

学位論文の要旨

氏名	小原 咲紀
学位論文題目	発現プロファイルと酵素活性に基づいたヒメツリガネゴケ由来キチナーゼの機能に関する研究
<p>キチナーゼ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防御応答タンパク質のひとつであると考えられている。本論文は、ヒメツリガネゴケ由来キチナーゼ (PpChi) の生体防御における役割について、遺伝子の発現と酵素化学的特徴に基づいて検討し、まとめたものである。</p> <p>第1章は序論である。これまでに報告されているキチナーゼの構造と機能、高等植物の生体防御におけるキチナーゼの役割についてまとめ、加えて、ヒメツリガネゴケを用いた機能解析の優位性について述べた。</p> <p>第2章は、キチンオリゴ糖処理によるPpChiおよびPpCERK (キチンエリシター受容体キナーゼ) 遺伝子の転写量の変動について検討した。NCBI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キチナーゼを3種類、クラスIIキチナーゼを3種類、クラスIVキチナーゼを1種類、クラスIIIキチナーゼを1種類、クラスVキチナーゼを2種類、合計10種類のキチナーゼ候補遺伝子を選抜した。さらに、2種類のPpCERK候補遺伝子も得た。それらの遺伝子について、キチンオリゴ糖処理条件下における遺伝子発現をリアルタイムRT-PCRにて解析した結果、6種類のキチナーゼで有意な発現が確認された。これらの遺伝子の発現プロファイルとキチナーゼのクラスには、相関が認められた。</p> <p>第3章は、キチナーゼ遺伝子のクローニングについて述べた。前章にて有意な発現が認められた6種類のキチナーゼ候補遺伝子の翻訳産物の酵素化学的諸性質を調べるために、ヒメツリガネゴケ茎葉体からmRNAを抽出後、逆転写反応によりcDNAを合成してクローニングした。得られたcDNAの塩基配列とデータベース上の推定mRNAの塩基配列を比較した結果、PpChi-IIa, PpChi-IIc, PpChi-IV, PpChi-Vbは完全に一致した。しかし、PpChi-IaおよびPpChi-IbのcDNAについては、推定mRNAとは異なる配列であった。推定mRNAには、キチン分解活性に必須な触媒残基であるグルタミン酸が存在しなかった。一方、cDNAの塩基配列にはグルタミン酸の存在が認められたことから、本研究で得られたcDNAの配列が正しいと判断した。</p> <p>第4章は、キチナーゼの発現系の構築と精製法の確立について検討した。前章で得られたcDNAより、クローニングによって制限酵素サイト付きPpChi遺伝子を作製した。これらの遺伝子を発現用ベクターpET22bに連結後、大腸菌BL21(DE3)の形質転換体を得て、</p>	

IPTGにて遺伝子発現を誘導した結果、目的タンパク質の発現が認められた。培養液より集菌・破碎後、PpChi-IVとPpChi-Vbは10 mM酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.0) で透析することにより大部分の夾雑タンパク質が取り除かれた。しかし、PpChi-Iaは10 mM酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.0) の透析で沈殿してしまうことが判明した。10 mM酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) で透析後、それぞれカラムを用いて精製することができた。組換えPpChi-Ia, PpChi-IV, PpChi-VbのSDS-PAGEによる推定分子量はそれぞれ29.0 kDa, 34.0 kDa, 38.4 kDaであった。PpChi-Ib, PpChi-IIa, PpChi-IIcについては、*Rosetta-gami*による発現, GST融合タンパク質の発現, *Brevibacillus*による発現, タンパク質の巻き戻しなどを試みたが、いずれの方法でも活性のある組換えタンパク質を得ることはできなかった。

第5章は、キチナーゼの酵素化学的諸性質についてまとめた。pHの影響を調べた結果、得られた組換えPpChi-Ia, PpChi-IV, PpChi-Vbの最適pHは、それぞれpH 5.0, pH 5.0, pH 4.0付近で、pH安定性はそれぞれpH 3- pH 10, pH 5- pH 10, pH 3- pH 10付近で80%以上の活性を保持していた。また、熱の影響を調べた結果、得られた組換えPpChi-Ia, PpChi-IV, PpChi-Vbの最適温度はそれぞれ60°Cで、熱安定性はそれぞれ0°C -40°Cで80%以上の活性を保持していた。低分子基質の分解特性および高分子基質に対する分解活性を調べた結果、PpChi-Iaは高分子基質に対して高い活性を示し、PpChi-IVは低分子基質 (GlcNAc)₄に対する分解能が高いことが示された。PpChi-Vbについては、(GlcNAc)_nの分解特性より、糖転移活性の存在が示唆された。糖転移活性を持つ植物キチナーゼは、ソテツ由来キチナーゼに続く2例目の報告となった。抗真菌活性について調べた結果、PpChi-Iaは300 pmolで糸状性真菌である *Tricoderma viride* の菌糸の伸長を抑制する活性が認められたが、PpChi-IVおよびPpChi-Vbには認められなかった。

