C、3 日間生育した。生育が見られたコロニーを、-UWL 液体培地で培養し、菌液をヒスチジン合成阻害剤である 3-AT (3-amino-1,2,4-triazol) を加えた -UWLH 培地 (ヒスチジンを含まない) にスポットした後、30°C、3 日間生育させた。

2-3. 形質転換イネの作成

pANDA ベクターを *Agrobacterium tumefaciens* (EHA101) へ形質転換した。日本晴の種子からカルスを作成し、pANDA を形質転換した *Agrobacterium* の菌液にカルスを浸して感染させた。感染後のカルスを、ハイグロマイシンを含む培地上で培養し、選抜した。選抜したカルスを植物体に再生し、種子を得た。得られた種子から再びカルスを作成し、培養細胞として液体培養した。

2-4. MAPK 活性化解析

イネの培養細胞を R2S 液体培地で 25°C、3 日間前培養した。培養細胞に 2 µg/ml のキチン処理し、処理後の細胞を液体窒素で凍らせた。回収した培養細胞を、抽出 Buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 10% glycerol, 5 mM DTT, 2.5 mM NaF, 1.5 mM Na₃VO₄, 1x complete EDTA-free protease inhibitor cocktail (Roche), 1% SDS) に懸濁し、タンパク質を抽出した。MAPK の活性化は、抗 p44/42 MAPK 抗体を用いたウエスタンブロッティングにより解析した。

2-5. 遺伝子発現解析

イネの培養細胞に 2 µg/ml のキチンを処理した後、6 時間後に回収し、液体窒素で凍らせた。回収した細胞をステンレスビーズで破碎し、TRIzol (Invitrogen)を用いて RNA を抽出した。抽出した RNA を DNase1 (Roche)で処理し、1 µg の RNA から PCR により cDNA を合成した。合成した cDNA をテンプレートとし、表 3-2 に示したプライマーを用いた Real-time PCR により遺伝子発現を解析した。また、OsMAPKKK11 の発現量を Semi-RT-PCR により解析した。

表 3-2 遺伝子の発現解析に用いたプライマー

Semi-RT-PCR

プライマー名	配列(5'-3')
Ubiquitin-F	CACAAGAAGGTGAAGCTCGC
Ubiquitin-R	GCCTTCTGGTTGTAGACGTAGTAGG
OsMAPKKK11-F	ATGCCATTAACCCTACGCGCACG
OsMAPKKK11-R	TCAGGTGAAATCCGCGGAGATGAAG

Quantitative-RT-PCR

プライマー名	配列(5'-3')
OsMAPKKK11-F	CTCCTCGGTAGCGGCACAT
OsMAPKKK11-R	GCACAAAGAGCTCCAGTTTGC
OsMAPKKK18-F	GCCCAAAGCAGACGAATTTTAG
OsMAPKKK18-R	GCCATTGAGGGTGCATCAAC
PBZ1-F	GGTGTGGGAAGCACATACAA
PBZ1-R	GTCTCCGTCGAGTGTGACTTG
OsPR10-F	CCTCAGCCATGCCATTGAG
OsPR10-R	CTTGTCCACGTCCAGGAACTC
Ubiquitin-F	AACCAGCTGAGGCCCAAGA
Ubiquitin-R	ACGATTGATTTAACCAGTCCATGA

2-6. ROS 解析

イネの培養細胞をプレートに移し、R2S 培地を加え、25°Cで一晩静置した。培地を除き、0.5 mM L-012 (Wako Chem)、10 µg/ml HRP を含む R2S 培地を新たに加えた。2

μg/ml のキチンを処理し、Mithras LB940 Multimode Microplate Reader (Berthold Technologies)を用いて ROS の生産量を検出した。

2-7. *N. benthamiana* の葉における一過的発現

OsRLCK185、*OsRLCK176*、*OsMAPKKK18* を導入したベクターを *Agrobacterium tumefaciens* (C58)に形質転換した。形質転換した *Agrobacterium* を液体培養した後、遠心分離によって菌を回収した。回収した菌を懸濁 Buffer (10 mM MgCl₂, 10 mM MES-NaOH (pH5.6))に懸濁し、150 μM アセトシリンゴンを加え、暗所で 3 時間静置した。4 週齢の *N. benthamiana* を使用し、1 ml 針無しシリンジを用いて、菌液を葉の裏側から浸潤させた。

2-8. リコンビナントタンパク質の精製

OsRLCK185 および *OsMAPKKK18* を導入した pCold ベクターを大腸菌に形質転換し、低温誘導により発現させた。誘導後の大腸菌を回収し、抽出 Buffer (80 mM Tris-HCl (pH 7.5), 4 mM EDTA, 4 mM DTT, 150 mM NaCl, 1x complete EDTA-free protease inhibitor cocktail (Roche))に懸濁した後、超音波破碎した。GST を融合した *OsRLCK185* は、glutathione sepharose 4B (GE Healthcare)で精製し、50 mM グルタチオンで溶出した。また、His タグを付加した *OsMAPKKK18* は、Metal Affinity Resin (TALON)を用いて精製し、200 mM イミダゾールで溶出した。

2-9. *in vitro* リン酸化実験

反応 Buffer (50 mM HEPES (pH 7.6), 10 mM MgCl₂, 100 μM ATP, 1 mM DTT)に、精製したリコンビナントタンパク質をそれぞれ 1 μg ずつ加えた。リン酸化反応は、反応 Buffer に 0.4 μl (4 μCi)の[γ-³²P] ATP を加え、25°Cで 1 時間反応させた。溶液に 6x サンプル Buffer (350 mM Tris-HCl, 35 mM DTT, 30%グリセリン, 60 mM DTT, 60 μM ブロモフェノールブルー(BPB))を 1x になるように加え、室温で 10 分間静置し、リン酸化反応を停止させた。反応後のサンプルは、ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離した。リン酸化によるバンドは、FLA-7000 imaging analyzer (FujiFilm)を用いて検出した。

3. 結果

3-1. OsRLCK185 と相互作用する MAPKKK の探索

シロイヌナズナでは、PBL27 が AtMAPKKK5 をリン酸化することで、キチンシグナルを MAPK カスケードへ伝達していることを明らかにした (Yamada et al., 2016b)。OsRLCK185 は、PBL27 とオルソログの関係にあることから、OsRLCK185 の下流では AtMAPKKK5 とオルソログの関係にある MAPKKK が機能していると予想された。そこで、イネに保存された MAPKKK の中で、AtMAPKKK5 と最も相同性の高いものを探索した結果、OsMAPKKK11 (Os07g0119000) および OsMAPKKK18 (Os03g0764300) を同定した(図 3-1)。AtMAPKKK5 と OsMAPKKK11/18 との相同性はそれぞれ、42%と 37.1%であった。また、OsMAPKKK11 と OsMAPKKK18 の相同性は 61.4%であった。AtMAPKKK5 と同様に、OsMAPKKK11/18 は中央にキナーゼドメインを持ち、さらに N 末端ドメインと C 末端ドメインに分けることができる(図 3-2 A)。

OsRLCK185 が OsMAPKKK11/18 と相互作用するかどうかを調べるために、酵母 Two-hybrid 法による解析を行った。OsMAPKKK11/18 の全長(Full)および各ドメインを pVP16 (prey)に、OsRLCK185 を pBTM116 (bait)に導入したコンストラクトを作成した。作成したコンストラクトを酵母に形質転換し、-UWLH (U:ウラシル、W:トリプトファン、L:ロイシン、H:ヒスチジンを含まない培地)上で生育させた。その結果、OsRLCK185 と OsMAPKKK11/18 の全長、N 末端ドメインおよび C 末端ドメインとの組み合わせで酵母の生育が見られた(図 3-2 B)。これは、OsRLCK185 が OsMAPKKK11/18 の N 末端ドメインおよび C 末端ドメインと特異的に相互作用することを示している。また、OsRLCK176 の発現を抑制することで、キチンに応答した MAPK の活性化が低下することが報告されている(Ao et al., 2014)。このことから、OsRLCK176 も OsMAPKKK11/18 と相互作用する可能性が示唆された。しかし、酵母を用いた相互作用解析の結果、OsRLCK176 は OsMAPKKK11/18 の全長およびいずれのドメインとも相互作用しなかった (図 3-2 B)。これらの結果から、OsMAPKKK11/18 が OsCERK1/CEBiP - OsRLCK185 の下流でキチン応答に機能していることが示唆された。

