

博士論文

キュウリモザイクウイルスに対する抵抗性タンパク質
RCY1 の蓄積量を制御する分子機構の解析

東北大学大学院農学研究科

応用生命科学専攻

佐藤有希代

指導教員 高橋 英樹 教授

目次

略語一覧	2
第一章 序論	4
第二章 RCY1 タンパク質蓄積量の調節に関わる変異体の探索とその RCY1 プロモーター修飾の解析	7
第一節 緒言	7
第二節 材料と方法	10
第三節 結果	17
第一項 シロイヌナズナにおける RCY1 発現動態	17
第二項 RCY1 発現量の制御に関わるシロイヌナズナ <i>src</i> 変異体の単離	20
第三項 <i>src</i> 変異体における RCY1 プロモーター修飾の解析	28
第四節 考察	35
第三章 RCY1 タンパク質蓄積量の制御に関わる RCY1 コード領域配列の解析	37
第一節 緒言	37
第二節 材料と方法	38
第三節 結果	49
第一項 RCY1 タンパク質蓄積量の制御に関わる RCY1 遺伝子領域の同定	49
第二項 RCY1 タンパク質蓄積量の制御における RCY1 イントロン配列の役割	56
第三項 RCY1 ホモログ NB-LRR タンパク質蓄積の制御におけるイントロンの効果	62
第四節 考察	69
第四章 総合考察	71
謝辞	73
引用文献	74

略語一覧

1. 植物病理学用語

Avr	avirulence
ER	extreme resistance
HR	hypersensitive response
R	resistance

2. ウイルス

CMV	cucumber mosaic virus
CMV(Y)	yellow strain of cucumber mosaic virus

3. シロイヌナズナエコタイプ

Col-0	Columbia-0
Ler-0	Landsberg <i>erecta</i> -0

4. 遺伝子・タンパク質・変異体, 遺伝子内領域および遺伝子間領域

<i>ACT2</i>	<i>ACTIN 2</i>
<i>ADR1</i>	<i>ACTIVATED DISEASE RESISTANCE 1</i>
<i>ADR1-L1</i>	<i>ADR1-LIKE1</i>
CaMV 35S	cauliflower mosaic virus 35S RNA
<i>COR15a</i>	<i>COLD-REGULATED 15A</i>
CP	coat protein
GFP	green fluorescent protein
GUS	β -glucuronidase
HA	hemagglutinin
MEA-ISR	<i>MEDEA</i> -intergenic subtelomeric repeats
<i>NbEF-1α</i>	<i>Nicotiana benthamiana</i> <i>ELONGATION FACTOR 1α</i>
<i>PR</i>	<i>PATHOGENESIS-RELATED</i>
<i>PRF3</i>	<i>PROFILIN 3</i>
RBCL	RuBisCO large subunit
<i>RCY1</i>	<i>RESISTANCE TO CMV(Y)</i>
<i>RPP8</i>	<i>RECOGNITION OF PERONOSPORA PARASITICA 8</i>
<i>rRNA</i>	<i>ribosomal RNA</i>
<i>src</i>	<i>suppressor of RCY1-mediated resistance to CMV(Y)</i>
<i>SUP</i>	<i>SUPERMAN</i>
<i>UBQ5</i>	<i>UBIQUITIN 5</i>

5. タンパク質ドメイン

CC	coiled-coil
LRR	leucine-rich-repeat
NB	nucleotide-binding site
TIR	Toll-like/interleukin-1 receptor

6. 試薬および培地

AZA	5-azacytidine
CBB	Coomassie brilliant blue
CTAB	cetyltrimethylammonium bromide
DAB	3, 3'-diaminobenzidine
DMSO	dimethyl sulfoxide
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EMS	ethyl methanesulfonate
GTC	guanidinium thiocyanate
MS	Murashige & Skoog
SDS	sodium dodecyl sulfate
SSC	saline sodium citrate buffer
TAE	Tris-acetate-EDTA buffer
TE	Tris-EDTA buffer
TBS-T	Tris buffered saline with Tween 20
YEB	yeast extract broth
YM	yeast mannitol

7. その他

bp	base-pair
dpi	days-post inoculation
DIG	digoxigenin
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
IME	intron-mediated enhancement
kb	kilo base
NS	no significant difference
PCR	polymerase chain reaction
rpm	rotations per minute
qRT-PCR	quantitative reverse transcription-PCR
UTR	untranslated region
w/v	weight per volume
v/v	volume per volume

第一章 序論

1. 植物のウイルス病とウイルス抵抗性

植物ウイルスは、少数 (1 個から 12 個) のタンパク質をコードするゲノム核酸と、それを覆うタンパク質から成る、粒子状の病原体である (Hull 2014). 宿主植物の細胞に侵入したウイルスは、宿主の代謝に依存しながら増殖し、細胞間移行を繰り返して植物組織に広がる過程を通じて、植物に様々な病徴を引き起こす (Hull 2014). 世界の主要農作物種の生産において、植物ウイルス病がもたらしている経済的な被害は、潜在的な全生産額の 4%にも昇ると試算されている (Oerke 2006; Popp and Hantos 2011). ウイルス病による農作物の減収や品質劣化を効果的に防ぐ手段を見出すことは、農業上重要な課題の一つである.

植物が先天的に有する免疫機構を利用することは、ウイルス病を防除する重要な手段の一つである. 真核生物において、RNA サイレンシング誘導は、多様なウイルスに対する防御機構として働くことが知られている (Voinnet 2005; Ding 2010). しかしながら多くの植物ウイルスは、ウイルスゲノム由来の RNA サイレンシングサプレッサーによって、宿主の抗ウイルス RNA サイレンシングを抑制してしまう (Csorba et al. 2015). これに対して植物は、ウイルスの感染を免れるためのより特異的な免疫機構として、“品種抵抗性”を獲得してきた (Kang et al. 2005). 植物病理学において一般的に、品種抵抗性は、“抵抗性遺伝子 [Resistance (*R*) gene]”を持つ植物品種が、“非病原性遺伝子 (Avirulence gene: *Avr*)”を持つ病原体系統に対して示す抵抗性として説明されている (Flor 1971). ウイルスに対する植物の *R* 遺伝子は、遺伝様式が劣性であるものと優性であるものに大別されている. 劣性の *R* 遺伝子は、ウイルスが感染に利用する宿主タンパク質の、変異型タンパク質をコードすることが知られている (Hashimoto et al. 2016). 一方で、優性の *R* 遺伝子は、ウイルス由来の *Avr* 遺伝子産物を認識して、直接的にウイルスの増殖を阻害するタンパク質や (Ishibashi et al. 2007; Verlaan et al. 2013), 複雑な防御応答システムの活性化を誘導することで間接的にウイルス感染を抑制するタンパク質をコードしていることが知られている. 現在までに同定された、ウイルスに対する優性 *R* 遺伝子の多くは、防御応答を誘導するタイプである nucleotide-binding site-leucine-rich repeat (NB-LRR) タンパク質をコードしていることが報告されている (de Ronde et al. 2014).

2. NB-LRR 型 R タンパク質の機能

センチュウ、菌、卵菌、細菌など、他の様々な病原体に対する *R* 遺伝子に関しても、多くが、NB-LRRドメインを有するタンパク質をコードしていることが知られているため (Gururani et al. 2012), NB-LRR 型の抵抗性 (resistance: *R*) タンパク質の機能は、世界中で盛んに研究されてきた. 植物の NB-LRR 型 *R* タンパク質は、細胞内に局在し、病原体の *Avr* 遺伝子産物を間接的または直接的に認識した後、一連の防御応答を誘導する分子スイッチとして機能していると考えられている (DeYoung and Innes 2006; Takken and Tameling 2009). NB-LRR タンパク質は、N 末端に Toll-interleukin-1 receptor-like (TIR) ドメインを持つか、coiled-coil (CC) ドメインを持つかにより、2つのサブクラスに大別される (Meyers et al. 1999, 2003). これら異なるサブクラスの NB-LRR タンパ

ク質は、共通および一部異なる経路を介して、活性酸素種・植物ホルモン等のシグナル伝達因子の産生や、防御関連遺伝子 [pathogenesis-related (*PR*) genes] の発現といった、共通性の高い応答を誘導し、多様な病原体の増殖を抑制する (Cournoyer and Dinesh-kumar 2011; Cui et al. 2015).

一般的に高等植物は、ゲノム上に百個弱から千個以上のNB-LRRタンパク質をコードしていることが知られている (Marone et al. 2013; Baggs et al. 2017). これらNB-LRR遺伝子のほとんどは、何の病原体の認識に関わっているのか未解明であるが、潜在的な*R*遺伝子資源として重要であると考えられている. 近年、NB-LRR型*R*タンパク質の病原体認識範囲を改変し、新たなウイルス認識特異性を付与する遺伝子工学的研究も進んでいる (Moffett 2017). したがって、植物を保護する上で、NB-LRRクラス*R*遺伝子を利用することは、今後とも重要な位置を占めうると考えられる.

3. NB-LRRタンパク質を介したウイルス抵抗性応答 ～HRとER～

NB-LRRタンパク質を介したウイルス抵抗性の応答は、過敏感反応 (hypersensitive response: HR) 抵抗性と、高度抵抗性 (extreme resistance: ER) の2種類に大別される. HRとは、病原体が局在する組織において誘導される、細胞死をともなう防御応答のことを指す (Mur et al. 2008). 植物組織においてウイルスに対するHRが誘導されると、ウイルスの初期感染細胞を中心とした、局部壊死病斑と呼ばれるスポット状の病斑が生じ、その周縁にウイルスの感染が限定される. ウイルスに対するHR型の*R*遺伝子として、タバコの*N*遺伝子を始めとして (Whitham et al. 1994), 現在までに十数個のNB-LRRクラス*R*遺伝子が見出されている (de Ronde et al. 2014). HR抵抗性とは対照的に、ERは、組織的なウイルスの増殖と細胞死の誘導をともなわない、細胞レベルのウイルス抵抗性応答として位置づけられている. ウイルスに対するERを付与するNB-LRRクラス*R*遺伝子として、ジャガイモの*Rx*遺伝子が単離されている (Bendahmane et al. 1999). さらに、同様にERを付与する*R*遺伝子座として知られる、ジャガイモの*Ry*、ダイズの*Rsv1*や、インゲンマメの*I*は、NB-LRR遺伝子のクラスターを含むことがわかっている (Hämäläinen et al. 1997; Hayes et al. 2004; Vallejos et al. 2006).

NB-LRRタンパク質を介したウイルスに対するHRとERは、共通の機構を介していることが示唆されつつある. 例えば、前述したER誘導型の*R*遺伝子に関して、ER誘導にはHR誘導と共通のシグナル伝達因子が必要とされることや (Peart et al. 2002; Botër et al. 2007; Fu et al. 2009; Zhang et al. 2012), *Avr*遺伝子とともに異所的に過剰発現させることでHR様細胞死を誘導することが知られている (Bendahmane et al. 1999; Mestre et al. 2000). 対照的に、HR誘導型のNB-LRRクラス*R*遺伝子として単離された、シロイヌナズナの*HRT*および*RCY1*や、ピーマンの*L3*を過剰発現させた植物に、*Avr*遺伝子を持つウイルスを接種すると、ERが誘導されることが示されている (Cooley et al. 2000; Sekine et al. 2008; Tomita et al. 2011). ウイルス抵抗性の強さ (HRかERか) を制御することは、自然界における植物の生存戦略上において、また、我々が植物保護において*R*遺伝子を利用する上で、極めて重要であると考えられる. 一方で植物が、NB-LRRタンパク質を介したウイルス抵抗性の強さをどのように制御しているのか、分子レベルでの理解は十分に得られていない.

4. NB-LRR 型 R タンパク質 RCY1 を介した CMV 抵抗性と本研究の目的

キュウリモザイクウイルス (cucumber mosaic virus: CMV) は、農作物種を含む 100 科 1300 種以上の植物種を宿主とする、植物病理学上極めて重要とされるウイルス病原体の一つである (Gallitelli 2000; Scholthof et al. 2011). CMV は、3 分節の一本鎖 RNA ウイルスであり、ゲノム上に複製タンパク質、サイレンシングサブプレッサータンパク質、細胞間移行タンパク質、および外被タンパク質 (coat protein: CP) をコードしている (Jacquemond 2012). シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) のエコタイプ C24 から、CMV 黄斑系統 [CMV(Y)] に対する CC-NB-LRR サブクラスの R 遺伝子として、*RESISTANCE TO CMV(Y) (RCY1)* が単離されている (Takahashi et al. 2002). *RCY1* に対する Avr 因子は、CMV(Y) の CP であることが示されている (Takahashi et al. 2001). エコタイプ C24 は、CMV に対して HR 型の抵抗性を示す (Takahashi et al. 1994, 2002). 一方で、シロイヌナズナの最も代表的なエコタイプである Columbia-0 (Col-0) は、*RCY1* を持たないため、CMV(Y) に対して罹病性を示す (Takahashi et al. 1994, 2002). 先行研究において、ヘマグルチニン (HA) エピトープ配列を付加した *RCY1* 遺伝子 (*RCY1-HA*) を形質転換した Col-0 系統 (Col::p*RCY1-HA*) が作出されている (Sekine et al. 2008). Col::p*RCY1-HA* 系統において、*RCY1* タンパク質蓄積量は、CMV(Y) に対する抵抗性の強さ、および HR 誘導によって形成される局部壊死病斑の縮小の程度に相関することがわかっている (Sekine et al. 2008). 特に、*RCY1* タンパク質を過剰蓄積している系統は、CMV(Y) に対して ER を示す (Sekine et al. 2008). Col::p*RCY1-HA* の系は、分子レベルでの解析基盤が最も充実しているモデル植物のシロイヌナズナにおいて、ウイルスに対する ER の研究を行うことができる、優れた実験系である. 以上のことから、*RCY1* タンパク質蓄積量を制御する分子システムを解析することで、植物がウイルス抵抗性の強さを制御する分子基盤に関して、具体的な知見を得ることができると考えられる.

そこで本研究では、*RCY1* タンパク質蓄積量を制御する分子機構を明らかにすることを目的とした. 第二章において、転写レベルでの制御機構として、*RCY1* の転写調節に関わる変異体を単離し、その変異体において *RCY1* プロモーター修飾の役割を明らかにした. 第三章において、翻訳レベルでの制御機構として、プロモーター以外の *RCY1* 遺伝子領域が、*RCY1* タンパク質蓄積量の転写後調節において果たす役割を明らかにした.

第二章 RCY1 タンパク質蓄積量の調節に関わる変異体の探索とその RCY1 プロモーター修飾の解析

第一節 緒言

1. NB-LRR 遺伝子の発現調節の役割

一般的に、NB-LRR タンパク質の蓄積量を厳密に制御することは、植物の生存戦略上、重要であると考えられる。Avr 遺伝子を持つ病原体が存在しない状況において、NB-LRR 型 R 遺伝子の存在がフィットネスクストとなる例が知られている (Tian et al. 2003; Karasov et al. 2014)。NB-LRR 遺伝子を異所的に過剰発現させることで、病原体の認識に関わらず防御応答が自動的に活性化され、植物体の細胞死や形態異常がもたらされる例もある (Bendahmane et al. 2002; Shirano et al. 2002; Takahashi et al. 2012b)。対照的に、植物において NB-LRR 型 R 遺伝子の発現量を増加させると、Avr 遺伝子を持つ病原体や (Cooley et al. 2000; Sekine et al. 2008)、様々な病原体に対する抵抗性が増強される例が知られている (Oldroyd and Staskawicz 1998; Tao et al. 2000; Grant et al. 2003)。したがって、NB-LRR 型 R タンパク質の蓄積量は、病原体非存在下における生育上のコストと、病原体存在下でもたらされる免疫誘導上のベネフィットのバランスのもと、決定されていると考えられる。

病原体感染時に R 遺伝子発現を誘導することは、R 遺伝子を持つコストとベネフィットのバランスをとる戦略の一つであると考えられている。一部の NB-LRR 遺伝子の発現は、マイクロ RNA による制御を受けており、ウイルスや病原性細菌の感染にともなって RNA サイレンシングが抑制された際に、誘導されることが示されている (Shivaprasad et al. 2012; Li et al. 2012)。また、防御応答のシグナル伝達因子であるサリチル酸に応答して、NB-LRR 遺伝子の転写活性が上昇する例が知られている (Shirano et al. 2002; Yang and Hua 2004; Mohr et al. 2010)。反対に、病原体感染時に、転写レベルが変動しない R 遺伝子の例も報告されている (Boyes et al. 1998; Ayliffe et al. 1999; Collins et al. 1999; Mes et al. 2000)。さらには、シロイヌナズナにおける網羅的遺伝子発現解析によって、サリチル酸により発現が誘導されるのは、NB-LRR 遺伝子全体の 1 割程度にとどまることが示唆されている (Tan et al. 2007)。したがって一般的に、植物が病害抵抗性を発揮する上で、R 遺伝子発現が転写レベルで誘導される必要は必ずしもないと考えられる。本章の結果の第一項においては、RCY1 を介した CMV(Y)抵抗性において、RCY1 の発現が誘導されるかどうか、解析を行った。

2. RCY1 遺伝子の発現調節に関わる因子探索のアプローチ

NB-LRR 遺伝子の発現は、転写因子を介した調節だけでなく、転写調節や転写後調節に関わる様々な因子による制御を受けていることが明らかにされつつある (Li et al. 2015)。そこで本研究において、RCY1 遺伝子の発現調節において重要な役割を果たす因子を、順遺伝学的に同定することを試みた。先行研究において、化学変異原である ethyl methanesulfonate (EMS) を処理したエコタイプ C24 の後代から、CMV(Y)に対する抵抗性を失った変異体をスクリーニングすると、RCY1 タンパク質自体の機能を喪失する変異体のみが単離されることが明らかになっている (Sekine et al. 2006) (図 1A)。したがって、RCY1 タンパク質の上流で働く新規な宿主因子の変異体を単離するためには、

新たなスクリーニング系を考案する必要があった。エコタイプ C24 は、*RCY1* 遺伝子を 1 コピーしか持たない。一方で、*RCY1* を多コピー有する植物系統に変異を誘発すれば、多コピー同時に変異が入る確率は低いと考えられるため、一部の *RCY1* タンパク質の機能が喪失しても、他の正常な *RCY1* タンパク質の働きにより *CMV(Y)* 抵抗性が保たれることが予想される (図 1B)。したがってこの際に *CMV(Y)* 抵抗性を失う変異体は、*RCY1* タンパク質上流で働く因子に変異を持ち得ると考えられる (図 1B)。そこで本研究では、*RCY1* を 10 コピー有しており、*CMV(Y)* に対して ER を示す、Col::p*RCY1*-HA#13 系統に着目した。本章の結果の第二項では、Col::p*RCY1*-HA#13 に EMS を処理して、*RCY1* 発現調節に異常をきたしたために、*CMV(Y)* に対する ER を失う *RCY1* サプレッサー変異体、*suppressor of RCY1-mediated resistance to CMV(Y)* (*src*) をスクリーニングした。さらに結果の第三項では、第二項で確立した変異体が、どのような機構を介して *RCY1* 発現調節に関与しているのか解析した。

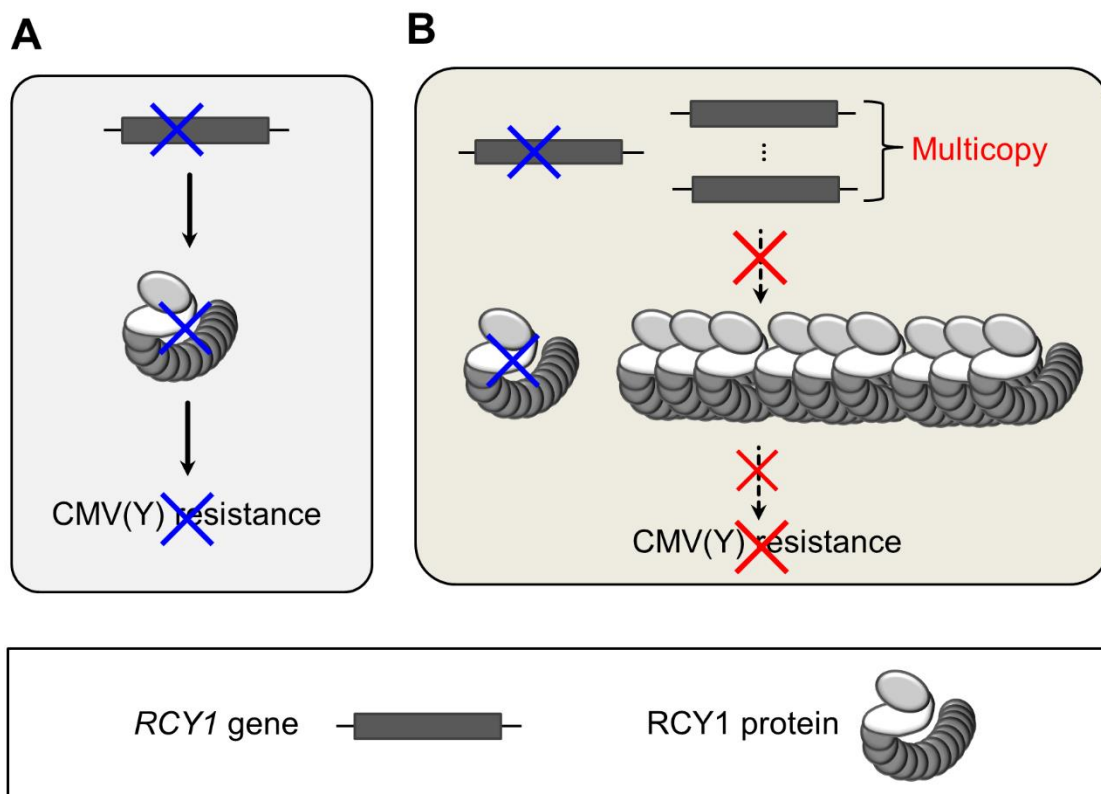


図 1. *src* 変異体のスクリーニングのアプローチの模式図.

A, 1 コピーの *RCY1* を持つシロイヌナズナエコタイプ C24 における遺伝学的スクリーニング系の模式図. 本系において, CMV(Y)抵抗性を失うエコタイプ C24 の変異体は, *RCY1* 遺伝子に生じた変異により, *RCY1* タンパク質自体の機能を喪失する (青色の×印) (Sekine et al. 2006). **B**, *RCY1* を多コピー有する植物系統を用いて, *RCY1* タンパク質蓄積の調節機構に異常を持つ変異体を単離する新規スクリーニング戦略の模式図. 本系において, 1 コピーの *RCY1* 遺伝子に変異が生じても (青色の×印), その他の *RCY1* コピーにコードされる *RCY1* タンパク質の働きにより, CMV(Y)抵抗性が保たれ得る. このとき, CMV(Y)抵抗性が失われる変異体は, *RCY1* タンパク質上流または下流で働く因子に変異を持ち得る (赤色の×印).

第二節 材料と方法

1. CMV(Y)接種源の調製と接種

本研究には、キュウリモザイクウイルス (cucumber mosaic virus) の黄斑系統 [CMV(Y)] (Tomaru, K., and Hidaka 1960) を供試した。接種源は、タバコ (*Nicotiana tabacum*) の Xanthi-nc 品種の CMV(Y)接種葉から粗精製した。接種源調製用のタバコは、昼夜温 26°C/21°C, 14 時間光周期 (10,000 lux) で栽培した。3 カ月齢のタバコに CMV(Y)を接種し、5 日後 [5 days post inoculation (dpi)] に接種葉を採種した。CMV(Y)感染葉に生重量の 4 倍のウイルス精製用バッファー [0.25 M クエン酸ナトリウム (pH 6.5), 50% (v/v) クロロホルム, 5 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (pH 8.0), 0.05% (v/v) 2-メルカプトエタノール] を加え、氷冷しながらホモジェナイザーで 12,000 rpm, 5 分間摩砕した。摩砕液を 4°C, 6,000 rpm で 10 分間遠心分離した。セルロース透析膜に上清を入れ、4°Cの 5 mM ホウ酸バッファー (pH 9.0) で 1 晩透析した。精製液は-80°Cで保存し、接種時に融解して使用した。タバコやシロイヌナズナの完全展開葉の向軸面に、600 mesh カーボランダムを散布し、綿棒でウイルス液を数回こすりつけて CMV(Y)を摩擦接種した。

2. シロイヌナズナ試料

(1) シロイヌナズナ試料と栽培

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の野生型エコタイプとして Col-0 および C24 を使用した。また、エコタイプ Col-0 をバックグラウンドとした形質転換体として、Col::pRCY1-HA (Sekine et al. 2008) の独立 4 系統 (Col::pRCY1-HA#8, #12, #13, #15) を用いた。また、本研究で確立した *src* 変異体やその交配後代については、次の項目に記す。120°Cで 20 分間オートクレーブ滅菌した PRO-MIX BX (Premier Tech Horticulture, Ltd., Quakertown, PA, USA) に、これらのシロイヌナズナ系統の種子を播種し、25°C・連続照光下 (8,000 lux) で栽培した。

(2) EMS 変異誘発による *src* 変異体のスクリーニング

Col::pRCY1-HA#13 の種子に 0.02% (v/v) Triton X-100 を処理した後、蒸留水で洗浄した。洗浄後の種子を 0.1% (v/v) EMS 中で 15 時間攪拌した後、蒸留水で 1 時間以上洗浄した。蒸留水を変え、洗浄を 3 回以上繰り返した。洗浄終了後、栽培土に播種し、通常通りに栽培した (M_1 植物)。 M_1 植物を 100 個体程度まとめて、 M_2 種子をバルク採種した。 M_2 植物 1 個体につき 1 枚の葉に、主脈を避けて CMV(Y)を接種した。接種 32 時間後に接種葉を切断し、Tissue printing 法により、抗体を用いて CMV-CP 蓄積を検出した。接種葉において CMV(Y)の感染が検出された個体を *src* 変異体候補とした。 M_2 植物の自殖後代である M_3 植物において、同様に CMV(Y)の感染が認められる系統を二次選抜した。結果的に、異なる M_1 バルク集団に由来する *src* 変異体独立 5 系統 (Col::pRCY1-HA#13 *src1* , Col::pRCY1-HA#13 *src2* , Col::pRCY1-HA#13 *src3* , Col::pRCY1-HA#13 *src4* および Col::pRCY1-HA#13 *src5*) を確立した。以降は、それぞれを *src1*, *src2*, *src3*, *src4* および *src5* という略称で表記する。また、コントロールとして、スクリーニングの過程で CMV(Y)接種葉において CMV-CP 蓄積が検出されなかった個体からランダムに 3 個体を選抜し、自

殖した系統 (ER1, ER2 および ER3) を確立した. これら *src* 変異体と ER 系統の M₄ 世代の植物体を用いて, 表現型の解析を行った.

また, *src* 変異形質の遺伝分析を行うため, Col::pRCY1-HA#13 に M₃ 世代の各 *src* 変異体を交配した. 6 種類の組み合わせ: Col::pRCY1-HA#13 × *src1*; Col::pRCY1-HA#13 × *src2*; *src2* × Col::pRCY1-HA#13; Col::pRCY1-HA#13 × *src3*; Col::pRCY1-HA#13 × *src4*; および Col::pRCY1-HA#13 × *src5* の交配系統を確立した. 交配後代 F₁ に加え, F₁ の自殖により得られた F₂ 系統において, 表現型の解析を行った.

3. CMV-CP の検出

(1) CMV-CP 抗体の調製

CMV 粒子を構成するサブユニットタンパク質である CMV-CP に対する抗体を, 以下の通りに調製した. まず, タバコ Xanthi-nc 品種の CMV(Y)接種葉 (5 dpi) から, 以下に示すように, 超遠心で CMV(Y)の粒子を精製した. 60 g の CMV(Y)接種葉に, 生重量の 4 倍のウイルス精製用バッファーを加え, ホモジェナイザーを用いて, 氷冷しながら 12,000 rpm で 5 分間摩砕した. 摩砕液を 4°C, 7,000 rpm で 10 分間遠心分離した. 水層を取り出し, 4°C, 38,000 rpm で 90 分間遠心分離した. テフロンホモジェナイザーにペレットを移し, 5.7 ml のバッファー [10 mM リン酸カリウム (pH 7.2), 2 mM EDTA (pH 8.0)] を加えて, 4°Cで一晩かけて懸濁した. 懸濁液を 4°C, 7,000 rpm で 10 分間遠心分離した. 上清に 1/5 量のバッファー [10 mM リン酸カリウム (pH 7.2), 2 mM EDTA (pH 8.0), 5% (v/v) Triton-X] を混合し, 4°C, 38,000 rpm で 90 分間遠心分離した. ペレットを取り出し, 500 μl のバッファー [10 mM リン酸カリウム (pH 7.2), 2 mM EDTA (pH 8.0)] に懸濁した. 外部委託により, 精製 CMV(Y)溶液を用いて, CMV(Y)粒子を抗原とするウサギ抗体を作製した.

(2) Tissue printing 法による CMV-CP の検出

Tissue printing 法 (Takahashi et al. 2002) により, CMV(Y)接種植物における CMV-CP 蓄積の局在を可視化した. 接種葉において CMV(Y)が増殖するかどうかを調べる上では, 3 週齢のシロイヌナズナ の完全展開葉に CMV(Y)を接種した. 植物体全身に CMV(Y)が移行するかどうかを調べる上では, 2 週齢のシロイヌナズナの本葉第一葉および第二葉のみに CMV(Y)を接種した. それぞれ, CMV(Y)接種葉または植物体全身の汁液を濾紙に転写し, Takahashi et al. (2002) と同様の手順で, 抗体を用いて CMV-CP を検出した.

(3) ELISA 法による CMV-CP の定量

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法により, CMV-CP を定量した. 生重量の 50 倍 (w/v) の 50 mM Na₂CO₃ (pH 9.6) で, シロイヌナズナの CMV(Y)接種葉 (3 dpi) を摩砕した. Protein Assay Dye Reagent (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) を用いて, Bradford 法 (Bradford 1976) により, 摩砕液に含まれる総タンパク質量を測定した. マイクロアッセイプレート (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) の各ウェルに, 総タンパク質濃度が 0.3 mg/ml

の摩砕液を 200 μ l ずつ入れ、1 時間静置した。Tris buffered saline with Tween 20 (TBS-T) で、各ウェルを 3 回洗浄した。タバコ摩砕液 (生重量の 10 倍の TBS-T でタバコ健全葉を摩砕した液) で 10,000 倍希釈した抗 CMV-CP 抗体液を 200 μ l を加え、1 時間静置した。TBS-T で 3 回洗浄した後、0.2 μ g/ml Anti-Rabbit IgG (Fc), AP conjugate (Promega Corp., Madison, WI, USA) を含む TBS-T を 200 μ l を加え、1 時間静置した。TBS-T で 3 回洗浄した後、200 μ l の発色基質液 [1 mg/mL (w/v) *p*-ニトロフェニルリン酸二ナトリウム, 10% (v/v) ジエタノールアミン (pH 9.0)] を加えた。発色開始 30 分後の 405 nm 吸光度を測定し、相対的な CMV-CP 蓄積量とした。

4. RCY1-HA タンパク質の検出

ウェスタンブロッティング法により、HA エピトープ標識 RCY1 タンパク質 (RCY1-HA) の検出および定量を行った。3 週齢のシロイヌナズナの完全展開葉 2 枚から、直径 6 mm のリーフディスクを 1 枚ずつ採取した。100 μ l の抽出バッファー [25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10% (v/v) グリセロール, 1 mM EDTA (pH 8.0), 150 mM NaCl, 10 mM ジチオスレイトール] で 2 枚のリーフディスクを摩砕した。Bradford 法 (Bradford 1976) によって総タンパク質蓄積量を測定し、全てのサンプルを同一の濃度に希釈した。摩砕液に等量の 2 \times サンプルバッファー [100 mM Tris-HCl (pH 6.8), 4% (w/v) ドデシル硫酸ナトリウム (sodium dodecyl sulfate: SDS), 20% (v/v) グリセロール, 0.12% (v/v) 2-メルカプトエタノール, 0.005% (w/v) ブロモフェノールブルー] を混合し、5 分間ボイルした。12,000 rpm, 5 分間の遠心分離によって得られた上清のうち、20 μ l を 10% (w/v) ポリアクリルアミドゲルで分離した。電気泳動後、セミドライブロッティング装置を用いて、バッファー [10 mM *N*-Cyclohexyl-3-aminopropanesulfonic acid (CAPS, pH 11.0), 10% (v/v) メタノール] を介して PVDF メンブレン (Immobilon-P, GE Healthcare UK Ltd., Amersham Place, UK) にゲル上のタンパク質を転写した。転写終了後、5% (w/v) スキムミルクを含む TBS-T [20 mM Tris-HCl (pH 7.6), 150 mM NaCl, 0.05% (v/v) Tween 20] 中で、メンブレンを 30 分間振とうした。TBS-T で 3 回洗浄した後、10 mU/ml Anti-HA-Peroxidase, High Affinity (F. Hoffmann-La Roche Ltd., Basel, Switzerland) および 5% スキムミルクを含む TBS-T で、メンブレンを 30 分間振とうした。TBS-T で 3 回洗浄した後、発色基質 Western BLoT Quant HRP Substrate (タカラバイオ株式会社, 草津, 日本) にメンブレンを浸した。Molecular Imager VersaDoc MPTM 4000 System (Bio-Rad Laboratories, Inc.) により、メンブレン上の化学発光を検出した。ソフトウェア Quantity One[®] (Bio-Rad Laboratories, Inc.) により、バンドの相対濃度を定量化することで、RCY1-HA タンパク質の相対蓄積量を数値化した。

5. RCY1 および PR-1 転写産物の検出

(1) GTC 法による total RNA の抽出

マルチビーズショッカーを用いて急速凍結した葉を摩砕し、6 倍量の抽出バッファー [4.2 M グアニジンチオシアン酸塩 (guanidinium thiocyanate: GTC), 0.5% (w/v) *N*-ラウロイルサルコシン酸ナトリウム, 25 mM クエン酸三ナトリウム二水和物, 1.6% (v/v) 2-メルカプトエタノール] と混合した。フェノール・クロロホルム抽出と 2-プロパノールによる沈殿を経た後、ペレットを滅菌水に溶解した。1/4 倍

量の 10 M 塩化リチウムを加えて、4°Cで 30 分間以上静置した後、12,000 rpm で 20 分間遠心分離した。沈殿物を 70% (v/v) エタノールでリンスして乾燥させた後、少量の滅菌水に溶解した。

(2) ノーザンブロッティング法による *RCY1*, *PR-1* 転写産物の検出

CMV(Y)接種 0, 0.5, 1, 2, 3 日後の接種葉全体を摩砕し、total RNA を抽出した。RNA 変性液 [12 µg total RNA, 1 M グリオキサール, 1× Tris-acetate-EDTA buffer (TAE), 50% (v/v) ジメチルスルホキシド (dimethyl sulfoxide: DMSO)] を 65°Cで 10 分間インキュベートし、氷冷した後、1/4 量の 5× Loading buffer [50% (v/v) グリセロール, 1× TAE, 0.04% (w/v) ブロモフェノールブルー, 0.04% (w/v) キシレンシアノール] と混合した。サンプルを 1.2% (w/v) アガロースゲルにアプライし、1× TAE 中で 100 V 定電圧で泳動した。20× saline sodium citrate buffer (SSC) を用いたキャピラリーブロッティングにより、ナイロンメンブレン (Hybond-N+, GE Healthcare UK Ltd.) にゲル中の RNA 断片を転写した。ブロッティング終了後、メンブレンを 50 mM NaOH に 15 秒間浸すことで、グリオキサールを除去した。2× SSC-0.2 M Tris-HCl (pH 7.5) に浸して中和した後、UV クロスリンカーを用いてメンブレンに RNA を固定した。メンブレンを風乾した後、ハイブリダイゼーションバッファー [50%ホルムアミド, 5× sodium chloride-sodium phosphate-EDTA (SSPE), 0.5% (w/v) SDS, 10× denhard's solution, 1 mg/ml salmon sperm DNA] に浸し、42°Cで数時間振とうした。さらに、ハイブリダイゼーションバッファーに熱変性させた digoxigenin (DIG) 標識 DNA プローブを加えて、42°Cで一晩振とうした。プローブは、DNA ラベリングミックス (F. Hoffmann-La Roche Ltd.) を用いた polymerase chain reaction (PCR) により DIG 標識した。*RCY1* 転写産物を検出するプローブは、*RCY1* の 3'-UTR 領域内の特異的配列を増幅する以下のプライマー対を用いて調製した。

RCY1utr3-F: 5'-GATAGAGGCTGCTTCACAAAAG-3'

RCY1utr3-R: 5'-AAGGCACAACATAACGATGCAC-3'

シロイヌナズナの *PATHOGENESIS-RELATED GENE 1 (PR-1, At2g14610)* および *18S ribosomal RNA (rRNA)* 転写産物は、先行研究 (Takahashi et al. 2012a) と同様のプローブを用いて検出した。ハイブリダイゼーション終了後、2× SSC-0.1% (w/v) SDS にメンブレンを浸して 10 分間振とうすることを 2 回繰り返した後、0.1× SSC-0.1% (w/v) SDS に浸して 55°Cで 20 分間振とうすることを 2 回繰り返して、未反応プローブを洗浄した。さらに、メンブレンに以下の反応液を順番に処理した。Dig buffer 1 [100 mM マレイン酸 (pH 7.5), 150 mM NaCl] 中で 5 分間振とうすることを 2 回繰り返した。ブロッキング溶液 [1% Blocking reagent (F. Hoffmann-La Roche Ltd.), 100 mM マレイン酸 (pH 7.5), 150 mM NaCl] 中で 30 分間振とうした後、75 mU/ml Anti-Digoxigenin-AP, Fab fragments (F. Hoffmann-La Roche Ltd.) を含むブロッキング溶液中で 30 分間振とうした。洗浄バッファー [100 mM マレイン酸 (pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.2% (v/v) Tween 20] 中で 5 分間振とうすることを 2 回繰り返した。Dig buffer 3 [100 mM Tris-HCl (pH 9.5), 50 mM MgCl₂, 100 mM NaCl] で 3 分間振とうした後、CDP-Star working solution (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, USA) に 5 分間浸した。Molecular Imager VersaDoc MP™ 4000 System (Bio-Rad Laboratories, Inc.) を用いて、

メンブレン上の化学発光を検出した。

(3) リアルタイム qRT-PCR 法による *RCY1* 転写産物の定量

リアルタイム定量 (quantitative: q) 逆転写 PCR (reverse transcription-PCR: RT-PCR) 法により, *RCY1* 転写産物の相対蓄積量を測定した. PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (タカラバイオ株式会社) を用いて, total RNA を鋳型として逆転写反応を行った. 得られた cDNA を鋳型として, SYBR® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus) (タカラバイオ株式会社) を用いて, 10 µl の PCR 反応液を調製した. Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific Inc.) を使用して, 95°C・30 秒間→(95°C・5 秒間→60°C・31 秒間) × 40 サイクルの反応における PCR 産物の増幅量を測定した. 以下のプライマー対により, *RCY1* 遺伝子およびシロイヌナズナの *UBQ1TIN5* (*UBQ5*, At3g62250) 遺伝子をそれぞれ検出した.

