

ヒメツリガネゴケにおける生体防御関連タンパク質の機能解析

○稲嶺咲紀^{A)}, 田中隆介^{B)}, 喜納善延^{B)}, 内海俊樹^{C)}, 平良東紀^{B)}

^{A)}鹿児島大学大学院理工学研究科, ^{B)}琉球大学農学部亜熱帯生物資源科学科,

^{C)}鹿児島大学学術研究院理工学域理学系

1. はじめに

キチナーゼ(キチン分解酵素)は広く陸上植物に存在しているが、その基質であるキチンは植物体内には存在しない。そのため、植物キチナーゼは病原性真菌の細胞壁キチンを分解することにより、その生育や感染を抑制する生体防御タンパク質であると考えられている。さらに、共生、分化誘導、胚形成、ストレス耐性など様々な生理機能に関与することが報告されているが、解明には至っていない。このようなタンパク質の生理機能は、植物の進化とともに多様化してきたと考えられる。そこで、陸上植物における進化の基部に位置するコケ植物のキチナーゼについて解析を行うことにより、その根源的な役割についての知見が得られることを期待して研究を行っている。

2. 目的

この研究では、様々なキチナーゼの生理機能の中でも、生体防御に関わる機能に着目した。これまでに、イネやシロイヌナズナなどの高等植物にはキチナーゼが関わる生体防御機構が存在することが報告されている。しかし、高等植物にはキチナーゼの種類とそれに類似した遺伝子の数が多く、機能解析を行うのが困難である。そこで、高等植物と比較してキチナーゼの遺伝子数が少なく、解析を行う上で有利であるコケ植物を利用し、キチナーゼの植物生体内における役割について明らかにするため、発現解析や大腸菌による発現系の構築、機能解析を行ったので、それらの方法等について紹介する。

3. 方法・結果

a) サンプルとなるコケ植物の選定

本研究では、コケ植物蘚類のヒメツリガネゴケ (*Physcomitrella patens* subsp. *patens*) を使用した(図1)。ヒメツリガネゴケを扱う理由として、

- ・小さいため培養が容易
- ・ライフサイクルが短い
- ・ゲノム解読が完了している
- ・形質転換体を比較的容易に得られる

といった点が挙げられ、モデル生物としても利用されている。

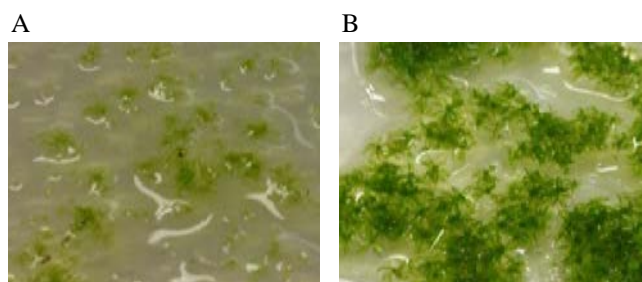


図1. ヒメツリガネゴケ

A: 継代後 8 日目(原系体) B: 継代後 30 日目(茎葉体)

b) キチナーゼ候補遺伝子の検索

植物キチナーゼは、その一次構造の違いによって糖質加水分解酵素ファミリー19 および 18 に分類される。さらに、ファミリー19 のキチナーゼはクラス I, クラス II, クラス IV, クラス IIL に、ファミリー18 のキチナーゼはクラス III, クラス IIIb, クラス V に分類される。NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) のヒメツリガネゴケデータベースにおける遺伝子検索、BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) による配列比較、酵素活性部位の保存性により、クラス I キチナーゼが 3 種類、クラス II キチナーゼが 3 種類、クラス IV キチナーゼが 1 種類、クラス IIL キチナーゼが 1 種類、クラス V キチナーゼが 2 種類、合計 10 種類のキチナーゼ (PpChi) 候補遺伝子を選抜した。さらにリアルタイム PCR による遺伝子発現解析の結果、6 種類のキチナーゼについて有意な発現が確認された。

c) 組換え PpChi の作製

候補遺伝子の発現解析の結果、有意な発現が認められた 6 種類のキチナーゼについて、大腸菌による発現系の構築を行った。発現用ベクター pET22b に目的 PpChi コード領域を連結し、タンパク質発現用大腸菌 BL21 (DE3) に導入後、IPTG 誘導することで 6 種類のうち 3 種類の組換えキチナーゼを得た。分子量はそれぞれ PpChi-Ia が 29,000, PpChi-IV が 34,000, PpChi-Vb が 38,000 となっていた(図2)。