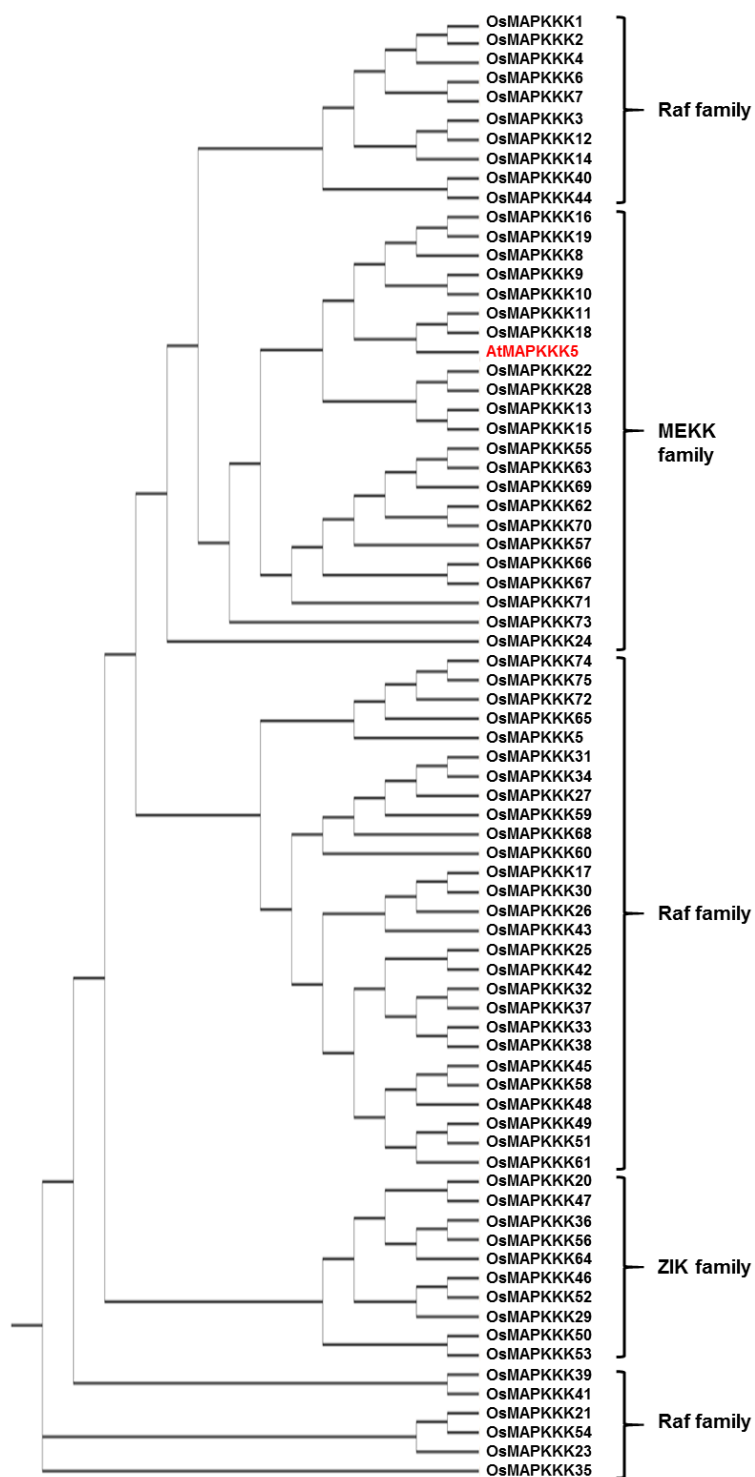


図 3-1. AtMAPKKK5 を含めたイネ MAPKKK の系統樹

AtMAPKKK5 およびイネの MAPKKK の全長のアミノ酸配列から系統樹を作成した。
赤文字で示した AtMAPKKK5 と最も相同性の高いものとして OsMAPKKK11/18 がある。

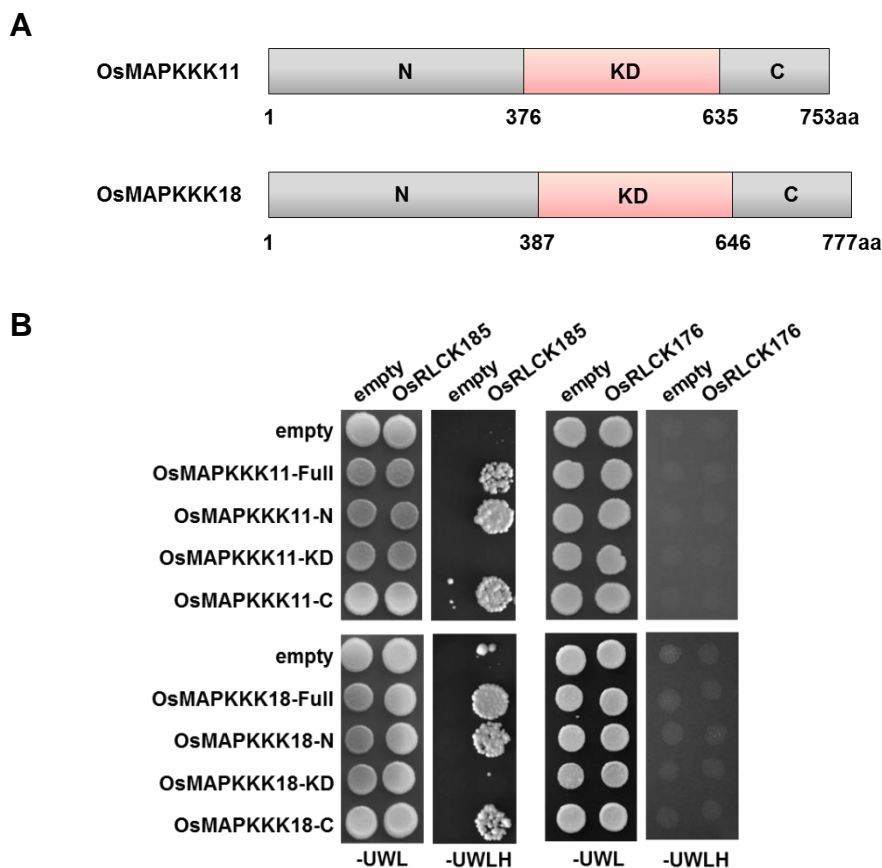


図 3-2. 酵母 Two-hybrid 法による OsRLCK185 と OsMAPKKK11/18 との相互作用解析

- A) OsMAPKKK11/18 のモデル図。N:N 末端ドメイン KD:キナーゼドメイン C:C 末端ドメイン
- B) OsMAPKKK11/18 を pVP16 (prey)、OsRLCK185/176 を pBTM116 (bait) にそれぞれ導入し、酵母に形質転換した。形質転換した酵母を、-UWLH (U:ウラシル W:トリプトファン L:ロイシン H:ヒスチジンを含まない培地) 上で生育させた。

3-2. キチン応答における OsMAPKKK11/18 機能解析

N.benthamiana の葉で *AtMAPKKK5* を一過的に発現させると細胞死が誘導される (Yamada et al., 2016b)。そこで、OsMAPKKK11/18 も同様に、細胞死を誘導するかどうかを調べるために、GFP を融合した OsMAPKKK11/18 に CaMV 35S プロモーターを繋いだコンストラクトをそれぞれ作成し、アグロバクテリウムを介して、*N.benthamiana* の葉で一過的に発現させた。感染後 72 時間において、OsMAPKKK11 と OsMAPKKK18 を発現させた領域で細胞死の誘導が見られた(図 3-3)。また、OsMAPKKK11 と

*OsMAPKKK18*によって誘導される細胞死の強さが同程度であったことから、これらのMAPKKKが同様の活性を持っていると考えられる(図 3-3)。

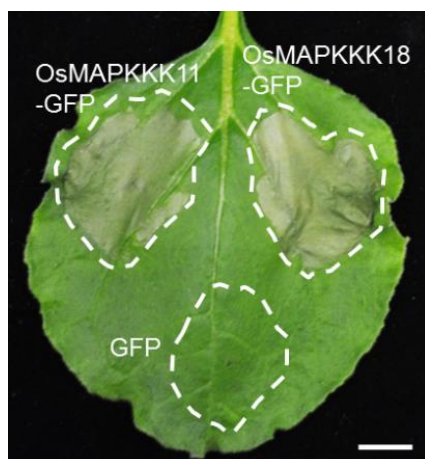


図 3-3. *N.benthamiana* の葉における細胞死の観察

OsMAPKKK11/18-GFP をそれぞれ、*N.benthamiana* の葉で一過的に発現させた。アグロバクテリウムの感染後 72 時間に観察を行った。*OsMAPKKK11-GFP* および *OsMAPKKK18-GFP* を発現させた部分では細胞死の誘導が見られた。*GFP* はネガティブコントロールとして発現させ、細胞死の誘導は見られなかった。