RCY1-HA.F: 5'-GAGTTGGGATTGGCAGTATC-3'

RCY1-HA.R: 5'-CCAGCGAAAGCCTTATTTGAC-3'

RTUBQ5-F1: 5'-GATCGATCCTTCTCTTTCTCTCTTATC-3'

RTUBQ5-R1: 5'-GTTCAACATAGAATCCATGATAACTCAAA-3'

シロイヌナズナ各系統における *RCY1* 転写産物の相対蓄積量を, *UBQ5* 転写産物の相対蓄積量で標準化した。

6. *RCY1* トランスジーンコピー数の推定

(1) CTAB 法によるゲノム DNA の抽出

300 µl の 2% Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) solution [100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 20 mM EDTA (pH 8.0), 1.4 M NaCl, 2% (w/v) CTAB] で, 3 週齢のシロイヌナズナの完全展開葉を摩砕し, 65°C で 30 分間インキュベートした. クロロホルム抽出を 2 回行って水層を取り出した後, 1.5 倍量 (v/v) の 1% CTAB solution [50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA (pH 8.0), 1% (w/v) CTAB] と混合し, 1 時間以上静置した. 8,000 rpm, 10 分間遠心分離して得られたペレットを 100 µl の Tris-EDTA buffer (TE) [10 mM EDTA (pH 8.0), 50 mM Tris-HCl (pH 8.0)] に懸濁した. エタノール沈殿により得たペレットを RNaseA (10 µg/ml) を含む TE に溶解し, 37°C で 30 分間インキュベートした. フェノール・クロロホルム抽出およびエタノール沈殿により RNaseA を除去した後, ペレットを TE に溶解した。

(2) リアルタイム PCR 法による *RCY1* トランスジーンコピー数の推定

リアルタイム PCR 法により, シロイヌナズナ各系統のゲノムに含まれる *RCY1* トランスジーンのコピー数を推定した. CTAB 法により抽出したゲノム DNA を鋳型として, リアルタイム qRT-PCR 法による *RCY1* 転写産物の定量と同様の手順で (p. 14), リアルタイム PCR を行った. 用いたプライマー配列も同様である. シロイヌナズナ各系統における *RCY1* 遺伝子の相対コピー数を, *UBQ5* 遺伝子の相対コピー数で標準化した。

7. トリパンブルー染色による死細胞の検出

HR 細胞死を染色するため、トリパンブルー染色液 [12.5% (w/v) フェノール, 12.5% (v/v) グリセロール, 12.5% (v/v) 乳酸, 50% (v/v) エタノール, 0.01% (w/v) トリパンブルー] に、シロイヌナズナの mock または CMV(Y) 接種葉を入れ、5 分間ボイルした。室温に戻した後、1.0 g/ml 抱水クロラルに葉を移し、数日間穏やかに振とうしてバックグラウンドを脱色した。

8. DNA メチル化の解析

(1) サザンブロッティング法による *RCY1* シトシンメチル化の解析

各植物系統の葉から CTAB 法 (p. 14) によって抽出したゲノム DNA を、メチル化感受性制限酵素である *Hpy*CH4IV または *Sau*3AI により、一晩かけて消化した。消化 DNA 断片を 2.0% (w/v) アガロースゲルにアプライし、1× TAE 中で 100 V 定電圧で泳動した。アルカリ溶液 (1 M NaCl, 0.4 N NaOH) を用いて、ナイロンメンブレン (Hybond-N+, GE Healthcare UK Ltd.) に、ゲル中の DNA 断片をキャピラリーブロッティングした。ブロッティング終了後、メンブレンを 2× SSC ですすいだ。UV クロスリンカーを用いてメンブレンに DNA を固定した。メンブレンを風乾した後、ノーザンブロッティング法の場合と同様に (pp. 13-14), メンブレン上の DNA 断片に DIG 標識 DNA プローブをハイブリダイズした。*RCY1* プロモーター領域を検出するプローブは、以下のプライマー対を用いて増幅した。

*RCY1*p-F: 5'-GATAGAGGCTGCTTCACAAAAG-3'

*RCY1*utr5-R: 5'-AAGGCACAACATAACGATGCAC-3'

ハイブリダイゼーション終了後、メンブレンに以下の反応液を処理した。まず、2× SSC-0.1% (w/v) SDS で 5 分間振とうした。さらに、0.1× SSC-0.1% (w/v) SDS で 55°C・10 分間振とうすることを 2 回繰り返して、プローブを洗浄した。以降は、ノーザンブロッティング法における方法と同様に (pp. 13-14), Anti-Digoxigenin-AP, Fab fragments (F. Hoffmann-La Roche Ltd.) による抗体反応と発色基質による化学発光の検出を行った。

(2) バイサルファイトシーケンス法によるシトシンメチル化の解析

まず、各植物系統の葉から CTAB 法 (p. 14) によって抽出したゲノム DNA に、バイサルファイト変換を施した。Methylamp DNA Modification Kit (EpiGentek Group Inc., Farmingdale, NY, USA) または Epiect Bisulfite Kit (Qiagen Inc., Hilden, Germany) により、1 サンプルにつき 200 ng のゲノム DNA をバイサルファイト変換した。バイサルファイト変換 DNA を鋳型として、KOD -Multi & Epi- (東洋紡株式会社, 大阪, 日本) を用いて PCR を行った。プライマー対 *RCY1*-BiF3 および *RCY1*-BiR3 により、*RCY1* 開始コドン上流 343-base から下流 5-base までを含む領域 (*RCY1* region I) のセンス鎖を増幅した。プライマー対 *RCY1*-BiF2 および *RCY1*-BiR2.1 により、*RCY1* 第二イントロンと第三エキソンの境界の上流 177-base から下流 118-base までを含む領域 (*RCY1* region II) のセンス鎖を増幅した。プライマー対 SUP-BiF1 および SUP-BiR2 により、*SUPERMAN* (*SUP*, At3g23130) 遺伝子の 5' 側領域を増幅した。プライマー対 MEA-ISR-BiF および MEA-ISR-BiR (Cao and Jacobsen 2002) により、*MEDEA* (*MEA*; At1g02580) 遺伝子と At1g02590 遺伝子の間の領域である *MEDEA*-intergenic

subtelomeric repeats (MEA-ISR) を増幅した. 以下にプライマー配列を示す.

RCY1-BiF3: 5'-AATGATAGGAYTGGGTYAATAGTT-3'

RCY1-BiR3: 5'-CCCAAACRACACAAATCCTTCA-3'

RCY1-BiF2: 5'-TTATGGTTTATTYATGATTGGTTTG-3'

RCY1-BiR2.1: 5'-TCAAAAACCTCTTTTCCACTCA-3'

SUP-BiF1: 5'-TAAGATGGGGATTTGATAATG-3'

SUP-BiR2: 5'-CAATTATCATAATCTCCATARCTCC-3'

MEA-ISR-BiF: 5'-AAAGTGGTTGTAGTTTATGAAAGGTTTTAT-3'

MEA-ISR-BiR: 5'-CTTAAAAAATTTCAACTCATTTTTTTTAAAAAA-3'

PCR 産物は, TArget Clone™ -Plus- (東洋紡株式会社) を用いて pTA2 ベクターに挿入したのち, *Escherichia coli* DH5α 系統に形質転換した. 抗生物質入り培地によって選抜した *E. coli* のシングルコロニーから, 標準的なミニプレップ法 (Green and Sambrook 2012) に従って, プラスミド DNA を抽出した. GenomeLab™ DTCS Quick Start Kit (Beckman Coulter, Inc. Brea, CA, USA), プラスミド DNA および M4 プライマー (5'-GTTTTCCAGTCACGAC-3') を用いて, サンガー法によるシーケンス反応を行った. シーケンス反応産物は, CEQ™ 8,000 Genetic Analysis System (Beckman Coulter, Inc.) によって解析した. 1 か所あたり, 8 クローン, 12 クローンまたは 15 クローンの配列を解析した. 最後に, ソフトウェア Kismeth (Gruntman et al. 2008) により, メチル化シトシンの分布と割合を可視化および数値化した. 統計解析ソフト R (R Core Team 2014) を用いた 1000 反復のブートストラップ解析により, シーケンスを解析したクローンのサンプリングバイアスを評価した. 解析に用いた R スクリプトは, <https://github.com/ShuheMiyashita/MethylationBootstrap/> に保存した.

9. シロイヌナズナに対するシトシンメチル化阻害剤の処理

DNA メチル化阻害剤である 5-azacytidine (AZA) のストック溶液は, 用時に終濃度 100 mM で DMSO に溶解した. シロイヌナズナの種子を 2% の次亜塩素酸で 5 分間表面殺菌した後, 滅菌水で 5 回洗浄した. 1% (w/v) スクロース, 0.8% (w/v) 寒天および 0.2 mM AZA を含む 0.5× Murashige & Skoog (MS) 培地 (Murashige and Skoog 1962) に, 殺菌種子を撒いた. 陰性対照として, AZA を除いた同培地に, 同様に種子を撒いた. 播種後 3 週間後の植物体の葉を用いて, RCY1 タンパク質蓄積, RCY1 転写産物量および RCY1 region I のメチル化シトシン割合を解析した. RCY1 転写産物量は, UBQ5 ではなく, AZA の影響を受けない ACTIN2 (ACT2, AT3G18780) の転写産物量によって標準化した. ACT2 転写産物は, 以下のプライマー対を用いて検出した.

AtACT-F: 5'-ATCGGTGGTTCCATTCTTGCT-3'

AtACT-R: 5'-GCTTTTAAAGCTTTTGATCTTGAGAG-3'

第三節 結果

第一項 シロイヌナズナにおける *RCY1* 発現動態

1. HR 誘導時における *RCY1* 発現変動

RCY1 を持ち、CMV(Y)に対して HR 抵抗性を示すシロイヌナズナのエコタイプ C24 と、*RCY1* を持たず、CMV(Y)罹病性であるエコタイプ Col-0 において、DIG 標識 *RCY1* プローブを用いたノーザンハイブリダイゼーションにより、*RCY1* 転写産物を検出した。エコタイプ C24 の CMV(Y)接種葉における HR の進展にともなって、*RCY1* 転写産物量は上昇しなかった (図 2)。CMV(Y)に対して HR 抵抗性を示す *RCY1* 形質転換体の Col::p*RCY1*-HA#12 系統 (Takahashi et al. 2012a) においても同様に、*RCY1* 転写産物を検出した。エコタイプ C24 における結果と同様に、Col::p*RCY1*-HA#12 系統の CMV(Y)接種葉においても、*RCY1* トランスジーン発現量は変動しなかった (図 2)。一方で、エコタイプ C24 と Col::p*RCY1*-HA#12 系統の CMV(Y)接種葉において、HR 誘導の典型的なマーカー遺伝子である *PR-1* の発現は明らかに上昇していた (図 2) ことから、内在性の *RCY1* と外来導入した *RCY1* のいずれの発現も、CMV(Y)感染応答において誘導されないことが示唆された。したがってシロイヌナズナにおいて、CMV(Y)に対する防御システムを活性化するのに、*RCY1* 発現誘導は必要とされないと考えられた。

2. Col::p*RCY1*-HA#13 の CMV(Y)感染応答

第一章でも述べたように、Col::p*RCY1*-HA 系統において、*RCY1* タンパク質の蓄積量は、CMV(Y)抵抗性の強さと相関することが見出されている (Sekine et al. 2008)。本研究で、未発表の Col::p*RCY1*-HA 系統である#13 系統の性質を解析した。Col::p*RCY1*-HA#12 系統に比べて、Col::p*RCY1*-HA#13 系統において、*RCY1* タンパク質が明らかに高蓄積し (図 3A)、*RCY1* 転写産物蓄積量が約 10 倍増加していることが認められた (図 3B)。一方で、Col::p*RCY1*-HA#13 系統は、野生型 Col-0 や、Col::p*RCY1*-HA#12 系統と同様に生育し、形態異常をきたさなかった。*RCY1* 特異的プライマー対を用いたリアルタイム PCR により、エコタイプ C24 および Col::p*RCY1*-HA#12 系統は 1 コピー、Col::p*RCY1*-HA#13 系統は 10 コピーの *RCY1* を有することが推定された (図 3C)。一部の葉にのみ CMV(Y)を接種した植物体において、CMV(Y)が非接種上位葉を含む全身に移行するかどうか調べた。その結果、エコタイプ Col-0 は CMV(Y)に全身感染し、黄化の病徴を示していた (図 3D)。一方で、エコタイプ C24、Col::p*RCY1*-HA#12 系統、および Col::p*RCY1*-HA#13 系統の CMV(Y)非接種上位葉において CMV-CP は検出されず、病徴も認められなかったため (図 3D)、これらのシロイヌナズナは CMV(Y)に対して抵抗性を示すことが確かめられた。エコタイプ C24 および Col::p*RCY1*-HA#12 系統の CMV(Y)接種葉において、局部壊死病斑の形成と CMV-CP 蓄積が認められた一方で、Col::p*RCY1*-HA#13 系統の CMV(Y)接種葉において、CMV-CP は全く検出されなかった (図 3E)。したがって、エコタイプ C24 や Col::p*RCY1*-HA#12 系統が CMV(Y)に対して HR 抵抗性を示すのに対して、*RCY1* を 10 コピー有しており、*RCY1* タンパク質をより高蓄積する Col::p*RCY1*-HA#13 系統は、ER を示すことが確かめられた。

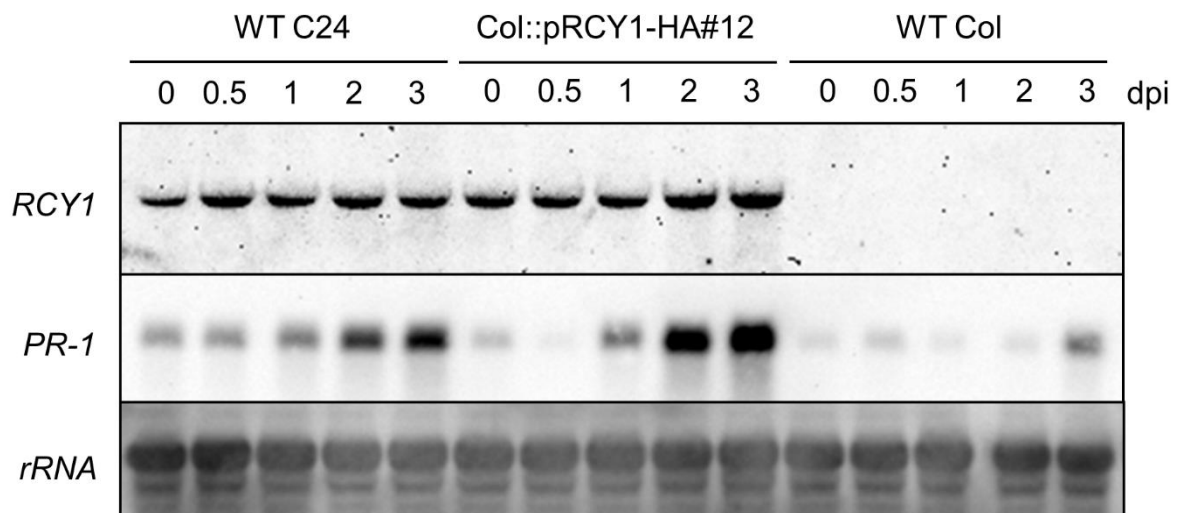


図2. シロイヌナズナエコタイプおよび *RCY1* 形質転換系統における *RCY1* 転写産物と *PR-1* 転写産物の検出

ノーザンブロット法により、シロイヌナズナの野生型エコタイプ C24 (WT C24), HA エピトープ付加 *RCY1* 形質転換 Col の#12 系統 (Col::pRCY1-HA#12), 野生型エコタイプ Col-0 (WT Col) について、CMV(Y)接種後 0, 0.5, 1, 2, および 3 日後 (days post inoculation: dpi) の接種葉における *RCY1* および *PR-1* 転写産物を検出した。RNA サンプルローディングの内部標準として、*18S rRNA* 転写産物を示した。

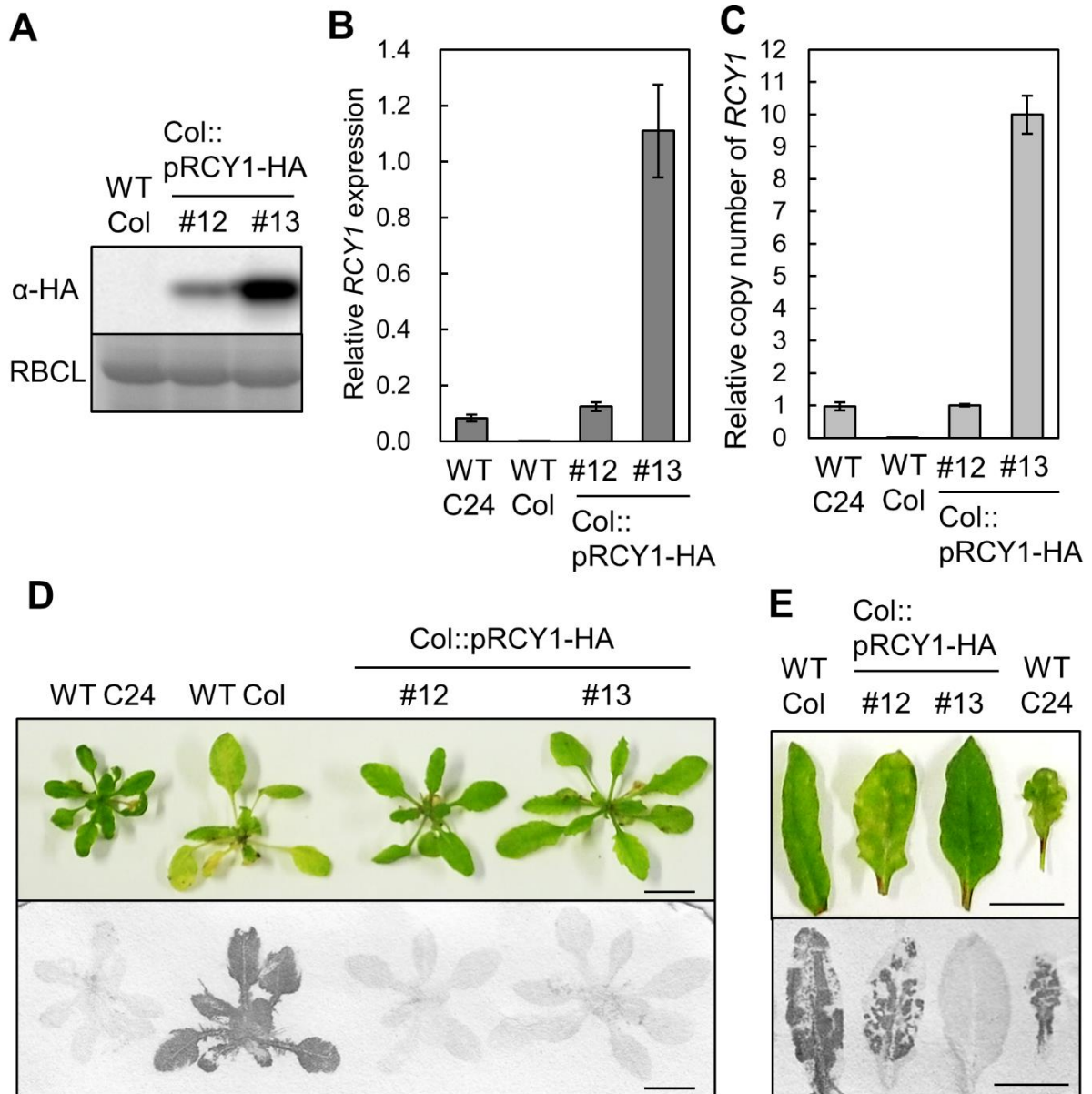


図 3. シロイヌナズナ *RCY1* 形質転換体における *RCY1* コピー数, *RCY1* 発現量と CMV(Y)感染応答

シロイヌナズナの野生型エコタイプ C24 (WT C24), 野生型エコタイプ Col-0 (WT Col), Col::pRCY1-HA の独立 2 系統 (#12 および #13) における *RCY1* コピー数と *RCY1* 発現および CMV(Y)感染応答を解析した. **A**, ウェスタンブロッティング法により, 抗 HA モノクローナル抗体を用いて, *RCY1*-HA タンパク質蓄積を検出した. 総タンパク質の内部標準として, CBB R-250 で染色した RuBisCO 大サブユニット (RBCL) のバンドを示した. **B**, qRT-PCR 法により, *RCY1* 転写産物蓄積量を推定し, *UBQ5* 転写産物蓄積量の相対値で標準化した値の, 3 個体における平均値 \pm 標準偏差を示した. **C**, リアルタイム PCR 法により, *RCY1* 遺伝子コピー数を推定し, *UBQ5* 遺伝子コピー数の相対値で標準化した値の, 3 個体における平均値 \pm 標準偏差を示した. **D**, CMV(Y)を本葉第一および第二葉のみに接種した植物体の, 接種 9 日後の全身像を示した (上パネル). また, tissue printing 法により, 抗 CMV-CP ポリクローナル抗体を用いて, 同植物体全身における CMV-CP の局在を検出した (下パネル). **E**, CMV(Y)接種 3 日後の接種葉を示した (上パネル). また, tissue printing 法により, 同接種葉における CMV-CP の局在を検出した (下パネル).

第二項 RCY1 発現量の制御に関わるシロイヌナズナ *src* 変異体の単離

1. *src* 変異体の CMV(Y)感染応答

EMS 処理によって Col::pRCY1-HA#13 に変異を誘発し、後代の M₂ 植物 20,000 個体から *src* 変異体の候補を選抜した。M₃ 世代における二次選抜を経て、異なる M₁ バルク集団に由来する、5 系統の独立 *src* 変異体 (*src1*, *src2*, *src3*, *src4*, および *src5*) を得た。Tissue printing 法により、これら *src* 変異体 5 系統の M₄ 世代においても、エコタイプ Col-0 や、エコタイプ C24, Col::pRCY1-HA#8 系統および#12 系統と同様に、CMV(Y)接種葉に CMV-CP が蓄積することが確かめられた (図 4A)。一方で、*RCY1* を過剰発現する Col::pRCY1-HA#13 系統および#15 系統の CMV(Y)接種葉においては、CMV(Y)の増殖は認められなかった (図 4A)。よって 5 系統の *src* 変異体は、CMV(Y)に対する ER を失っていることが確かめられた。

トリパンブルーを用いて、HR 誘導によって形成される局部壊死病斑を染色したところ、5 系統の *src* 変異体や、エコタイプ Col-0 の CMV(Y)接種 3 日後の接種葉において、局部壊死病斑の形成は認められなかった (図 4B)。一方で、エコタイプ C24, Col::pRCY1-HA#8 系統や#12 系統の CMV(Y)接種葉においては、明瞭な局部壊死病斑の形成が認められた (図 4B)。さらに CMV(Y)が植物体全身に移行するかどうかを調べたところ、エコタイプ Col-0 の場合と同様に、5 系統全ての *src* 変異体において、CMV(Y)が全身移行していることが認められた (図 5A)。これに対して、エコタイプ C24, Col::pRCY1-HA#12 系統および#13 系統に関しては、CMV(Y)は非接種上位葉において検出されなかった (図 5A)。ELISA 法により、CMV(Y)接種葉における CMV-CP 蓄積量を経時的に測定したところ、*src* 変異体 3 系統 (*src1*, *src2*, および *src3*) の CMV(Y)接種葉において、エコタイプ Col-0 の CMV(Y)接種葉と同程度に CMV(Y)-CP が増加し続けた (図 5B)。これに対して、HR が誘導された Col::pRCY1-HA#12 系統の CMV(Y)接種葉においては、CMV(Y)-CP の増加が抑制されていた (図 5B)。また、Col::pRCY1-HA#13 系統の CMV(Y)接種葉では CMV(Y)-CP 蓄積は全く認められなかった (図 5B)。以上から、5 系統の *src* 変異体全てにおいて、罹病性の系統と同様の表現型を示すまでに、*RCY1* を介した CMV(Y)抵抗性が失われていることが認められた。

2. *src* 変異体における *RCY1* 発現

ウェスタンブロットリング法により、抗 HA モノクローナル抗体を用いて、5 系統の *src* 変異体における HA エピトープ標識 *RCY1* タンパク質を検出した。*src1*, *src2*, *src3*, *src4*, および *src5* 変異体における *RCY1* タンパク質の平均蓄積量は、Col::pRCY1-HA#13 系統の 0.6% から 5.3% 程度と、顕著に低下していた (図 6A, B)。このことから、*src* 変異体における CMV(Y)に対する ER の喪失が、*RCY1* タンパク質蓄積量の減少と相関していることが認められた。さらに、リアルタイム qRT-PCR によって、*RCY1* 転写産物の蓄積量を解析した。その結果、*RCY1* タンパク質蓄積量の場合と類似して、*src1*, *src2*, *src3*, *src4*, および *src5* 変異体における *RCY1* 転写産物の平均蓄積量は、Col::pRCY1-HA#13 の 0.1% から 2.5% 程度に減少していた (図 6C)。したがって、5 系統の *src* 変異体における、Col::pRCY1-HA#13 系統と比べた *RCY1* タンパク質の激減は、*RCY1* 転写産物の減少に起因していることが考えられた。

3. *src* 変異形質の遺伝分析

Col::pRCY1-HA#13 と *src* 変異体の交配後代を用いて、*src* 変異形質の遺伝分析を行った。Col::pRCY1-HA#13 と *src2* 変異系統の相互交配後代 F₁ における、RCY1 タンパク質と RCY1 転写産物の蓄積量は、両親である Col::pRCY1-HA#13 と *src2* 変異体の場合の中間的な値を示した (図 7A, B)。これら F₁ 植物の CMV(Y)接種葉において、CMV-CP が蓄積し、Col::pRCY1-HA#12 と同様に HR 細胞死が誘導されていた (図 7C, D)。これらの結果から、*src* 変異形質は不完全優性遺伝する可能性が示唆された。Col::pRCY1-HA#13 と *src1*, *src2*, *src3*, *src4*, または *src5* 変異系統の交配後代 F₂ 集団において、全ての交配組み合わせについて、CMV(Y)に対して ER を示すものは 1%から 6%のみしか現れなかった (表 1)。さらに、Col::pRCY1-HA#13 と *src2* 変異系統の相互交配後代 F₂ 集団の全ての個体において、RCY1 タンパク質蓄積量は、Col::pRCY1-HA#13 に比べて不規則に減少していた (図 8)。したがって、*src* 変異形質の遺伝は、単一遺伝子座のメンデル遺伝の分離法則では説明できないことが明らかとなった。

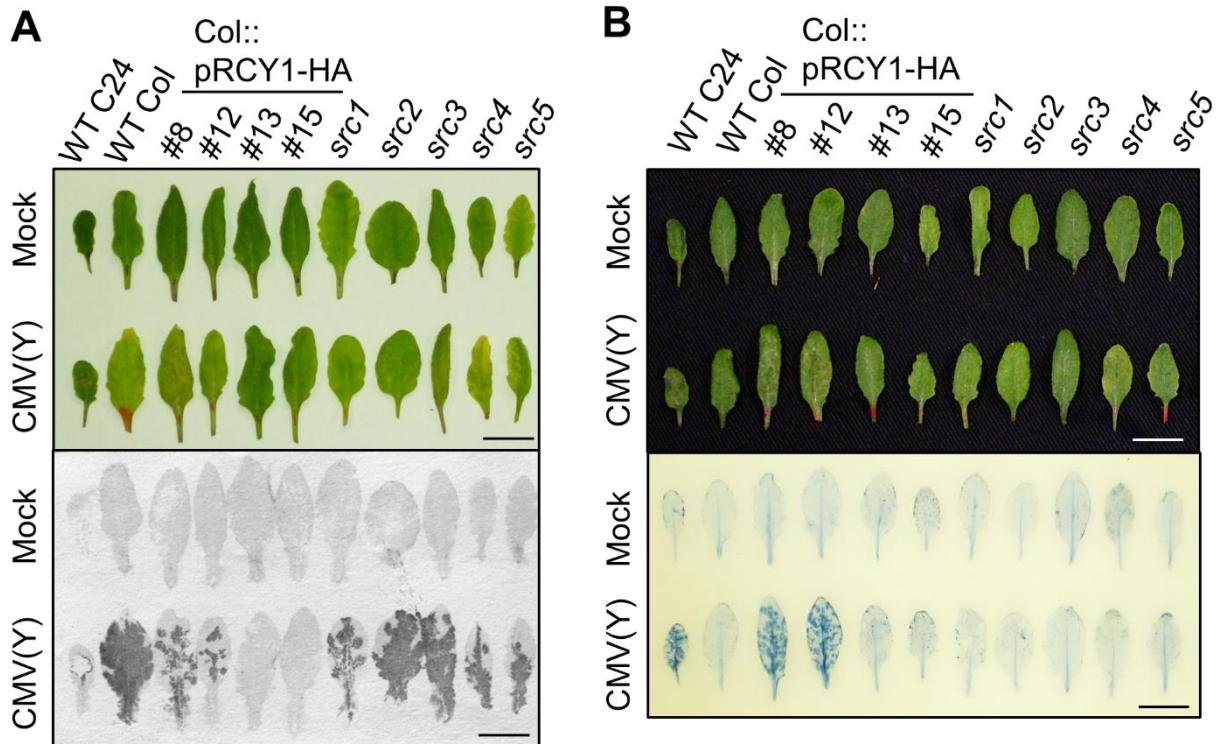


図 4. *suppressor of RCY1-mediated resistance to CMV(Y) (src)* 変異体の CMV(Y)接種葉におけるウイルス外被タンパク質および HR 細胞死の検出

シロイヌナズナ野生型エコタイプ C24 (WT C24), 野生型エコタイプ Col-0 (WT Col), Col::pRCY1-HA 独立 4 系統 (#8, #12, #13, #15) および *src* 変異体独立 5 系統 (*src1*, *src2*, *src3*, *src4*, *src5*) の CMV(Y)接種葉における応答を示した. **A**, Tissue printing 法により, 抗 CMV-CP 抗体を用いて, mock または CMV(Y)接種葉 (3 dpi) における CMV-CP 蓄積の局在を検出した (下パネル). **B**, トリパンプルー染色法により, mock または CMV(Y)接種葉 (3 dpi) の死細胞を染色した (下パネル). **A** および **B** の上パネルにおいて, mock または CMV(Y)接種葉 (3 dpi) の写真を示した.

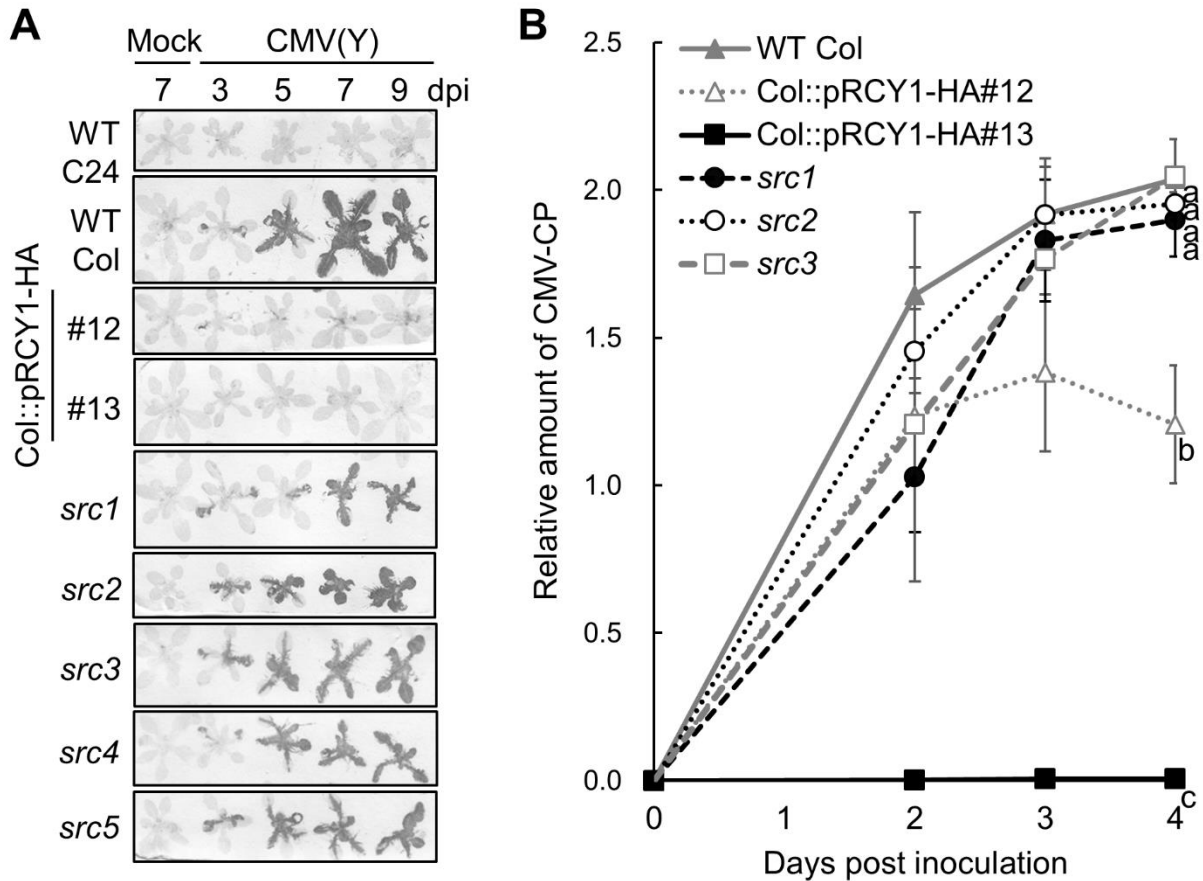


図 5. *src* 変異体の CMV(Y)感染

シロイヌナズナ野生型エコタイプ C24 (WT C24), 野生型エコタイプ Col-0 (WT Col), Col::pRCY1-HA 独立 4 系統 (#8, #12, #13, #15) および *src* 変異体独立 5 系統 (*src1*, *src2*, *src3*, *src4*, *src5*) における CMV(Y)感染の程度を解析した. **A**, Tissue printing 法により, 抗 CMV-CP 抗体を用いて, 接種 3, 5, 7 または 9 日後の mock または CMV(Y)接種植物体全身における CMV-CP の局在を検出した. **B**, ELISA 法により, 抗 CMV-CP 抗体を用いて CMV(Y)接種 0, 2, 3 または 4 日後の接種葉における CMV-CP の相対蓄積量を測定し, 3 個体における平均値±標準偏差で示した. 接種 4 日後のデータを統計解析した. 同じアルファベットは, 各植物系統間において接種 4 日後の相対 CMV-CP 蓄積量に統計的有意差が検出されないことを示す [one-way ANOVA ($F_{5,12} = 161.5, P < 0.001$) followed with Games-Howell *post hoc* test ($n = 3, P < 0.05$)].