第6章は研究の総括であり、ヒメツリガネゴケ由来キチナーゼの遺伝子発現と酵素化学的特徴に基づいて、防御応答における植物キチナーゼのクラス毎の役割について考察した。病原性真菌であるカビが侵入すると、常時発現しているクラスIIキチナーゼが、病原性真菌の細胞壁に作用してキチンオリゴ糖を遊離する。遊離したキチンオリゴ糖は、PpCERKに認識される。認識後、シグナル伝達によって、抗真菌活性をもつPpChi-Iaの発現が誘導される。そして、PpChi-Vbの糖転移活性が、より生体防御応答を強く刺激できる高重合度のオリゴ糖 (4量体以上) の生産に寄与する。しかし、これらの防御応答によって病原性真菌の感染を防ぐことができても、キチンオリゴ糖がある限り防御応答は続いてしまう。そこで、病原応答の後期には、PpCERKに認識されない4量体以下の大きさにまで、PpChi-IVが積極的にキチンオリゴ糖を分解することで、これらの防御応答反応を抑制あるいは終息させるのであろうと推定した。

Summary of Doctoral Dissertation

Title of Doctoral Dissertation:

The functions of chitinases based on their gene expressions and enzymatic activities in *Physcomitrella patens*

Name: Saki Kobaru

This thesis comprises 6 Chapters. Chitinase catalyzes the hydrolysis of chitin, which is a β -1, 4-linked homopolymer of *N*-acetylglucosamine. Most plants have chitinases that may be involved in the interaction between plants and microbes which produce chitin and chitin-related compounds. In this thesis, the role of plant chitinases in defense system is discussed based on gene expression and enzymatic characteristics of the chitinases derived from a moss plant *Physcomitrella patens*.

Chapter 1 gives a general introduction of structure and function of plant chitinases.

Chapter 2 states the expression analysis of genes of chitinase and of chitin elicitor receptor kinase (CERK). The candidate genes of ten chitinases and two CERK were found on the genome of *P. patens* in NCBI database. Reverse transcription-real time quantitative PCR analysis revealed the significant expression of six genes of chitinase and two genes of CERK. Transcription level was upregulated or downregulated by chitin oligosaccharide treatment and their expression profiles correlated with the class of chitinase.

Chapter 3 describes cloning of the chitinase genes of *P. patens*. The PCR products were cloned and sequenced. Finally, the cDNA sequences of the six chitinases of *P. patens*, PpChi-Ia, PpChi-Ib, PpChi-IIa, PpChi-IIc, PpChi-IV and PpChi-Vb, were decided.

Chapter 4 states the construction of expression systems and of purification methods for the recombinant PpChis. The heterologous expression and isolation of recombinant PpChis were successful in three, PpChi-Ia, PpChi-IV and PpChi-Vb, out of six chitinases. The molecular mass of recombinant PpChis were calculated from the result of SDS-PAGE, PpChi-Ia, PpChi-IV and PpChi-Vb were 29 kDa, 34 kDa and 38 kDa, respectively.

Chapter 5 reports the biochemical properties of recombinant PpChis. The optimum pH and temperature were pH 4.0–pH 5.0 and 60°C, respectively. PpChi-Ia and Vb were stable between pH 3.0 and pH 10.0, and PpChi-IV was stable between pH 5.0 and pH 10.0. Temperature stability ranges of PpChis were up to 50°C. Class IV chitinase exhibited high activity against low molecular substrate, whereas Class I and class V chitinases showed high activity against the polymer substrate. Class V chitinase showed transglycosylation activity. The antifungal activity of PpChi-Ia, PpChi-IV and PpChi-Vb were determined using the hyphal extension inhibition assay on agar plates with *Trichoderma viride* as the test fungus. PpChi-Ia inhibited hyphal extension, but PpChi-IV and PpChi-Vb did not.

Chapter 6 summarizes the presented results and gives discussion on the function of chitinases in the plant defense system. Combining the findings with gene expression patterns, oligosaccharide degradation patterns and antifungal abilities of PpChis, the roles of each class of chitinase and a CERK in plant defense system were expected to be as follows; when fungal hyphae invade intercellular space of its host plant, chitin oligomers (longer than tetramer) are released from fungal cell walls by constitutively expressed class II chitinase. Then, the chitin oligomers are recognized as elicitors by CERK, and the signal from CERK causes expression of the defense-related genes including class I chitinase. The class I chitinase having antifungal ability directly prevents fungal invasion by degrading cell wall chitin. The class IV chitinase, expressed at late stages of fungal invasion, degrades the chitin elicitors resulting in repression of the defense response of the plant.