Scale bar=1 cm

次に、*OsMAPKKK11/18* がキチン応答に関与しているかどうかを調べるために、RNA interference (RNAi) によって *OsMAPKKK11/18* の発現を抑制した培養細胞を作出した。得られた RNAi の 2 系統について、*OsMAPKKK11/18* の発現量を Real-time PCR により解析した。その結果、2 系統の両方において、*OsMAPKKK11/18* 両方の発現量が有意に低下していることを確認した(図 3-4A)。これらの *OsMAPKKK11/18* 発現抑制体を用いて、キチン応答時における MAPK の活性化解析を行った。抗 MAPK リン酸化抗体を用いたウエスタンブロッティングの結果、*OsMAPKKK11/18* 発現抑制体の 2 つの系統両方において、MAPK の活性化が顕著に低下していた(図 3-4 B)。さらに、免疫応答関連遺伝子である *PBZ1* および *OsPR10* の発現量を Real-time PCR により解析した。その結果、野生型に比べて *OsMAPKKK11/18* 発現抑制体では、キチンに応答したこれらの遺伝子の発現量が著しく低下していた(図 3-4 C,D)。以上の結果から、*OsMAPKKK11/18* がキチン応答に重要な働きをしていることが明らかになった。また、*OsRLCK185* 発

現抑制体では、キチン応答時の ROS の生産量が低下する (Yamaguchi et al., 2013)。そこで、*OsMAPKKK11/18* 発現抑制体におけるキチン応答時の ROS の生産量を解析した。しかし、野生型と *OsMAPKKK11/18* 発現抑制体の間で、ROS 生産量に有意な差は認められなかった(図 3-4 E)。このことは、イネのキチンシグナル伝達経路において、ROS 生産に関わる経路は *OsRLCK185* で分岐していることを示す。

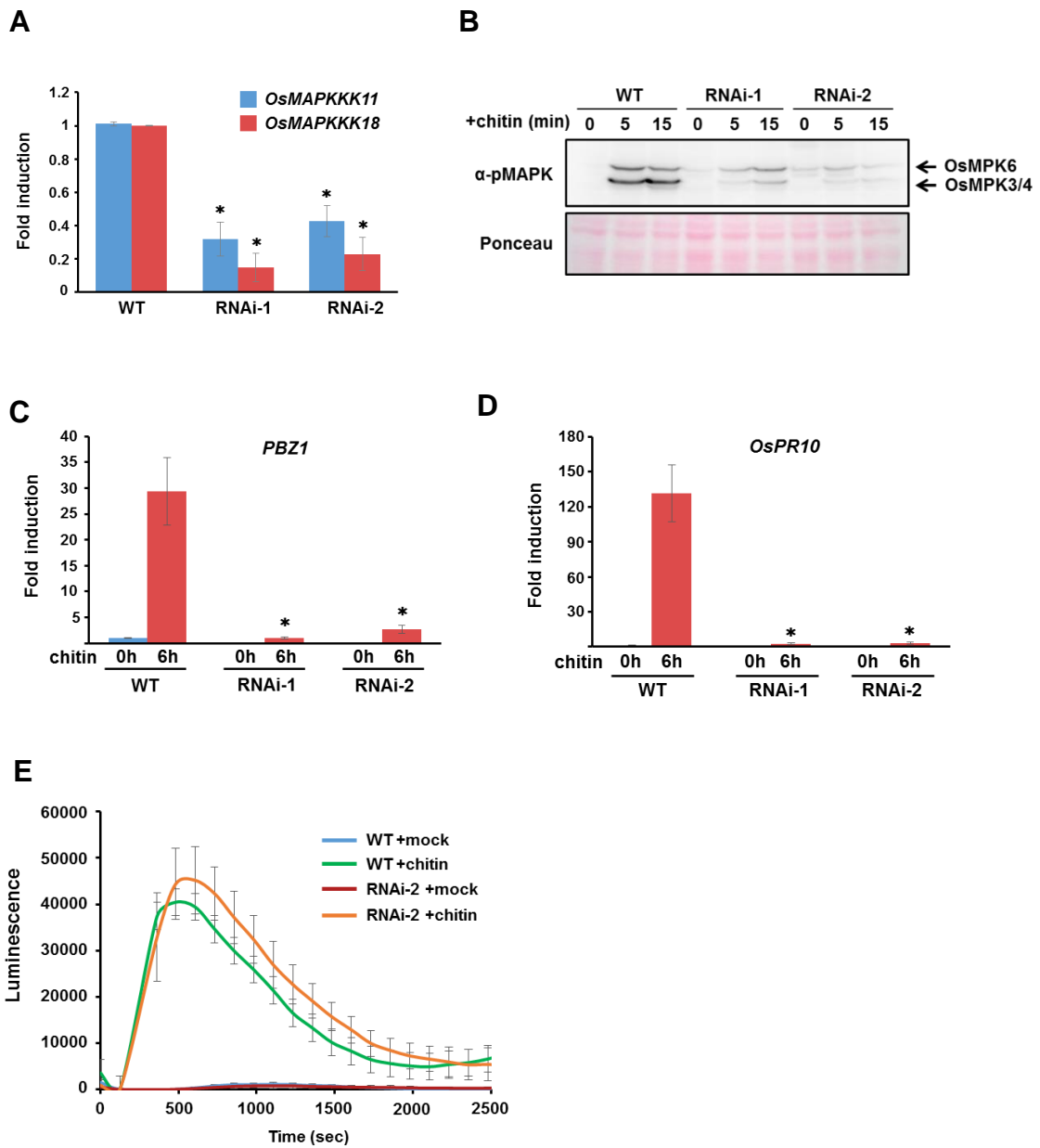


図 3-4. キチン応答における OsMAPKKK11/18 の機能解析

- A) *OsMAPKKK11/18* 発現抑制体における遺伝子発現解析。RNAi 2 系統において、*OsMAPKKK11/18* の発現量が共に低下している。それぞれの値は 3 回行った実験の平均値±標準偏差を示す。*は野生型(WT)と RNAi 系統との有意差($p < 0.01$)を示す。
- B) イネ培養細胞におけるキチン応答時の MAPK の活性化解析。キチン処理後 0 分、5 分、15 分で解析した。*OsMAPKKK11/18* 発現抑制体では MAPK の活性化が低下する。
- C), D) *PBZ1* (C)と *OsPR10* (D)の発現解析。*OsMAPKKK11/18* 発現抑制体ではキチンに応答したこれらの遺伝子の発現量が有意に低下する。それぞれの値は 3 回行った実験の平均値±標準偏差を示す。*は WT と RNAi 系統との有意差($p < 0.05$)を示す。
- E) キチン応答時の ROS 生産量。WT と *OsMAPKKK11/18* 発現抑制体との間で大きな差は見られない。それぞれの値は 3 回行った実験の平均値±標準偏差($n=15$)を示す。

OsMAPKKK11/18 の機能をより詳細に解析するために、*OsMAPKKK11* のゲノム上にレトロトランスポゾンである *Tos17* が挿入された、*Osmapkkk11* 機能欠損変異体を得た。解析には、*OsMAPKKK11* の 2 番目のエクソンに *Tos17* が挿入された系統(NG9082)を用いた(図 3-5 A)。変異体では *OsMAPKKK11* 遺伝子が発現していないことを RT-PCR により確認した(図 3-5 B)。また、CRISPR/Cas9 システムを用いて、*Osmapkkk18* 機能欠損変異体の作出を試みたが、変異体を得ることができなかった。得られた *Osmapkkk11* 機能欠損変異体を用いて、キチン応答時の MAPK の活性化解析を行った。しかし、野生型と *Osmapkkk11* 変異体において、MAPK の活性化レベルに有意な差は認められなかった(図 3-5 C)。また、内在性の *OsMAPKKK11/18* の発現量を Real-time PCR により比較した結果、*OsMAPKKK18* の発現量が、*OsMAPKKK11* の発現量よりも非常に高いことが分かった(図 3-5 D)。これらの結果から、キチンシグナル伝達経路では、*OsMAPKKK18* が主に機能していると考えられる。