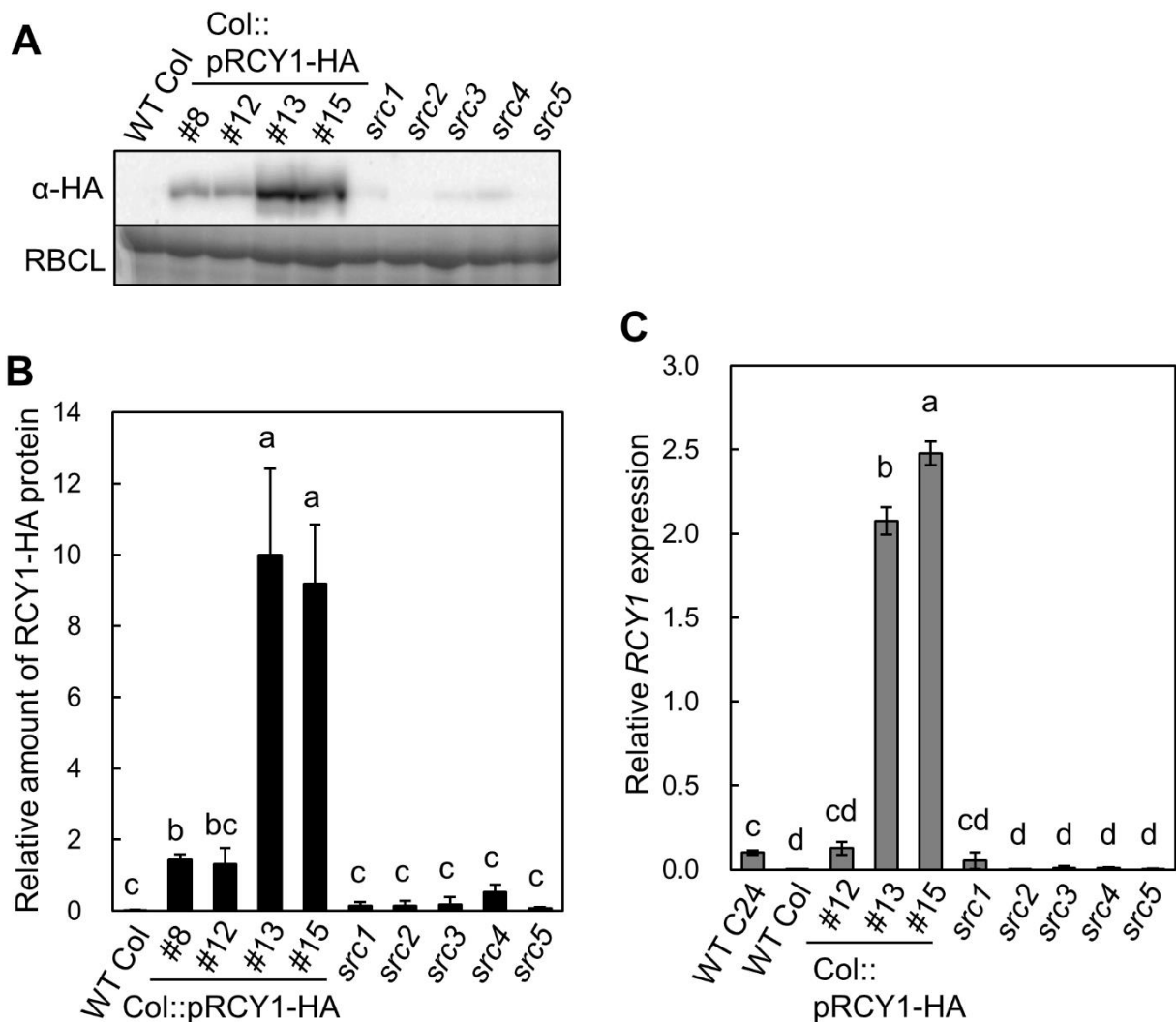


図 6. *src* 変異体における RCY1-HA タンパク質蓄積量と *RCY1* 転写産物蓄積量

シロイヌナズナ野生型エコタイプ Col-0 (WT Col), Col::pRCY1-HA 独立 4 系統 (#8, #12, #13, #15) および *src* 変異体独立 5 系統 (*src1*, *src2*, *src3*, *src4*, *src5*) の葉における RCY1-HA タンパク質および *RCY1* 転写産物を定量した. **A**, ウェスタンブロッティング法により, 抗 HA モノクローナル抗体を用いて RCY1-HA タンパク質を検出した. **B**, Quantity One ソフトウェアを用いて, ウェスタンブロッティングにより検出した RCY1-HA タンパク質のバンド濃度を定量化した. 4 個体における相対 RCY1 タンパク質の平均値±標準偏差を示した. **C**, qRT-PCR 法により, *RCY1* 転写産物の相対量を測定し, *UBQ5* 転写産物の相対量で標準化した. 3 個体における相対 *RCY1* 転写産物蓄積量の平均値±標準偏差を示した. **B** および **C** において, 同じアルファベットは, 植物系統間で統計的有意差が検出されないことを示す ($P < 0.05$, Games-Howell *post hoc* test).

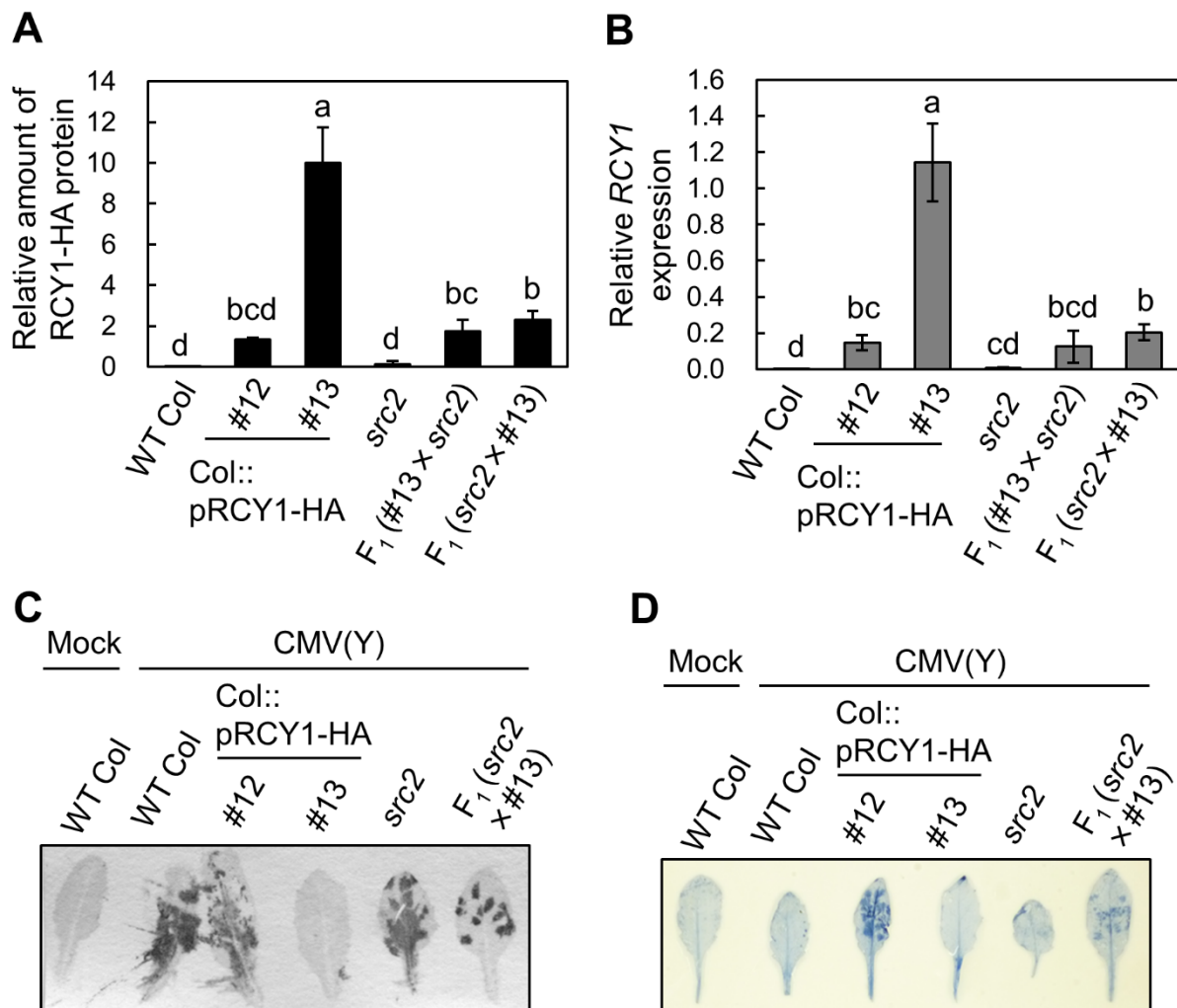


図 7. Col::pRCY1-HA#13 と *src* 変異体の交配後代 F₁ の表現型

シロイヌナズナ野生型エコタイプ Col-0 (WT Col), Col::pRCY1-HA 独立 2 系統 (#12, #13), *src2* 変異体, F₁ [Col::pRCY1-HA#13 × *src2* (#13 × *src2*)] および F₁ [*src2* × Col::pRCY1-HA#13 (*src2* × #13)] における *RCY1* 発現および CMV(Y)感染応答を解析した. **A**, ウェスタンブロッティング法により, 抗 HA モノクローナル抗体を用いて検出した RCY1-HA タンパク質のバンド濃度を定量化し, 3 個体における平均値±標準偏差を示した. 同じアルファベットは, 植物系統間で有意差が検出されないことを示す [one-way ANOVA ($F_{5,12} = 70.647$, $P < 0.001$) followed by a Games-Howell *post hoc* test ($n = 3$, $P < 0.05$)]. **B**, qRT-PCR 法により測定した, 相対 *RCY1* 転写産物蓄積量を *UBQ5* 転写産物量で標準化した値の, 3 個体における平均値±標準偏差を示した. 同じアルファベットは, 植物系統間で統計的有意差が検出されないことを示す [one-way ANOVA ($F_{5,12} = 58.941$, $P < 0.001$) followed by a Games-Howell *post hoc* test ($n = 3$, $P < 0.1$)]. **C**, Tissue printing 法により, 抗 CMV-CP 抗体を用いて, mock または CMV(Y)接種葉における CMV-CP 蓄積の局在を検出した. **D**, トリパンブルーを用いて, mock または CMV(Y)接種葉における死細胞を染色した.

表 1. Col::pRCY1-HA#13 と *src* 変異体の交配後代 F₂ の CMV(Y)感染応答

交配系統	F ₂ 個体の CMV(Y)に 対する応答 ^a		全接種個体中の ER 個体の割合		χ^2	$\chi^2_{0.005}$
	ER	ER 喪失	実測値	期待値 ^b		
	個体数	個体数	%	%		
Col::pRCY1-HA#13 × <i>src1</i>	2	57	3.4	25	14.7	7.879
Col::pRCY1-HA #13 × <i>src2</i>	3	50	5.7	25	10.6	7.879
<i>src2</i> × Col::pRCY1-HA #13	2	52	3.7	25	13.1	7.879
Col::pRCY1-HA #13 × <i>src3</i>	1	54	1.8	25	15.8	7.879
Col::pRCY1-HA #13 × <i>src4</i>	1	74	1.3	25	22.4	7.879
Col::pRCY1-HA #13 × <i>src5</i>	4	66	5.7	25	13.9	7.879

^a 3 週齢の植物体に CMV(Y)を接種した. Tissue printing 法により, CMV(Y)接種 3 日後の接種葉におけるウイルス CP 蓄積を検出した. CMV-CP 蓄積が検出された個体 (ER 喪失個体) と検出されなかった個体 (ER 個体) の個体数を示した.

^b *src* 変異が単一遺伝子座に存在し, メンデルの法則に従って遺伝する場合の期待値を示した.

第三項 *src* 変異体における *RCY1* プロモーター修飾の解析

1. *src* 変異体における *RCY1* のメチル化

src 変異は、パラ変異に類似した遺伝様式を示している可能性が考えられた。パラ変異とは、ある遺伝子の発現状態が、相同アレルや他の座位の相同遺伝子の発現状態に影響を及ぼす現象のことを指し、DNA メチル化やヒストン修飾を介して生じることが示唆されている (Stam and Scheid 2005; Chandler 2010)。DNA メチル化は、様々な真核生物の遺伝子発現制御において重要な役割を果たしている (Jaenisch and Bird 2003; Bird 2007)。さらに、遺伝子のプロモーター領域のメチル化は、しばしば転写抑制を引き起こすことが知られている (Park et al. 1996; Stam et al. 1998)。そこで本項において、*src* 変異体の表現型が、*RCY1* プロモーター領域のシトシンメチル化に起因する可能性を検討した。植物において、DNA メチル化は、全てのシトシン残基に対して起こりうる (Suzuki and Bird 2008)。一方で、CG 配列、CHG 配列および CHH 配列 (H は A, C または T を示す) の配列コンテキストごとに、メチル化の確立や維持に必要とされる因子が異なることが示唆されているため (Chan et al. 2005)、各配列コンテキストごとのシトシンメチル化を解析した。

まず、メチル化感受性制限酵素を用いてサザンブロッティングを行った。*HpyCH4IV* および *Sau3AI* を用いて、エコタイプ Col-0, Col::p*RCY1*-HA#13 系統および 5 系統の *src* 変異体から抽出したゲノム DNA を消化した。*HpyCH4IV* の切断活性は、認識配列に重なる CG メチル化により、*Sau3AI* の切断活性は、認識配列に重なる全ての配列コンテキストのシトシンメチル化により阻害される。サザンブロッティングにより、*RCY1* プロモーターおよび 5'-UTR 全域にハイブリダイズする DIG 標識 DNA プローブを用いて、*HpyCH4IV* または *Sau3AI* で消化した DNA 断片を検出した (図 9A)。その結果、*HpyCH4IV* で消化した Col::p*RCY1*-HA#13 のゲノム DNA において、完全消化によって現れる 534-bp の断片のみが検出された (図 9B)。一方で、*HpyCH4IV* で消化した *src1*, *src2*, *src3*, *src4*, および *src5* 変異体のゲノム DNA については、534-bp の断片が減少し、完全消化を免れた 781-bp の断片が現れていた (図 9B)。さらに、*Sau3AI* で消化した Col::p*RCY1*-HA#13 のゲノム DNA においても、完全消化によって現れる 757-bp の断片のみが検出された (図 9C)。一方で、*Sau3AI* で消化した *src1*, *src2*, *src3*, *src4* および *src5* 変異体のゲノム DNA のプロットでは、1 kb より長い断片が数種類検出された (図 9C)。これらの結果から、*src1*, *src2*, *src3*, *src4* および *src5* 変異体全てにおいて *RCY1* 遺伝子のプロモーター領域やその近傍領域がランダムにメチル化されていることが示唆された。

さらに、バイサルファイトシーケンス法により、*RCY1* プロモーター領域を含む、*RCY1* 開始コドンの上流 343 塩基から下流 5 塩基までにわたる領域 (*RCY1* region I) における、メチル化シトシンの分布と割合を解析した。Col::p*RCY1*-HA#13 の大部分の *RCY1* region I クローンは、メチル化されていなかった (図 10A, C)。一方で、*src2* 変異体の大部分の *RCY1* region I クローンは、全ての配列コンテキストのシトシンについて、Col::p*RCY1*-HA#13 に比べて明らかに高メチル化されていた (図 10A, C)。一方で、*src2* 変異体の、*RCY1* region II と称する、*RCY1* の第二イントロンと第三エキソンの境界から 177-base 上流から 118-base 下流にわたる領域のシトシンメチル化は、*RCY1* region I ほどは亢進していなかった (図 10A, D)。

2. *src* 変異体における *RCY1* プロモーター領域メチル化と *RCY1* タンパク質蓄積減少の相関関係

src 変異体において、*RCY1* プロモーターの高メチル化が *RCY1* タンパク質蓄積量の減少を招いているのかどうか調べるために、*RCY1* タンパク質を異なるレベルで蓄積する Col::p*RCY1*-HA#13 系統と *src2* 変異体の交配後代 F₂ を 3 個体 [F₂ (#13 × *src2*)-#1, F₂ (#13 × *src2*)-#2, F₂ (#13 × *src2*)-#3] 用意した。これら F₂ 系統における *RCY1* タンパク質蓄積量は、Col::p*RCY1*-HA#13 に比べて低かった (図 10B)。一方で、これら F₂ 系統間で比較した場合には、F₂ (#13 × *src2*)-#1, F₂ (#13 × *src2*)-#2, F₂ (#13 × *src2*)-#3 の順番に *RCY1* タンパク質蓄積量が高くなっていった (図 10B)。バイサルファイトシーケンスにより、これら F₂ 系統と両親の *RCY1* region I におけるシトシンメチル化の割合を解析して比較した結果、F₂ (#13 × *src2*)-#2 と F₂ (#13 × *src2*)-#3 間の CHG 配列および CHH 配列中のシトシンメチル化を例外として、*RCY1* region I におけるシトシンメチル化の上昇の程度が、*RCY1* タンパク質蓄積量の減少の程度と相関していることが認められた (図 10B, C)。

EMS を処理した Col::p*RCY1*-HA#13 の後代から、ランダムに選んで自殖した 3 系統のシロイヌナズナ (ER1, ER2 および ER3) は、M₄ 世代において CMV(Y) に対して ER を示し、Col::p*RCY1*-HA#13 と同レベルに *RCY1* タンパク質を高蓄積していた (図 11A-C)。さらに、ER1 系統における *RCY1* region I のメチル化の程度は、Col::p*RCY1*-HA#13 と同程度であった (図 11D)。よって、*RCY1* プロモーター領域のメチル化と *RCY1* タンパク質蓄積量の減少は、Col::p*RCY1*-HA#13 に対する EMS 処理により非特異的に誘導されたわけではなく、*src* 変異体において特異的に誘導されていると考えられた。

さらに、*RCY1* プロモーター領域のメチル化と *RCY1* タンパク質蓄積量の減少の因果関係を調べるために、*src* 変異体の表現型に対する、DNA メチル化阻害剤 5-azacytidine (AZA) の影響を解析した。*src2*, *src3* および *src4* 変異体において、0.2 mM の AZA 処理により、*src* 変異によって減少した *RCY1* タンパク質と *RCY1* 転写産物の蓄積が回復した (図 12A, B)。このとき、0.2 mM AZA 処理により、*src2* 変異体における *RCY1* region I のメチル化レベルが減少していることが確認された (図 12C, D)。したがって、*src* 変異体における *RCY1* の発現減少は、*RCY1* プロモーター領域のメチル化レベルの上昇に起因している可能性が強く示唆された。

3. *src* 変異体における他の指標ゲノム領域のメチル化

シロイヌナズナの花芽形成に関与する *SUP* 遺伝子は、野生型植物ではメチル化されていないが、エピジェネティック制御に関連する変異体において高メチル化されることが知られている (Jacobsen and Meyerowitz 1997)。Col::p*RCY1*-HA#13 系統および *src2* 変異体において、*SUP* 遺伝子の 5' 上流領域はほとんど同様にメチル化されていなかった (図 13A, B)。遺伝子間領域の MEA-ISR は、野生型シロイヌナズナにおいて高度にメチル化されていることが知られている (Cao and Jacobsen 2002)。*src1* および *src2* 変異体における MEA-ISR 領域のメチル化状態は、Col::p*RCY1*-HA#13 における MEA-ISR 領域のメチル化状態と大きくは変わらなかった (図 13C, D)。これらの結果は、*src* 変異体におけるゲノム DNA の高メチル化が、*RCY1* プロモーター領域に特異的であることを示唆している。

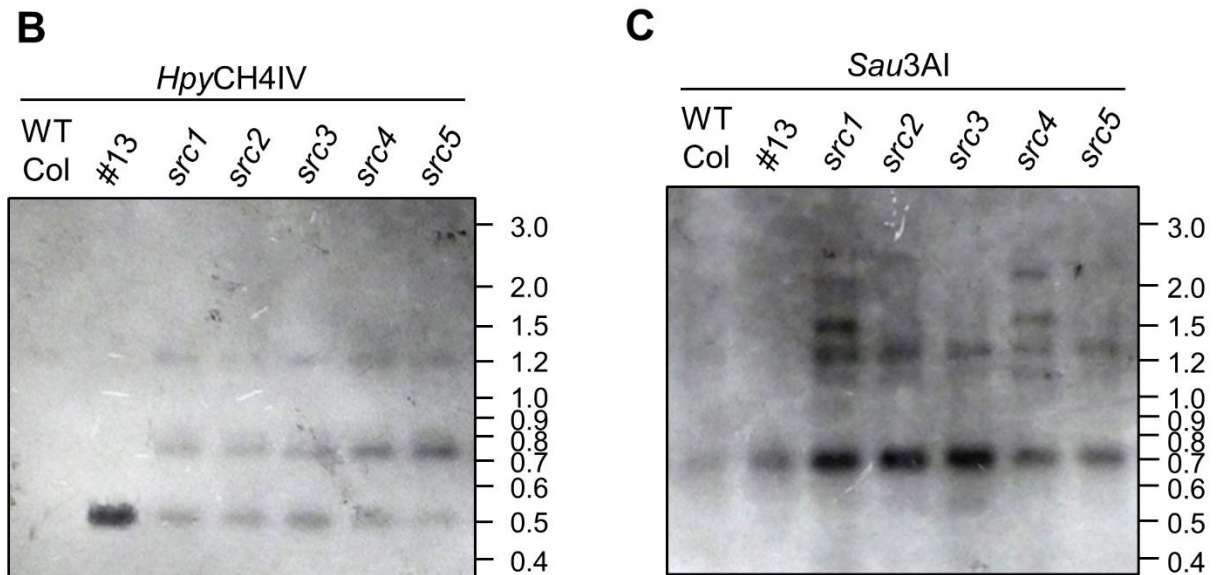
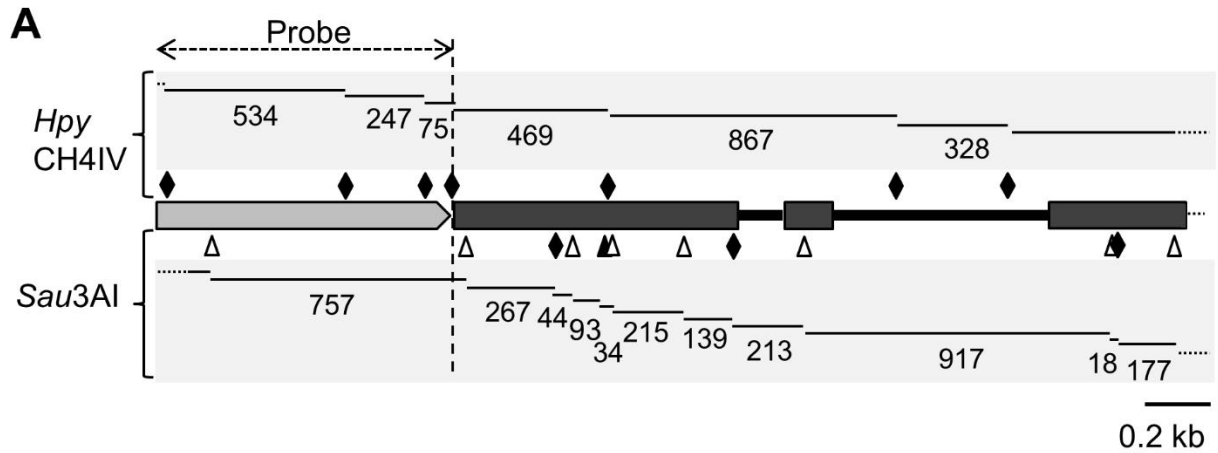


図 9. *src* 変異体における *RCY1* メチル化

シロイヌナズナエコタイプ Col-0 (WT Col), Col::pRCY1-HA#13 系統 (#13), *src* 変異体 5 系統 (*src1*, *src2*, *src3*, *src4*, *src5*) における *RCY1* プロモーター領域メチル化状態を解析した. **A**, *RCY1-HA* トランスジーンの上流側領域の模式図と, *HpyCH4IV* および *Sau3AI* 認識サイトを示した. 淡灰色のボックスで *RCY1* プロモーターおよび 5'-UTR, 濃灰色のボックスで *RCY1* コード領域, 太線でイントロンを示した. 両矢印で, サザンブロットティングに用いたプローブの位置を示した. *HpyCH4IV* 認識サイト (5'-ACGT-3') および *Sau3AI* 認識サイト (5'-GATC-3') の位置を, ひし形と三角形で示した. 黒色のひし形, 黒色の三角形および白色の三角形は, それぞれ CG 配列, CHG 配列または CHH 配列と重複する制限酵素の認識サイトを示す. 上パネルと下パネルに, それぞれ *HpyCH4IV* または *Sau3AI* で完全消化した場合に生成される断片の長さ (bp) を示した. スケールバーは, 0.2 kb を示す. **B** および **C**, サザンブロットティング法により, *HpyCH4IV* (**B**) または *Sau3AI* (**C**) を用いて消化したゲノム DNA 断片を検出した.

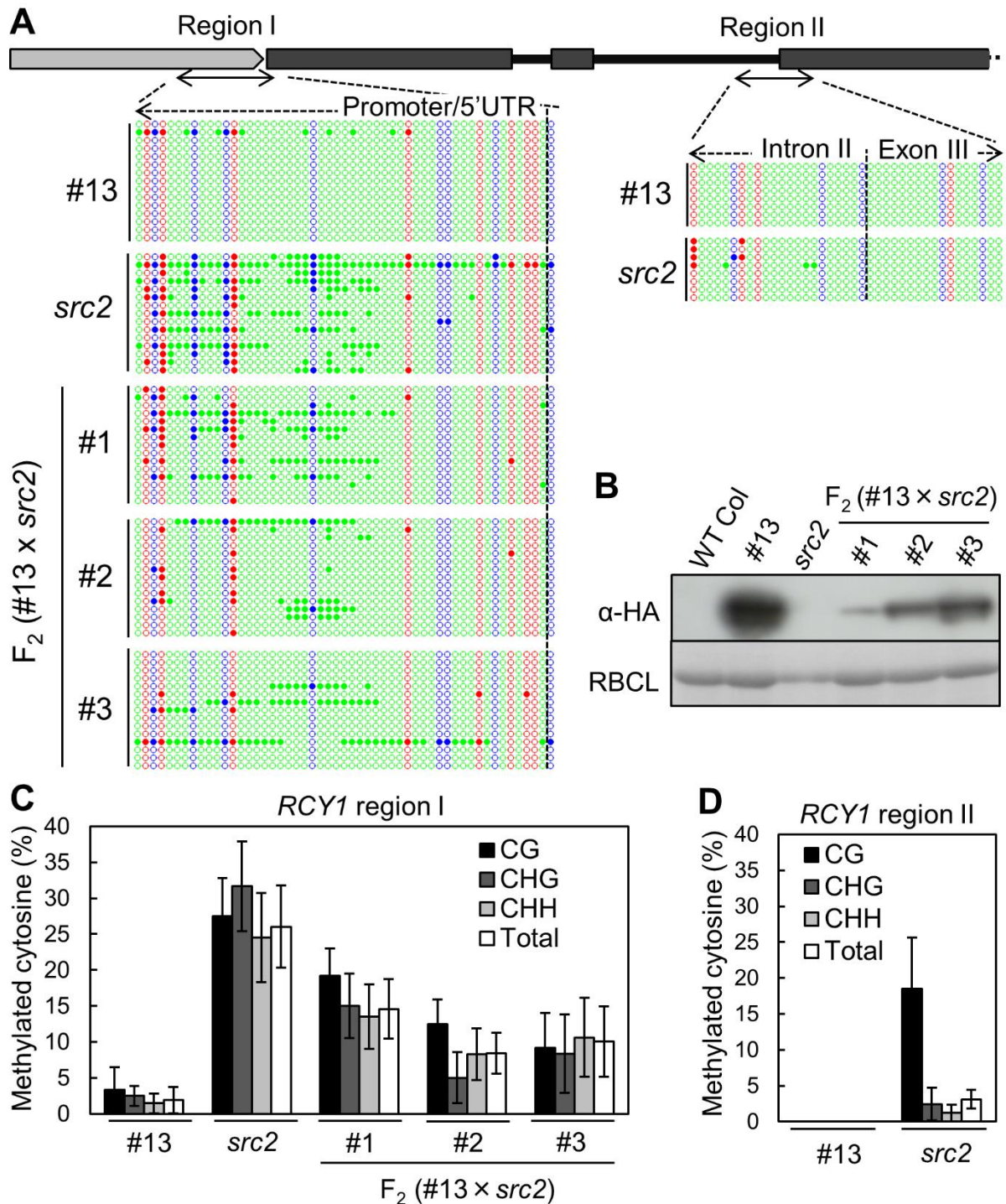


図 10. *src* 変異体における *RCY1* プロモーターのメチル化と *RCY1* タンパク質蓄積量の減少の相関
シロイヌナズナ野生型エコタイプ Col-0 (WT Col), Col::pRCY1-HA#13 (#13), *src2* 変異体, および F_2 [Col::pRCY1-HA#13 x *src2* (#13 x *src2*)] 3 個体 (#1, #2, #3) を用いて, *RCY1* メチル化と *RCY1* タンパク質減少の関係を解析した. **A**, バイサルファイトシーケンス法により, *RCY1* プロモーター内の一部領域 (region I) と *RCY1* コード領域内の一部領域 (region II) における 5-メチルシトシンの分布を, それぞれ 15 クローンまたは 8 クローン解析した. *RCY1*-HA トランスジーンの上流側領域の模式図として, 淡灰色のボックスで *RCY1* プロモーターおよび 5'-UTR, 濃灰色のボックスで *RCY1* コード領域, 太線でイントロンを示した. また, CG, CHG および CHH 配列と重複するシトシンを, それぞれ赤色, 青色 および緑色で示した. 塗りつぶしの丸でメチル化シトシン, 白丸で非メチル化シトシンを表した. **B**, ウェスタンブロッティング法により, 抗 HA モノクローナル抗体を用いて *RCY1*-HA タンパク質蓄積を検出した. **C** および **D**, バイサルファイトシーケンスの結果に基づき, region I の 15 クローン分 (**C**), region II の 8 クローン分 (**D**) のメチル化シトシン割合を数値化した. CG 配列, CHG 配列, CHH 配列または全シトシン中の 5-メチルシトシンの割合を, それぞれ黒色, 濃灰色, 淡灰色および白色の棒グラフで示した. ブートストラップ法により 1000 回リサンプリングを繰り返した際の平均値 \pm 標準偏差を示した.

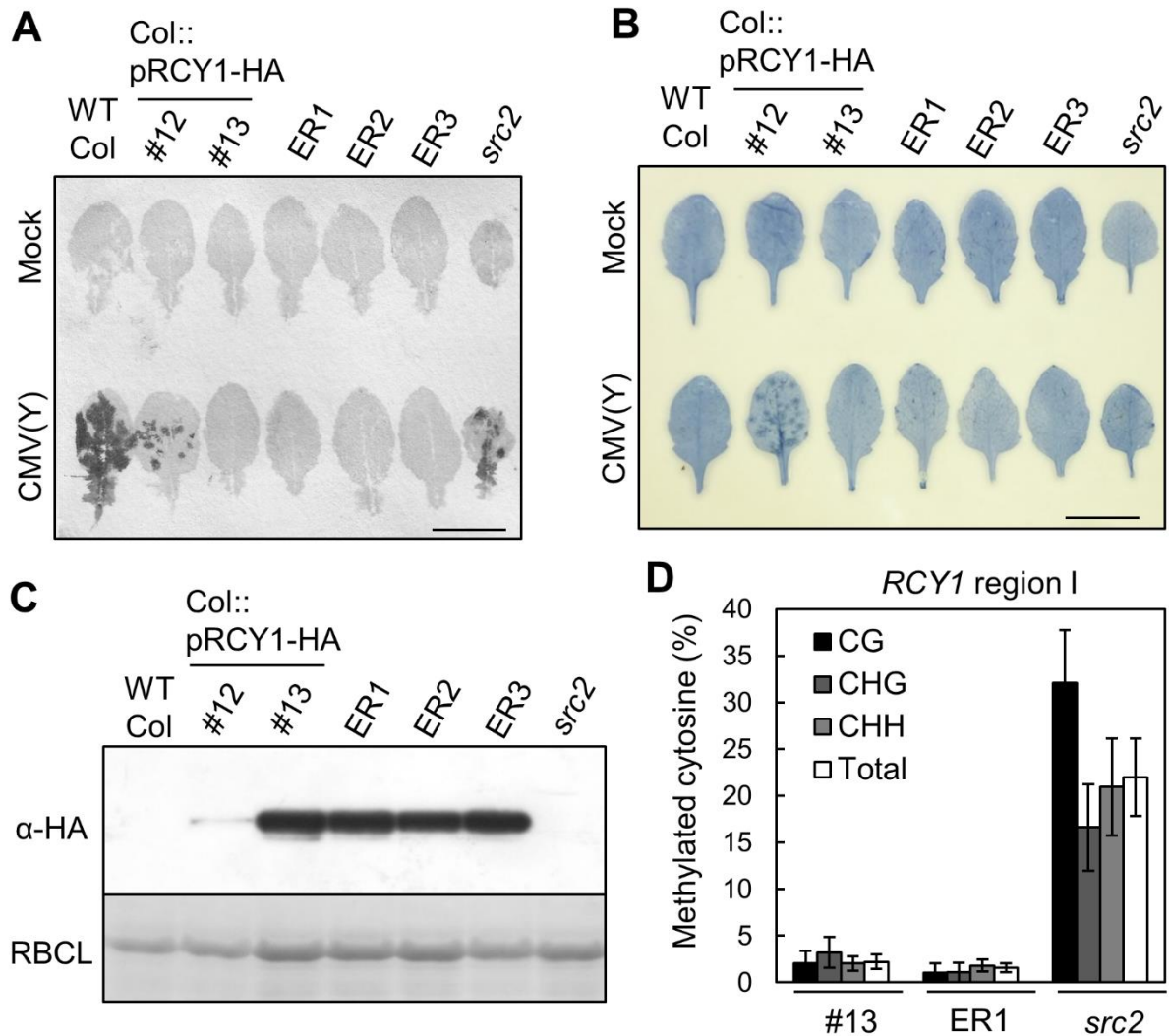


図 11. EMS 処理 Col::pRCY1-HA#13 の自殖後代の表現型と *RCY1* メチル化

EMS を処理した Col::pRCY1-HA#13 の自殖後代から任意に選んだ 3 系統 (ER1, ER2 および ER3) の M₄ 世代植物における CMV(Y) 感染応答, *RCY1* タンパク質蓄積量および *RCY1* メチル化状態を, 野生型 Col-0 (WT Col), Col::pRCY1-HA の独立 2 系統 (#12 および #13), および *src2* 変異体における場合と比較した. **A**, Tissue printing 法により, 各植物体の mock または CMV(Y) 接種葉 (3 dpi) における CMV(Y)-CP 蓄積を免疫学的に検出した. **B**, トリパンブルーにより, 各植物体の mock または CMV(Y) 接種葉 (3 dpi) における死細胞を染色した. **C**, ウェスタンブロッティング法により, 抗 HA モノクローナル抗体を用いて HA エピトープ標識 *RCY1* タンパク質を検出した. 総タンパク質ローディングの内部標準として, CBB R-250 によって RBCL タンパク質を染色して示した. **D**, バイサルファイトシークエンス法により, *RCY1* region I のメチル化シトシン割合を解析した. CG 配列, CHG 配列, CHH 配列または全シトシン中の 5-メチルシトシンの割合を, それぞれ黒色, 濃灰色, 淡灰色および白色の棒グラフで示した. 12 クローンの配列を解析し, ブートストラップ法により 1000 回リサンプリングを繰り返した際の, 1 クローンあたりのメチル化シトシン割合の平均値 ± 標準偏差を示した.

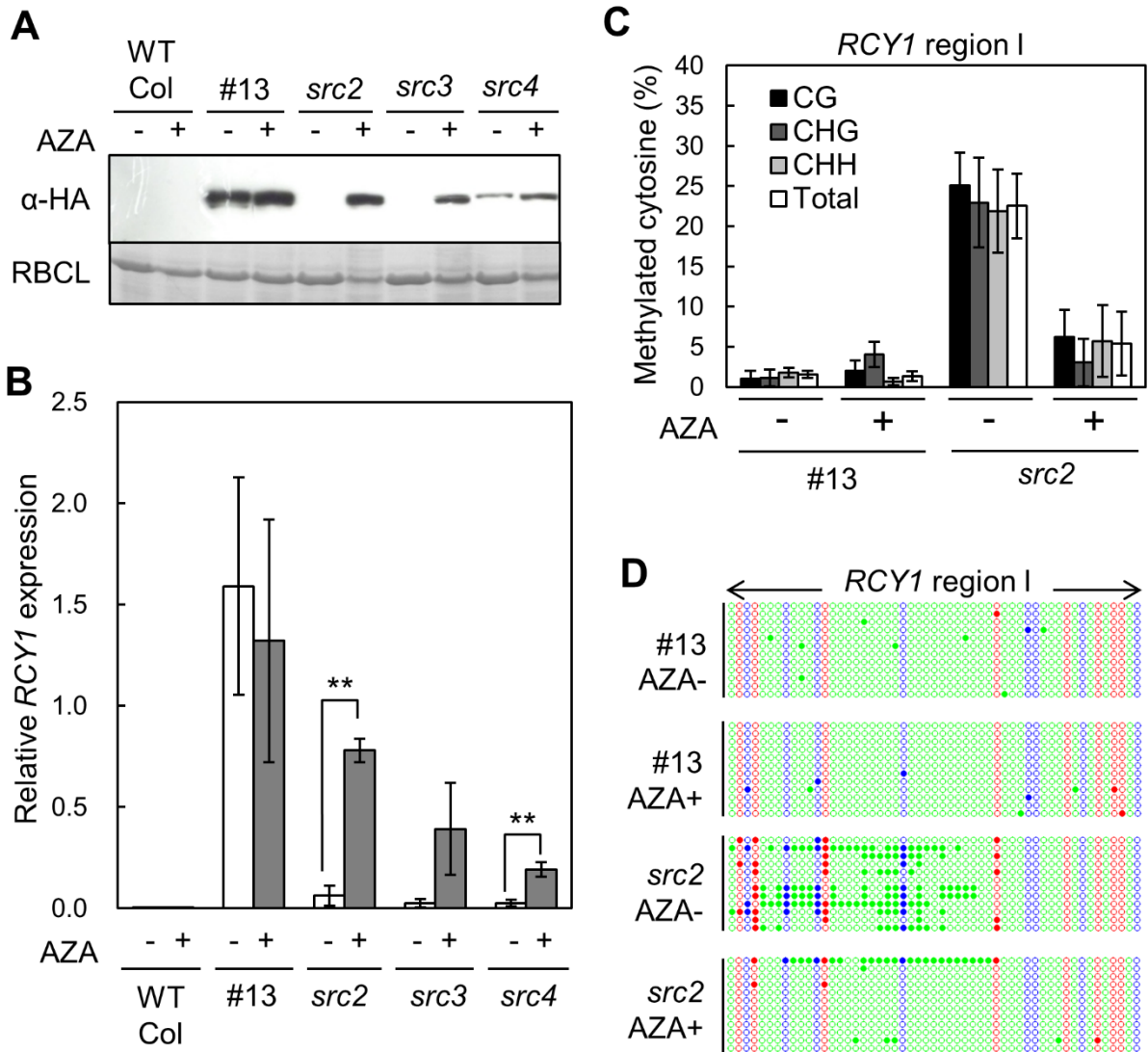


図 12. *src* 変異体における *RCY1* 発現に対する DNA メチル化阻害剤 (AZA) の影響

0.2 mM 5-azacytidine (AZA) を含む MS 培地 (+) または含まない MS 培地 (-) で栽培したシロイヌナズナ野生型エコタイプ Col-0 (WT Col), Col::pRCY1-HA#13 系統 (#13) および *src* 変異体 3 系統 (*src2*, *src3*, *src4*) における, *RCY1* 発現を解析した. **A**, ウェスタンブロッティング法により, 抗 HA モノクローナル抗体を用いて *RCY1*-HA タンパク質蓄積を検出した. 総タンパク質ローディングの内部標準として RBCL タンパク質の CBB 染色像を示した. **B**, qRT-PCR 法で測定した *RCY1* 転写産物の相対量を *ACT2* 転写産物の相対量で標準化した値の, 4 個体における平均値±標準偏差を示した. アスタリスクは, AZA 処理の有無により統計的有意差が検出されたことを示す (** $P < 0.01$, Two-way ANOVA followed by Games-Howell *post hoc* test). **C**, バイサルファイトシーケンス法により, *RCY1* region I のメチル化シトシン割合を解析した. 12 クローンの配列を解析し, ブートストラップ法により 1000 回リサンプリングを繰り返した際の, 1 クローンあたりのメチル化シトシン割合の平均値±標準偏差を示した. CG 配列, CHG 配列, CHH 配列または全シトシン中の 5-メチルシトシンの割合を, それぞれ黒色, 濃灰色, 淡灰色および白色の棒グラフで示した. **D**, バイサルファイトシーケンス法により明らかとなった, 12 クローン分の *RCY1* region I の 5-メチルシトシンの分布を示した. CG, CHG および CHH 配列と重複するシトシンを, それぞれ赤色, 青色および緑色で示した. 塗りつぶしの丸でメチル化シトシン, 白丸で非メチル化シトシンを表した.

