

植物の生体防御に関わるキチナーゼの機能解析

○稲嶺咲紀¹, 田中隆介², 喜納善延², 内海俊樹¹, 平良東紀²

鹿児島大学大学院理工学研究科技術部¹, 琉球大学²

1. 背景

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係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に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) コケ植物の選定

モデル生物として利用されるコケ植物蘚類のヒメツリガネゴケ (*Physcomitrella patens* subsp. *patens*) を使用した。

b) キチナーゼ候補遺伝子の検索

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 10 種類のキチナーゼ候補遺伝子を得た。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

タンパク質発現用ベクター pET22b および大腸菌 BL21 (DE3) による組換えキチナーゼの作製を行った結果、6 種類のキチナーゼのうち 3 種類の作製に成功した。

d) 温度・pH の影響

様々な温度・pH における活性を測定した結果、最適 pH は 4.5~5.0 付近、最適温度は 60°C であった。また、pH 3.0~10.0、温度は 0~40°C の間で 80% 以上の活性を保持していた。

e) キチンオリゴ糖分解パターン解析

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。3 種類のうち 1 種類のキチナーゼについて、糖転移活性が認められた。

f) 遺伝子ノックアウトによる機能解析

キチナーゼの機能解析を行うために、遺伝子ノックアウト変異体を作製しているところである。

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。

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。