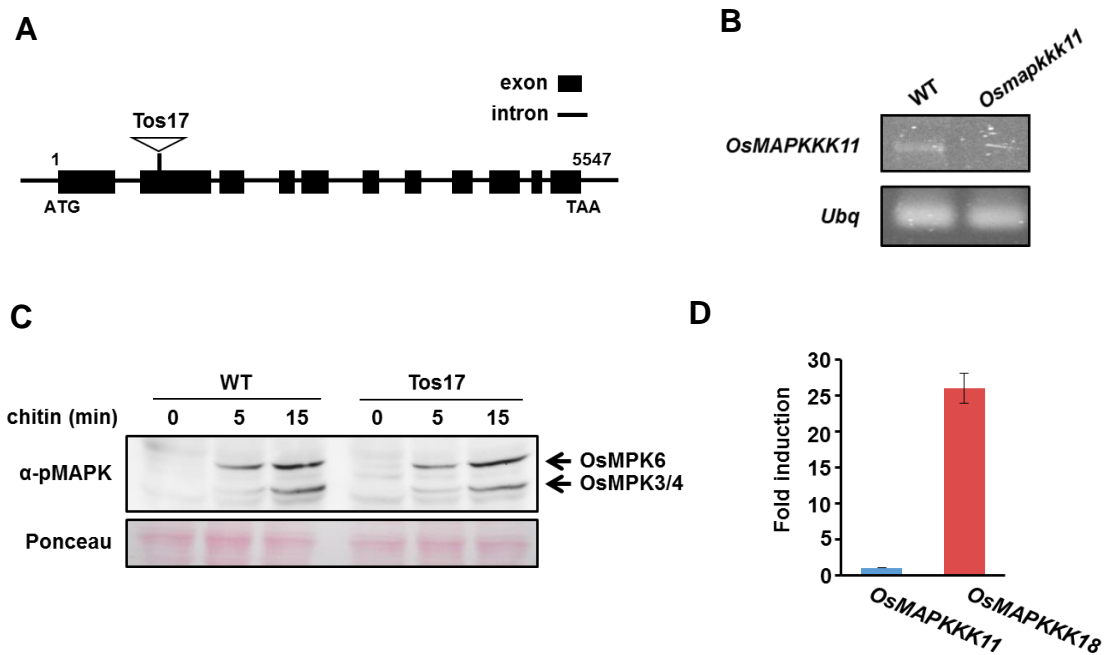


図 3-5. *Osmapkkk11* 機能欠損変異体を用いたキチン応答における機能解析

- A) *OsmAPKKK11* の遺伝子構造モデル。Tos17 の挿入位置は矢印で示している。黒の Box はエクソンを示す。
- B) RT-PCR による *OsmAPKK11* 発現解析。Tos17 が挿入された変異体では、*OsmAPKKK11* の発現が見られない。
- C) *Osmapkkk11* 機能欠損変異体におけるキチン応答時の MAPK 活性化解析。WT と *Osmapkkk11* 機能欠損変異体では、MAPK の活性化に差は見られない。
- D) Real-time PCR による内在性 *OsmAPKKK11/18* の発現量比較。 *OsmAPKKK11* に比べて *OsmAPKKK18* の発現量が非常に高いことを示す。

3-3. 細胞内における OsMAPKKK18 の局在解析

OsMAPKKK18 の細胞内局在を解析するために、GFP を融合した OsMAPKKK18 を、アグロバクテリウムを用いて、*N.benthamiana* の葉で一過的に発現させた。感染 40 時間後において蛍光観察を行った結果、細胞質および細胞膜で OsMAPKKK18-GFP の蛍光が見られた(図 3-6)。OsMAPKKK18 が細胞膜上に局在しているかを確認するために、1 M NaCl を処理し、原形質分離を引き起こした後に再度観察を行った。その結果、原形質分離によって細胞壁から剥がれた膜において蛍光が見られた。このことから、OsMAPKKK18 は細胞質と細胞膜上に局在していると考えられる(図 3-6)。

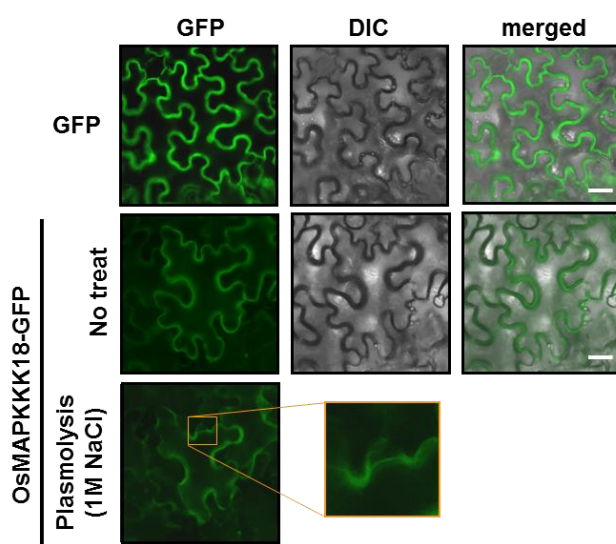


図 3-6. OsMAPKKK18 の細胞内局在解析

N.benthamiana における OsMAPKKK18-GFP の蛍光観察。アグロバクテリウムの感染後 40 時間で観察した。原形質分離は 1 M NaCl の処理によって誘導した。Scale bar=30 μ m

N.benthamiana の葉で OsRLCK185 と OsMAPKKK18 を共発現させ、BiFC 法による相互作用解析を行った。しかし、OsRLCK185 と OsMAPKKK18 を共発現させると細胞死が誘導されるため、相互作用を確認することができなかった。そこで、OsMAPKKK18 の ATP 結合部位と予想される Lys-416 を Arg に置換することで、リン酸化活性を消失させた変異体(OsMAPKKK18^{K416R})を作成した。GFP を融合した OsMAPKKK18^{K416R} を *N.benthamiana* の葉で一過的に発現させ、蛍光観察を行った結果、細胞質と細胞膜の両

方において蛍光が観察された(図 3-7 A)。また、原形質分離によって剥がれた細胞膜上で強い蛍光を観察することができた(図 3-7 A)。これらの結果は、OsMAPKKK18 のリン酸化活性が自身の細胞内局在に影響しないことを示している。そこで、OsMAPKKK18^{K416R}を用いて、BiFC 法による OsRLCK185 との相互作用解析を行った。蛍光タンパク質である Venus の N 末端側を OsMAPKKK18^{K416R}、C 末端側を OsRLCK185 に融合させたコンストラクト(OsMAPKKK18^{K416R}-Vn:OsRLCK185-Vc)を作成した。作成したコンストラクトをアグロバクテリウムに形質転換し、タバコの葉に感染させた。感染後 48 時間で蛍光観察を行った結果、細胞全体で蛍光が見られた(図 3-7 B)。また、1 M NaCl を処理し、再度観察を行った結果、細胞膜で蛍光を観察することができた。一方で、Venus の N 末端側を OsRLCK176 に融合したコンストラクト(OsRLCK176-Vn)と、OsMAPKKK18^{K416R}-Vn を共発現させた細胞では蛍光が見られなかった(図 3-7 B)。これらの結果は、OsRLCK185 と OsMAPKKK18 が細胞膜上で特異的に相互作用することを示している。

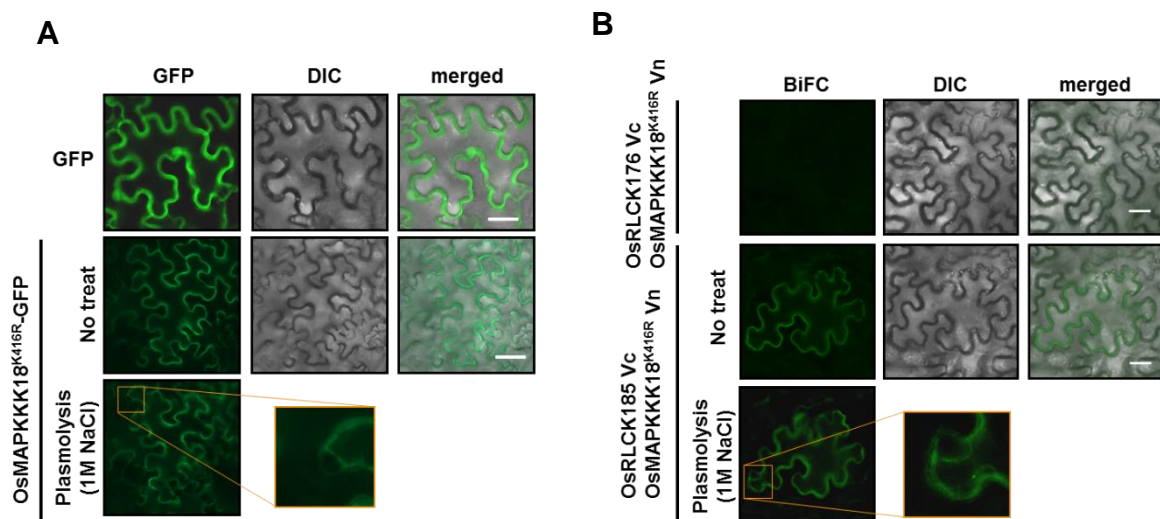


図 3-7. *in vivo* における OsRLCK185 と OsMAPKKK18 の相互作用解析

- A) *N. benthamiana* における OsMAPKKK18^{K416R}-GFP の蛍光観察。アグロバクテリウムの感染後 40 時間で観察した。原形質分離は 1 M NaCl の処理によって誘導した。Scale bar=30 μ m
- B) BiFC 法による OsRLCK185 および OsRLCK176 と OsMAPKKK18^{K416R} の相互作用解析。Venus の C 末端側 (Vc) を OsRLCK185/176 に、N 末端側 (Vn) を OsMAPKKK18^{K416R} に融合させ、*N. benthamiana* の葉で共発現させた。アグロバクテリウムの感染後 48 時間で観察を行った。原形質分離は 1 M NaCl の処理によって誘導した。Scale bar=30 μ m