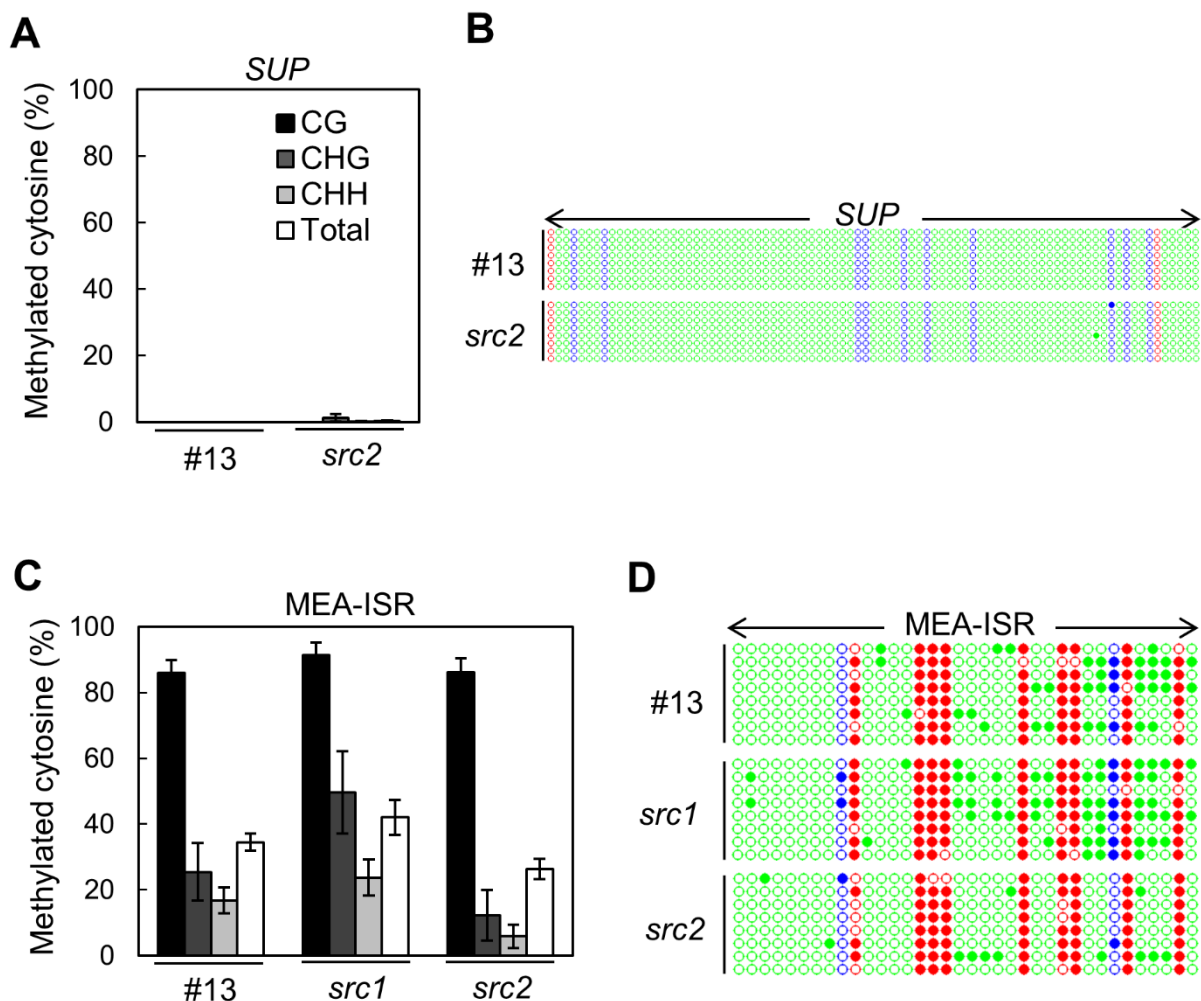


図 13. *src* 変異体における他のゲノム領域のメチル化状態

パイサルファイトシーケンス法により, Col::pRCY1-HA#13 系統 (#13) と *src* 変異体独立 2 系統 (*src1* および *src2*) の *SUP* 遺伝子 5'側領域および MEA-ISR 領域における, 8 クローン分のメチル化シトシンの分布および割合を解析した. **A** および **C**, 各植物系統の *SUP* 遺伝子の 5'側領域 (**A**) および MEA-ISR (**C**) におけるメチル化シトシン割合を示した. 8 クローンにおいて, ブートストラップ法により 1000 回サンプリングを繰り返した際の, 1 クローンあたりのメチル化シトシン割合の平均値 ± 標準偏差を示した. CG 配列, CHG 配列, CHH 配列または全シトシン中の 5-メチルシトシンの割合を, それぞれ黒色, 濃灰色, 淡灰色および白色の棒グラフで示した. **B** および **D**, *SUP* 遺伝子の 5'側領域内 (**B**) および MEA-ISR (**D**) のシトシン配列中における 5-メチルシトシンの位置のドットプロットを示した. CG 配列, CHG 配列および CHH 配列と重複するシトシンを, それぞれ赤色, 青色および緑色で示した. 塗りつぶしの丸でメチル化シトシン, 白丸で非メチル化シトシンを表した.

第四節 考察

1. *RCY1* 発現調節の CMV(Y)抵抗性における役割

いくつかの *R* 遺伝子については, *Avr* 遺伝子を持つ病原体の感染に応答して, 転写量が顕著に上昇することが知られている. 例えば, *N* 遺伝子を持つタバコにタバコモザイクウイルスを接種すると, 接種 2 日後の接種葉において, *N* 遺伝子の転写産物量は約 30 倍まで上昇することが知られている (Levy et al. 2004). これに対して, ネイティブプロモーター制御のもと *RCY1* を発現するシロイヌナズナの, HR が誘導された CMV(Y)接種葉において, *RCY1* 転写産物レベルはほとんど変動しなかった (図 2). 一方で, 先行研究においても示されているように (Sekine et al. 2008), *RCY1* の発現量が高く, *RCY1* タンパク質が恒常的に高蓄積している Col::*pRCY1*-HA 系統において, CMV(Y)の増殖がより速く抑えられ, HR 抵抗性が ER に転換することが確認された (図 3). 以上のことから, CMV(Y)抵抗性の強さを制御する上で, 構成的な *RCY1* 発現量や *RCY1* タンパク質蓄積量が重要になると考えられた.

2. *RCY1* 発現調節に関わる *src* 変異体の単離

RCY1 発現調節に関与する宿主因子を単離することを目指して, Col::*pRCY1*-HA#13 系統を遺伝的バックグラウンドとした遺伝学的スクリーニングにより, CMV(Y)高度抵抗性を失う *src* 変異体を単離した. 5 系統の *src* 変異体において, CMV(Y)に対する抵抗性が完全に失われたことは (図 4, 5), Col::*pRCY1*-HA#13 系統に比べて *RCY1* タンパク質と *RCY1* 転写産物が激減したと相関していた (図 6). Col::*pRCY1*-HA#13 系統は, 10 コピーの *RCY1* 遺伝子を有することを踏まえると (図 2C), 図 1 において示したように, *src* 変異体における CMV(Y)抵抗性の喪失は, *RCY1* の塩基配列変異ではなく, *RCY1* 転写産物の蓄積量を制御する因子の変異に起因している可能性が考えられた.

一方で, 遺伝分析の結果, *src* 変異形質の遺伝は, 単一遺伝子座のメンデル法則に従わないことが明らかとなった. 具体的には, Col::*pRCY1*-HA#13 系統と *src* 変異体の相互交配後代 F₁ は, 両親の中間的な表現型を示した (図 7). さらに, Col::*pRCY1*-HA#13 系統と *src* 変異体の交配後代 F₂ の多くの個体において, *RCY1* タンパク質蓄積量の激減にともない, CMV(Y)に対する高度抵抗性が失われていた (表 1, 図 8). このように, *src* 変異形質はパラ変異様に遺伝するため, *src1*, *src2*, *src3*, *src4* および *src5* 変異遺伝子がアレル同士であるかどうか, 検討することはできなかった. *src* 原因変異を同定することは, 今後の課題となるが, Col::*pRCY1*-HA#13 と *src* 変異体の交配後代 F₂ 集団において, *RCY1* タンパク質蓄積量が比較的高い個体群と, 低い個体群を対照として, MutMap 法 (Abe et al. 2012) によりマッピングするといったアプローチが考えられる.

3. *src* 変異による DNA メチル化制御

RCY1 トランスジーンのプロモーター領域に含まれるシトシンは, Col::*pRCY1*-HA#13 系統や, EMS を処理した Col::*pRCY1*-HA#13 系統の後代の任意の系統ではほとんどメチル化されていない一方で, 5 つの *src* 変異系統では, CG, CHG および CHH の全ての配列コンテキストに関して高メチル化されていることを見出した (図 9, 10, 11). さらに, Col::*pRCY1*-HA#13 系統と *src* 変異体の交配後代において, *RCY1* タンパク質蓄積量の減少と *RCY1* プロモーター領域におけるシトシンメチル化

の亢進が密接に相関していることが認められた (図 10). また, *src* 変異系統へのシトシンメチル化阻害剤 AZA 処理によって, *src* 変異により誘発された *RCY1* プロモーター領域のメチル化が緩和されるとともに, *RCY1* 発現減少の表現型が部分的に回復することが認められた (図 12). プロモーター領域近傍の DNA メチル化は, 直接的に転写活性化因子のアクセスを阻害したり, 間接的に転写のコリプレッサーと相互作用したりして, 転写を抑制すると考えられている (Klose and Bird 2006). 以上のことから, *src* 変異体における *RCY1* 転写産物量の減少は, *RCY1* プロモーター領域のメチル化を介した転写抑制に起因していることが示唆された.

配列重複する内在性遺伝子やトランスジーンは, 場合によっては DNA メチル化により発現抑制を受けることが示唆されている (Mette et al. 2000; Chan et al. 2005; Belete et al. 2013; Zheng et al. 2015). 一方で, 本研究室において, Col::*pRCY1*-HA#13 系統は, 世代を経ても安定的に *RCY1* を発現することが確かめられている. Col::*pRCY1*-HA#13 系統において, 本研究の遺伝学的スクリーニングの過程を介して, 非特異的なトランスジーンサイレンシングが誘導されたかどうかは今のところ定かではないため, 今後明らかにする必要がある. バイサルファイトシーケンス法により, メチル化指標としてよく利用されるゲノム領域の *SUP* 遺伝子と MEA-ISR 領域のメチル化状態を解析したところ, いずれについても Col::*pRCY1*-HA#13 系統と *src* 変異体の間でメチル化レベルに差はみられなかった (図 12). これらの結果から, *src* 変異体におけるメチル化状態の変化は, 未解析の領域を除けば, *RCY1* に特異的である可能性が示唆される.

4. NB-LRR コード遺伝子の DNA メチル化制御に関する知見

近年, DNA メチル化やクロマチンの修飾・構造変化が, NB-LRR タンパク質をコードする遺伝子の転写制御において重要な役割を果たしていることが示されつつある. シロイヌナズナにおいて, ヒストン修飾やクロマチン活性化を介して, 一部の NB-LRR クラス遺伝子の発現制御に関与する植物因子がいくつか同定されている (Palma et al. 2010; Xia et al. 2013; Li et al. 2010, 2011; Tsuchiya and Eulgem 2013). 一方で, DNA メチル化制御機構の NB-LRR クラス *R* 遺伝子の発現制御における役割は, 後述する 2 つのケースを除いて, よく知られていない. 植物において, 細菌フラジェリンにより誘発される防御応答の下流で, TIR-NB-LRR タンパク質をコードする *RGMI* 遺伝子が脱メチル化され, 発現誘導を受けることが明らかにされている (Yu et al. 2013). また, 低メチル化変異体 *ddm1* の自殖系統から単離されたエピジェネティックバリエントの *bal* 植物においては, TIR-NB-LRR サブクラス遺伝子のクラスターである *RPP5* 複合抵抗性遺伝子座のタンデム重複が誘発され, それら遺伝子が過剰発現していることが知られている (Stokes and Richards 2002; Yi and Richards 2009).

本研究で見出された *src* 変異体による *RCY1* プロモーター領域の高メチル化が, 何らかの遺伝子 (*SRC*) の塩基配列変異に起因するのであれば, 正常な *SRC* は, *RCY1* プロモーター領域の低メチル化制御を介して, *RCY1* 発現および CMV(Y)抵抗性を調節している可能性がある. 本研究において原因変異を同定することには至らなかったが, 今後原因変異を同定し, 解析を進めることで, NB-LRR クラス *R* 遺伝子のメチル化制御について新たな知見がもたらされ得る. 本研究においては, *RCY1* プロモーターのメチル化を抑制することが, 転写レベルの制御を介した *RCY1* タンパク質蓄積量の増加と, CMV(Y)抵抗性の増強に必要であるということが示された.

第三章 RCY1 タンパク質蓄積量の制御に関わる RCY1 コード領域配列の解析

第一節 緒言

1. NB-LRR タンパク質のコード領域配列の役割

第二章においては、プロモーター領域の修飾を介した、*RCY1* の転写調節機構に言及した。一方で、一般的に植物の遺伝子発現は、プロモーターだけでなく、エンハンサー、イントロンや、messenger RNA (mRNA) の 5'-および 3'-非翻訳領域 (untranslated region: UTR) などの様々な調節配列を介した、転写および転写後調節機構によって、厳密に制御されていると考えられている (Farrell, 2007)。第二章では、*RCY1* の発現調節にトランスに関与する因子を探索する遺伝学的アプローチを試みたが、本章では、*RCY1* 遺伝子内の機能配列を探索するアプローチにより、プロモーター以外の遺伝子領域を介した *RCY1* タンパク質蓄積量の制御機構について解析した。

NB-LRR クラス *R* 遺伝子の、プロモーター以外の遺伝子領域を介した発現制御機構として、選択的スプライシングが生じることがよく知られている。選択的転写産物が産生される NB-LRR クラス *R* 遺伝子は、いくつか報告されているものの (Lawrence et al. 1995; Anderson et al. 1997; Parker et al. 1997; Gassmann et al. 1999; Dinesh-Kumar and Baker 2000; Borhan et al. 2004; Schornack et al. 2004; Ayliffe et al. 1999; Halterman et al. 2003), このうち病害抵抗性における選択的スプライシングの必要性が明らかにされているのは、わずかなケースに限られている (Dinesh-Kumar and Baker 2000; Zhang and Gassmann 2007)。中には、選択的スプライシングの有無が、病害抵抗性に影響を及ぼさない *R* 遺伝子の例も知られている (Ayliffe et al. 1999)。さらに、これらの NB-LRR 遺伝子の選択的転写産物が、どのような分子機構を介して病害抵抗性に影響を及ぼしているのかは、今のところ不明である (Staiger and Brown 2013)。したがって、NB-LRR クラス *R* 遺伝子のコード領域配列の役割は、十分に理解されているとは言えない。

2. RCY1 タンパク質蓄積量の制御に関わる RCY1 コード領域配列の探索

本章の結果の第一項では、*RCY1* に含まれる UTR やイントロンが、発現調節に関わるかどうか検討するため、それらエレメントを欠失させた一連の *RCY1* コンストラクト間における *RCY1* 発現を比較した。遺伝子を発現する方法として、*Nicotiana benthamiana* におけるアグロインフィルトレーション法を利用した。アグロインフィルトレーション法は、植物の細胞間隙に、バイナリーベクターを導入したアグロバクテリウムをインフィルトレーションし、遺伝子を一過的に発現させる方法である。アグロインフィルトレーション法は、形質転換体を作成する場合と比較して、手間や時間を必要としないという利点と、染色体位置効果による発現バイアスを生じないという利点を持つ。*N. benthamiana* は、アグロインフィルトレーションによる遺伝子発現効率が高く、植物-病原体相互作用の解析におけるモデル植物として頻繁に用いられている (Goodin et al. 2008)。さらに、*N. benthamiana* においては、*RCY1* タンパク質の機能を解析する系が既に確立されている (Takahashi et al. 2012b)。本章の結果の第二項においては、第一項で絞り込まれた *RCY1* 遺伝子領域の、*RCY1* 発現調節における役割を解析した。さらに、第三項においては、その発現調節機構について、*RCY1* ホモログにおける一般性を検討した。

第二節 材料と方法

1. ベクター構築

(1) In-Fusion クローニング

In-Fusion クローニング法により、ベクターコンストラクトを構築した。ベクターは、制限酵素処理により線状化した。インサートは、KOD DNA polymerase (東洋紡株式会社) を用いて PCR 法により調製した。各ベクターおよびインサートの調製手順は、後の項目に詳述する。ベクター構築のための PCR に用いたプライマーの配列は、全て表 2 に示した。線状化ベクターとインサート断片は、アガロースゲル電気泳動により副産物と分離した後、DE81 ペーパー (GE Healthcare UK Ltd.) に吸着させて回収した。TE/50 mM NaCl [10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA, 50 mM NaCl] でペーパーを 3 回リンスした後、TE/1 M NaCl [10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA, 1 M NaCl] によりペーパーから DNA を溶出した。フェノール・クロロホルム抽出、クロロホルム抽出に続きエタノール沈殿により DNA を精製した後、滅菌水に溶解した。In-Fusion® HD Cloning Kit (タカラバイオ株式会社) を用いて、線状化ベクターとインサート断片を融合した。In-Fusion 反応産物を、大腸菌へ形質転換した後、プラスミド抽出により精製した。制限酵素処理と DNA シークエンスにより、設計通りの構造を持つプラスミドを選抜した。

(2) RCY1 タンパク質をコードするベクターの構築

図 14B に、C 末端側に HA エピトープを付加した RCY1 タンパク質 (RCY1-HA) をコードする 10 個のベクターコンストラクトを示した。これらコンストラクトは全て、pRI201-AN バイナリーベクター (タカラバイオ株式会社, 図 14A) の *Heat Shock Protein* ターミネーター上流に融合した。本章において、ゲノム *RCY1* の開始コドンから上流 66-bp の配列を *RCY1* 5'-UTR, 終始コドンから下流 71-bp の配列を *RCY1* 3'-UTR と称する。

P_{35S}-cRCY1-HA は、pRI201::*RCY1-HA* (Takahashi et al. 2012b) を改称したコンストラクトであり、pRI201-AN ベクターの、cauliflower mosaic virus 35S RNA (CaMV 35S) プロモーター (*P_{35S}*) 下流の *NdeI* および *SalI* サイトの間に、*RCY1* 両末端 UTR を含み、イントロンを除いた *RCY1-HA* cDNA をクローニングした構造を持つ (図 14B)。

P_{RCY1}-gRCY1-HA は、*RCY1* 開始コドン上流およそ 1.5 kb から *RCY1* 3'-UTR までにわたる、ゲノム *RCY1-HA* 遺伝子を含むコンストラクトである (図 14B)。同ゲノム *RCY1-HA* 領域は、プライマー対として RI201AN.HindIII15.gRCY1 と RI201AN.SalI15.RCY1utr3, 鋳型として pBS+SK/RCY1-HA (Sekine et al. 2008) を用いて増幅し、pRI201-AN ベクターの *HindIII* および *SalI* サイトにクローニングした。

また、*P_{RCY1}-gRCY1-HA* ベクターおよび *P_{35S}-cRCY1-HA* ベクターの *NotI* サイトに、CaMV 35S プロモーターと融合した緑色蛍光タンパク質遺伝子 (green fluorescent protein: GFP) を挿入して、それぞれ *P_{RCY1}-gRCY1-HA::P_{35S}-GFP* または *P_{35S}-cRCY1-HA::P_{35S}-GFP* と称した (図 14B)。GFP の発現カセットは、プライマー対として pUC.-40+NotI.15R と pUC.RV+NotI.15F, 鋳型として *35Spro::GFP* コンストラクト (Hondo et al. 2007) を用いて増幅した。

P_{35S}-gRCY1-HA は, CaMV 35S プロモーターの下流に, *RCY1* 両末端 UTR と 2 つのイントロンを含むゲノム *RCY1-HA* コード領域を融合したコンストラクトである (図 14B). *P_{35S}-gRCY1-HA* は, プライマー対として RI201AN.NdeI15.RCY1utr5 と RI201AN.SalI15.RCY1utr3 , 鋳型として pGA482/RCY1-HA (Sekine et al. 2008) を用いて増幅した PCR 断片を, pRI201-AN の *NdeI* および *SalI* サイトの間に挿入して作製した. *P_{35S}-gRCY1-HA* から *RCY1* 由来両末端 UTR を除いた構造を持つ *P_{35S}-gRCY1-HA^{of}* は (図 14B), プライマーを RI201AN.NdeI15bp と RI201AN.SalI15 bp に置き換えた点を除き, *P_{35S}-gRCY1-HA* と同様の手順で作製した.

P_{35S}-gRCY1.ΔI-HA および *P_{35S}-gRCY1.ΔII-HA* は, *P_{35S}-gRCY1-HA* からそれぞれ第一イントロンまたは第二イントロンを欠失したコンストラクトである (図 14B). *P_{35S}-gRCY1.ΔI-HA* の *RCY1* 第一イントロンを欠失した 5'側半分は, RI201AN.NdeI15.RCY1utr5 と RCY1.ExonII-R をプライマー対とし, *RCY1-HA* cDNA を鋳型として PCR 増幅した. さらに, *P_{35S}-gRCY1.ΔI-HA* の *RCY1* 第二イントロンを含む 3'側半分は, RCY1.ExonII-F と RI201AN.SalI15.RCY1utr3 をプライマー対とし, ゲノム *RCY1-HA* を鋳型として PCR 増幅した. pRI201-AN ベクターの *NdeI* および *SalI* サイトの間に, これら 2 つのインサートをクローニングした. *P_{35S}-gRCY1.ΔII-HA* は, *P_{35S}-gRCY1.ΔI-HA* の 2 つのインサート間でプライマー対と鋳型の組み合わせを入れ替えることで, 同様に作製した.

シロイヌナズナの *COLD-REGULATED 15A (COR15a, At2g42540)* 遺伝子の第二イントロンおよび *PROFILIN 3 (PRF3, At5g56600)* 遺伝子の第一イントロンは, 発現上昇活性を持たないことが示されている (Rose et al. 2008; Jeong et al. 2006). *P_{35S}-cRCY1.Ic-HA* および *P_{35S}-cRCY1.Ip-HA* は, *P_{35S}-cRCY1-HA* の第一エクソン・第二エクソンのスプライス接合部に, それぞれ *COR15a* 第二イントロンまたは *PRF3* 第一イントロンを挿入した構造を持つ (図 14B). *P_{35S}-cRCY1.Ic-HA* は, 3 種類の PCR 産物: プライマー対 RI201AN.NdeI15.RCY1utr5 と nE1rcy.cIcor-R を用いて増幅した *RCY1* 第一エクソン; プライマー対 nE1rcy.cIcor-F と nIcor.cE2rcy-R を用いて増幅した *COR15a* の第二イントロン; プライマー対 nIcor.cE2rcy-F と RI201AN.SalI15.RCY1utr3 を用いて増幅した *RCY1-HA* 第二・第三エクソンを, pRI201-AN ベクターの *NdeI* および *SalI* サイトの間にクローニングして作製した. 同様に, *P_{35S}-cRCY1.Ip-HA* は, 3 種類の PCR 産物: プライマー対 RI201AN.NdeI15.RCY1utr5 と nE1rcy.cIprf3-R を用いて増幅した *RCY1* 第一エクソン; プライマー対 nE1rcy.cIprf3-F と nIprf3.cE2rcy-R を用いて増幅した *PRF3* の第一イントロン; プライマー対 nIprf3.cE2rcy-F と RI201AN.SalI15.RCY1utr3 を用いて増幅した *RCY1-HA* 第二・第三エクソンを, pRI201-AN ベクターの *NdeI* および *SalI* サイトの間にクローニングして作製した.

(3) cDNA プールの調製

3 週齢のシロイヌナズナエコタイプ Col-0 に, CMV 接種 (48 時間), サリチル酸処理 (0.5 mM サリチル酸に葉柄を浸漬, 24 時間・48 時間), 高温処理 (37°C, 24 時間) および低温処理 (4°C, 24 時間) を施した. 各ストレスを処理した葉およびストレスを処理していない葉を混合して 1 つのサンプルとし, GTC 法 (pp. 12-13) により total RNA を抽出した. *Oligotex-dT30 <Super> mRNA Purification Kit* (タカラバイオ株式会社) を用いて, total RNA から polyA⁺ mRNA を精製した. ThermoScript™

RT-PCR System (Thermo Fisher Scientific Inc.) を用いて, polyA⁺ mRNA を鋳型, Oligo(dT)₂₀ をプライマーとして逆転写反応を行い, cDNA を合成した.

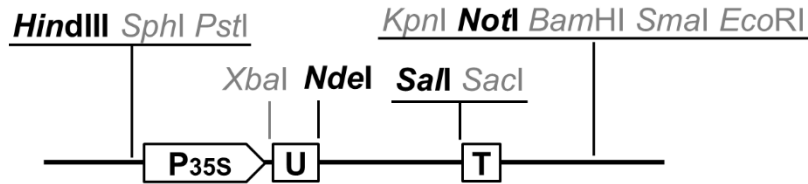
(4) COR15a, PRF3 および RCY1 ホモログ NB-LRR をコードするベクターの構築

防御応答とは無関係の遺伝子のコントロールとして, *COR15a* および *PRF3* のベクターを構築した. また, シロイヌナズナの 5 つの CC-NB-LRR 遺伝子, *RECOGNITION OF PERONOSPORA PARASITICA 8 (RPP8, At5g43470)*, *rpp8 (At5g43470)*, *At5g35450*, *ACTIVATED DISEASE RESISTANCE 1 (ADR1, At1g33560)*, および *ADR1-LIKE 1 (ADR1-L1, At4g33300)* のベクターを構築した. これら 7 つの遺伝子の, ゲノム型の (自己のイントロンを持つ) コード領域を含むコンストラクトを *P_{35S}-gx-HA*, cDNA 型の (イントロンを除いた) コード領域を含むコンストラクトを *P_{35S}-cx-HA* と称した (*x* は各遺伝子名を示す, 図 15B).

P_{35S}-cRPP8-HA は, 先行研究で作製された pRI201-AN::*RPP8-HA* (Takahashi et al. 2012b) を改称したコンストラクトである. *P_{35S}-gRPP8-HA* は, 2 つの PCR 産物: プライマー対として RI201AN.NdeI15.RCY1utr5 と RPP8.ExonI-R, 鋳型として *P_{35S}-cRPP8-HA* を用いて増幅した PCR 産物; プライマー対として RPP8.ExonI-F と RPP8.NdeI15-R, 鋳型としてエコタイプ Ler-0 のゲノム DNA を用いて増幅した PCR 産物を, *NdeI* により線状化した pRI201-AN::*P_{35S}-cRPP8-HA* にクローニングして作製した.

RPP8 以外の 6 つの遺伝子のゲノム型と cDNA 型のコード領域は, それぞれシロイヌナズナエコタイプ Col-0 由来のゲノム DNA または cDNA プールを鋳型として PCR 増幅した. *COR15a* は, RI201AN.NdeI.COR15a-F プライマーと, *BstZ17I* 認識サイトおよび HA エピトープ配列を付加した RI201AN.SalI15.HA.V.COR15a-R プライマーによって増幅した. pRI201-AN ベクターの *NdeI* および *SalI* サイト (図 14A) に同 PCR 断片を挿入して, HA タグ付きの pRI201-AN ベクター (図 15A) を作製した. その他, *PRF3*, *rpp8*, *At5g35450*, *ADR1* および *ADR1-L1* は, プライマー対 RI201AN.NdeI.x-F および HA.BstZ17I.x-R によって増幅し (*x* は各遺伝子名を示す, 表 2), pRI201-AN::*P_{35S}-gCOR15a-HA* ベクターの *NdeI* および *BstZ17I* サイト間 (図 15A) に挿入することで, コード配列の 3'-末端側に HA エピトープ配列を付加した (図 15B).

A pRI201-AN



B

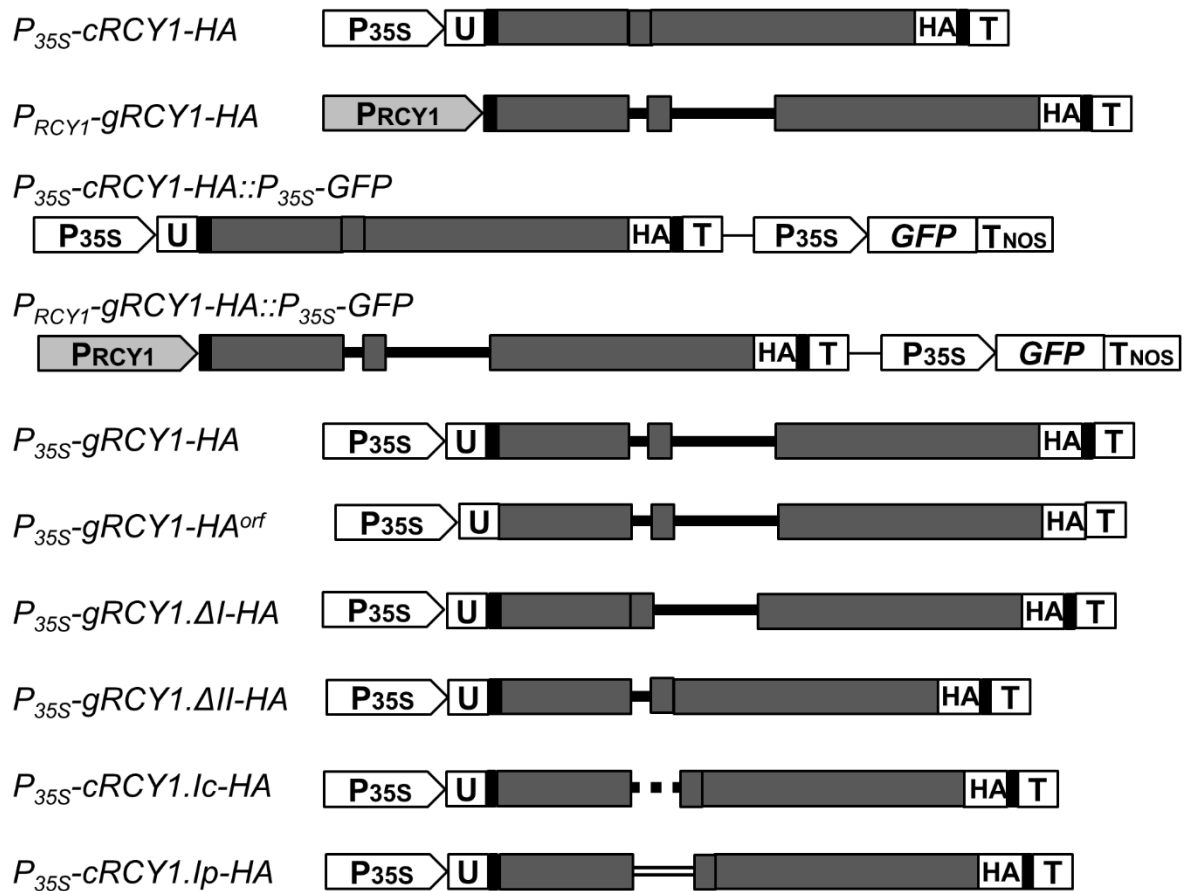
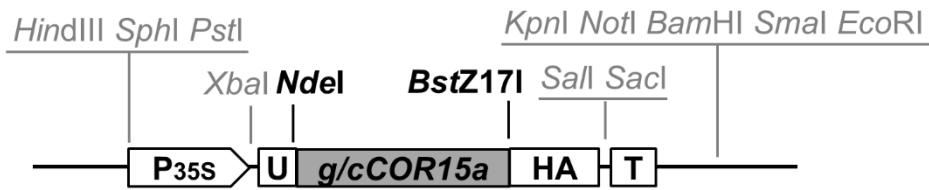


図 14. RCY1 タンパク質をコードするベクターコンストラクトの模式図

A, pRI201-AN バイナリーベクターのマルチクローニングサイトの模式図を示した. B, pRI201-NA バイナリーベクターにクローニングした, RCY1 タンパク質をコードする 10 個のコンストラクトの模式図を示した. 黒色のボックスで RCY1 両末端 UTR, 濃灰色のボックスで RCY1 コード領域を示した. ボックス内の垂線で, スプライス接合部位を示した. 太線で RCY1 の 2 つのイントロン, 太点線で COR15a 第二イントロン, 二重線で PRF3 第一イントロンを示した. A および B において, RCY1 由来プロモーターを“P_{RCY1}”, CaMV 35S プロモーターを“P_{35S}”, シロイヌナズナ *Alcohol Dehydrogenase* 由来 5'-UTR を“U”, ヘマグルチニンエピトープ配列を“HA”, シロイヌナズナ *Heat Shock Protein* 由来ターミネーターを“T”, 緑色蛍光タンパク質コード領域を“GFP”, *Nopaline Synthase* 由来ターミネーターを“T_{NOS}”のボックスで示した.