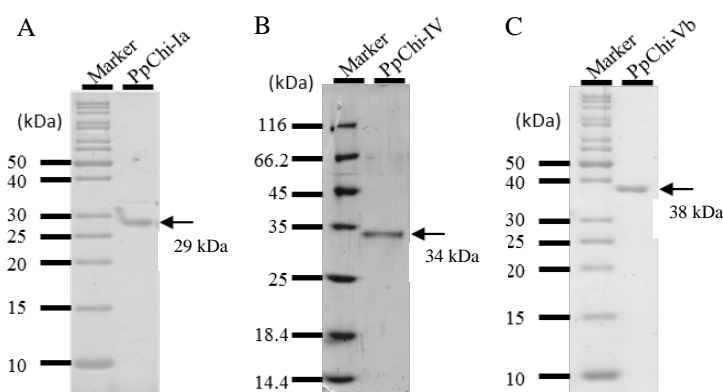


図2. SDS-PAGE による分子量測定

A: PpChi-Ia B: PpChi-IV C: PpChi-Vb

d) 最適温度・pH および熱・pH 安定性

得られた組換えキチナーゼについて、様々な温度・pH における活性を測定することで最適温度・pH, 熱・pH 安定性を測定した。緩衝液は、グリシン - HCl (pH 2, 3), 酢酸ナトリウム (pH 4, 5), クエン酸ナトリウム (pH 4, 5), リン酸ナトリウム (pH 6, 7), トリス-塩酸 (pH 8, 9), グリシン - NaOH (pH 10, 11, 12) を用いた。その結果、組換え PpChi-Ia, IV, Vb それぞれの最適 pH は 5.0, 5.0, 4.0 付近, また最適温度はいずれも 60°C であった。各 pH において 4°C, 12 時間後の残存活性を測定した結果, 組換え PpChi-Ia, IV, Vb はそれぞれ pH 3.0-10.0, pH 5.0-10.0, pH 3.0-10.0 付近で 80% 以上の活性を保持していた。各温度で 60 分間熱処理を行った後の残存活性を測定した結果, 組換え PpChi-Ia, IV, Vb 共に 0-40 °C で 80% 以上の活性を保持しており, 50°C より活性の低下が見られ, 60°C でほぼ完全に失活した。

e) キチンオリゴ糖分解パターン

キチナーゼと重合度の異なる基質(キチンオリゴ糖)を反応させた際に生じる分解産物の量を経時的に測定し、分解パターンの違いについて調べた。PpChi-Vb において、キチンオリゴ糖 6 量体の分解により 2,3,4,5 糖を生成したが、単糖は検出されなかった。詳しい解析の結果、2~5 糖の他に 8 糖の生成が認められたことから、PpChi-Vb はキチンオリゴ糖の加水分解反応と同時に、糖転移反応が起こっていることがわかった(図3)。糖転移活性を持つ植物キチナーゼの報告はソテツ由来キチナーゼに続き、2 例目となる。

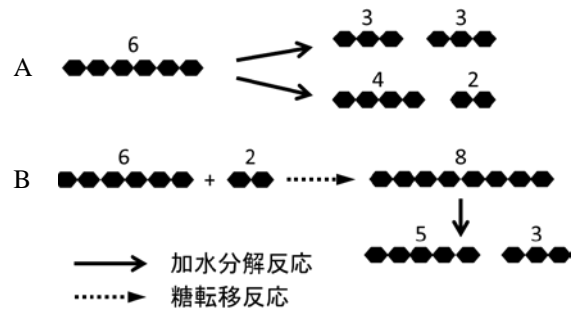


図3. PpChi-Vb の糖転移活性

A: 加水分解反応 B: 糖転移反応

f) 抗真菌活性

抗真菌活性の有無について調べた。抗真菌活性測定は PDA 培地に *Trichoderma viride* を培養し、試料を添加したウェル周辺の菌糸の伸長阻害を観察することで行った。その結果、PpChi-Ia は 300 pmol で糸状性真菌である *T. viride* 菌糸の成長抑制効果が認められたが、PpChi-IV および Vb には認められなかった。

4. まとめ

これらの結果から、コケ植物においても高等植物と同様にキチナーゼに関わる生体防御システムが存在し、生体内においてクラス毎に異なる役割を果たしていることが示唆された。現在、キチナーゼ遺伝子ノックアウトによる機能解析を行っているところである。

5. 謝辞

本研究の一部は科研費(15H00436)の助成を受けたものである。