3-4. OsRLCK185 による OsMAPKKK18 リン酸化解析

シロイヌナズナでは、PBL27 が AtMAPKKK5 の C 末端ドメインを特異的にリン酸化することを明らかにした。このことから、OsRLCK185 もまた、OsMAPKKK18 をリン酸化すると予想された。そこで、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP を用いた *in vitro* リン酸化実験を行った。GST を融合した OsRLCK185 および His タグを付加した OsMAPKKK18 の各ドメインのタンパク質を、大腸菌発現系を用いて作成した。また、OsMAPKKK18-KD は自己リン酸化活性を有しているため、不活性型である OsMAPKKK18-KD^{K416R} を解析に用いた。解析の結果、OsRLCK185 によって OsMAPKKK18-N 末端ドメインおよび C 末端ドメインが強くリン酸化されていた(図 3-8)。一方で、OsMAPKKK18-KD^{K416R} においてもリン酸化が見られたが、N 末端/C 末端ドメインよりも非常に弱いものであった(図 3-8)。今回得られた結果は、酵母 Two-hybrid 法による相互作用解析の結果とも一致することから(図 3-2 B)、OsRLCK185 は OsMAPKKK18 の N 末端ドメインと C 末端ドメインをリン酸化することで、キチンシグナルを MAPK カスケードへ伝達していると考えられる。

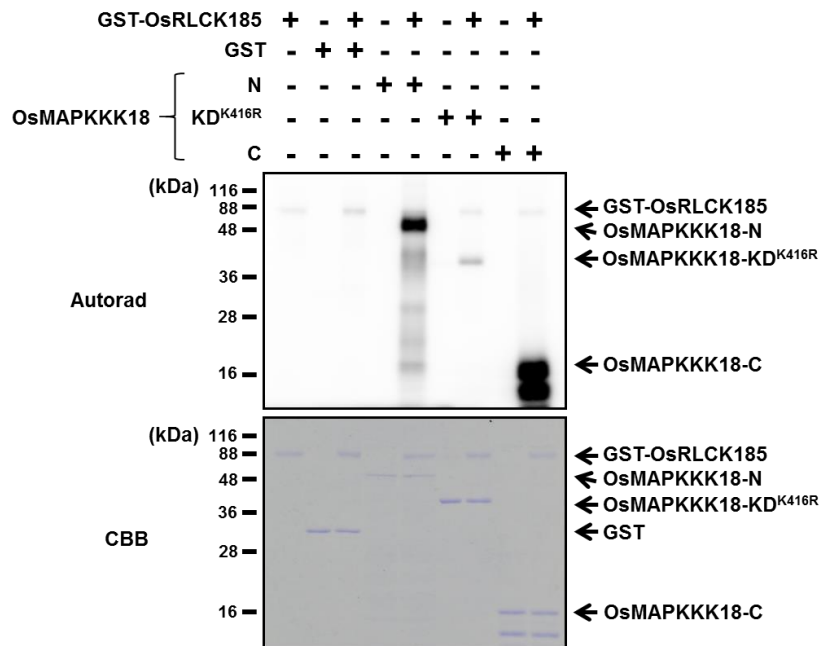


図 3-8. OsRLCK185 による OsMAPKKK18 リン酸化解析

GST タグを融合した OsRLCK185 および His タグを付加した OsMAPKKK18 の各ドメインのタンパク質を、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP を含む Buffer 中で反応させ、オートラジオグラフィーにより解析した。CBB: Coomassie brilliant blue

3-5. OsMAPKKK18 と OsMKK4/5 との相互作用解析

AtMAPKKK5 は AtMKK4/5 をリン酸化することで下流へとシグナルを伝達していると考えられる。イネでは、AtMKK4/5 のオルソログとして、OsMKK4/5 が存在する。CERK1/CEBiP の下流では、OsMKK4-OsMPK3/6 の経路が存在しているが、OsMKK5 は関与していないことが報告されている(Kishi-Kaboshi et al., 2010)。このことから、OsMAPKKK18 が OsMKK4 と特異的に相互作用する可能性が考えられた。そこで、酵母 Two-hybrid 法による相互作用解析を行った。OsMKK4/5 を pVP16 (prey)、OsMAPKKK18の全長および各ドメインを pBTM116 (bait)にそれぞれ導入したコンストラクトを作成した。作成したコンストラクトを酵母に形質転換し、2mM 3-AT を含む-UWLH 培地上で生育した。その結果、OsMKK4 と OsMAPKKK18-KD のみにおいて相互作用が見られ、全長および N 末端/C 末端ドメインとの相互作用は見られなかった(図 3-9)。また、OsMKK5 と OsMAPKKK18 のいずれのコンストラクトとも相互作用は見られなかった(図 3-9)。これらの結果から、CERK1/CEBiP の下流では、OsMAPKKK18-OsMKK4-OsMPK3/6 から構成される MAPK カスケードが機能していることが示唆された。

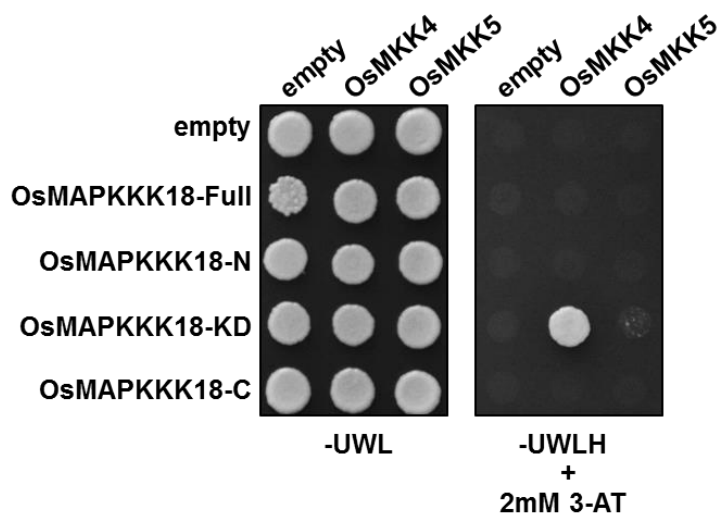


図 3-9. 酵母 Two-hybrid 法による OsMAPKKK18 と OsMKK4/5 との相互作用解析

OsMKK4/5 を pVP16 (prey), OsMAPKKK18 の各ドメインを pBTM116 (bait) にそれぞれ導入し、酵母に形質転換した。形質転換した酵母を、2 mM 3-AT を含む-UWLH (U:ウラシル W:トリプトファン L:ロイシン H:ヒスチジンを含まない培地)上で生育させた。Full:全長 N:N 末端ドメイン KD:キナーゼドメイン C:C 末端ドメイン