A pRI201-AN::P_{35S}-g/cCOR15a-HA



B

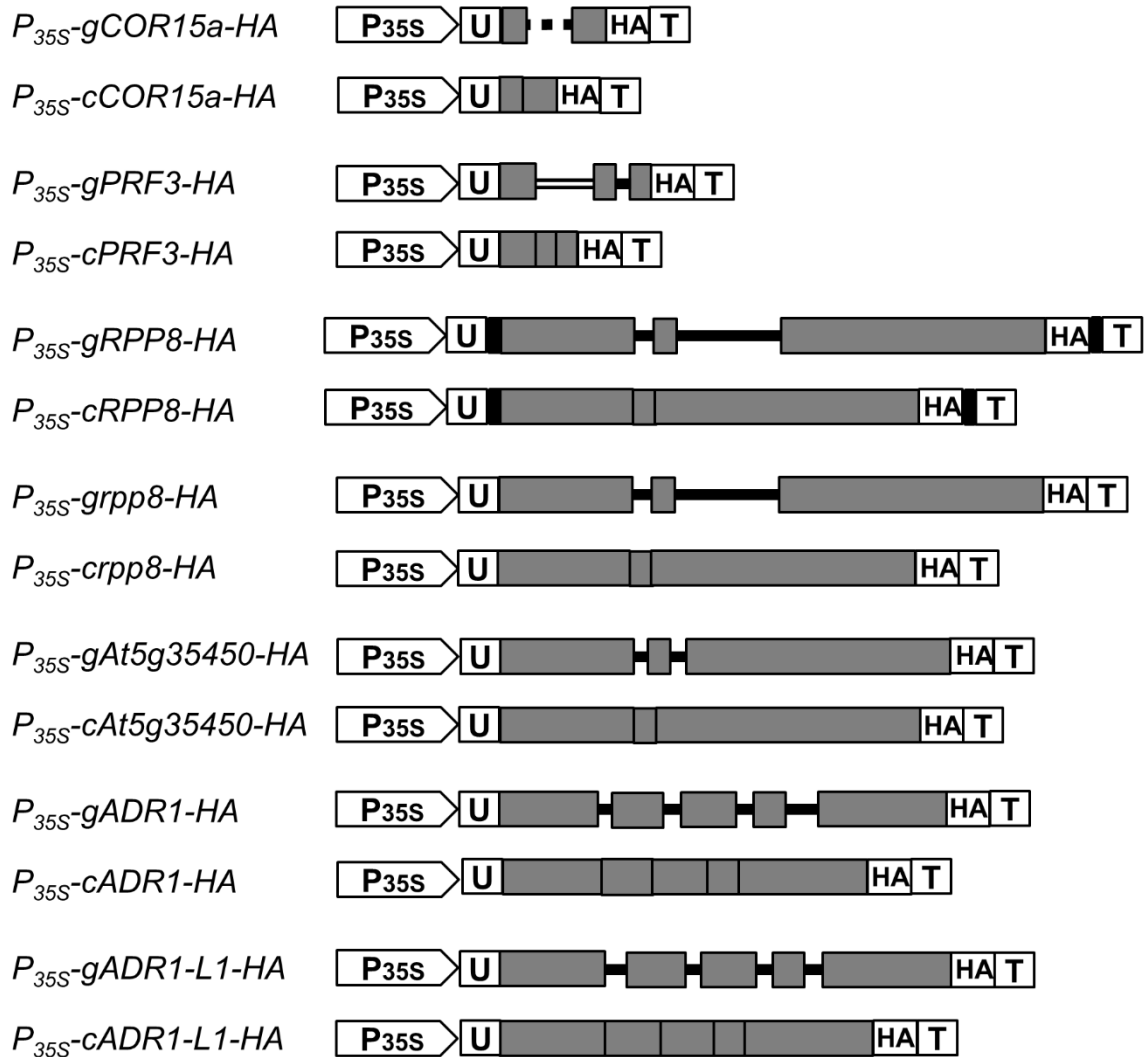


図 15. COR15a, PRF3 および CC-NB-LRR タンパク質をコードするベクターコンストラクトの模式図
A, 本研究で作製した, HA タグ付きの pRI201-AN バイナリーベクターのマルチクローニングサイトの模式図を示した. **B**, pRI201-NA バイナリーベクターにクローニングした, ゲノム型 (g) または cDNA 型 (c) の *COR15a*, *PRF3* または CC-NB-LRR 遺伝子コンストラクトの模式図を示した. 濃灰色のボックスで各遺伝子のコード領域を示した. ボックス内の垂線で, スプライス接合部位を示した. 太点線で *COR15a* 第二イントロン, 二重線で *PRF3* 第一イントロン, 太線でその他のイントロンを示した. 黒色のボックスは, *RCY1* 由来両末端 UTR を示す. **A** および **B** において, CaMV 35S プロモーターを“P_{35S}”, シロイヌナズナ *Alcohol Dehydrogenase* 由来 5'-UTR を“U”, ヘマグルチニンエピトープ配列を“HA”, シロイヌナズナ *Heat Shock Protein* 由来ターミネーターを“T”のボックスで示した.

表 2. ベクター構築に用いたプライマー配列

Primer name	Sequence (5' to 3') ^a
pUC.RV+NotI.15F	<u>CGGGATCCAGCGGCCCGACGTTGTAAAACGACGGCCAGT</u>
pUC.-40+NotI.15R	<u>TTGGTACCTGCGGCCGGAAACAGCTATGACCATGATTAC</u>
RI201AN.HindIII15.gRCY1	<u>GGCCAGTGCCAAGCTCAATTTTGGATTCCCTGCTTGCATC</u>
RI201AN.SalI15.RCY1utr3	<u>ATTCAGAATTGTCTCGAATGACTTTCACACGAATACAACAA</u>
RI201AN.NdeI15.RCY1utr5	<u>CACTGTTGATACATAAGAGAATCTGTACCCTTGGCGTTC</u>
RI201AN.NdeI15bp	<u>CACTGTTGATACATATGGCTGAAGGATTTGTGTCTGTTTGG</u>
RI201AN.SalI15bp	<u>ATTCAGAATTGTCTCGACTAAGCATAATCTGGAACATCGTAT</u>
RCY1.ExonII-R	CAGTTTCATCTCTCCTAGGGAATACTATTC
RCY1.ExonII-F	GAATAGTATTCCTAGGAGAGATGAAACTG
nE1rcy.cIcor-R	GAAAGAATGTAGACTTACCTCTTTTCCGTGGAAAC
nE1rcy.cIcor-F	GTTTCCACGGAAAAGAGGTAAGTCTACATTCTTTC
nIcor.cE2rcy-R	GTAAGCAGCATCTTCCAACCTATATCATTTTTCAA
nIcor.cE2rcy-F	TTTGAAAATGATATAGGTTGGAAGATGCTGCTTAC
nE1rcy.cIprf3-R	ATAGAAATAAACCTAACCTCTTTTCCGTGGAAAC
nE1rcy.cIprf3-F	GTTTCCACGGAAAAGAGGTTAGGTTTATTTCTAT
nIprf3.cE2rcy-R	GTAAGCAGCATCTTCCAACCTAAAACAACAACAATAC
nIprf3.cR2rcy-F	GTATTGTTGTTGTTTTAGGTTGGAAGATGCTGCTTAC
RPP8.ExonI-F	CAGGAAAGACAAAGGGTGCAGAGGGAGATC
RPP8.ExonI-R	GATCTCCCTCTGCACCCTTTGTCTTTCCTG
RPP8.NdeI15-R	CGGAGCTTAGTCATATGGAGGAGGTCTGTCACACTACTG
RI201AN.NdeI.COR15a-F	<u>CACTGTTGATACATATGGCTTCTTCTTTCCACAGCGGAG</u>
RI201AN.SalI15.HA.V.COR15a-R	<u>ATTCAGAATTGTCTGACCTAAGCATAATCTGGAACATCGTATG</u> <u>GGTATACTTTGTGGCATCCTTAGCCTCTCCTG</u> ^b
RI201AN.NdeI.PRF3-F	<u>CACTGTTGATACATATGCCATTGCCACACACTCACTC</u>
HA.BstZ17I.PRF3-R	<u>AACATCGTATGGGTATACGAGCCCCGATTCAATCAGGTAC</u>
RI201AN.NdeI.rpp8-F	<u>CACTGTTGATACATATGGCTGAAGCATTGTGTCTGTTTGG</u>
HA.BstZ17I.rpp8-R	<u>AACATCGTATGGGTATACCTGGTCACAGTTGATAAATTG</u>
RI201AN.NdeI.At5g35450-F	<u>CACTGTTGATACATATGGCTGAAGGAGTTGTGTCTG</u>
HA.BstZ17I.At5g35450-R	<u>AACATCGTATGGGTATACTTCTCTTTGTTCGTCGTCACAG</u>
RI201AN.NdeI.ADR1-F	<u>CACTGTTGATACATATGGCTTCGTTTCATAGATCTTTTTCG</u>
HA.BstZ17I.ADR1-R	<u>AACATCGTATGGGTATACATCGTCAAGCCAATCCACGGTG</u>
RI201AN.NdeI.ADR1-L1-F	<u>CACTGTTGATACATATGGCCATCACCGATTTTTCG</u>
HA.BstZ17I.ADR1-L1-R	<u>AACATCGTATGGGTATACTTCGTCAAGCCAGTCTAGGCTGAA</u> <u>G</u>

^a In-Fusion 反応のために付加した線状化ベクター末端 15-bp に相同な配列を下線で示した。

^b HA エピトープのアンチセンス配列を二重下線, *BstZ17I* の切断部位を太字で示した。

2. アグロインフィルトレーション法による遺伝子の一過的発現

エレクトロポレーション法により、*Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 系統 [LBA4404 Electro-Cells (タカラバイオ株式会社)]に、バイナリーベクターを導入した。*A. tumefaciens* および各バイナリーベクターに対応する抗生物質を含む yeast mannitol (YM) 固形培地 [0.04% (w/v) 酵母エキス, 1.0% (w/v) マンニトール, 1.7 mM NaCl, 0.8 mM MgSO₄, 2.2 mM K₂HPO₄, 1.5% (w/v) 寒天] に播き, 28°Cで2晩培養した。*A. tumefaciens* および各バイナリーベクターに対応する抗生物質を含む yeast extract broth (YEB) 培地 [1.33% (w/v) Nutrient broth, 0.1% (w/v) 酵母エキス, 0.5% (w/v) スクロース, 2.0 mM MgSO₄] にYM固形培地上のシングルコロニーを植菌し, 30°Cで40時間振とう培養した。培養液を6,000 rpmで5分間遠心分離した。上清を捨て、ペレットに培養時の液量と同量のインフィルトレーションバッファー [10 mM MES-KOH (pH 5.7), 10 mM MgCl₂, 150 μM アセトシリゴン] を加え, よく懸濁した後, 6,000 rpmで5分間遠心分離した。上清を捨て, 培養液量と同量のインフィルトレーションバッファーにペレットをよく懸濁した。OD₆₀₀が0.5になるようにインフィルトレーションバッファーで菌液を希釈した後, 25°Cで2時間インキュベートした。針なしの1 ml シリンジを用いて, *N. benthamiana* 完全展開葉の背軸面から *A. tumefaciens* 懸濁液を浸潤した。1枚の葉の独立した箇所、各 *A. tumefaciens* 形質転換系統をインフィルトレーションすることで、遺伝子コンストラクト間の発現の比較を行った。

N. benthamiana は、ピート板 (サカタのタネ株式会社, 横浜, 日本) に播種し, 昼夜温 26°C/21°C, 14時間光周期 (10,000 lux) のもと栽培した。播種から数週間後に, 複合肥料 (N:P:K = 1:1:1) を添加した栽培土に移植し, 同条件下で栽培した。アグロインフィルトレーションには, 7週齢の植物体を使用した。

3. シロイヌナズナ試料

(1) シロイヌナズナ試料と栽培

シロイヌナズナの野生型エコタイプとして Col-0 および C24 を使用した。また, エコタイプ Col-0 をバックグラウンドとした形質転換体として, Col::pRCY1-HA (Sekine et al. 2008) の独立3系統 (Col::pRCY1-HA#8, #10, #12) を用いた。また, 次項に示すように, 本研究で確立した Col::P_{35S}-cRCY1-HA の独立3系統 (Col::P_{35S}-cRCY1-HA#5, #21, #23) を供試した。120°Cで20分間オートクレーブ滅菌した PRO-MIX BX (Premier Tech Horticulture, Ltd.) に, これらのシロイヌナズナ系統を播種し, 25°C・連続照光下 (8,000 lux) で栽培した。

(2) シロイヌナズナ形質転換

外部委託により, アグロバクテリウムを介してシロイヌナズナエコタイプ Col-0 に P_{35S}-cRCY1-HA を形質転換した。得られた形質転換体の種子を, 70% (v/v) エタノール中で5分間振とうし, 2%の次亜塩素酸で5分間表面殺菌した後, 滅菌水で5回洗浄した。50 μg/ml カナマイシン, 100 μg/ml カルベニシリン, 1% (w/v) スクロースおよび 0.8% (w/v) 寒天を含む 0.5× MS 固形培地 (Murashige and Skoog 1962) に殺菌種子を撒き, 形質転換植物を選抜した。トランスジーンをホモで持つ植物体は,

2 世代目および 3 世代目 (T₂ および T₃) 植物体において, 抗 HA モノクローナル抗体 (F. Hoffmann-La Roche Ltd.) を用いたウェスタンブロッティングを介して選抜した. 選抜された系統を, Col::P_{35S}-cRCY1-HA と称した.

4. HA エピトープ標識タンパク質と GFP タンパク質の検出

HA エピトープ標識タンパク質は, 第二章の RCY1-HA タンパク質の検出法 (p. 12) と同様に, ウェスタンブロッティング法により検出した. ただし, COR15a-HA タンパク質を検出する際には, 電気泳動に用いる総タンパク質量を 1/50 量に減らし, ブロッティングにはニトロセルロースメンブレンおよび Towbin バッファー [25 mM Tris, 192 mM グリシン, 20 % (v/v) メタノール] を用いた.

RCY1-HA タンパク質を検出した後のメンブレンを用いて, GFP タンパク質を検出した. Anti-GFP (Green Fluorescent Protein) pAb (医学生物学研究所, 名古屋, 日本) を含む TBS-T (1:5000) 中で, メンブレンを 30 分間振とうした. TBS-T で 3 回洗浄した後, 0.2 µg/ml Anti-Rabbit IgG (Fc), AP conjugate (Promega Corp., Madison, WI, USA) を含む TBS-T 中で, メンブレンを 30 分間振とうした. TBS-T で 3 回洗浄した後, 発色基質液 [100 mM Tris-HCl (pH 9.5), 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0.033% (w/v) 塩化ニトロブルーテトラゾリウム, 0.017 % (w/v) 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate] を用いて, メンブレン上の GFP タンパク質を可視化した.

5. RCY1 転写産物の検出と定量

(1) ノーザンブロッティング法による転写産物の検出

ノーザンブロッティング法により, 遺伝子コンストラクトを一過的に発現させた *N. benthamiana* 組織に蓄積する各遺伝子の転写産物を検出した. ノーザンブロッティングは, 用いるプローブを除いて, シロイヌナズナにおける *RCY1* 転写産物の検出 (pp. 13-14) と同様に行った. *RCY1*, *RPP8* および *rpp8* 転写産物を検出するプローブは, 3 遺伝子間での共通性が高い領域を増幅する, 以下のプライマー対を用いて調製した.

RCY1.ExonI-F: 5'-ATGGCTTCTTCTTTCCACAGCGGAG-3'

rpp8-R3: 5'-CTTTGTGGCATCCTTAGCCTCTCCTG-3'

COR15a および *PRF3* 転写産物を検出するプローブは, それぞれ以下のプライマー対により増幅した.

COR15a-F: 5'-ATGGCTTCTTCTTTCCACAGCGGAG-3'

COR15a-R: 5'-CTTTGTGGCATCCTTAGCCTCTCCTG-3'

PRF3-F: 5'-ATGCCATTGCCACACACTCACTC-3'

PRF3-R: 5'-GAGCCCCGATTCAATCAGGTAC-3'

N. benthamiana の HR 誘導のマーカー遺伝子である *PRB-1b*, *PR-2b* および *PR-6* の転写産物を検出するプローブは, 以下のプライマー対を用いて調製した.

PRB-1b-F: 5'-CGGGATCCCGCCAAAACCCAAAATGGGATA-3'

PRB-1b-R: 5'-CGGAATTCCGCGTAGGGACGTTGTCCTCTC-3'

PR-2b-F: 5'-CGGGATCCCGGATGCCATTGTTGGCTTCTT-3'

PR-2b-R: 5'-CGGAATTCCGACTGTCCCAAACCTCCACCAG-3'
PR-6-F: 5'-ACGATCCCATATGCACCACT-3'
PR-6-R: 5'-AATCCAGAAAACGGGCAAC-3'

(2) リアルタイム qRT-PCR 法による *RCY1* 転写産物の定量

リアルタイム qRT-PCR 法により、シロイヌナズナまたはアグロインフィルトレーション 48 時間後の *N. benthamiana* の遺伝子発現組織における *RCY1*, *RPP8* または *rpp8* 転写産物蓄積量を定量した。qRT-PCR は、シロイヌナズナにおける *RCY1* 転写産物の検出法 (p. 14) と同様に行った。*RCY1* 転写産物の検出には、プライマー対 *RCY1*-HA.F および *RCY1*-HA.R (p. 14) を用いた。*RPP8* 転写産物は、プライマー対 *CYCYRP*-HA.F および *CYCYRP*-HA.R を用いて検出した。*rpp8* 転写産物は、プライマー対 *rpp8*-F6 および *rpp8*-R2 を用いて検出した。内部標準として、プライマー対 *NbEF-1α*-F および *NbEF-1α*-R によって *Nicotiana benthamiana ELONGATION FACTOR 1α* (*NbEF-1α*) 転写産物を検出した。プライマー配列を以下に示す。

CYCYRP-HA.F: 5'-TCCCCACCTTGCACAAA-3'
CYCYRP-HA.R: 5'-CCAGCGAAAGCCTTAAATGTT-3'
rpp8-F6: 5'-ACAACCTAACATTGCTCAGG-3'
rpp8-R2: 5'-CCTTAGCCTCGTATAAACTC-3'
NbEF-1α-F: 5'-CTGATTATTGACTCCACCACTG-3'
NbEF-1α-R: 5'-GATCTTGTTACAGCAGCAAATC-3'

6. HR における植物の生理的变化の解析

(1) トリパンブルー染色による HR 様細胞死の検出

トリパンブルー染色によって細胞死を可視化した。トリパンブルー染色液 (p. 15) に、アグロインフィルトレーション 3 日後の *N. benthamiana* の葉を入れ、8 分間ボイルした。室温に戻した後、1.0 g/ml 抱水クロラールに葉を移し、数日間穏やかに振とうしてバックグラウンドを脱色した。

(2) DAB 染色による H_2O_2 産生の検出

3, 3'-diaminobenzidine (DAB) を用いて H_2O_2 産生を検出した。1 mg/ml DAB 溶液 (pH 3.8) に、アグロインフィルトレーション 3 日後の *N. benthamiana* の葉を入れ、暗条件下 25°C で 12 時間インキュベートした。95% エタノールに葉を移し、10 分間ボイルしてバックグラウンドを脱色した。

(3) 電解質漏出量の測定

電解質漏出量測定により、HR 様細胞死の強さを定量評価した。アグロインフィルトレーション 3 日後の *N. benthamiana* 葉における各遺伝子コンストラクトの発現組織から、直径 0.6 cm のリーフディスクを 10 枚くり抜き、11 ml の 0.4 M ソルビトールに浮かべた。25°C で 20 時間インキュベートした後、電気伝導率計 (ES-51; 堀場製作所, 京都, 日本) を用いてインキュベート溶液の導電率を測定した。

インキュベート溶液とリーフディスクを 10 分間ボイルして室温に戻した後、ボイル溶液の導電率を測定した。ボイル前およびボイル後の溶液の導電率からブランクの導電率を差し引いた値をそれぞれサンプル導電率または総導電率と称した。総導電率に対するサンプル導電率の割合を相対電解質漏出量として示した。

7. RCY1 イントロンのエンハンサー活性の解析

(1) GUS レポーターベクターの構築

pSMAHdN632L-M2GUS (Hakata et al. 2010) の *gusA* 遺伝子上流に、pBI121 ベクター由来の CaMV 35S プロモーターを挿入したコンストラクトを *P_{35S}-GUS* と称した。*RCY1intI+II-P_{35S}-GUS* は、*RCY1* ゲノム DNA の第一イントロンから第二イントロンに亘る領域を *P_{35S}-GUS* 上流にクローニングしたコンストラクトである。*P_{35S}-gRCY1-HA* を鋳型として、以下のプライマー対を用いて PCR 増幅したイントロン断片を、*SbfI* によって線状化した *P_{35S}-GUS* にクローニングした。

SMAH.SbfIXhoI.RCY1intron-F:

5'-GTTAAGGAATTGCCCTGCAGGCTCGAGTTCACGGAAAAGAGGTG-3'

SMAH.SbfI.RCY1intron-R:

5'-GGCTAATCTGGGGACCTGCACATCAAGCCTTACTTCTGC-3'

(2) ELISA 法による GUS タンパク質蓄積量の定量

ELISA 法により、GUS タンパク質を定量した。生重量の 100 倍の 50 mM Na₂CO₃ (pH 9.6) で、*N. benthamiana* の各遺伝子コンストラクトの発現組織を摩砕した。総タンパク質量を 0.022 mg/ml に調製した摩砕液 200 μl をマイクロアッセイプレート (Thermo Fisher Scientific Inc.) の各ウェルに入れ、1 時間静置した。以降、一次抗体の種類を除き、ELISA 法による CMV-CP 蓄積の定量方法 (pp. 11-12) と同様に、相対 GUS タンパク質蓄積量として 405 nm 吸光度を測定した。一次抗体には、0.4 μg/ml の Anti-β-Glucuronidase Rabbit IgG (H+L) Fraction (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) を使用した。

8. qRT-PCR による RCY1 選択的転写産物の検出

GTC 法 (pp. 12-13) により、シロイヌナズナ葉または *RCY1-HA* を一過的に発現した *N. benthamiana* 葉組織から total RNA を抽出した。RQ1 RNase-Free DNase (Promega Corp.) を用いて、total RNA に混入している可能性があるゲノム DNA を分解した。ゲノム DNA を分解した後、フェノール・クロロホルム抽出およびエタノール沈殿により RNA を精製した。精製 RNA を鋳型として、ThermoScript™ RT-PCR System (Thermo Fisher Scientific Inc.) を用いて、Oligo(dT)₂₀ をプライマーとして逆転写反応を行い、cDNA を合成した。GoTaq® DNA polymerase (Promega Corp.) を用いた RT-PCR により、*RCY1* と *rpp8* の共通配列に特異的なプライマーを用いて、*RCY1* および *rpp8* 選択的転写産物を検出した。第一イントロンを保持する *RCY1* 転写産物の検出には、プライマーセットとして *RCY1.IntI-F1-2* と *RCY1.ExonIII-R*、または *RCY1.ExonI-F* と *RCY1.ExonII-R* を用いた。第二イント

ロンを保持する *RCY1* 転写産物の検出には、プライマーセットとして *RCY1.ExonI-F* と *RCY1.IntII-R2* を用いた。 *RCY1.ExonI-F* (p. 45) と *RCY1.ExonII-R* プライマーの配列 (p. 43, 表 2) を除く、プライマー配列を以下に示す。

RCY1.IntI-F1-2: 5'-GTGAGCTCTTATGGTACATACATGAAG-3'

RCY1.ExonIII-R: 5'-GTCTTTGATAATTTGTAGGAAGTTCTCTTC-3'

RCY1.IntII-R2: 5'-GCCTAAATTAGCATATGGATTACC-3'

内部標準として、シロイヌナズナにおいては *UBQ5*, *N. benthamiana* においては *NbEF-1 α* 発現を検出した。 *UBQ5* 検出のプライマー配列は p.14, *NbEF-1 α* 検出のプライマー配列は p.46 に示した。 PCR 産物を 1.0% (w/v) アガロースゲルと 1 \times TAE で電気泳動し、ゲルをエチジウムブロマイドで染色した。 鋳型 cDNA にゲノム DNA がコンタミネーションしている可能性を検討するコントロール実験として、逆転写反応を施す前の total RNA を鋳型として、PCR を行った。 また、イントロンが保持されたまたは除去された *RCY1* 断片のサイズを確認するコントロールとして、*RCY1-HA* コンストラクトのプラスミド DNA を鋳型として PCR を行った。

第三節 結果

第一項 RCY1 タンパク質蓄積量の制御に関わる RCY1 遺伝子領域の同定

1. *N. benthamiana*におけるゲノム RCY1 と CaMV 35S プロモーター制御 RCY1 cDNA の一過的発現

初めに、ゲノム RCY1 と RCY1 cDNA の発現を比較した。RCY1 プロモーターを含むゲノム RCY1-HA のベクターである $P_{RCY1}\text{-gRCY1-HA}$ と、CaMV35S プロモーター下流に RCY1-HA の cDNA を融合したベクターである $P_{35S}\text{-cRCY1-HA}$ の下流それぞれに、T-DNA 領域の細胞核内への移行効率の内部標準として、GFP 発現カセットを挿入した (図 14B)。*N. benthamiana* において、これら $P_{RCY1}\text{-gRCY1-HA}::P_{35S}\text{-GFP}$ および $P_{35S}\text{-cRCY1-HA}::P_{35S}\text{-GFP}$ コンストラクトを一過的に発現させた。その結果、アグロインフィルトレーションの 48 時間後と 72 時間後において、 $P_{35S}\text{-cRCY1-HA}::P_{35S}\text{-GFP}$ の発現組織に比べ、 $P_{RCY1}\text{-gRCY1-HA}::P_{35S}\text{-GFP}$ の発現組織において、RCY1 タンパク質がより高蓄積していた (図 16)。各コンストラクトの発現葉組織において、GFP 蓄積量の推移に大きな差は認められなかったことから (図 16)、RCY1 タンパク質高蓄積は、T-DNA 移行効率の差ではなく、RCY1 発現カセットの遺伝子構造の違いに起因すると考えられた。

2. *N. benthamiana*における UTR・イントロン欠失 RCY1 の一過的発現

ゲノム RCY1 に含まれるプロモーター、UTR およびイントロンのどの遺伝子構造が RCY1 タンパク質高蓄積に寄与しているのか調べるため、*N. benthamiana* において一連のベクターコンストラクト (図 14B) を一過的に発現させて、アグロインフィルトレーション48時間後の発現組織における RCY1 タンパク質および RCY1 転写産物の蓄積量を比較した。

まず、RCY1 プロモーターと CaMV 35S プロモーターの活性を比較するために、 $P_{RCY1}\text{-gRCY1-HA}$ に対して、RCY1 プロモーターを CaMV 35S プロモーターに置き換えた $P_{35S}\text{-gRCY1-HA}$ コンストラクトの発現を比較した。 $P_{35S}\text{-gRCY1-HA}$ 発現組織に比べて、 $P_{RCY1}\text{-gRCY1-HA}$ 発現組織において、RCY1 転写産物と RCY1 タンパク質の蓄積量は低下していた (図 17)。したがって、図 16 において認められたゲノム RCY1 発現における RCY1 タンパク質高蓄積は、CaMV 35S プロモーターに比べた、RCY1 プロモーター活性の高さに起因するものではないと考えられた。

次に、RCY1 タンパク質高蓄積における RCY1 由来の 5'-UTR および 3'-UTR の役割を調べるために、 $P_{35S}\text{-gRCY1-HA}$ に対して、RCY1 由来両末端 UTR を欠失させた $P_{35S}\text{-gRCY1-HA}^{of}$ コンストラクトの発現を比較した。 $P_{35S}\text{-gRCY1-HA}$ および $P_{35S}\text{-gRCY1-HA}^{of}$ の発現組織間で、RCY1 転写産物や RCY1 タンパク質の蓄積量は、同等であった (図 17)。この結果から、RCY1 の両末端 UTR は、RCY1 発現量の調節に関与していないことが示唆された。

さらに、RCY1 のコード領域内に含まれる 2 つのイントロンの役割を調べるため、 $P_{35S}\text{-gRCY1-HA}$ と $P_{35S}\text{-cRCY1-HA}$ の発現を比較した。その結果、 $P_{35S}\text{-cRCY1-HA}$ の発現組織に比べて、 $P_{35S}\text{-gRCY1-HA}$ の発現組織において、明らかに RCY1 タンパク質が高蓄積していることが認められた (図 17A, B)。反対に、 $P_{35S}\text{-cRCY1-HA}$ 発現葉組織に比べて、 $P_{35S}\text{-gRCY1-HA}$ 発現葉組織における

RCY1 転写産物蓄積量は低下していた (図 17C, D および図 18). *P_{35S}-gRCY1-HA* ベクターは CaMV 35S プロモーター下流に、イントロンを 2 つ有するゲノム *RCY1* をコードしているのに対し、*P_{35S}-cRCY1-HA* ベクターは、イントロンを持たない *RCY1* cDNA をコードしている。以上より、*RCY1* コード領域におけるイントロンの存在が、*RCY1* タンパク質蓄積量の上昇に不可欠であると考えられた。また、このイントロンを介した *RCY1* タンパク質高蓄積は、*RCY1* 転写産物量の減少をともなうことが認められた。

さらに、*RCY1* コード領域に含まれる 2 つのイントロンの役割を解析するために、*P_{35S}-gRCY1-HA* に対して、*RCY1* 第一イントロンを欠失させた *P_{35S}-gRCY1.ΔI-HA* コンストラクトと、*RCY1* 第二イントロンを欠失させた *P_{35S}-gRCY1.ΔII-HA* コンストラクトの発現を調べた。*P_{35S}-gRCY1.ΔI-HA* および *P_{35S}-gRCY1.ΔII-HA* の発現組織における *RCY1* タンパク質蓄積量は、*P_{35S}-gRCY1-HA* 発現組織と類似している一方で、*P_{35S}-cRCY1-HA* 発現組織に比べて顕著に上昇していた (図 17A, B)。*P_{35S}-gRCY1.ΔI-HA* および *P_{35S}-gRCY1.ΔII-HA* を発現させた葉組織における *RCY1* 転写産物蓄積量も、*P_{35S}-gRCY1-HA* 発現組織と同様であったのに対し、*P_{35S}-cRCY1-HA* 発現組織に比べて明らかに低下していた (図 17C, D)。したがって、*RCY1* の 2 つのイントロンのいずれか片方のみが存在すれば、*RCY1* タンパク質が同等に高蓄積することが認められた。

3. ゲノム *RCY1* を一過的に発現させた *N. benthamiana* における防御応答誘導の促進

RCY1 タンパク質は、*N. benthamiana* において過剰蓄積すると、*Avr* 遺伝子産物が存在しない状況においても自発的に活性化し、HR 様の応答を誘導することがわかっている (Takahashi et al. 2012b)。*N. benthamiana* において、*P_{35S}-cRCY1-HA* を一過的に発現させた組織に比べて、*P_{35S}-gRCY1-HA* の発現組織において、HR 様細胞死、電解質漏出や H_2O_2 産生がより強く誘導されていた (図 19A-C)。さらに、*P_{35S}-gRCY1-HA* 発現組織における *PRB-1b*、*PR-2b* および *PR-6* を含む防御関連遺伝子の発現は、*P_{35S}-cRCY1-HA* 発現組織に比べてより強く誘導されていた (図 19D)。したがって、イントロンを介した *RCY1* タンパク質蓄積量の増加は、*RCY1* タンパク質下流の防御応答を強化する役割を担っていると考えられた。

4. シロイヌナズナにおけるゲノム *RCY1* と CaMV 35S プロモーター制御 *RCY1* cDNA の発現

シロイヌナズナにおいてもイントロンが *RCY1* タンパク質高蓄積に必要であるのか調べるため、*P_{35S}-cRCY1-HA* を形質転換した Col-0 系統を作出し、ゲノム *RCY1* 形質転換系統である Col::p*RCY1*-HA (Sekine et al. 2008) と比較した。それぞれの形質転換体について、1 コピーのみ *RCY1* トランスジーンを有する独立 3 系統を選抜した (図 20A)。ゲノム *RCY1* 形質転換体の独立 3 系統 (Col::p*RCY1*-HA#8, #10, #12) に比べて、*RCY1* の cDNA の形質転換体の独立 3 系統 (Col::P_{35S}-c*RCY1*-HA#5, #21, #23) において、*RCY1* 転写産物量は平均して 10 倍以上高かった一方で (図 20B)、*RCY1* タンパク質蓄積量は約 1/4 に減少していた (図 20C, D)。したがって、シロイヌナズナにおいても、ゲノム *RCY1* コード領域のイントロンが、*RCY1* 転写産物量の上昇とは相関しない、*RCY1* タンパク質蓄積量の上昇に関与していることが示唆された。

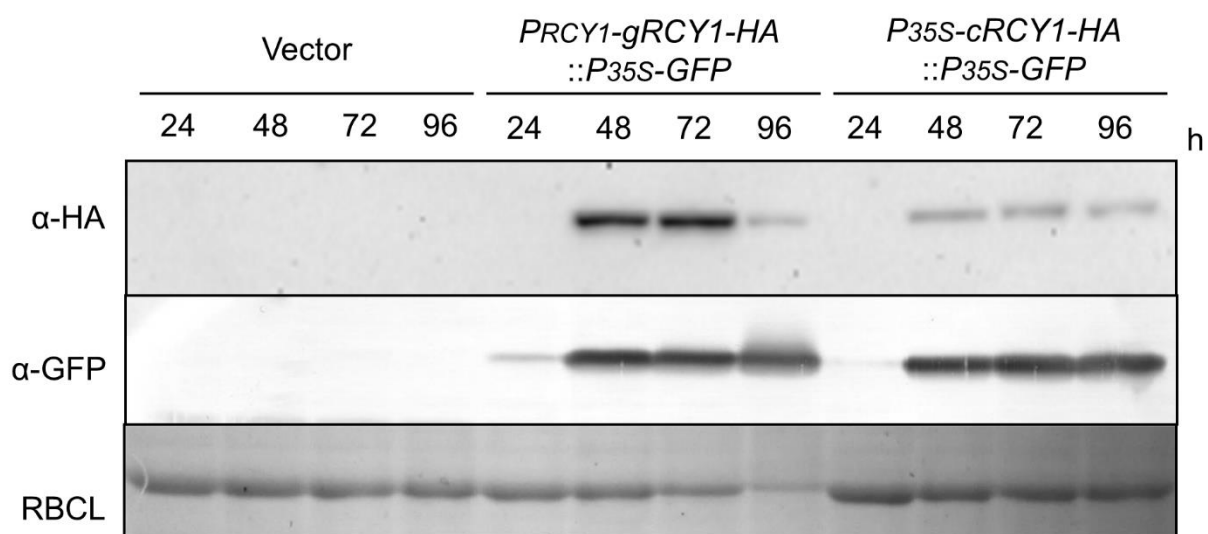


図 16. ネイティブ *RCY1* プロモーター制御ゲノム *RCY1-HA* または *CaMV35S* プロモーター制御 *RCY1-HA* cDNA 一過的発現 *N. benthamiana* 葉における HA エピトープ標識 *RCY1* の検出

P_{RCY1}-gRCY1-HA::P_{35S}-GFP または *P_{35S}-gRCY1-HA::P_{35S}-GFP* を一過的に発現させた *N. benthamiana* 葉組織において、アグロインフィルトレーション操作の 24, 48, 72 および 96 時間後に、抗 HA モノクローナル抗体を用いて *RCY1-HA* タンパク質を検出した。同様に内部標準として、抗 GFP ポリクローナル抗体を用いて GFP タンパク質蓄積を検出した。タンパク質サンプル定量の内部標準として、CBB R-250 により RBCL タンパク質を可視化した。

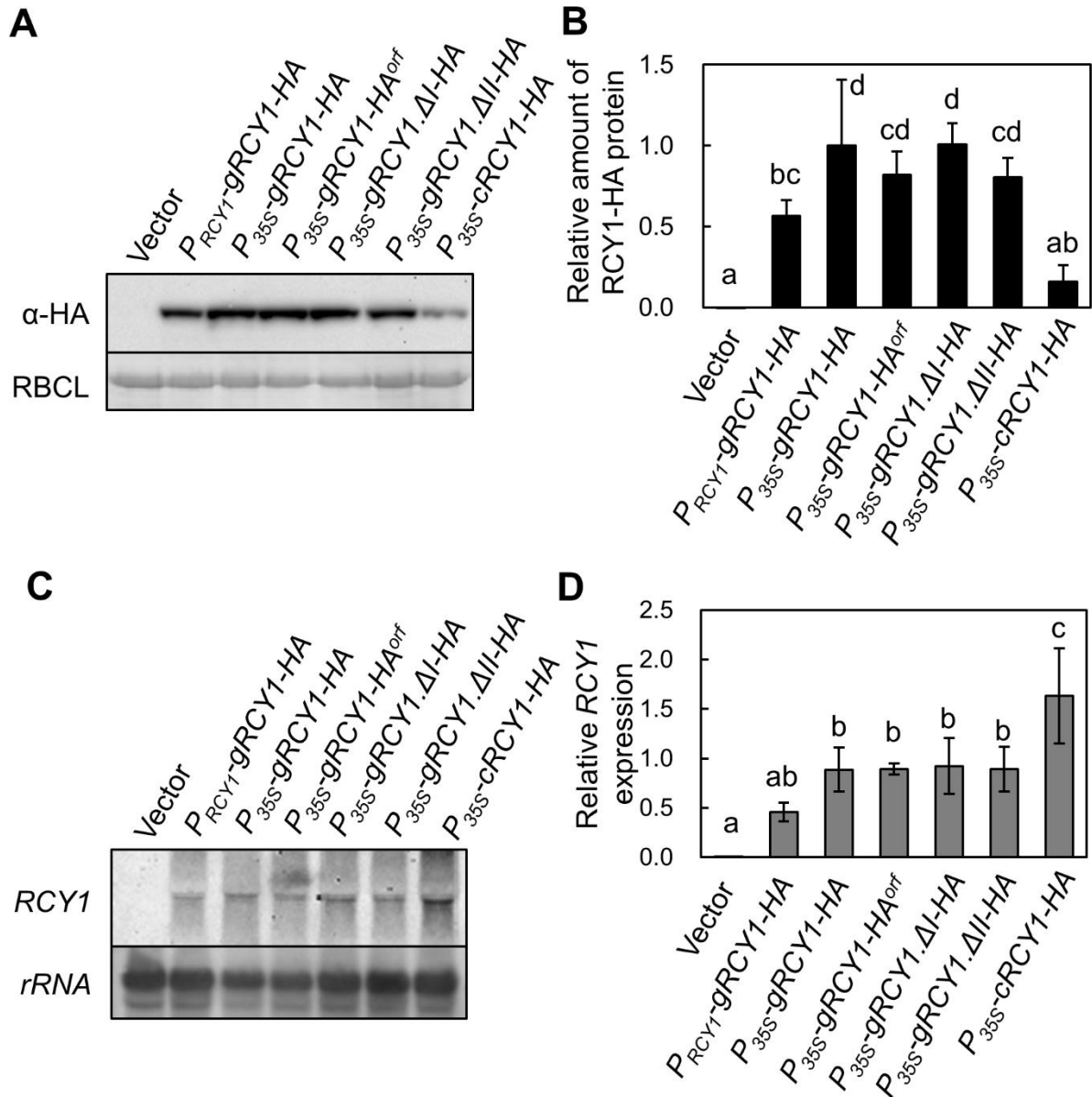


図 17. ネイティブプロモーターまたは CaMV 35S プロモーター制御のもと *RCY1-HA* コンストラクトシリーズを一過的に発現した *N. benthamiana* 葉における HA エピトープ標識 *RCY1* タンパク質および *RCY1* 転写産物の検出

アグロバクテリウムを介して、*P_{RCY1}-gRCY1-HA*、*P_{35S}-gRCY1-HA*、*P_{35S}-gRCY1-HA^{orf}*、*P_{35S}-gRCY1.ΔI-HA*、*P_{35S}-gRCY1.ΔII-HA* または *P_{35S}-cRCY1-HA* を一過的に発現した *N. benthamiana* 葉において、アグロインフィルトレーション操作の 48 時間後に、*RCY1-HA* タンパク質および *RCY1* 転写産物を定量した。一過的遺伝子発現操作のコントロールとして、pRI201-AN ベクター (Vector) を用いた。A, ウェスタンブロットング法により、抗 HA モノクローナル抗体を用いて *RCY1-HA* タンパク質蓄積を検出した。サンプルローディングの内部標準として、CBB R-250 によって染色した RBCL タンパク質のバンドを示した。B, ウェスタンブロットングのバンドの画像解析により、*RCY1-HA* タンパク質蓄積を定量化した。C, ノーザンブロットング法により、*RCY1* 転写産物を検出した。サンプルローディングの内部標準として、18S *rRNA* を検出した。D, qRT-PCR 法により、*RCY1* 転写産物蓄積量を測定し、*NbEF-1α* 転写産物蓄積量で標準化した。B および D において、4 個体における平均値±標準偏差を示した。同じアルファベットは、コンストラクト間で統計的有意差が検出されないことを示す ($P < 0.05$, Tukey HSD test).