4. 考察

イネにおけるキチン認識は、RLK である OsCERK1 と RLP である CEBiP の複合体が機能している(Kaku et al., 2006; Shimizu et al., 2010)。また、OsCERK1/CEBiP 複合体の下流では、OsMKK4-OsMPK3/6 が機能していることが報告されている(Kishi-Kaboshi et al., 2010)。しかし、キチン応答に機能している MAPKKK は同定されていなかった。これまでに我々は、OsCERK1 が OsRLCK185 を直接リン酸化することで、キチンシグナルを細胞内へ伝達していることを明らかにしている(Yamaguchi et al., 2013)。また、第 2 章では、OsRLCK185 のシロイヌナズナのオルソログである PBL27 が、AtMAPKKK5 にキチンシグナルを伝達していることを明らかにした(Yamada et al., 2016b)。これらのことから、キチンシグナル伝達経路において OsRLCK185 の下流で機能する MAPKKK が、AtMAPKKK5 のオルソログである可能性が考えられた。そこで、AtMAPKKK5 と最も相同性の高いイネの MAPKKK を探索した結果、OsMAPKKK11/18 を同定した(図 3-1)。OsMAPKKK11/18 発現抑制体では、キチンによって誘導される MAPK の活性化が顕著に低下した(図 3-4 B)。また、防御応答関連遺伝子である PBZ1 や OsPR10 の発現量が顕著に低下した(図 3-4 C)。これらの結果から、OsMAPKKK11/18 がキチン応答に重要な役割を果たしていると考えられた。一方で、Tos17 の挿入による Osmapkkk11 機能欠損変異体では、MAPK の活性化に大きな影響は見られなかった(図 3-5 C)。OsMAPKKK11/18 をそれぞれ、*N.benthamiana* の葉で一過的に発現させると細胞死の誘導が見られた(図 3-3)。OsMAPKKK11 と OsMAPKKK18 によって誘導される細胞死の強さに差は見られなかったことから、これらの MAPKKK が同程度の活性を有していると考えられる。さらに、イネにおける OsMAPKKK11/18 の発現量を比較した結果、OsMAPKKK18 の発現量が OsMAPKKK11 に比べて非常に高いことが分かった(図 3-5 D)。これらの結果から、イネのキチンシグナル伝達経路において、OsMAPKKK18 が主に機能していると考えられる。

OsRLCK185 発現抑制体では、キチンによる ROS の生産量が低下することが明らかになっている(Yamaguchi et al., 2013)。一方で、OsMAPKKK11/18 発現抑制体では、キチン応答における ROS 生産量に大きな変化は見られなかった(図 3-4 E)。この結果から、イネのキチンシグナル伝達経路において、ROS 生産と MAPK の活性化に関わる経路が、OsRLCK185 で分岐していると考えられる。シロイヌナズナでは、RLCK である BIK1 が flg22 や elf18、キチンに応答して、NADPH オキシダーゼである RBOHD を直接リン酸化することで ROS 生産を制御していることが報告されている(Kadota et al., 2013; Li et al., 2014)。このことから、OsRLCK185 もまた、イネの RBOH を直接リン

酸化することで、キチン応答における ROS 生産を制御している可能性が考えられる。しかし、BIK1 は MAPK の活性化には関与していないと考えられている。一方で、PBL27 の機能欠損変異体では、キチンに応答した MAPK の活性化が低下するが、ROS 生産には影響がないことが明らかになっている(Shinya et al., 2014)。これらの結果から、シロイヌナズナのキチンシグナル伝達経路では PBL27 と BIK1 の異なる 2 つの RLCK がそれぞれ、MAPK の活性化と ROS 生産を分担して制御していると考えられる。一方、イネのキチンシグナル伝達経路においては、OsRLCK185 が RBOH を介した ROS 生産と MAPK の活性化の 2 つの役割を担っていることが示唆された。また、OsRLCK185 と同様に、OsRLCK176 がキチン応答における MAPK の活性化を制御していることが報告されている(Ao et al., 2014)。しかし、酵母 Two-hybrid 法による解析の結果、OsRLCK176 は OsMAPKKK11/18 のいずれのドメインとも相互作用しなかった(図 3-2)。このことから、OsRLCK176 が未同定の MAPKKK にキチンシグナルを伝達していることが考えられる。

シロイヌナズナでは、PBL27 が AtMAPKKK5 の C 末端ドメインをリン酸化することで、キチンシグナルを MAPK カスケードへ伝達していることが明らかになった(Yamada et al., 2016b)。酵母を用いた相互作用解析の結果、OsRLCK185 は OsMAPKKK18 の N 末端ドメインと C 末端ドメインに結合することが明らかになった(図 3-2 B)。また、*in vitro* におけるリン酸化解析の結果、OsMAPKKK18 の N 末端ドメインおよび C 末端ドメインが OsRLCK185 によって強くリン酸化されることが明らかになった(図 3-8)。これらの結果から、OsMAPKKK18 の活性化には N 末端と C 末端の両方のドメイン、あるいはいずれかのドメインのリン酸化が必要であると考えられ、AtMAPKKK5 とは異なる活性化メカニズムが存在する可能性が考えられる。

シロイヌナズナのキチン応答には MKK4/5 が機能しており、AtMAPKKK5 はこれらの MAPKK を直接リン酸化する(Yamada et al., 2016b)。イネでは、MKK4/5 のオルソログとして OsMKK4/5 が存在している。キチンシグナル伝達経路では、OsMKK4 が機能しており、OsMKK5 は関与していないことが報告されている(Kishi-Kaboshi et al., 2010)。酵母 Two-hybrid 法を用いた相互作用解析の結果、OsMAPKKK18-KD のみが OsMKK4 と相互作用することが分かった(図 3-9)。しかし、OsMKK5 は OsMAPKKK18 のいずれのドメインとも相互作用しなかった(図 3-9)。これらの結果から、OsMAPKKK18 が OsMKK4 を特異的にリン酸化することによって下流へシグナルを伝達していると考えられ、イネのキチンシグナル伝達経路として、OsCERK1/CEBiP-OsRLCK185-OsMKK4-OsMPK3/6 が機能していることが示唆された。また、シロイヌナズナにおいても同様の

キチンシグナル伝達経路が存在していることから、これらの植物では、PRR から MAPK カスケードへのシグナル伝達機構が高く保存されていると考えられる(図 3-10)。

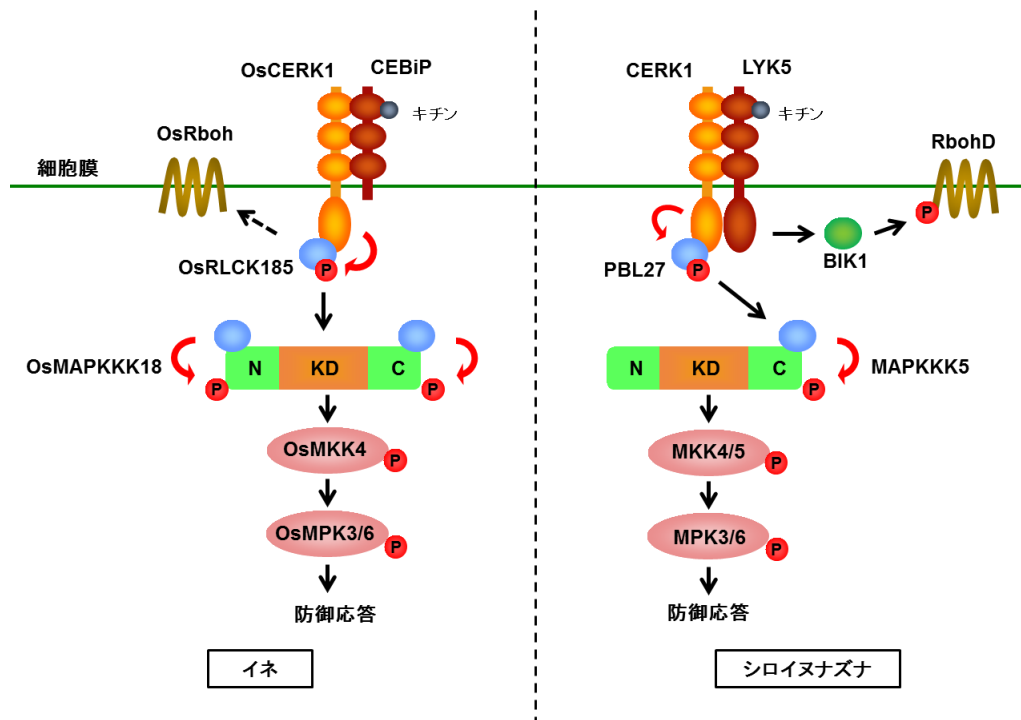


図 3-10. シロイヌナズナとイネのキチン応答におけるシグナル伝達モデル

シロイヌナズナでは、CERK1/LYK5 によって PBL27 がリン酸化されることで活性化する。活性化した PBL27 は MAPKKK5 の C 末端ドメインをリン酸化することで、MAPK カスケードへシグナルを伝達する。さらに、MAPKKK5 は MKK4/5 をリン酸化し、下流へとシグナルを伝達している。

イネでは、OsRLCK185 が CERK1/CEBiP 複合体の下流で、ROS 生産と MAPK の活性化の両方の経路を制御していると考えられる。OsRLCK185 は OsMAPKKK18 をリン酸化することで、MAPK カスケードへキチンシグナルを伝達する。また、OsMAPKKK18 の下流では、OsMKK4-OsMPK3/6 が機能していると考えられる。

第4章 総括

植物の防御応答において、MAPK カスケードは重要な役割を持つシグナル伝達経路として知られている。しかし、細胞膜受容体からのシグナルを直接 MAPK カスケードへ伝達している因子については明らかにされていなかった。そこで、本研究では、イネとシロイヌナズナにおいて、真菌由来の PAMPs であるキチン応答時に、どのように MAPK カスケードへシグナルが伝達されているかについて、その活性化機構の解明を明らかにすることを目的とした。シロイヌナズナでは、キチン受容体である CERK1/LYK5 複合体の下流で機能する RLCK PBL27 が MAPK カスケードへシグナルを伝達していることを明らかにした。酵母 Two-hybrid 法を用いた解析の結果、PBL27 と相互作用する MAPKKK として MAPKKK5 を同定した。*mapkkk5* 機能欠損変異体では、キチンによって誘導される MPK3/6 の活性化が低下することから、MAPKKK5 がキチン応答に重要な因子であることが明らかになった。また、PBL27 は MAPKKK5 と細胞膜上で相互作用し、リン酸化することでシグナルを伝達していると考えられる。さらに、PBL27 による MAPKKK5 のリン酸化には、CERK1 による PBL27 の活性化が必要であることも明らかになった。MPK3/6 の上流では、MAPKK である MKK4/5 が機能していることがこれまでに報告されている。*in vitro* におけるリン酸化実験の結果、MAPKKK5 は MKK4/5 の活性化ループを特異的にリン酸化することが明らかになった。これらの結果から、シロイヌナズナのキチン応答において、CERK1/LYK5-PBL27-MAPKKK5-MKK4/5-MPK3/6 によるリン酸化シグナル伝達経路が存在していることが示唆された。

イネでは、PBL27 のオルソログである OsRLCK185 が、OsCERK1/CEBiP 複合体の下流で機能している。イネに存在する 75 個の MAPKKK から、AtMAPKKK5 と最も相同性の高いものを探索した結果、OsMAPKKK11/18 を同定した。OsMAPKKK11/18 発現抑制体では、キチンによる MAPK の活性化や防御応答遺伝子の発現が低下した。しかし、*Osmapkkk11* 機能欠損変異体では、MAPK の活性化に影響は見られなかった。OsMAPKKK18 の発現量が OsMAPKKK11 の発現量よりも非常に高いことから、キチンシグナル伝達経路において主要な役割を担っているのは OsMAPKKK18 であると考えられる。*in vitro* リン酸化解析の結果、OsRLCK185 が OsMAPKKK18 の N 末端領域と C 末端領域の両方をリン酸化することが明らかになった。このことから、OsRLCK185 が OsMAPKKK18 を介して MAPK カスケードへキチンシグナルを直接伝達していると考えられる。さらに、OsMAPKKK18 が MAPKK である OsMKK4 と相互作用することが明らかになった。これまでに、OsMKK4-OsMPK3/6 がキチンシグナルに関与していることが報告されている。これらの結果から、イネでは、CERK1/CEBiP-OsRLCK185-

OsMAPKKK18-OsMKK4-OsMPK3/6 によるキチンシグナル伝達経路が存在していることが示唆された。

今回の研究から、RLCK がキチン応答時の MAPK カスケードへのシグナル伝達に重要な役割を担っていることが示された。近年、RLCK が PRR と複合体を形成し、PAMPs によるシグナル伝達に機能していることが報告されている。このことから、植物の防御応答において、様々な PRR から MAPK カスケードへのシグナル伝達に RLCK が関与していると考えられる。また、単子葉類であるイネと双子葉類であるシロイヌナズナにおいて、同様のシグナル伝達経路が存在していることが明らかになった。このことから、RLCK を介した、受容体から MAPK カスケードへのシグナル伝達機構は、植物の間で広く保存されているのではないかと予想される。

参考文献

Abramovitch, R.B., Janjusevic, R., Stebbins, C.E., Martin, G.B. (2006). Type III effector AvrPtoB requires intrinsic E3 ubiquitin ligase activity to suppress plant cell death and immunity. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 103: 2851–2856.

Ao, Y., Li, Z., Feng, D., Xiong, F., Liu, J., Li, J.F., Wang, M., Wang, J., Liu, B., Wang, H.B. (2014). OsCERK1 and OsRLCK176 play important roles in peptidoglycan and chitin signaling in rice innate immunity. *Plant J* 80: 1072 – 1084

Asai, T., Tena, G., Plotnikova, J., Willmann, M.R., Chiu, W.L., Gomez-Gomez, L., Boller, T., Ausubel, F.M., Sheen, J. (2002). MAP kinase signaling cascade in Arabidopsis innate immunity. *Nature* 415: 977–983.

Bergmann, D.C., Lukowitz, W., Somerville, C.R. (2004). Stomatal development and pattern controlled by a MAPKK kinase. *Science* 304: 1494-1497.

Cao, Y., Liang, Y., Tanaka, K., Nguyen, C.T., Jedrzejczak, R.P., Joachimiak, A., Stacey, G. (2014). The kinase LYK5 is a major chitin receptor in and forms a chitin-induced complex with related kinase CERK1. *eLife* 3: e03766.

Cheng, W., Munkvold, K.R., Gao, H., Mathieu, J., Schwizer, S., Wang, S., Yan, Y.B., Wang, J., Martin, G.B., Chai, J. (2011). Structural analysis of *Pseudomonas syringae* AvrPtoB bound to host BAK1 reveals two similar kinase-interacting domains in a type III Effector. *Cell Host Microbe* 10: 616–626.

Chinchilla, D., Bauer, Z., Regenass, M., Boller, T., Felix, G. (2006). The *Arabidopsis* receptor kinase FLS2 binds flg22 and determines the specificity of flagellin perception. *Plant cell* 18: 465-476.

Chinchilla, D., Zipfel, C., Robatzek, S., Kemmerling, B., Nu"rnberger, T., Jones, J.D., Felix, G., Boller, T. (2007). A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. *Nature* 448: 497–500.

Couto, D., Zipfel, C. (2016). Regulation of pattern recognition receptor signaling in plants. *Nat Rev Immunol.* 16: 537-552.

Cui, H., Xiang, T., Zhou, J.M. (2009). Plant immunity: a lesson from pathogenic bacterial effector proteins. *Cell. Microbiol.* 11: 1453–1461.

Gehl, C., Waadt, R., Kudla, J., Mendel, R.R., Hansch, R. (2009). New GATEWAY vectors for high throughput analyses of protein-protein interactions by bimolecular fluorescence complementation. *Mol Plant.* 2: 105101058.

Gimenez-Ibanez, S. Hann, D.R., Ntoukakis, V., Petutschnig, E., Lipka, V., Rathjen, J.P. (2009). AvrPtoB targets the LysM receptor kinase CERK1 to promote bacterial virulence on plants. *Curr. Biol.* 19: 423–429.

Gohre, V. Spallek, T., Haweker, H., Mersmann, S., Mentzel, T., Boller, T., de Torres, M., Robatzek, S. (2008). Plant pattern-recognition receptor FLS2 is directed for degradation by the bacterial ubiquitin ligase AvrPtoB. *Curr. Biol.* 18: 1824–1832.

Huse, M., Kuriyan, J. (2002). The conformational plasticity of protein kinases. *Cell* 109: 275 – 282.

Ichimura, K., Shinozaki, K., Tena, G., Sheen, J., Henri, Y., Champion, A., Kreis, M., Zhang, S.Q., Hirt, H., Wilson, C., Heberle-Bors, E., Ellis, BE., Morris, PC., Innes, RW., Ecker, J.R., Scheel, D., Klessig, D.F., Machida, Y., Mundy, J., Ohashi, Y. et al., (2002) Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. *Trends Plant Sci* 7: 301 – 308.

Jonak, C., Okresz, L., Bogre, L., Hirt, H. (2002). Complexity, cross talk and integration of plant MAP kinase signalling. *Curr Opin Plant Biol* 5: 415 – 424.

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

Kadota, Y., Sklenar, J., Derbyshire, P., Stransfeld, L., Asai, S., Ntoukakis, V., Jones, J.D., Shirasu, K., Menke, F., Jones, A., Zipfel, C. (2014). Direct regulation of the NADPH oxidase RBOHD by the PRR-associated kinase BIK1 during plant immunity. *Mol Cell* 54: 43 – 55

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

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

Lee, J.S., Kuroha, T., Hnilova, M., Khatayecich, D., Kanaoka, M.M., McAbee, J.J., Sarikaya, M., Tamerler, C., Torii, K.U. (2012). Direct interaction of ligand-receptor pairs specifying stomatal patterning. *Genes Dev* 26: 126-136.

Li, L., Li, M., Yu, L., Zhou, Z., Liang, X., Liu, Z., Cai, G., Gao, L., Zhang, X., Wang, Y., Chen, S., Zhou, J.M. (2014). The FLS2-associated kinase BIK1 directly phosphorylates the NADPH oxidase RbohD to control plant immunity. *Cell Host Microbe* 15: 329-338.