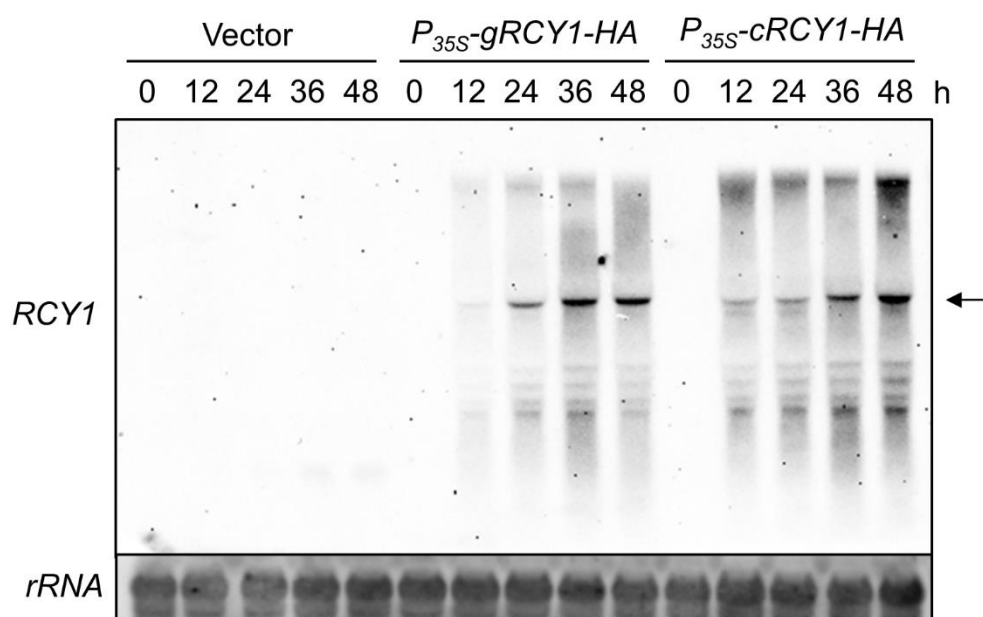


図 18. P_{35S} -gRCY1-HA および P_{35S} -cRCY1-HA を一過的に発現した *N. benthamiana* 葉における RCY1 転写産物蓄積の推移

P_{35S} -gRCY1-HA または P_{35S} -cRCY1-HA を一過的に発現した *N. benthamiana* 組織において、アグロインフイルトレーション操作の 0, 12, 24, 36, 48 時間後の RCY1 転写産物蓄積量を、ノーザンブロットティング法により解析した。矢印は、RCY1 の成熟 mRNA の位置を示す。サンプルローディングの内部標準として、18S rRNA を示した。

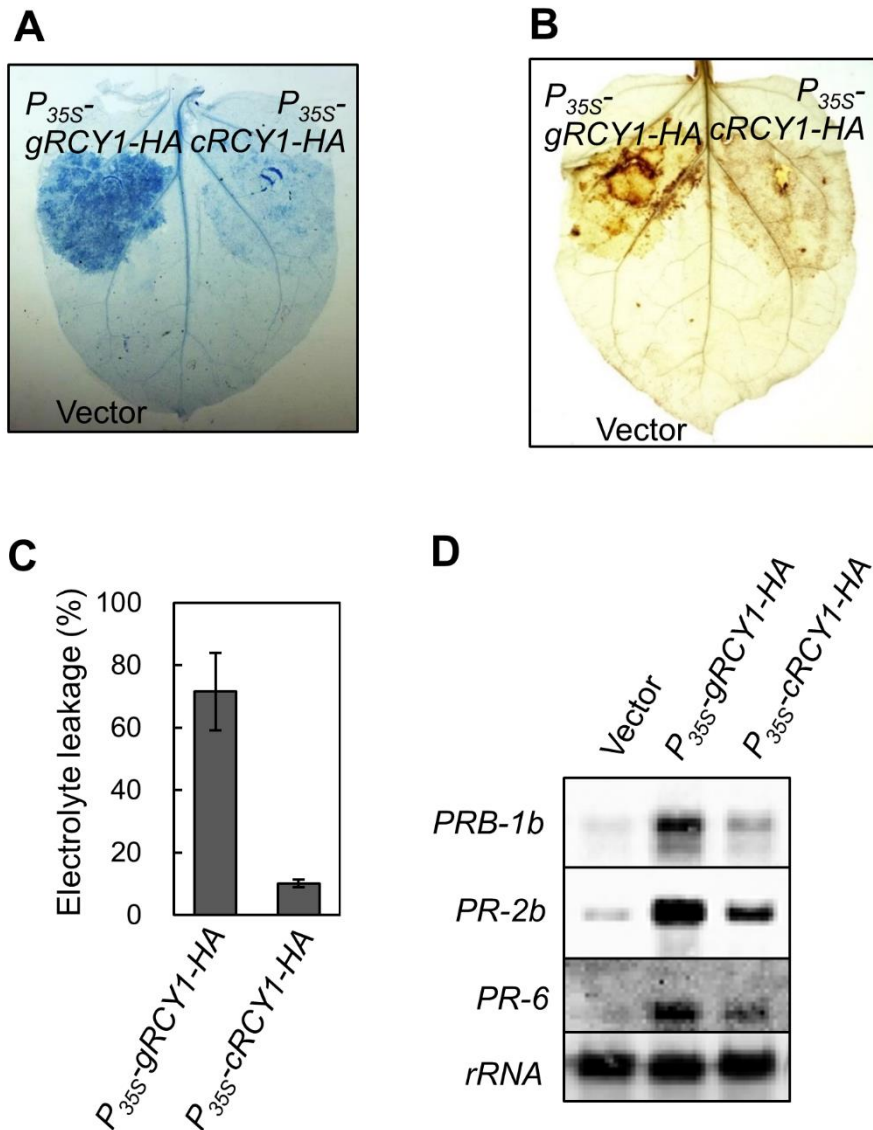


図 19. P_{35S} -gRCYI-HA および P_{35S} -cRCYI-HA を一過的に発現した *N. benthamiana* 葉における防御応答活性の解析

アグロバクテリウムを介して、 P_{35S} -gRCYI-HA または P_{35S} -cRCYI-HA を一過的に発現した *N. benthamiana* 組織において誘導される防御応答を解析した。一過的遺伝子発現操作のコントロールとして、pRI201-AN ベクター (Vector) を用いた。A, トリパンプルー染色法により HR 細胞死を可視化した。B, DAB 染色法により、 H_2O_2 産生を可視化した。C, 電解質漏出量の測定により、過敏感反応の程度を定量的に評価した。A から C において、アグロインフィルトレーション 72 時間後の各遺伝子の発現組織を解析に用いた。D, ノーザンブロットング法により、アグロインフィルトレーション 48 時間後の各遺伝子の発現組織に蓄積する、防御関連 (pathogenesis-related: PR) 遺伝子 *PRB-1b*, *PR-2b* および *PR-6* の転写産物を検出した。RNA サンプルローディングの内部標準として、18S *rRNA* 発現を検出した。

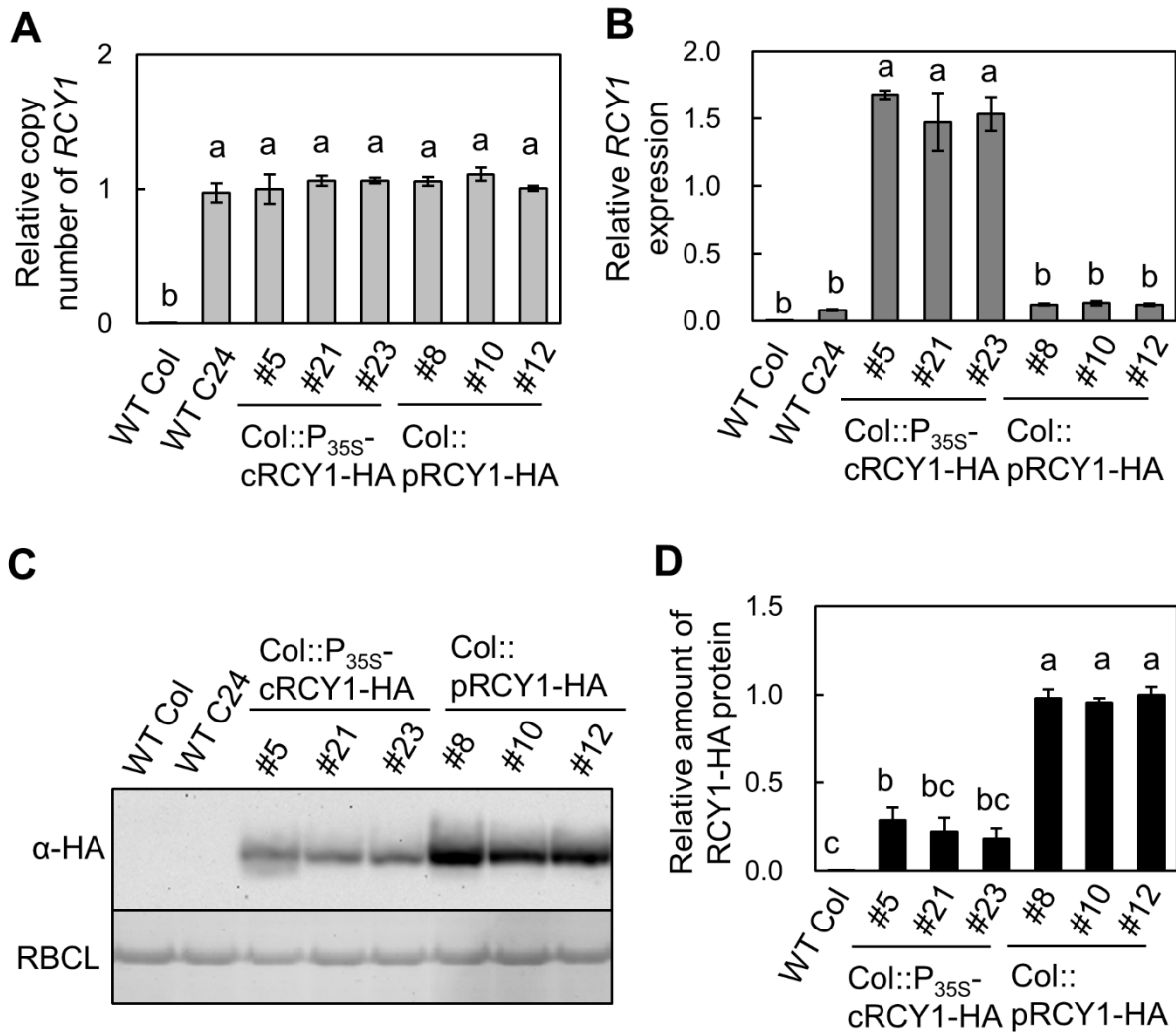


図 20. HA 標識ゲノム *RCY1* または HA 標識 *RCY1* cDNA 形質転換 Col-0 独立 3 系統における *RCY1* 転写産物, *RCY1* トランスジーンおよび HA エピトープ標識 *RCY1* タンパク質の検出

シロイヌナズナ野生型エコタイプ Columbia (WT Col) および C24 (WT C24), HA 標識ゲノム *RCY1* 形質転換体の独立 3 系統 (Col::pRCY1-HA #8, #10, #12) および HA 標識 *RCY1* cDNA 形質転換体の独立 3 系統 (Col::P_{35S}-cRCY1-HA #5, #21, #23) における *RCY1* 転写産物, *RCY1* コピー数および *RCY1*-HA タンパク質蓄積量を示した. **A**, リアルタイム PCR 法により, *RCY1* の相対コピー数を測定し, *UBQ5* の相対コピー数によって標準化した値の, 3 個体における平均値±標準偏差を示した. **B**, qRT-PCR 法により, *RCY1* 転写産物蓄積量を測定し, *UBQ5* 転写産物蓄積量によって標準化した値の, 3 個体における平均値±標準偏差を示した. **C**, ウェスタンブロッティング法により, 抗 HA モノクローナル抗体を用いて *RCY1*-HA タンパク質を検出した. 総タンパク質の内部標準として, CBB R-250 により染色した RBCL タンパク質のバンドを示した. **D**, Quantity One ソフトウェアを用いたバンド濃度の定量により, *RCY1*-HA タンパク質蓄積量を数値化し, 4 個体における平均値±標準偏差を示した. **A**, **B** および **D** において, 同じアルファベットは, 植物系統間で統計的有意差が検出されないことを示す ($P < 0.05$, Tukey HSD test).

第二項 RCY1 タンパク質蓄積量の制御における RCY1 イントロン配列の役割

1. RCY1 イントロンのエンハンサー活性

RCY1 イントロンに、非特異的にタンパク質蓄積量を上昇させるシス配列が含まれるかどうか調べるために、CaMV35S プロモーターと融合した β -グルクロニダーゼ (GUS) 発現カセット (P_{35S} -GUS) の上流に、RCY1 第一イントロンから第二イントロンにわたる領域を挿入したコンストラクト $RCY1intI+II-P_{35S}$ -GUS を作製し (図 21A), *N. benthamiana* において一過的に発現させた。ELISA 法により、各コンストラクトの発現組織間における GUS タンパク質蓄積量を定量したところ、 P_{35S} -GUS および $RCY1intI+II-P_{35S}$ -GUS 間で、GUS タンパク質蓄積量は変化しなかった (図 21B)。よって RCY1 イントロンに、エンハンサー様のシス配列が存在する可能性は低いと考えられた。

2. COR15a イントロンおよび PRF3 イントロンの発現増強活性

イントロンを介した RCY1 タンパク質蓄積上昇の効果が、RCY1 イントロン配列に特異的であるのか調べるため、ゲノム RCY1 のイントロンを、配列相同性のない他のイントロンに置換する実験を行うことにした。そのために、転写エンハンサー活性を持たないことが報告されている、シロイヌナズナの COR15a 第二イントロンまたは PRF3 の第一イントロンに着目した (Jeong et al. 2006; Rose et al. 2008)。本研究においてもあらかじめ、COR15a および PRF3 の発現において、イントロンの有無が、それぞれがコードするタンパク質の蓄積量に影響を与えるかどうか解析した。*N. benthamiana* において、CaMV 35S プロモーター制御下でイントロンを持つまたは持たない HA エピトープ付加 COR15a (それぞれ P_{35S} -gCOR15a-HA と P_{35S} -cCOR15a-HA, 図 15B) を一過的に発現させた。その結果、COR15a 転写産物と COR15a タンパク質蓄積量は、イントロンの存在の有無によって変化しないことが確かめられた (図 22A, C, D)。同様に、イントロンを持つまたは持たない HA エピトープ付加 PRF3 (それぞれ P_{35S} -gPRF3-HA と P_{35S} -cPRF3-HA, 図 15B) 間における、PRF3 転写産物と PRF3 タンパク質の蓄積量も同等であった (図 22B, C, E)。

3. イントロンを介した RCY1 タンパク質増強の RCY1 イントロン配列特異性

続いて、 P_{35S} -cRCY1-HA の第一エクソン-第二エクソン接合部に COR15a 第二イントロンまたは PRF3 第一イントロンを挿入したコンストラクトを作製し、それぞれ P_{35S} -cRCY1.Ic-HA および P_{35S} -cRCY1.Ip-HA と称した (図 14B)。これらイントロン置換 RCY1 (P_{35S} -cRCY1.Ic-HA および P_{35S} -cRCY1.Ip-HA) を発現させた *N. benthamiana* 組織における RCY1 タンパク質蓄積量は、もとのイントロンを含む RCY1 (P_{35S} -gRCY1-HA や P_{35S} -gRCY1. Δ II-HA) の発現組織と同等であった一方、イントロンを含まない RCY1 (P_{35S} -cRCY1-HA) の発現組織と比較すると明らかに高かった (図 23A, B)。さらに、RCY1 転写産物レベルも、イントロンを含む 4 つの RCY1-HA コンストラクト (P_{35S} -gRCY1-HA, P_{35S} -gRCY1. Δ II-HA, P_{35S} -cRCY1.Ic-HA および P_{35S} -cRCY1.Ip-HA) の発現組織間で類似している一方で、イントロンを持たない P_{35S} -cRCY1-HA の発現組織に比べて減少していた (図 23C, D)。これらのことから、RCY1 イントロンではなく、発現増強活性を持たない他のイントロンの存在によっても、RCY1 タンパク質蓄積量が増加することが示された。

4. シロイヌナズナおよび *N. benthamiana* 一過的発現系における *RCY1* 選択的転写産物の検出

緒言で述べた通り，NB-LRR 型 R タンパク質の機能に，それらをコードする遺伝子の選択的転写に関わるという報告があるため，そもそも *RCY1* やそのアレルの発現において選択的転写産物は産生されるかどうか検証した．シロイヌナズナの野生型エコタイプ C24 とエコタイプ Col-0 において，それぞれ *RCY1* と，そのアレルである *rpp8* の選択的転写産物の有無を解析した．各エコタイプから poly A⁺ mRNA を抽出し，Oligo (dT)₂₀ プライマーにより逆転写した鋳型として，RT-PCR を行った．*RCY1/rpp8* の第一エクソンと第二イントロンに結合するプライマー対 (*RCY1.ExonI-F* と *RCY1.IntII-R*，図 24A) により，第一・第二イントロンともに保持された転写産物に加え，第二イントロンのみが保持された転写産物と予想される長さの断片が少量検出された (図 24B)．また，*RCY1/rpp8* の第一イントロンと第三エクソンに結合するプライマー対 (*RCY1.IntI-F1-2* と *RCY1.ExonIII-R*，図 24A) によって，第二イントロンが除去され，かつ第一イントロンが保持された転写産物と予想される長さの断片が少量検出された (図 24C)．一方で，逆転写前の RNA を鋳型とすると，PCR 産物は検出されなかったことから，RT-PCR により検出された断片は，ゲノム DNA のコンタミネーションに由来するものではないことが確かめられた (図 24B-C)．したがって，シロイヌナズナの野生型エコタイプにおいて，*RCY1* や *rpp8* の成熟 mRNA 配列に加え，ポリアデニル化された 3 種類の選択的転写産物，すなわち，第一イントロンと第二イントロンがともに保持された転写産物，第一イントロンまたは第二イントロンのみが保持された転写産物が生じていることが示唆された．

また，*RCY1* 第一イントロンを含むゲノム *RCY1* (*P_{35S}-gRCY1-HA* および *P_{35S}-gRCY1.ΔII-HA*)，イントロン置換 *RCY1* (*P_{35S}-cRCY1.Ic-HA* および *P_{35S}-cRCY1.Ip-HA*) およびイントロンを持たない *RCY1* (*P_{35S}-cRCY1-HA*) (図 14B) を一過的に発現させた *N. benthamiana* 葉組織において，同様に RT-PCR 法により *RCY1* 選択的転写産物を検出した．*RCY1* 第一エクソンおよび第二エクソンに結合するプライマー対 (*RCY1.ExonI-F* と *RCY1.ExonII-R*，図 24A) を用いて RT-PCR を行うと，イントロンをもつ 4 つの *RCY1* コンストラクト全ての発現組織において，成熟 *RCY1* mRNA に加え，イントロンが保持された転写産物と予想される長さの断片が少量検出された (図 24D)．したがって，*N. benthamiana* における異所的な *RCY1* 発現においても，イントロン配列に関わらず，イントロンが保持された *RCY1* の選択的転写産物が生じていることが示唆された．以上のことから，シロイヌナズナや *N. benthamiana* の一過的遺伝子発現系において，イントロンが保持された *RCY1* 選択的転写産物が生じることが示唆されたが，その役割は本研究では解析していないため，今後明らかにする必要がある．

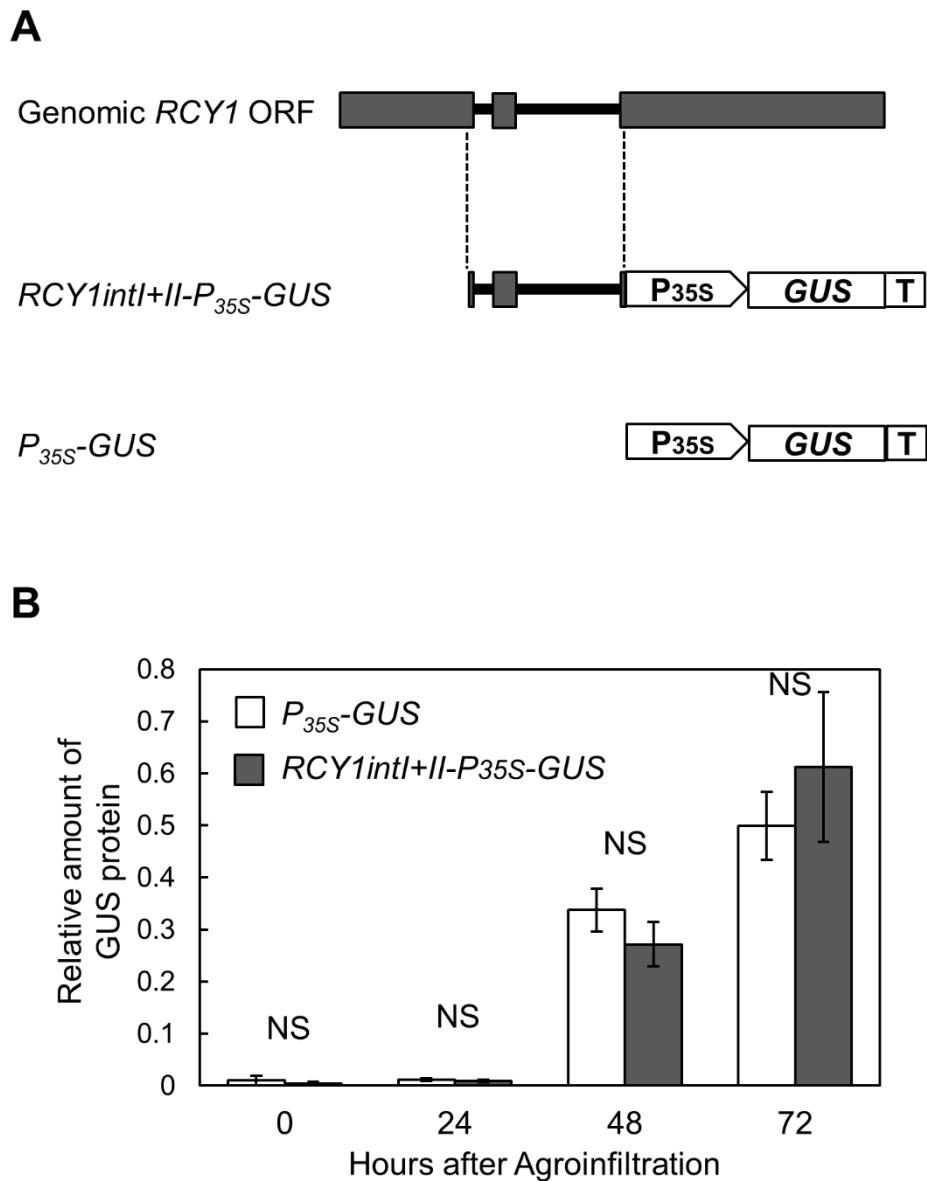


図 21. *RCY1* イントロン配列によるプロモーター活性増強の解析

A, CaMV 35S プロモーター (P_{35S}) と *nopaline synthase* ターミネーター (T) の間に *GUS* 遺伝子を含むコンストラクトである P_{35S} -*GUS* に加え, P_{35S} -*GUS* の P_{35S} 上流 *SbfI* サイトに *RCY1* イントロン配列を挿入したコンストラクト $RCY1intI+II$ - P_{35S} -*GUS* の模式図を示した. 濃灰色のボックスで *RCY1* コード配列, 太線でイントロンを示した. *RCY1* イントロンを含む断片の $RCY1intI+II$ - P_{35S} -*GUS* への挿入位置を点線で示した. **B**, P_{35S} -*GUS* および $RCY1intI+II$ - P_{35S} -*GUS* を一過的に発現した *N. benthamiana* 葉組織において, アグロインフィルトレーション操作の 0, 24, 48 および 72 時間後の *GUS* タンパク質蓄積量を定量した. *GUS* タンパク質蓄積量は, ELISA 法により抗 *GUS* ポリクローナル抗体を用いて測定した. 4 個体における相対 *GUS* タンパク質蓄積量の平均値 \pm 標準誤差を示した. NS は統計的有意差が認められなかったことを示す (Student's *t*-test; $n = 4$, $P < 0.05$).

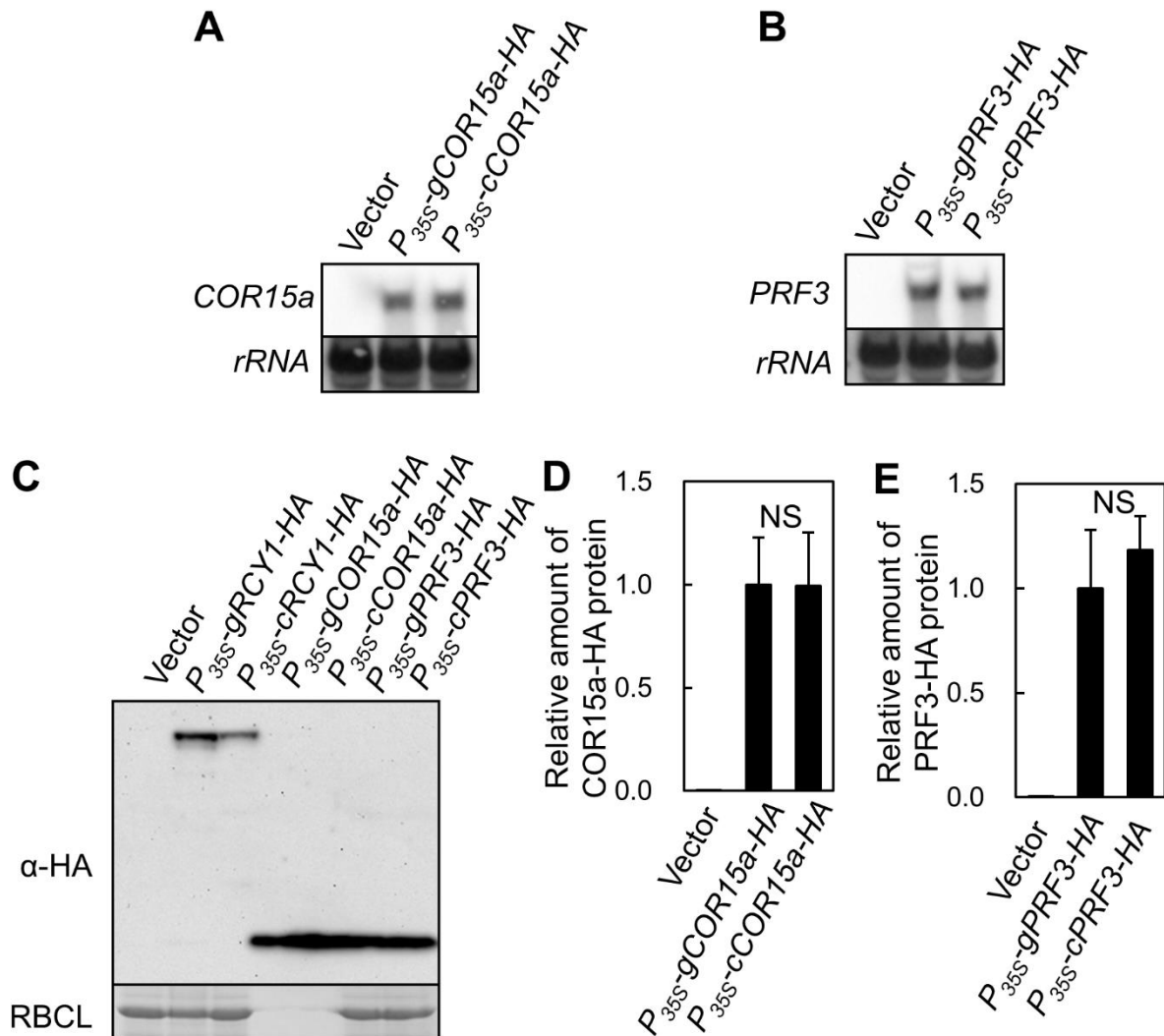


図 22. ゲノム *COR15a*・*PRF3* または *COR15a*・*PRF3* cDNA を一過的に発現した *N. benthamiana* 葉組織における *COR15a* および *PRF3* 転写産物およびタンパク質蓄積量の比較

アグロバクテリウムを介して、*P*_{35S}-*gRCY1*-*HA*、*P*_{35S}-*cRCY1*-*HA*、*P*_{35S}-*gCOR15a*-*HA*、*P*_{35S}-*cCOR15a*-*HA*、*P*_{35S}-*gPRF3*-*HA* または *P*_{35S}-*cPRF3*-*HA* を一過的に発現した *N. benthamiana* 葉において、アグロインフィルトレーション操作の 48 時間後に、各遺伝子の転写産物やタンパク質を定量した。コントロールとして、pRI201-AN ベクター (Vector) を用いた。A および B、ノーザンブロッティング法により、*COR15a* 転写産物 (A) または *PRF3* 転写産物 (B) を検出した。サンプルローディングの内部標準として、18S *rRNA* を検出した。C、ウェスタンブロッティング法により、抗 HA モノクローナル抗体を用いて RCY1-HA、COR15a-HA および PRF3-HA タンパク質蓄積を検出した。COR15a-HA に関しては、1/50 量の総タンパク質をアプライした。サンプルローディングの内部標準として、CBB R-250 によって染色した RBCL タンパク質のバンドを示した。D および E、ウェスタンブロッティングのバンドの画像解析により、COR15a-HA タンパク質 (D) または PRF3-HA タンパク質 (E) の蓄積量を定量化し、4 個体における平均値±標準偏差を示した。NS は、コンストラクト間で統計的有意差が認められなかったことを示す (Student's *t*-test, *P* < 0.05)。

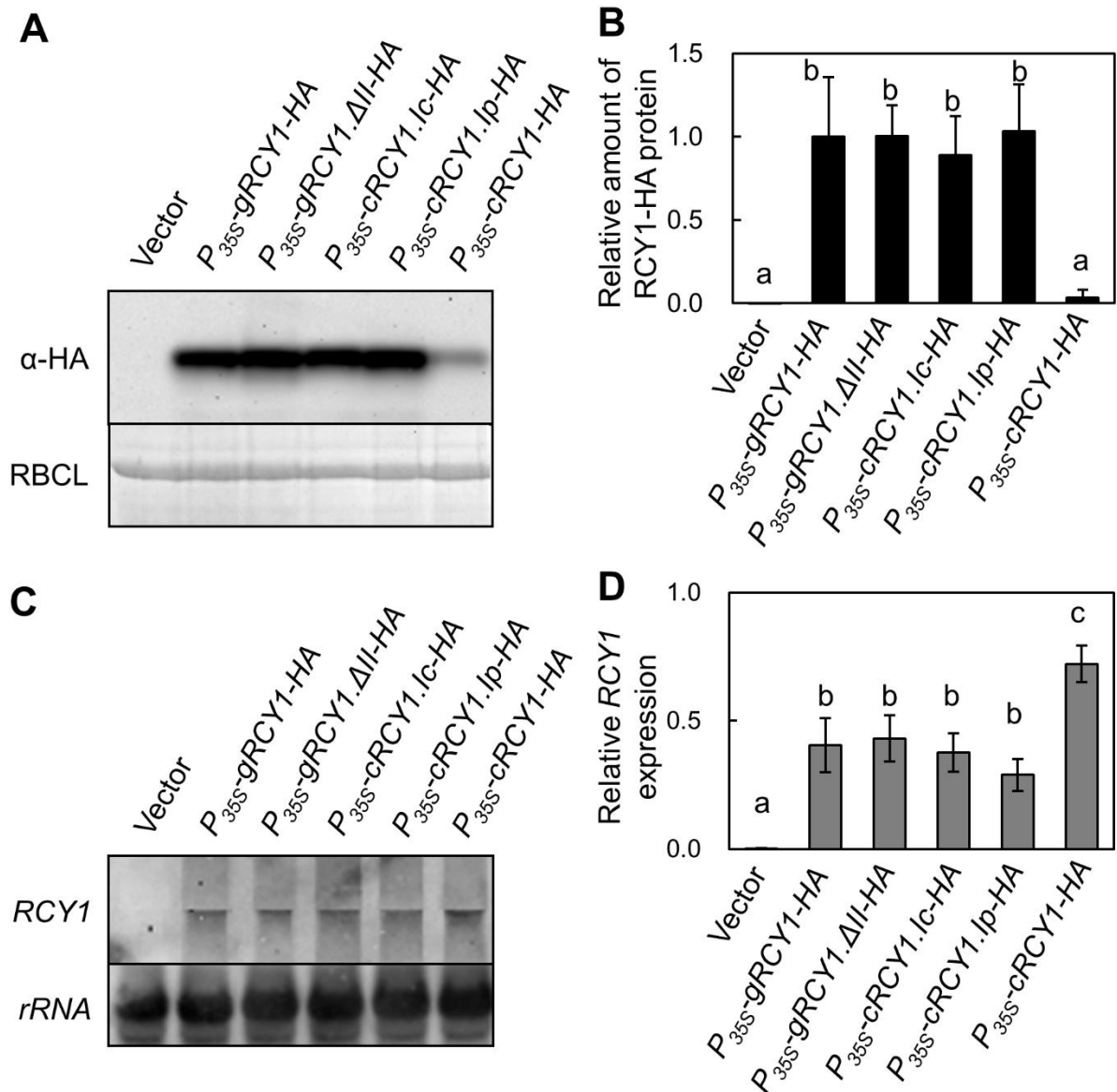


図 23. *RCY1* イントロンを *COR15a* または *PRF3* イントロンに置換した *RCY1-HA* コンストラクトを一過的に発現した *N. benthamiana* 葉における HA エピトープ標識 *RCY1* タンパク質および *RCY1* 転写産物の検出

アグロバクテリウムを介して、 P_{35S} -gRCY1-HA, P_{35S} -gRCY1. Δ II-HA, P_{35S} -cRCY1.Ic-HA, P_{35S} -cRCY1.Ip-HA または P_{35S} -cRCY1-HA を一過的に発現した *N. benthamiana* 葉において、アグロインフィルトレーション操作の 48 時間後に、RCY1-HA タンパク質および *RCY1* 転写産物を定量した。一過的遺伝子発現操作のコントロールとして、pRI201-AN ベクター (Vector) を用いた。A, ウェスタンブロットング法により、抗 HA モノクローナル抗体を用いて RCY1-HA タンパク質蓄積を検出した。サンプルローディングの内部標準として、CBB R-250 によって染色した RBCL タンパク質のバンドを示した。B, ウェスタンブロットングのバンドの画像解析により、RCY1-HA タンパク質蓄積を定量化した。C, ノーザンブロットング法により、*RCY1* 転写産物を検出した。サンプルローディングの内部標準として、18S *rRNA* を検出した。D, qRT-PCR 法により、*RCY1* 転写産物蓄積量を測定し、*NbEF-1 α* 転写産物蓄積量で標準化した。B および D において、4 個体における平均値 \pm 標準偏差を示した。同じアルファベットは、コンストラクト間で統計的有意差が検出されないことを示す ($P < 0.05$, Tukey HSD test)。