Liu, B., Li, J.F., Ao, Y., Qu, J., Li, Z., Su, J., Zhang, Y., Liu, J., Feng, D., Qi, K., He, Y., Wang, J., Wang, H.B. (2012). Lysin motif-containing proteins LYP4 and LYP6 play dual roles in peptidoglycan and chitin perception in rice innate immunity. *Plant Cell* 24: 3406-3419.

Liu, Z., Wu, Y., Yang, F., Zhang, Y., Chen, S., Xie, Q., Tian, X., Zhou, J.M. (2013). BIK1 interacts with PEPRs to mediate ethylene-induced immunity. *Proc Natl Acad Sci USA* 110: 6205 – 6210.

Lu, D., Wu, S., Gao, X., Zhang, Y., Shan, L., He, P. (2010). A receptor-like cytoplasmic kinase, BIK1, associates with a flagellin receptor complex to initiate plant innate immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107: 496-501.

Macho, A.P., Schwessinger, B., Ntoukakis, V., Brutus, A., Segonzac, C., Roy, S., Kadota, Y., Oh, M.H., Sklenar, J., Derbyshire, P., Lozano-Duran, R., Malinovsky, F.G., Monaghan, J., Menke, F.L., Huber, S.C., He, S.Y., Zipfel, C. (2014) A bacterial tyrosine phosphatase inhibits plant pattern recognition receptor activation. *Science* 343: 1509–1512.

Macho, A.P., Zipfel, C. (2014). Plant PRRs and the activation of innate immune signaling. *Mol Cell* 54: 263 – 272.

Meng, X., Zhang, S. (2013). MAPK cascades in plant disease resistance signaling. *Annu Rev Phytopathol* 51: 245 – 266.

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

Mithoe, S.C., Ludwig, C., Pel, M.J., Cucinotta, M., Casartelli, A., Mbengue, M., Sklenar, J., Derbyshire, P., Robatzek, S., Pieterse, C.M., Aebersold, R., Menke, F.L. (2016). Attenuation of pattern recognition receptor signaling is mediated by a MAP kinase kinase. *EMBO J* 17: 441-454.

Miya, A., Albert, P., Shinya, T., Desaki, Y., Ichimura, K., Shirasu, K., Narusaka, Y., Kawasaki, N., Kaku, H., Shibuya, N. (2007). CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 19613-19618.

Monaghan, J., Zipfel, C. (2012). Plant pattern recognition receptor complexes at the plasma membrane. *Curr Opin Plant Biol* 15: 349 – 357.

Musielak, T.J., Bayer, M. (2014). YODA signaling in the early *Arabidopsis* embryo. *Biochem Soc Trans* 42: 408-412.

Nakagawa, T., Kurose, T., Hino, T., Tanaka, K., Kawamukai, M., Niwa, Y., Toyooka, K., Matsuoka, K., Jinbo, T., Kimura, T. (2007). Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation. *J Biosci Bioeng.* 104: 34-41.

Rasmussen, M.W., Roux, M., Petersen, M., Mundy, J. (2012). MAP kinase cascades in Arabidopsis innate immunity. *Front Plant Sci* 3: 169.

Ren, D., Yang, H., Zhang, S. (2002). Cell death mediated by mitogen-activated protein kinase pathway is associated with the generation of hydrogen peroxide in Arabidopsis. *J Biol Chem* 277: 559–565.

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

Shinya, T., Yamaguchi, K., Desaki, Y., Yamada, K., Narisawa, T., Kobayashi, Y., Maeda, K., Suzuki, M., Tanimoto, T., Takeda, J., Nakashima, M., Funama, R., Narusaka, M., Narusaka, Y., Kaku, H., Kawasaki, T., Shibuya, N. (2014). Selective regulation of the chitin-induced defense response by the Arabidopsis receptor-like cytoplasmic kinase PBL27. *Plant J* 79: 56 – 66.

Suarez-Rodriguez, M.C., Adams-Phillips, K., Liu, Y., Wang, H., Su, S.H., Jester, P.J., Zhang, S., Bent, A.F., Krysan, P.J. (2007). MEKK1 is required for flg22-induced MPK4 activation in Arabidopsis plants. *Plant Physiol* 143: 661-669.

Tang, J., Han, Z., Sun, Y., Zhang, H., Gong, X., Chai, J. (2015). Structural basis for recognition of an endogenous peptide by the plant receptor kinase PEPR1. *Cell Res.* 25: 110–120.

Wang, H., Ngwenyama, N., Liu, Y., Walker, J.C., Zhang, S. (2007). Stomatal development and patterning are regulated by environmentally responsive mitogen-activated protein kinases in Arabidopsis. *Plant cell* 19: 63-73

Willmann, R., Lajunen, H.M., Erbs, G., Newman, M.A., Kolb, D., Tsuda, K., Katagiri, F., Fliegmann, J., Bono, J.J., Cullimore, J.V., Jehle, A.K., Gotz, F., Kulik, A., Molinaro, A., Lipka, V., Gust, A.A., Nurnberger, T. (2011) Arabidopsis lysin-motif proteins LYM1 LYM3 CERK1 mediate bacterial peptidoglycan sensing and immunity to bacterial infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108: 19824-19829.

Yamada, K., Yamashita-Yamada, M., Hirase, T., Fujiwara, T., Tsuda, K., Hiruma, K., Saijo, Y. (2016a). Danger peptide receptor signaling in plants ensures basal immunity upon pathogen-induced depletion of BAK1. *EMBO J* 35: 46 – 61.

Yamada, K., Yamaguchi, K., Shirakawa, T., Nkakagami, H., Mine, A., Ishikawa, K., Fujiwara, M., Narusaka, M., Narusaka, Y., Ichimura, K., Kobayashi, Y., Matsui, H., Nomura, Y., Nomoto, M., Tada, Y., Fukao, Y., Fukamizo, T., Tsuda, K., Shirasu, K., Shibuya, N., Kawasaki, T. (2016b) The *Arabidopsis* CERK1-associated kinase PBL27 connects chitin perception to MAPK activation. *EMBO J* 35: 2468-2483.

Yamaguchi, K., Yamada, K., Ishikawa, K., Yoshimura, S., Hayashi, N., Uchihashi, K., Ishihama, N., Kishi-Kaboshi, M., Takahashi, A., Tsuge, S., Ochiai, H., Tada, Y., Shimamoto, K., Yoshioka, H., Kawasaki, T. (2013). A receptor-like cytoplasmic kinase targeted by a plant pathogen effector is directly phosphorylated by the chitin receptor and mediates rice immunity. *Cell Host Microbe* 13: 347 – 357.

Yamaguchi, Y., Huffaker, A. (2011). Endogenous peptide elicitors in higher plants. *Curr Opin Plant Biol* 14: 351 – 357.

Zhang, J., Shao, F., Li, Y., Cui, H., Chen, L., Li, H., Zou, Y., Long, L., Chai, J., Chen, S., Tnag, X., Zhou, J.M. (2007). A *Pseudomonas syringae* effector inactivates MAPKs to suppress PAMP-induced immunity in plants. *Cell Host Microbe* 1: 175–185.

Zhang, J., Li, W., Xiang, T., Liu, Z., Laluk, K., Ding, X., Zou, Y., Gao, M., Zhang, X., Chen, S., Mengiste, T., Zhang, Y., Zhou, J.M. (2010). 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.

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

謝辞

本研究を遂行するにあたり、常に労を惜しまれず、親切な御指導、御助言を賜りました近畿大学大学院農学研究科 川崎努教授に心より感謝申し上げます。

また、本論文を審査していただきました近畿大学大学院農学研究科 重岡成教授、ならびに佐渡敬教授に厚くお礼申し上げます。

実験の遂行にあたり、ベクターを分譲して頂いた香川大学農学部 市村和也准教授に深く感謝の意を表します。また、抗 PIP1 抗体を分譲して頂いた近畿大学大学院農学研究科 田茂井政宏准教授に深く感謝の意を表します。また、質量分析にご協力いただいた慶応義塾大学先端生命科学研究科 藤原正幸博士ならびにマックスプランク研究所 中神弘史博士に深く感謝の意を表します。

そして、6年間に渡り、優しく、丁寧な御指導、御助言をして下さった山口公志博士、石川和也博士、ならびに吉村(川崎) 智美博士に深く感謝致します。

最後に、研究を遂行するにあたり、ご協力いただきました植物分子遺伝学研究室の卒業生の皆様に心より感謝申し上げます。

本当にありがとうございました。