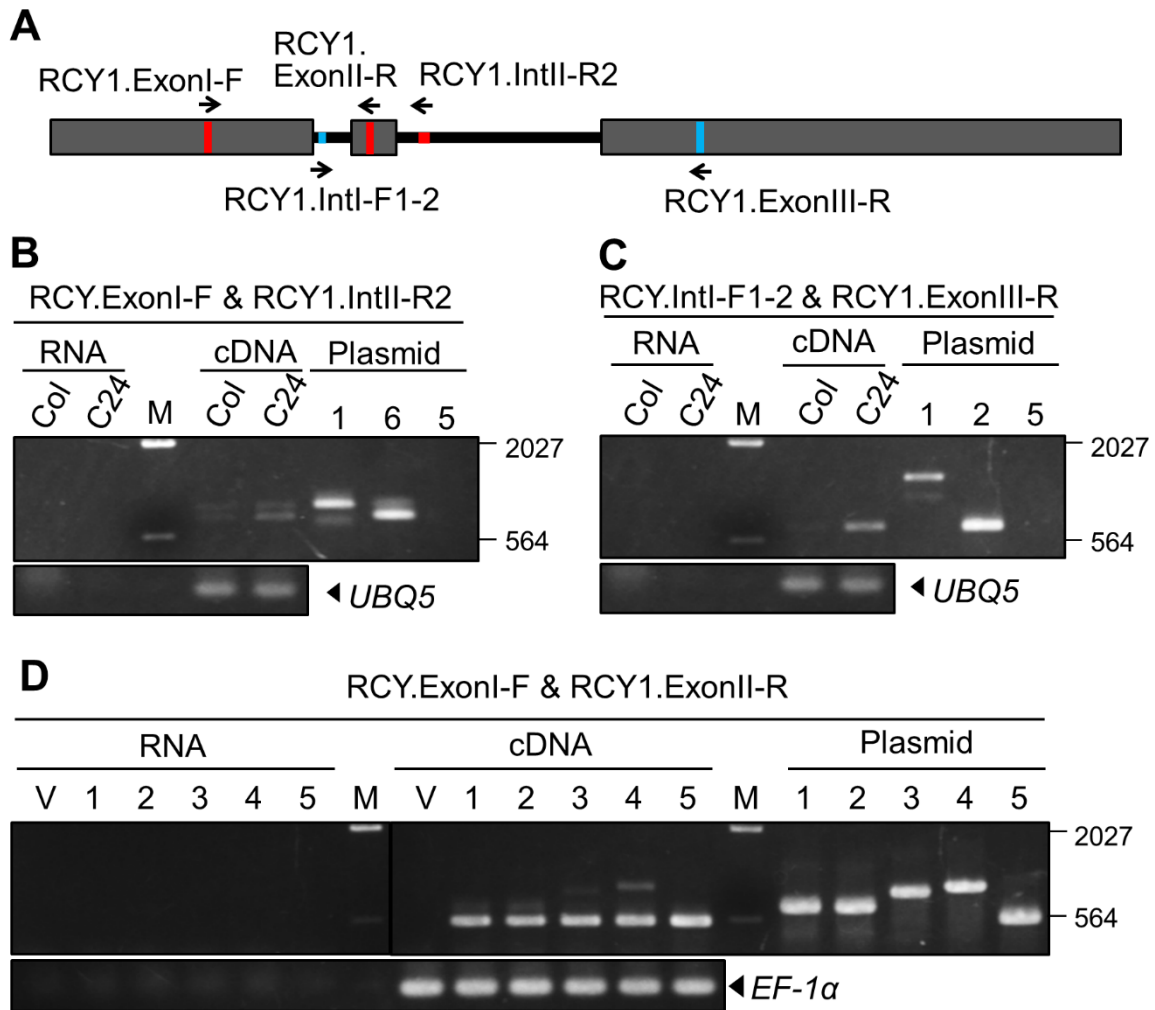


図 24. シロイヌナズナ野生型エコタイプおよび *RCY1* 一過的発現 *N. benthamiana* 葉における *RCY1* 選択的転写産物の検出

A, ゲノム *RCY1* コード領域の模式図に、RT-PCR に用いた 5 つのプライマーの位置を示した。灰色のボックスは *RCY1* エキソン、灰色の太線はイントロンを示す。**B**, シロイヌナズナ野生型エコタイプ Col-0 およびエコタイプ C24 において、プライマー対 *RCY1*.ExonI-F および *RCY1*.intII-R2 を用いた RT-PCR により、第一イントロンを保持した *rpp8* または *RCY1* 選択的転写産物を検出した。**C**, 同シロイヌナズナエコタイプにおいて、プライマー対 *RCY1*.intI-F1-2 および *RCY*.ExonIII-R を用いた RT-PCR により、第二イントロンを保持した *rpp8* または *RCY1* 選択的転写産物を検出した。**D**, プライマー対として *RCY1*.intI-F1-2 および *RCY*.ExonIII-R を用いて、pRI201-AN ベクター (V), *P_{35S}-gRCY1-HA* (1), *P_{35S}-gRCY1.ΔII-HA* (2), *P_{35S}-cRCY1.lc-HA* (3), *P_{35S}-cRCY1.lp-HA* (4) および *P_{35S}-cRCY1-HA* (5) を一過的に発現させた *N. benthamiana* 葉に蓄積する、*RCY1* 成熟 mRNA および *RCY1* の選択的転写産物を検出した。**B** から **D** において、“cDNA”と付したサンプルは、RT-PCR 産物を示す。“RNA”と付したサンプルは、ゲノム DNA のコンタミネーションの有無を示すコントロールとして、逆転写前の RNA を鋳型とした PCR 産物を示す。“Plasmid”と付したサンプルは、イントロン保持断片の長さを示すコントロールとして、*P_{35S}-gRCY1-HA* (1), *P_{35S}-gRCY1.ΔII-HA* (2), *P_{35S}-cRCY1.lc-HA* (3), *P_{35S}-cRCY1.lp-HA* (4), *P_{35S}-cRCY1-HA* (5), および *P_{35S}-gRCY1.ΔI-HA* (6) のプラスミド DNA を鋳型とした PCR 産物を示す。 λ HindIII digest をサイズマーカー (M) として用いた。図の右側に、 λ HindIII 断片の分子量 (bp) を表示した。

第三項 RCY1 ホモログ NB-LRR タンパク質蓄積の制御におけるイントロンの効果

1. RCY1 アレルの発現におけるイントロンを介したタンパク質蓄積増強

RCY1 のアレルとして、シロイヌナズナエコタイプ *Landsberg erecta* (Ler-0) から単離されたアブラナ科卵菌類ベト病菌 (*Hyaloperonospora arabidopsidis*) Emco5 系統抵抗性遺伝子の *RPP8* や、エコタイプ Dijon-17 から単離されたカブ縮葉ウイルス抵抗性遺伝子の *HRT* が知られている (McDowell et al. 1998; Cooley et al. 2000; Takahashi et al. 2002). エコタイプ Col-0 における RCY1 アレルは、*rpp8* と称されており、何の病原体を認識するのか明らかにされていない。これら RCY1 アレルは、全てコード領域の同位置に2つのイントロンを有しており (図 25), アレル間でエキソンおよびイントロンとも 95%超の高い配列相同性を示す (表 3 および図 26).

これら RCY1 アレルの 3'-末端に HA エピトープ配列を付加し、イントロンを含むゲノム DNA 型のコード配列と、イントロンを含まない cDNA 型のコード配列を CaMV35S プロモーター下流にクローニングした。RPP8 のゲノム配列を含むコンストラクトと、RPP8 の cDNA 配列を含むコンストラクトは、それぞれ *P_{35S}-gRPP8-HA* および *P_{35S}-cRPP8-HA* と称した (図 15B). また、*rpp8* のゲノム配列を含むコンストラクトと、*rpp8* の cDNA 配列を含むコンストラクトは、それぞれ *P_{35S}-grpp8-HA* および *P_{35S}-crpp8-HA* と称した (図 15B). *N. benthamiana* において、これらコンストラクトと、コントロールとして *P_{35S}-gRCY1-HA* および *P_{35S}-cRCY1-HA* (図 14B) を一過的に発現させた。RCY1 の場合と同様に、イントロンを含む遺伝子 (*P_{35S}-gRPP8-HA* および *P_{35S}-grpp8-HA*) の発現組織において、イントロンを含まない遺伝子 (*P_{35S}-cRPP8-HA* および *P_{35S}-crpp8-HA*) の発現組織に比べ、明らかに RPP8 または *rpp8* タンパク質が高蓄積していた (図 27A, B). 一方で、イントロンの有無により、RPP8 や *rpp8* の転写産物蓄積量に差は認められなかった (図 27C-E). これらの結果から、イントロンを介した転写後調節によるタンパク質蓄積増強は、RCY1 に特異的ではなく、アレルである RPP8 および *rpp8* でも同様に保存されていることが示唆された。

2. 他の座位の CC-NB-LRR コード遺伝子の発現におけるイントロンを介したタンパク質蓄積増強

シロイヌナズナエコタイプ Col-0 のゲノムには、NB-LRR タンパク質をコードする遺伝子が 149 個存在する (Meyers et al. 2003). このうち、CC-NB-LRR (CNL) タンパク質をコードする 55 個の遺伝子は、配列相同性に基づいて、CNL-A から CNL-D までの 4 つのサブグループに区分されている (Meyers et al. 2003). また、CC-NB-LRR 遺伝子は、イントロン構成が全く異なる 3 つのパターンに区別される (Meyers et al. 2003). CNL-B サブグループと CNL-C サブグループに分類される 33 遺伝子は、コード領域にイントロンを持たない (図 25A). 一方で、CNL-A サブグループに分類される 6 遺伝子は、コード領域に 4 つのイントロンを持つ (図 25A). また、CNL-D サブグループに分類される 16 遺伝子は、コード領域に 2 つのイントロンを持つ (図 25A). CNL-A サブグループと CNL-D サブグループ間において、全てのイントロンの位置に対応が認められないことから (図 25A), これら CC-NB-LRR 遺伝子は、独立にイントロンを獲得したと考えられている (Meyers et al. 2003).

CNL-D サブグループに属する At5g35450 は、RCY1 と同位置にイントロンを有し (図 25B), コード配列において 89% 程度の塩基配列相同性を示す (表 3). 一方、RCY1, RPP8 および *rpp8* のイント

ロン配列と比較すると, At5g35450 の対応するイントロンのいずれにおいても, 大規模な配列の欠失と置換が生じていた (図 26). At5g35450 の 3'-末端に HA エピトープ配列を付加し, イントロンを含むゲノム DNA 型のコード配列と, イントロンを含まない cDNA 型のコード配列を CaMV35S プロモーター下流にクローニングして, それぞれ *P_{35S}-gAt5g35450-HA* および *P_{35S}-cAt5g35450-HA* と称した (図 15B). これらコンストラクトを *N. benthamiana* において一過的に発現させたところ, *P_{35S}-cAt5g35450-HA* 発現組織に比べて, *P_{35S}-gAt5g35450-HA* の一過的に発現組織において, At5g35450 がコードするタンパク質が明らかに高蓄積していた (図 28A, B). よって, イントロン配列が大きく異なる At5g35450 の遺伝子発現においても, *RCY1* と同様にイントロンがタンパク質蓄積の増強に関わっていると考えられた.

シロイヌナズナエコタイプ Col-0 の *ADR1* 遺伝子や *ADR1-L1* 遺伝子は, CNL-A サブグループに分類される. *ADR1* や *ADR1-L1* にコードされるタンパク質は, 他の NB-LRR タンパク質の下流において防御応答誘導を増強する役割を果たしていることが示唆されている (Bonardi et al. 2011; Dong et al. 2016). *ADR1* や *ADR1-L1* は, *RCY1* と全く異なる位置に, 4 つのイントロンを有する (図 25). また, *RCY1* のコード配列と, *ADR1* や *ADR1-L1* のコード配列の相同性は, 42%程度に留まる (表 3). これら遺伝子に関しても, 3'-末端に HA エピトープ配列を付加し, イントロンを含むゲノム DNA 型のコード配列と, イントロンを含まない cDNA 型のコード配列を CaMV35S プロモーター下流にクローニングした. *ADR1* のゲノム配列を含むコンストラクトと, *ADR1* の cDNA 配列を含むコンストラクトは, それぞれ *P_{35S}-gADR1-HA* および *P_{35S}-cADR1-HA* と称した (図 15B). また, *ADR1-L1* のゲノム配列を含むコンストラクトと, *ADR1-L1* の cDNA 配列を含むコンストラクトは, それぞれ *P_{35S}-gADR1-L1-HA* および *P_{35S}-cADR1-L1-HA* と称した (図 15B). *P_{35S}-gADR1-HA* と *P_{35S}-cADR1-HA* の発現組織間において, 同等に *ADR1* タンパク質が蓄積していた (図 28C, D). 同様に, *P_{35S}-gADR1-L1-HA* と *P_{35S}-cADR1-L1-HA* の発現組織間においても, *ADR1-L1* タンパク質の蓄積量に差は認められなかった (図 28C, D). このことから, *RCY1* 遺伝子座と異なるイントロン構成を有し, コード配列における *RCY1* との相同性が比較的低い *ADR1* および *ADR1-L1* においては, イントロンはタンパク質蓄積量の調節に関与しないと考えられた.

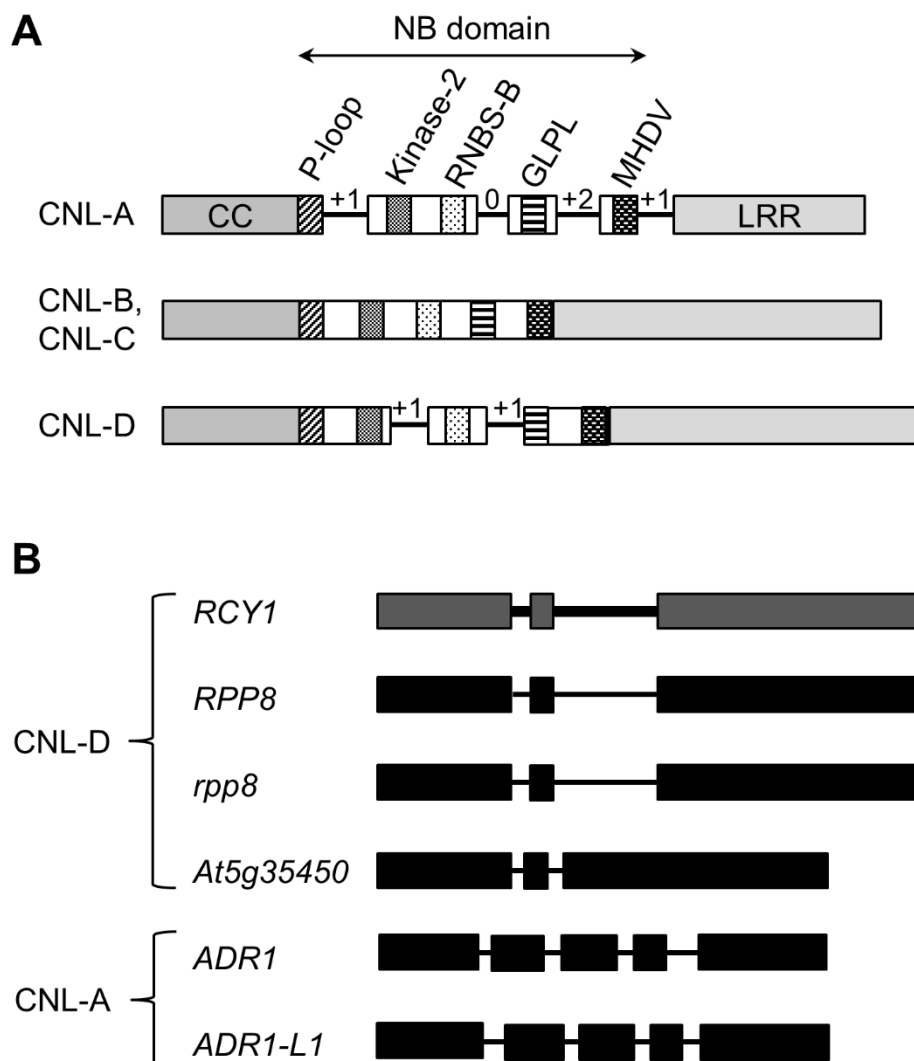


図 25. シロイヌナズナエコタイプ Col-0 の NB-LRR コード遺伝子のイントロン構成による分類

A, イントロンの数と位置に基づいて, シロイヌナズナエコタイプ Col-0 に存在する 55 個の CC-NB-LRR コード遺伝子座を 3 パターンに大別し, 模式図として示した (Meyers et al., 2003 の図を改変した). ボックスはエクソン, ボックス間を結ぶ太線はイントロンを示す. イントロンの上に記した数値は, イントロンのコドンにおける介在位置を示す. P-loop, Kinase-2, RNBS-B, GPLP および MHDV は, NB ドメイン内の配列モチーフを示す. **B**, *RCY1* に加え, シロイヌナズナの 5 種類の NB-LRR コード遺伝子, *RPP8*, *rpp8*, *At5g35450*, *ADR1*, *ADR1-L1* のコード領域の模式図を示した. 黒色のボックスでコード配列, 太線でイントロンを示した.

表 3. CC-NB-LRR 遺伝子間のコード配列 (coding sequence: CDS) の塩基配列相同性 (%)^a

	<i>RCY1</i> CDS	<i>RPP8</i> CDS	<i>rpp8</i> CDS	<i>At5g35450</i> CDS	<i>ADR1</i> CDS	<i>ADR1-L1</i> CDS
<i>RCY1</i> CDS	100.0	99.8	96.6	88.7	42.0	42.3
<i>RPP8</i> CDS		100.0	96.1	88.4	41.8	42.1
<i>rpp8</i> CDS			100.0	88.7	42.0	42.6
<i>At5g35450</i> CDS				100.0	42.9	42.1
<i>ADR1</i> CDS					100.0	69.1
<i>ADR1-L1</i> CDS						100.0

^a Clustal Omega により, 各遺伝子のコード配列間の塩基配列相同性を解析し, %割合で表示した.

A

RCY1 Intron I	1	GTGAGCTCTTATGGTACATACATGAAGCACTTTTCTTCTTAATTCATAAAAAGTGATTGTTAAAAAGAA	70
RPP8 intron I	1	70
rpp8_Col intron I	1	70
At5g35450 intron I	1C.....	33
RCY1 Intron I	71	ATATATAGAATAATTGCCTTTTTTATTCCCTAGCATGAGAAACACAAATATTTTTGCAG	129
RPP8 intron I	71	129
rpp8_Col intron I	71	129
At5g35450 intron I	34	-----...A...-.....-..G..A.....-.....-.....	77

B

RCY1 Intron II	1	GTACATATCTTATTATATAATGTTTAGTTTCTCTAACTTTTAAGAAAAATACATTTACATATACTAATTT	70
RPP8 intron II	1	70
rpp8_Col intron II	1	70
At5g35450 intron II	1CT.TCA.A.T..A...TAAG.TCAAGAA.CTAGGAA.TTTT.TT.TT-----	52
RCY1 Intron II	71	ACATGTATATATTTATATTATTTTATAAATTTTTATTTTCCCTTAACCAAAAAGTAATATTTGTATACATA	140
RPP8 intron II	71G.....	140
rpp8_Col intron II	71A.....	140
At5g35450 intron II	52	-----	52
RCY1 Intron II	141	TTGCTATTTTTTCCCTACTATTAGAACAACTAACTAAAAACGTATGGTAATCCATATGCTAATTTAGGCA	210
RPP8 intron II	141	210
rpp8_Col intron II	141	210
At5g35450 intron II	52	-----	52
RCY1 Intron II	211	TGTATAAAAAAAATGTCAATGGTAATCTTGATTTTGACCAAAAAATAATTAATTTAATTAGCATGAACA	280
RPP8 intron II	211T.....	279
rpp8_Col intron II	211A.....	280
At5g35450 intron II	52	-----	52
RCY1 Intron II	281	ATGAGTGTGTTAAGGTTCAAAGGACAATATAATTATTAACATTAATTTAATTGGATAACAATTAATA	350
RPP8 intron II	280	349
rpp8_Col intron II	281	350
At5g35450 intron II	52	-----	52
RCY1 Intron II	351	AAATTAACATTAATCCCTAGTACAGTAAGTCAGTAATTACGAATCTTGAAAATTTGGTTTTGGTTTTTTTC	420
RPP8 intron II	350	419
rpp8_Col intron II	351	420
At5g35450 intron II	52	-----	52
RCY1 Intron II	421	TTCTATTTTTTATAGGTTTATTCAAATAGAAATATCGAATTACTACTTTTATGGTTTATTTCATGATT	490
RPP8 intron II	420	489
rpp8_Col intron II	421	490
At5g35450 intron II	52	-----	52
RCY1 Intron II	491	GGTTTGATTAATAATTAACGTAATAAAATCAACTAAATTTGAAAGAAACATGTATTGATTAACCCGAGAT	560
RPP8 intron II	490	559
rpp8_Col intron II	491T...	560
At5g35450 intron II	52	-----	52
RCY1 Intron II	561	TACACGATTCCTTGTAATAAAGTTCAAATATAATACTAAGACCAAGAATCTAGTGTATTATTTTTATTG	630
RPP8 intron II	560G.....A.....	629
rpp8_Col intron II	561G.....A.....	630
At5g35450 intron II	52	-----	52
RCY1 Intron II	631	GCAGCTCACATGTTGAAATGTATTAGCTTGTGATATTGTGCAG	673
RPP8 intron II	630	672
rpp8_Col intron II	631	673
At5g35450 intron II	53CA.....C.....C.A.....	94

図 26. *RCY1*, *RPP8*, *rpp8* および *At5g35450* のイントロン配列の相同性

RCY1, *RPP8*, *rpp8* および *At5g35450* 間において、第一イントロン (A) と第二イントロン (B) の塩基配列をそれぞれ比較した。

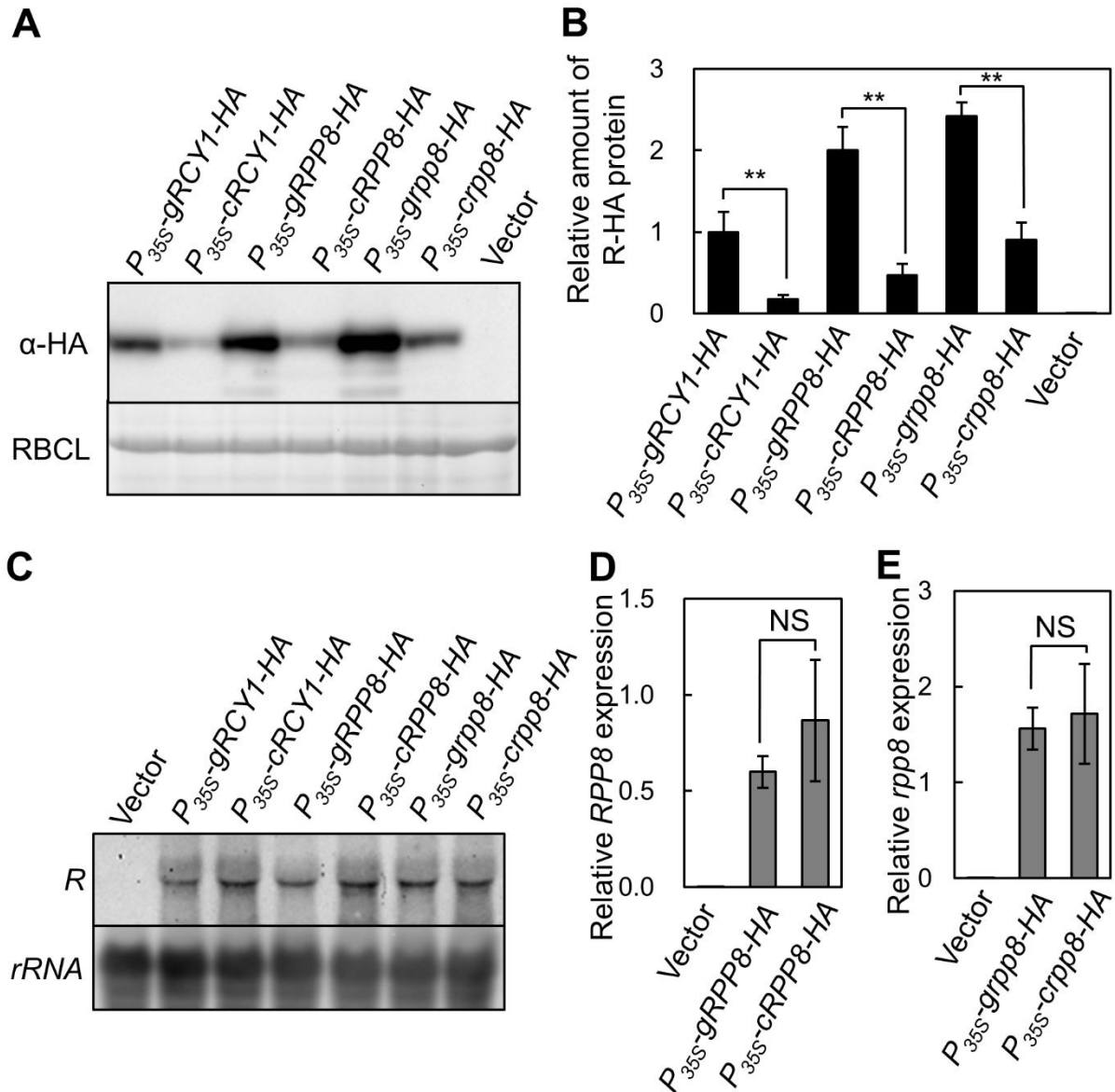


図 27. CaMV 35S プロモーターを介してゲノム型または cDNA 型の *RCY1*, *RPP8*, *rpp8* を一過的に発現させた *N. benthamiana* 葉におけるタンパク質および転写産物の検出

アグロバクテリウムを介して、*P*_{35S}-gRCY1-HA, *P*_{35S}-cRCY1-HA, *P*_{35S}-gRPP8-HA, *P*_{35S}-cRPP8-HA, *P*_{35S}-grpp8-HA, *P*_{35S}-crpp8-HA を一過的に発現した *N. benthamiana* 葉において、アグロインフィルトレーション操作の 48 時間後に、各転写産物およびタンパク質を検出した。一過的遺伝子発現操作のコントロールとして、pRI201-AN ベクター (Vector) を用いた。A, ウェスタンブロッティング法により、抗 HA モノクローナル抗体を用いて、HR エピトープ標識した各 NB-LRR タンパク質 (R-HA) を検出した。サンプルローディングの内部標準として、CBB R-250 によって染色した RBCL タンパク質のバンドを示した。B, ウェスタンブロッティングのバンドの画像解析により、R-HA タンパク質蓄積を定量化した。C, ノーザンブロッティング法により、*RCY1*, *RPP8* および *rpp8* の転写産物を検出した。サンプルローディングの内部標準として、18S *rRNA* を検出した。D および E, qRT-PCR 法により、*RPP8* 転写産物蓄積量 (D) または *rpp8* 転写産物蓄積量 (E) を測定し、*NbEF-1α* 転写産物蓄積量で標準化した。B および D において、4 個体における平均値±標準偏差を示した。アスタリスクは、ゲノム型コンストラクトと cDNA 型コンストラクト間で統計的有意差が検出されたことを示す (Student's *t*-test; *n* = 4, *0.01 ≤ *P* < 0.05; ***P* < 0.01; NS: non-significant)。

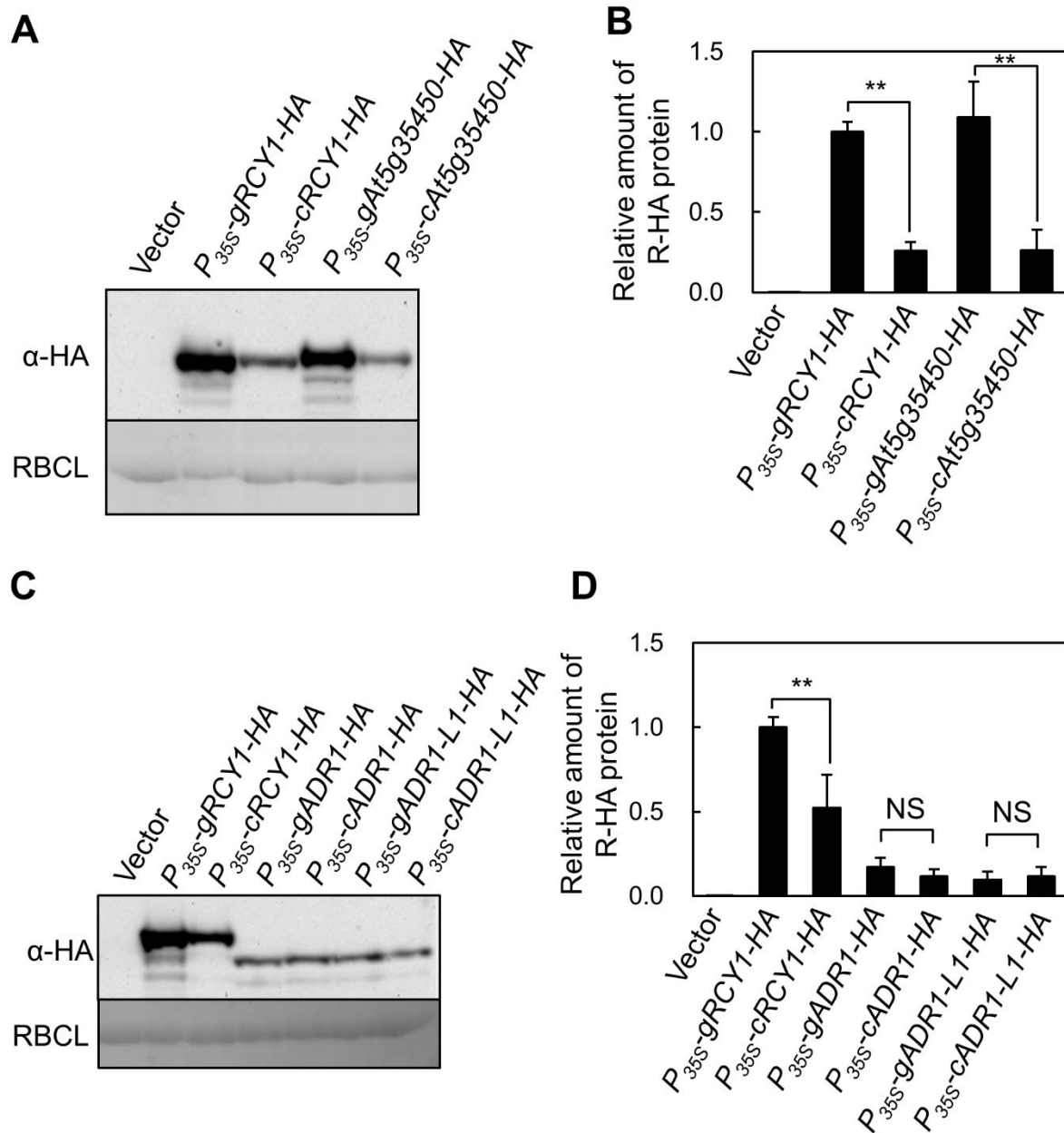


図 28. CaMV 35S プロモーターを介してゲノム型または cDNA 型の *At5g35450*, *ADR1*, *ADR1-L1* を一過的に発現させた *N. benthamiana* 葉における HA 標識タンパク質の検出

アグロバクテリウムを介して, P_{35S} -gRCY1-HA, P_{35S} -cRCY1-HA, P_{35S} -gAt5g35450-HA, P_{35S} -cAt5g35450-HA, P_{35S} -gADR1-HA, P_{35S} -cADR1-HA, P_{35S} -gADR1-L1-HA または P_{35S} -cADR1-L1-HA を一過的に発現した *N. benthamiana* 葉において, アグロインフィルトレーション操作の 48 時間後に, 各転写産物およびタンパク質を検出した. 一過的遺伝子発現操作のコントロールとして, pRI201-AN ベクター (Vector) を用いた. **A** および **C**, ウェスタンブロッティング法により, 抗 HA モノクローナル抗体を用いて, HR エピトープ標識した各 NB-LRR タンパク質 (R-HA) 蓄積を検出した. サンプルローディングの内部標準として, CBB R-250 によって染色した RBCL タンパク質のバンドを示した. **B** および **D**, ウェスタンブロッティングのバンドの画像解析により, R-HA タンパク質蓄積を定量化し, 4 個体における平均値 \pm 標準偏差を示した. アスタリスクは, ゲノム型コンストラクトと cDNA 型コンストラクト間で統計的有意差が検出されたことを示す (Student's *t*-test; $n = 4$, $*0.01 \leq P < 0.05$; $**P < 0.01$; NS: non-significant).

第四節 考察

1. イントロンを介した RCY1 タンパク質蓄積の増強と一般的な IME の知見の比較

植物において、イントロンが遺伝子発現を正に調節する効果は、intron-mediated enhancement (IME) と呼ばれ、一般的に転写産物量の増加をともなうことが知られている (Gallegos and Rose 2015). 実際に、様々な植物遺伝子の発現において、イントロンが転写レベルを増加させる例が知られている (Callis et al. 1987; Dean et al. 1989; Xu et al. 1994; Rethmeier et al. 1997; Rose and Last 1997; Rose et al. 2008). しかしながら、イントロンの存在が転写産物量を増強させる分子機構については、未だ不明の点が多いとされる (Gallegos and Rose 2015). 植物における典型的な IME は、ハウスキーピング遺伝子内の、転写開始点近傍に位置するイントロンで多く認められるとされている (Rose et al., 2008). これらのイントロンに含まれる IME シグナルを基にして、任意のイントロン配列の IME 活性を試算するアルゴリズムである IMEter も開発されている (Rose et al. 2008; Parra et al. 2011).

本研究において、一連の *RCY1* コンストラクトを一過的に発現させた *N. benthamiana* 葉における *RCY1* タンパク質蓄積量の解析から、*RCY1* コード領域におけるイントロンの存在が、*RCY1* タンパク質蓄積量を上昇させる効果を持つことが示された (図 17). 一方で、一般的な IME の知見とは対照的に、イントロンを介した *RCY1* タンパク質蓄積の増強においては、タンパク質の上昇に先立った *RCY1* 転写産物レベルの顕著な上昇は認められなかった (図 17, 18). イントロンを介した、転写産物蓄積量の上昇をともなわないタンパク質蓄積量の増強は、*RCY1* アレルの発現においても認められた (図 27). *CaMV 35S* プロモーター上流に *RCY1* の 2 つのイントロンを挿入した際に、*GUS* タンパク質蓄積量は増強されなかったことから (図 21), *RCY1* イントロンにエンハンサー配列が含まれるわけではないと考えられた. 一方で、*RCY1* タンパク質蓄積の増強は、IME シグナルを欠く *COR15a* や *PRF3* のイントロンと (Rose et al., 2008) (図 22), *RCY1* イントロンを置換した際にも認められた (図 23). このように、イントロンを介した *RCY1* タンパク質蓄積の増強は、イントロンに転写エンハンサーが含まれることや、いわゆる“IME”として体系化されている現象 (Gallegos and Rose 2015) とは、異なる機構に起因していることが示唆された.

2. イントロンを介した RCY1 タンパク質蓄積の増強機構

イントロンを介した *RCY1* タンパク質蓄積増強は、*RCY1* イントロン配列に依存せず (図 23), *RCY1* 転写産物量の上昇をともなわなかったことから (図 17, 18, 20), スプライシングを介した転写後調節機構に起因していることが考えられた. 詳しい分子機構に関しては不明であるが、現在のところ、スプライシング関連因子または選択的転写産物を介して、mRNA の核外輸送や、タンパク質への翻訳が促進されている可能性が考えられる.

スプライシングによってイントロンが除去されると、mRNA の 2 つのエキソンの接合部近傍 (20-25 ヌクレオチド上流) に、エキソン接合部複合体 (exon junction complex: EJC) が形成される. EJC は、Y14, Mago, eIF4AIII や MLN51 等の中心的コンポーネントをはじめとしたタンパク質複合体であり、mRNA 品質管理機構、mRNA 輸送、mRNA 局在から翻訳に至るまでの過程で機能する (Glisovic

et al. 2008). 動物においては、細胞質において PYM が、EJC の中心的コンポーネントの一つである Y14-Mago ヘテロ二量体と 40S リボソーム小サブユニットを架橋し、mRNA の翻訳効率を上昇させることが知られている (Bono et al. 2004; Diem et al. 2007). 植物においては、転写後調節における EJC の重要性は未解明であるが、シロイヌナズナや他の植物種において、Y14, Mago および PYM のホモログが単離されている (Park and Muench 2007; Koroleva et al. 2009; Mufarrege et al. 2011). したがって、EJC およびその相互作用因子 PYM を介した翻訳制御システムが、シロイヌナズナや *N. benthamiana* における RCY1 タンパク質蓄積において機能を果たしているかもしれない.

植物においては、転写産物へのイントロンの選択的保持が最もよく生じる選択的スプライシング形式であることがわかっている (Ner-Gaon et al., 2004; Wang and Brendel, 2006). イントロンが保持された転写産物は、しばしばナンセンス変異依存 mRNA 分解機構を介して、mRNA の安定性や翻訳効率の調節に関わることが示唆されている (Reddy et al. 2013). シロイヌナズナの野生型エコタイプ C24 や、*N. benthamiana* で異所的に *RCY1* を発現させた組織において、*RCY1* 第一イントロンと第二イントロンのいずれかまたは両方が保持された選択的転写産物が生じていることが示唆された (図 24). しかしながら、RT-PCR では、ヘテロ核 RNA、すなわち核内でプロセッシングを受ける過程の precursor mRNA が検出される場合も考えられる. *RCY1* 選択的転写産物が翻訳されるかどうか、また、*RCY1* タンパク質蓄積量の調節において役割を持つかどうかは未解明であり、さらなる解析が必要である.

3. イントロンを介した CC-NB-LRR タンパク質蓄積の増強

本研究では、イントロンが、NB-LRR クラス R タンパク質の蓄積量の制御に関わることを初めて明らかにした. *RCY1* と同等のイントロン構成を有し (図 25), コード領域塩基配列の相同性が比較的高い *RCY1* アレル (*RPP8* および *rpp8*) や *At5g35450* の発現においても (表 3), イントロンを介したタンパク質蓄積量の増加が認められた (図 27A, B および図 28A, B). 一方、*RCY1* およびそのアレルや *At5g35450* とは異なるイントロン構成を有し (図 25), コード領域塩基配列の相同性が比較的低い *ADRI* や *ADRI-LI* の発現においては (表 3), イントロンの有無はタンパク質蓄積量に影響を及ぼさなかった (図 28C, D). これらのことから、コード領域イントロンを介したタンパク質蓄積量の増加は、NB-LRR 型抵抗性遺伝子全般に見られる発現調節機構ではなく、少なくとも *RCY1* アレルおよび *At5g35450* といった一部の NB-LRR 遺伝子に特異的な調節機構によると考えられた. その特異性は、エキソン配列の違いや、イントロンの位置に依存している可能性が考えられる.

第四章 総合考察

自然界において、植物がウイルス抵抗性の強さを制御する機構は、植物の生存戦略上極めて重要な役割を持っていたと考えられる。NB-LRR タンパク質を介したウイルスに対する HR 誘導が局部組織に留められない場合、ウイルスが植物組織に広がった後を HR 細胞死が追いかける形で、植物が枯死する例が知られている (Dinesh-Kumar et al. 2000; Nam et al. 2011; Harris et al. 2013)。今日では、ウイルスに対する HR において誘導される細胞死は、ウイルス抵抗性の決定的な原因ではないということが示唆されている (Künstler et al. 2016)。RCY1 についても、細胞死の誘導能を失った変異体においても、RCY1 を介した CMV(Y)抵抗性は損なわれないことがわかっている (Takahashi et al. 2012a)。NB-LRR タンパク質を介したウイルスに対する ER、局所的な HR、および全身的な HR は、共通のシステムが異なる強度で誘導された現象であると捉えられている (Künstler et al. 2016)。したがって、植物がウイルスに感染して、罹病化したり、全身 HR により枯死したりすることを免れるためには、R 遺伝子を獲得することだけではなく、ウイルスを局所に留めるに足りる強さの防御応答を誘導する仕組みを確立する必要があると考えられる。ウイルスに対する NB-LRR 型 R 遺伝子を農業利用する上では、全身 HR が誘導されると農作物の収量が著しく低下する恐れがあることはもちろんのこと、農作物によっては HR 病斑の形成が商品価値を低下させることも問題となり得る。したがって我々にとっても、植物がウイルス抵抗性の強さを調節する分子機構を理解し、それを人為的に制御するための知見を蓄積していくことは、重要であると考えられる。

そこで本研究では、CMV(Y)抵抗性の強さを直接的に制御することが示唆されている、RCY1 タンパク質蓄積量の調節機構を解析した。第二章において、CMV(Y)に対して ER を示す RCY1 形質転換シロイヌナズナ系統を遺伝的バックグラウンドとして、ER を喪失する *src* 変異体を単離した。独立 5 系統の *src* 変異体の形質を解析した結果、RCY1 プロモーター領域の高メチル化により、RCY1 転写産物が減少したことが、CMV(Y)に対する ER が失われた原因であることが示された。したがって、本研究結果から、RCY1 プロモーター領域の低メチル化制御を介した転写調節の増強が、RCY1 タンパク質の高蓄積に必須であることが見出された。今後、*src* の原因変異を同定し、RCY1 プロモーターのメチル化を制御する機構を詳細に解明することは、NB-LRR タンパク質を高蓄積させる手段を見出す上で有用であると考えられる。

本研究の第三章においては、RCY1 タンパク質をコードする様々な遺伝子コンストラクトの発現を比較した結果、RCY1 コード領域のイントロンがスプライシングを受けることが、転写後調節を介した RCY1 タンパク質蓄積の増強に必要であることが示された。一般的にイントロンが存在することは、必ずしもタンパク質蓄積の増強に関わらない一方で (図 22, 図 28)、RCY1 タンパク質や、アブラナ科べと病菌に対する R タンパク質である RPP8 の蓄積においては、イントロンの存在が重要であることが示された。本研究から、イントロンが NB-LRR タンパク質の蓄積を増強させるか否かは、イントロン配列ではなく、エクソン配列に左右されている可能性が示唆された。今後、イントロンを介した NB-LRR タンパク質蓄積増強に必要とされる遺伝子構造を解明することにより、NB-LRR 遺伝子内の機能性配列に関して新たな知見がもたらされ得る。

以上のように本研究では、RCY1タンパク質の高蓄積において重要となる、転写調節機構と、転写後調節機構の存在を明らかにした。第二章において既に述べた通り、いくつかのR遺伝子は、防御応答時に大きく発現誘導を受ける仕組みを獲得している一方で、RCY1遺伝子のように、そのような仕組みを持たないNB-LRR型R遺伝子が少なからず存在すると考えられる。このように、病原体感染時にR遺伝子の発現が顕著に誘導されない場合において植物は、病原体に対する抵抗性を十分に発現するに足りるRタンパク質蓄積量を構成的に維持する必要があると考えられる。本研究で明らかとなった、RCY1タンパク質や類似するNB-LRRタンパク質の蓄積量の調節機構は、その上で役割を果たしてきたことが考えられる。また本研究は、植物において、遺伝子発現ベクターを介して安定的にNB-LRRタンパク質を高蓄積させるために必要となる要因を明らかにしたため、応用面においても有益な情報をもたらしたと言える。

NB-LRR型R遺伝子を持つ植物が、Avr遺伝子を持つウイルスに対してどのような応答を示すかは、ウイルス側の要因によっても決定されることが示唆されている。Rsv1を含むダイズは、ダイズモザイクウイルスの多くの系統に対してERを示すが、ある系統に対しては全身HRを示す。この現象は、各ウイルス系統の持つAvr因子間の、アミノ酸置換に起因していることが示されている (Eggenberger et al. 2008)。NB-LRRタンパク質蓄積量やAvr因子の構造変化により、植物のウイルス抵抗性の強さが変化する分子機構は、明らかにされていないものの、細胞内における活性化NB-LRRタンパク質の量に依存していることが考えられる。すなわち、植物細胞内において、Avr因子と相互作用するNB-LRRタンパク質の量が増すことで、あるいは、Avr因子とNB-LRRタンパク質間の相互作用が強くなることで、活性型NB-LRRタンパク質の濃度が高まり、下流の防御応答シグナル誘導が強化され、より速くウイルス増殖が抑えられているということが予想される。

ウイルス抵抗性の強さの制御機構が、NB-LRRタンパク質とAvr因子間の相互作用の強さや量に依存するのであれば、Rタンパク質によるAvr認識の分子機構を解明することも重要である。Rタンパク質による認識を逃れるようなAvr因子の変異は、病原体側にとって多大なフィットネスコストをとまなう場合には、選択されにくいと考えられる。例えばRCY1は、CMV(Y)-CP分子内の、安定的な粒子形成に必要とされる構造を認識していることが示唆されている (unpublished data)。一方で、RCY1タンパク質による認識を逃れることができるCMV系統も存在する (Takahashi et al. 2001; Sekine et al. 2008)。Rタンパク質とAvr因子間の相互作用機構の解明が進めば、将来的に、病原体の生存にとって欠くことのできないAvr因子の構造を認識するRタンパク質を設計するといった応用展開も可能になるかもしれない。以上のように、NB-LRRタンパク質蓄積量の調節機構と、NB-LRRタンパク質とAvr因子の相互作用機構を複合的に解明していくことで、NB-LRR型R遺伝子をより効率的に利用する病害防除体系を確立することが期待される。

謝辞

本博士論文は、東北大学大学院農学研究科の植物病理学分野において行った研究をまとめたものです。同分野の高橋英樹教授には、本研究および本論文の執筆に関して、終始懇切丁寧なるご指導、ご鞭撻を賜りましたことに、厚く御礼申し上げます。また、同分野の安藤杉尋准教授および宮下脩平助教には、平素より多大なるご指導、ご助言を賜りましたことに、心より御礼申し上げます。また、本論文をご精読いただき数々の貴重なご助言を賜りました、東北大学大学院農学研究科の植物遺伝子育種学分野の西尾剛教授および植物細胞生化学分野の宮尾光恵教授に、心より感謝申し上げます。最後になりますが、研究室生活でお世話になりました、植物病理学分野の先輩ならびに後輩の皆様に、心より感謝申し上げます。

引用文献

- Abe, A., Kosugi, S., Yoshida, K., Natsume, S., Takagi, H., Kanzaki, H., Matsumura, H., Yoshida, K., Mitsuoka, C., Tamiru, M., Innan, H., Cano, L., Kamoun, S., and Terauchi, R. 2012. Genome sequencing reveals agronomically important loci in rice using MutMap. *Nat. Biotechnol.* 30:174–178
- Anderson, P. A., Lawrence, G. J., Morrish, B. C., Ayliffe, M. A., Finnegan, E. J., and Ellis, J. G. 1997. Inactivation of the flax rust resistance gene *M* associated with loss of a repeated unit within the leucine-rich repeat coding region. *Plant Cell.* 9:641–651
- Ayliffe, M. A., Frost, D. V, Finnegan, E. J., Lawrence, G. J., Anderson, P. A., and Ellis, J. G. 1999. Analysis of alternative transcripts of the flax L6 rust resistance gene. *17:287–292*
- Baggs, E., Dagdas, G., and Krasileva, K. V. 2017. NLR diversity, helpers and integrated domains: making sense of the NLR IDentity. *Curr. Opin. Plant Biol.* 38:59–67
- Belele, C. L., Sidorenko, L., Stam, M., Bader, R., Arteaga-Vazquez, M. A., and Chandler, V. L. 2013. Specific tandem repeats are sufficient for paramutation-induced trans-generational silencing. *PLOS Genet.* 9:e1003773
- Bendahmane, A., Farnham, G., Moffett, P., and Baulcombe, D. C. 2002. Constitutive gain-of-function mutants in a nucleotide binding site-leucine rich repeat protein encoded at the *Rx* locus of potato. *Plant J.* 32:195–204
- Bendahmane, A., Kanyuka, K., and Baulcombe, D. C. 1999. The *Rx* gene from potato controls separate virus resistance and cell death responses. *Plant Cell.* 11:781–792
- Bird, A. 2007. Perceptions of epigenetics. *Nature.* 447:396–398
- Bonardi, V., Tang, S., Stallmann, A., Roberts, M., Cherkis, K., and Dangl, J. L. 2011. Expanded functions for a family of plant intracellular immune receptors beyond specific recognition of pathogen effectors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108:16463–16468
- Bono, F., Ebert, J., Unterholzner, L., Guttler, T., Izaurralde, E., and Co. 2004. Molecular insights into the interaction of PYM with the Mago–Y14 core of the exon junction complex. *EMBO repots.* 5:304–310
- Borhan, M. H., Holub, E. B., Beynon, J. L., Rozwadowski, K., and Rimmer, S. R. 2004. The arabidopsis TIR-NB-LRR gene *RAC1* confers resistance to *Albugo candida* (white rust) and is dependent on *EDS1* but not *PAD4*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 17:711–719
- Botër, M., Amigues, B., Peart, J., Breuer, C., Kadota, Y., Casais, C., Moore, G., Kleanthous, C., Ochsenbein, F., Shirasu, K., and Guerois, R. 2007. Structural and functional analysis of SGT1 reveals that its interaction with HSP90 is required for the accumulation of Rx, an R protein involved in plant immunity. *Plant Cell.* 19:3791–3804
- Boyes, D. C., Nam, J., and Dangl, J. L. 1998. The Arabidopsis thaliana RPM1 disease resistance gene product is a peripheral plasma membrane protein that is degraded coincident with the

- hypersensitive response. *Plant Biol.* 95:15849–15854
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248–254
- Callis, J., Fromm, M., and Walbot, V. 1987. Introns increase gene expression in cultured maize cells. *Genes Dev.* 1:1183–1200
- Cao, X., and Jacobsen, S. E. 2002. Locus-specific control of asymmetric and CpNpG methylation by the DRM and CMT3 methyltransferase genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99:16491–16498
- Chan, S. W. L., Henderson, I. R., and Jacobsen, S. E. 2005. Gardening the genome: DNA methylation in *Arabidopsis thaliana*. *Nat. Rev. Genet.* 6:351–360
- Chandler, V. L. 2010. Paramutation's properties and puzzles. *Science.* 330:628–629
- Collins, N., Drake, J., Ayliffe, M., Sun, Q., Ellis, J., Hulbert, S., and Pryor, T. 1999. Molecular characterization of the maize *Rp1-D* rust resistance haplotype and its mutants. *Plant Cell.* 11:1365–1376
- Cooley, M. B., Pathirana, S., Wu, H., Kachroo, P., and Klessig, D. F. 2000. Members of the *Arabidopsis HRT/RPP8* family of resistance genes confer resistance to both viral and oomycete pathogens. *Plant Cell.* 12:663–676
- Cournoyer, P., and Dinesh-kumar, S. P. 2011. NB-LRR immune receptors in plant virus defence. Pages 149–176 in: Caranta C, Aranda MA, Tepfer M, and Lopez-Moya JJ (ed) *Recent Advances in Plant Virology*, 1st edn. Caister Academic Press, Norfolk, UK,
- Csorba, T., Kontra, L., and Burgyán, J. 2015. Viral silencing suppressors: Tools forged to fine-tune host-pathogen coexistence. *Virology.* 479–480:85–103
- Cui, H., Tsuda, K., and Parker, J. E. 2015. Effector-triggered immunity: from pathogen perception to robust defense. *Annu. Rev. Plant Biol.* 66:487–511
- Dean, C., Favreau, M., Bond-Nutter, D., Bedbrook, J., and Dunsmuir, P. 1989. Sequences downstream of translation start regulate quantitative expression of two petunia *rbcS* genes. *Plant Cell.* 1:201–208
- DeYoung, B. J., and Innes, R. W. 2006. Plant NBS-LRR proteins in pathogen sensing and host defense. *Nat. Immunol.* 7:1243–1249
- Diem, M., Chan, C., Younis, I., and Dreyfuss, G. 2007. PYM binds the cytoplasmic exon-junction complex and ribosomes to enhance translation of spliced mRNAs. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14:1173–1179
- Dinesh-Kumar, S., and Baker, B. 2000. Alternatively spliced *N* resistance gene transcripts: their possible role in tobacco mosaic virus resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97:1908–1913
- Dinesh-Kumar, S. P., Tham, W. H., and Baker, B. J. 2000. Structure-function analysis of the tobacco mosaic virus resistance gene *N*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97:14789–14794
- Ding, S.-W. 2010. RNA-based antiviral immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 10:632–644
- Dong, O. X., Tong, M., Bonardi, V., El Kasmi, F., Woloshen, V., Wunsch, L. K., Dangl, J. L., and Li,

- X. 2016. TNL-mediated immunity in *Arabidopsis* requires complex regulation of the redundant *ADRI* gene family. *New Phytol.* 210:960–973
- Eggenberger, A. L., Hajimorad, M. R., and Hill, J. H. 2008. Gain of virulence on *Rsv1*-genotype soybean by an avirulent *Soybean mosaic virus* requires concurrent mutations in both P3 and HC-Pro. *Mol. Plant Microbe Interact.* 21:931–6
- Flor, H. H. 1971. Current status of the gene-for-gene concept. *Annu. Rev. Phytopathol.* 9:275–296
- Fu, D., Ghabrial, S., and Kachroo, A. 2009. *GmRAR1* and *GmSGT1* are required for basal, *R* gene-mediated and systemic acquired resistance in soybean. *Mol. Plant Microbe Interact.* 22:86–95
- Gallegos, J. E., and Rose, A. B. 2015. The enduring mystery of intron-mediated enhancement. *Plant Sci.* 237:8–15
- Gallitelli, D. 2000. The ecology of *Cucumber mosaic virus* and sustainable agriculture. *Virus Res.* 71:9–21
- Gassmann, W., Hinsch, M. E., and Staskawicz, B. J. 1999. The *Arabidopsis RPS4* bacterial-resistance gene is a member of the TIR-NBS-LRR family of disease-resistance genes. *Plant J.* 20:265–277
- Glisovic, T., Bachorik, J., Yong, J., and Dreyfuss, G. 2008. RNA-binding proteins and post-transcriptional gene regulation. *FEBS Lett.* 582:1977–1986
- Goodin, M. M., Zaitlin, D., Naidu, R. A., and Lommel, S. A. 2008. *Nicotiana benthamiana*: its history and future as a model for plant-pathogen interactions. *Mol. Plant Microbe Interact.* 21:1015–1026
- Grant, J. J., Chini, A., Basu, D., and Loake, G. J. 2003. Targeted activation tagging of the *Arabidopsis NBS-LRR* gene, *ADRI*, conveys resistance to virulent pathogens. *Mol. Plant Microbe Interact.* 16:669–680
- Green, M. R., and Sambrook, J. 2012. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 4th edn. Cold Spring Harbor, NY, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Gruntman, E., Qi, Y., Slotkin, R. K., Roeder, T., Martienssen, R. A., and Sachidanandam, R. 2008. Kismeth: Analyzer of plant methylation states through bisulfite sequencing. *BMC Bioinformatics.* 9:371
- Gururani, M. A., Venkatesh, J., Upadhyaya, C. P., Nookaraju, A., Pandey, S. K., and Park, S. W. 2012. Plant disease resistance genes: Current status and future directions. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 78:51–65
- Hakata, M., Nakamura, H., Iida-Okada, K., Miyao, A., Kajikawa, M., Imai-Toki, N., Pang, J., Amano, K., Horikawa, A., Tsuchida-Mayama, T., Song, J., Igarashi, M., Kitamoto, H. K., Ichikawa, T., Matsui, M., Kikuchi, S., Nagamura, Y., Hirochika, H., and Ichikawa, H. 2010. Production and characterization of a large population of cDNA-overexpressing transgenic rice plants using Gateway-based full-length cDNA expression libraries. *Breed. Sci.* 60:575–585
- Halterman, D. A., Wei, F., and Wise, R. P. 2003. Powdery mildew-induced *Mla* mRNAs are

- alternatively spliced and contain multiple upstream open reading frames. *Plant Physiol.* 131:558–567
- Hämäläinen, J. H., Watanabe, K. N., Valkonen, J. P. T., Arihara, A., Plaisted, R. L., Pehu, E., Miller, L., and Slack, S. A. 1997. Mapping and marker-assisted selection for a gene for extreme resistance to potato virus Y. *Theor. Appl. Genet.* 94:192–197
- Harris, C. J., Slootweg, E. J., Goverse, A., and Baulcombe, D. C. 2013. Stepwise artificial evolution of a plant disease resistance gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110:21189–21194
- Hashimoto, M., Neriya, Y., Yamaji, Y., and Namba, S. 2016. Recessive resistance to plant viruses: potential resistance genes beyond translation initiation factors. *Front. Microbiol.* 7:1695
- Hayes, A. J., Jeong, S. C., Gore, M. A., Yu, Y. G., Buss, G. R., Tolin, S. A., and Maroof, M. A. S. 2004. Recombination within a nucleotide-binding-site/leucine-rich-repeat gene cluster produces new variants conditioning resistance to soybean mosaic virus in soybeans. *Genetics.* 166:493–503
- Hondo, D., Hase, S., Kanayama, Y., Yoshikawa, N., Takenaka, S., and Takahashi, H. 2007. The LeATL6-associated ubiquitin/proteasome system may contribute to fungal elicitor-activated defense response via the jasmonic acid-dependent signaling pathway in tomato. *Mol. Plant Microbe Interact.* 20:72–81
- Hull, R. 2014. *Plant Virology*, 5th edn. Acad.Press, Cambridge, MA, USA.
- Ishibashi, K., Masuda, K., Naito, S., Meshi, T., and Ishikawa, M. 2007. An inhibitor of viral RNA replication is encoded by a plant resistance gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104:13833–13838
- Jacobsen, S. E., and Meyerowitz, E. M. 1997. Hypermethylated *SUPERMAN* epigenetic alleles in *Arabidopsis*. *Science.* 277:1100–1103
- Jacquemond, M. 2012. Cucumber mosaic virus. *Adv. Virus Res.* 84:439–504
- Jaenisch, R., and Bird, A. 2003. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat. Genet.* 33:245–254
- Jeong, Y.-M., Mun, J.-H., Lee, I., Woo, J. C., Hong, C. B., and Kim, S.-G. 2006. Distinct roles of the first introns on the expression of *Arabidopsis* profilin gene family members. *Plant Physiol.* 140:196–209
- Kang, B.-C., Yeam, I., and Jahn, M. M. 2005. Genetics of plant virus resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43:581–621
- Karasov, T. L., Kniskern, J. M., Gao, L., DeYoung, B. J., Ding, J., Dubiella, U., Lastra, R. O., Nallu, S., Roux, F., Innes, R. W., Barrett, L. G., Hudson, R. R., and Bergelson, J. 2014. The long-term maintenance of a resistance polymorphism through diffuse interactions. *Nature.* 512:436–440
- Klose, R. J., and Bird, A. P. 2006. Genomic DNA methylation: The mark and its mediators. *Trends Biochem. Sci.* 31:89–97
- Koroleva, O. A., Calder, G., Pendle, A. F., Kim, S. H., Lewandowska, D., Simpson, C. G., Jones, I. M., Brown, J. W. S., and Shaw, P. J. 2009. Dynamic behavior of *Arabidopsis* eIF4A-III, putative

- core protein of exon junction complex: fast relocation to nucleolus and splicing speckles under hypoxia. *Plant Cell*. 21:1592–1606
- Lawrence, G. J., Finnegan, E. J., Ayliffe, M. A., and Ellis, J. G. 1995. The *L6* gene for flax rust resistance is related to the *Arabidopsis* bacterial resistance gene *RPS2* and the tobacco viral resistance gene *N*. *Plant Cell*. 7:1195–1206
- Levy, M., Edelbaum, O., and Sela, I. 2004. Tobacco mosaic virus regulates the expression of its own resistance gene *N*. *Plant Physiol*. 135:2392–1397
- Li, F., Pignatta, D., Bendix, C., Brunkard, J. O., Cohn, M. M., Tung, J., and Sun, H. 2012. MicroRNA regulation of plant innate immune receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109:1790–1795
- Li, X., Kapos, P., and Zhang, Y. 2015. NLRs in plants. *Curr. Opin. Immunol.* 32:114–121
- Li, Y., Dong, O. X., Johnson, K., and Zhang, Y. 2011. *MOS1* epigenetically regulates the expression of plant *Resistance* gene *SNCI*. *Plant Signal. Behav.* 6:434–436
- Li, Y., Tessaro, M. J., Li, X., and Zhang, Y. 2010. Regulation of the expression of plant *Resistance* gene *SNCI* by a protein with a conserved BAT2 domain. *Plant Physiol*. 153:1425–1434
- Marone, D., Russo, M. A., Laidò, G., De Leonardis, A. M., and Mastrangelo, A. M. 2013. Plant nucleotide binding site-leucine-rich repeat (NBS-LRR) genes: active guardians in host defense responses. *Int. J. Mol. Sci.* 14:7302–7326
- McDowell, J. M., Dhandaydham, M., Long, T. A., Aarts, M. G. M., Goff, S., Holub, E. B., and Dangl, J. L. 1998. Intragenic recombination and diversifying selection contribute to the evolution of downy mildew resistance at the *RPP8* locus of *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 10:1861–1874
- Mes, J. J., Doorn, A. A. Van, Wijbrandi, J., Simons, G., Cornelissen, B. J. C., and Haring, M. A. 2000. Expression of the *Fusarium* resistance gene *I-2* colocalizes with the site of fungal containment. *Plant J.* 23:183–193
- Mestre, P., Brigneti, G., and Baulcombe, D. C. 2000. An *Ry*-mediated resistance response in potato requires the intact active site of the *Nla* proteinase from potato virus Y. *Plant J.* 23:653–661
- Mette, M. F., Aufsatz, W., van der Winden, J., Matzke, M. A., and Matzke, A. J. 2000. Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA. *EMBO J.* 19:5194–5201
- Meyers, B. C., Dickerman, A. W., Michelmore, R. W., Sivaramakrishnan, S., Sobral, B. W., and Young, N. D. 1999. Plant disease resistance genes encode members of an ancient and diverse protein family within the nucleotide-binding superfamily. *Plant J.* 20:317–332
- Meyers, B. C., Kozik, A., Griego, A., Kuang, H., and Michelmore, R. W. 2003. Genome-wide analysis of NBS-LRR-encoding genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 15:809–834
- Moffett, P. 2017. Transfer and modification of NLR proteins for virus resistance in plants. *Curr. Opin. Virol.* 26:43–48
- Mohr, T. J., Mammarella, N. D., Hoff, T., Woffenden, B. J., Jelesko, J. G., and McDowell, J. M. 2010. The *Arabidopsis* downy mildew resistance gene *RPP8* is induced by pathogens and salicylic acid and is regulated by *W* box *cis* elements. *Mol. Plant Microbe Interact.* 23:1303–1315

- Mufarrege, E. F., Gonzalez, D. H., and Curi, G. C. 2011. Functional interconnections of *Arabidopsis* exon junction complex proteins and genes at multiple steps of gene expression. *J. Exp. Bot.* 62:5025–5036
- Mur, L. A. J., Kenton, P., Lloyd, A. J., Ougham, H., and Prats, E. 2008. The hypersensitive response; The centenary is upon us but how much do we know? *J. Exp. Bot.* 59:501–520
- Murashige, T., and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15
- Nam, M., Koh, S., Kim, S. U., Domier, L. L., Jeon, J. H., Kim, H. G., Lee, S. H., Bent, A. F., and Moon, J. S. 2011. *Arabidopsis TTR1* causes LRR-dependent lethal systemic necrosis, rather than systemic acquired resistance, to tobacco ringspot virus. *Mol. Cells.* 32:421–429
- Oerke, E.-C. 2006. Crop losses to pests. *J. Agric. Sci.* 144:31–43
- Oldroyd, G. E., and Staskawicz, B. J. 1998. Genetically engineered broad-spectrum disease resistance in tomato. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95:10300–10305
- Palma, K., Thorgrimsen, S., Malinovsky, F. G., Fiil, B. K., Nielsen, H. B., Brodersen, P., Hofius, D., Petersen, M., and Mundy, J. 2010. Autoimmunity in *Arabidopsis acd11* is mediated by epigenetic regulation of an immune receptor. *PLOS Pathog.* 6:e1001137
- Park, N., and Muench, D. 2007. Biochemical and cellular characterization of the plant ortholog of PYM, a protein that interacts with the exon junction complex core proteins Mago and Y14. *Planta.* 225:625–639
- Park, Y. D., Papp, I., Moscone, E. A., Iglesias, V. A., Vaucheret, H., Matzke, A. J., and Matzke, M. A. 1996. Gene silencing mediated by promoter homology occurs at the level of transcription and results in meiotically heritable alterations in methylation and gene activity. *Plant J.* 9:183–194
- Parker, J. E., Coleman, M. J., Szabò, V., Frost, L. N., Schmidt, R., van der Biezen, E. A., Moores, T., Dean, C., Daniels, M. J., and Jones, J. D. 1997. The *Arabidopsis* downy mildew resistance gene *RPP5* shares similarity to the toll and interleukin-1 receptors with *N* and *L6*. *Plant Cell.* 9:879–894
- Parra, G., Bradnam, K., Rose, A. B., and Korf, I. 2011. Comparative and functional analysis of intron-mediated enhancement signals reveals conserved features among plants. *Nucleic Acids Res.* 39:5328–37
- Peart, J. R., Lu, R., Sadanandom, A., Malcuit, I., Moffett, P., Brice, D. C., Schausser, L., Jaggard, D. A. W., Xiao, S., Coleman, M. J., Dow, M., Jones, J. D. G., Shirasu, K., and Baulcombe, D. C. 2002. Ubiquitin ligase-associated protein SGT1 is required for host and nonhost disease resistance in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99:10865–10869
- Popp, J., and Hantos, K. 2011. The impact of crop protection on agricultural production. *Stud. Agric. Econ.* 113:47–66
- R Core Team. 2014. R: A language and environment for statistical computing. in: R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>,

- Reddy, A. S. N., Marquez, Y., Kalyna, M., and Barta, A. 2013. Complexity of the alternative splicing landscape in plants. *Plant Cell*. 25:3657–83
- Rethmeier, N., Seurinck, J., Montagu, M. Van, and Marc, C. 1997. Intron-mediated enhancement of transgene expression in maize is a nuclear, gene-dependent process. *Plant J*. 12:895–899
- Rose, A. B., Elfersi, T., Parra, G., and Korf, I. 2008. Promoter-proximal introns in *Arabidopsis thaliana* are enriched in dispersed signals that elevate gene expression. *Plant Cell*. 20:543–551
- Rose, A. B., and Last, R. L. 1997. Introns act post-transcriptionally to increase expression of the *Arabidopsis thaliana* tryptophan pathway gene *PAT1*. *Plant J*. 11:455–464
- Scholthof, K. B. G., Adkins, S., Czosnek, H., Palukaitis, P., Jacquot, E., Hohn, T., Hohn, B., Saunders, K., Candresse, T., Ahlquist, P., Hemenway, C., and Foster, G. D. 2011. Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol*. 12:938–954
- Schornack, S., Ballvora, A., Gürlebeck, D., Peart, J., Ganai, M., Baker, B., Bonas, U., and Lahaye, T. 2004. The tomato resistance protein Bs4 is a predicted non-nuclear TIR-NB-LRR protein that mediates defense responses to severely truncated derivatives of AvrBs4 and overexpressed AvrBs3. *Plant J*. 37:46–60
- Sekine, K.-T., Ishihara, T., Hase, S., Kusano, T., Shah, J., and Takahashi, H. 2006. Single amino acid alterations in *Arabidopsis thaliana* RCY1 compromise resistance to *Cucumber mosaic virus*, but differentially suppress hypersensitive response-like cell death. *Plant Mol. Biol*. 62:669–682
- Sekine, K., Kawakami, S., Hase, S., Kubota, M., Ichinose, Y., Shah, J., Kang, H., Klessig, D. F., and Takahashi, H. 2008. High level expression of a virus resistance gene, *RCY1*, confers extreme resistance to *Cucumber mosaic virus* in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant Microbe Interact*. 21:1398–1407
- Shirano, Y., Kachroo, P., Shah, J., and Klessig, D. F. 2002. A gain-of-function mutation in an *Arabidopsis* Toll interleukin receptor–nucleotide binding site-leucine-rich repeat type R gene triggers defense responses and results in enhanced disease resistance. *Plant Cell*. 14:3149–3162
- Shivaprasad, P. V., Chen, H., Patel, K., Bond, D. M., Santos, B. A. C. M., and Baulcombe, D. C. 2012. A microRNA superfamily regulates nucleotide binding site-leucine-rich repeats and other mRNAs. *Plant Cell*. 24:859–874
- Staiger, D., and Brown, J. W. S. 2013. Alternative splicing at the intersection of biological timing, development, and stress responses. *Plant Cell*. 25:3640–56
- Stam, M., and Scheid, O. M. 2005. Paramutation: An encounter leaving a lasting impression. *Trends Plant Sci*. 10:283–290
- Stam, M., Viterbo, A., Mol, J. N., and Kooter, J. M. 1998. Position-dependent methylation and transcriptional silencing of transgenes in inverted T-DNA repeats: implications for posttranscriptional silencing of homologous host genes in plants. *Mol. Cell. Biol*. 18:6165–6177
- Stokes, T. L., and Richards, E. J. 2002. Induced instability of two *Arabidopsis* constitutive pathogen-response alleles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 99:7792–7796

- Suzuki, M. M., and Bird, A. 2008. DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. *Nat. Rev. Genet.* 9:465–476
- Takahashi, H., Goto, N., and Ehara, Y. 1994. Hypersensitive response in cucumber mosaic virus-inoculated *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 6:369–377
- Takahashi, H., Kai, A., Yamashita, M., Ando, S., Sekine, K.-T., Kanayama, Y., and Tomita, H. 2012a. Cyclic nucleotide-gated ion channel-mediated cell death may not be critical for *R* gene-conferred resistance to *Cucumber mosaic virus* in *Arabidopsis thaliana*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 79:40–48
- Takahashi, H., Miller, J., Nozaki, Y., Takeda, M., Shah, J., Hase, S., Ikegami, M., Ehara, Y., and Dinesh-Kumar, S. P. 2002. *RCY1*, an *Arabidopsis thaliana* *RPP8/HRT* family resistance gene, conferring resistance to cucumber mosaic virus requires salicylic acid, ethylene and a novel signal transduction mechanism. *Plant J.* 32:655–667
- Takahashi, H., Shoji, H., Ando, S., Kanayama, Y., Kusano, T., Takeshita, M., Suzuki, M., and Masuta, C. 2012b. *RCY1*-mediated resistance to *Cucumber mosaic virus* is regulated by LRR domain-mediated interaction with CMV(Y) following degradation of *RCY1*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 25:1171–1185
- Takahashi, H., Suzuki, M., Natsuaki, K., Shigyo, T., Hino, K., Teraoka, T., Hosokawa, D., and Ehara, Y. 2001. Mapping the virus and host genes involved in the resistance response in cucumber mosaic virus-infected *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 42:340–347
- Takken, F. L., and Tameling, W. I. 2009. To nibble at plant resistance proteins. *Science.* 324:744–746
- Tan, X., Meyers, B. C., Kozik, A., West, M. Al, Morgante, M., St Clair, D. A., Bent, A. F., and Michelmore, R. W. 2007. Global expression analysis of nucleotide binding site-leucine rich repeat-encoding and related genes in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biol.* 7:56
- Tao, Y., Yuan, F. H., Leister, R. T., Ausubel, F. M., and Katagiri, F. 2000. Mutational analysis of the *Arabidopsis* nucleotide binding site- leucine-rich repeat resistance gene *RPS2*. *Plant Cell.* 12:2541–2554
- Tian, D., Traw, M. B., Chen, J. Q., Kreitman, M., and Bergelson, J. 2003. Fitness costs of *R*-gene-mediated resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Nature.* 423:74–77
- Tomaru, K., and Hidaka, J. 1960. Strains of cucumber mosaic virus isolated from tobacco plants. III. A yellow strain. *Bull. Hatano Tob. Exp. Stn.* 46:143–149
- Tomita, R., Sekine, K.-T., Mizumoto, H., Sakamoto, M., Murai, J., Kiba, A., Hikichi, Y., Suzuki, K., and Kobayashi, K. 2011. Genetic basis for the hierarchical interaction between *Tobamovirus* spp. and *L* resistance gene alleles from different pepper species. *Mol. Plant Microbe Interact.* 24:108–117
- Tsuchiya, T., and Eulgem, T. 2013. An alternative polyadenylation mechanism coopted to the *Arabidopsis* *RPP7* gene through intronic retrotransposon domestication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110:E3535–E3543

- Vallejos, C. E., Astua-Monge, G., Jones, V., Plyler, T. R., Sakiyama, N. S., and Mackenzie, S. A. 2006. Genetic and molecular characterization of the *I* locus of *Phaseolus vulgaris*. *Genetics*. 172:1229–1242
- Verlaan, M. G., Hutton, S. F., Ibrahim, R. M., Kormelink, R., Visser, R. G. F., Scott, J. W., Edwards, J. D., and Bai, Y. 2013. The Tomato Yellow Leaf Curl Virus resistance genes *Ty-1* and *Ty-3* are allelic and code for DFDGD-class RNA-dependent RNA polymerases. *PLOS Genet.* 9:e1003399
- Voinnet, O. 2005. Induction and suppression of RNA silencing: insights from viral infections. *Nat. Rev. Genet.* 6:206–220
- Whitham, S., Dinesh-Kumar, S. P., Choi, D., Hehl, R., Corr, C., and Baker, B. 1994. The product of the tobacco mosaic virus resistance gene N: Similarity to toll and the interleukin-1 receptor. *Cell*. 78:1101–1115
- Xia, S., Cheng, Y. T., Huang, S., Win, J., Soards, A., Jinn, T.-L., Jones, J. D. G., Kamoun, S., Chen, S., Zhang, Y., and Li, X. 2013. Regulation of transcription of nucleotide-binding leucine-rich repeat-encoding genes *SNCI* and *RPP4* via H3K4 trimethylation. *Plant Physiol.* 162:1694–1705
- Xu, Y., Yu, H., and Timothy, C. H. 1994. Rice triosephosphate isomerase gene 5' sequence directs β -glucuronidase activity in transgenic tobacco but requires an intron for expression in rice. *Plant Physiol.* 106:459–467
- Yang, S., and Hua, J. 2004. A haplotype-specific *resistance* gene regulated by *BONZAI1* in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 16:1060–1071
- Yi, H., and Richards, E. J. 2009. Gene duplication and hypermutation of the pathogen *Resistance* gene *SNCI* in the *Arabidopsis* bal variant. *Genetics*. 183:1227–1234
- Yu, A., Lepère, G., Jay, F., Wang, J., Bapaume, L., Wang, Y., Abraham, A.-L., Penterman, J., Fischer, R. L., Voinnet, O., and Navarro, L. 2013. Dynamics and biological relevance of DNA demethylation in *Arabidopsis* antibacterial defense. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110:2389–2394
- Zhang, C., Grosic, S., Whitham, S. A., and Hill, J. H. 2012. The requirement of multiple defense genes in soybean *Rsv1*-mediated extreme resistance to *Soybean mosaic virus*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 25:1307–1313
- Zhang, X.-C., and Gassmann, W. 2007. Alternative splicing and mRNA levels of the disease resistance gene *RPS4* are induced during defense responses. *Plant Physiol.* 145:1577–1587
- Zheng, Z., Yu, H., Miki, D., Jin, D., Zhang, Q., Ren, Z., Gong, Z., Zhang, H., and Zhu, J. K. 2015. Involvement of multiple gene-silencing pathways in a paramutation-like phenomenon in *Arabidopsis*. *Cell Rep.* 11:1160–1167