

論文審査の要旨

報告番号	理工研 第 450 号	氏名	小原 咲紀
審査委員	主査	内海 俊樹	
	副査	伊東 祐二	九町 健一
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 (The functions of chitinases based on their gene expressions and enzymatic activities in <i>Physcomitrella patens</i>)			
審査要旨			
<p>提出された学位論文及び論文目録等をもとに、学位論文審査を実施した。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てまとめたものであり、全文6章より構成されている。</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高等植物の生体防御における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遺伝子およびPpCERK(キチンエリク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。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。これらの転写量変動パターンとキチナーゼのクラスには、相関があることを見いだした。</p> <p>第3章は、6種類のキチナーゼのcDNAのクローニングについて述べた。塩基配列を解析し、活性部位を有するキチナーゼのcDNAであることを確認した。</p> <p>第4章は、キチナーゼの発現系と精製法の構築について検討した。6種類のキチナーゼのうち、PpChi-Ia、PpChi-IV、PpChi-Vbの3種については、組換えタンパク質を得ることができた。残り3種については、様々な生産系を試みたものの、組換えタンパク質を得るには至らなかった。</p> <p>第5章は、組換えキチナーゼの酵素化学的諸性質についてまとめた。得られた組換えPpChi-Ia、PpChi-IV、PpChi-Vbの最適pHは5.0付近であり、最適温度は60°Cであった。キチンオリゴ糖を基質とした活性を検討したところ、PpChi-Iaは、より重合度の高い基質に対して高い活性を示し、PpChi-IVは4量体に対する分解活性が高いことが示された。PpChi-Vbについては、(GlcNAc)_nの分解パターンより、糖転移活性の存在が示唆された。糖転移活性を持つ植物由来のキチナーゼは極めて珍しく、ソテツのキチナーゼに続く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には糸状性真菌である <i>Tricoderma viride</i> の生育抑制効果が認められたが、PpChi-IVおよびPpChi-Vbには検出されなかった。</p> <p>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。病原性真菌が存在すると、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、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。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。</p> <p>このように、本論文は、ヒメツリガネゴケのキチナーゼの遺伝子発現プロファイルと酵素化学的特徴に基づいて、防御応答におけるキチナーゼの機能について考察し、役割分担のモデルを提案した。その成果は、植物における防御応答の進化的理解にも大きく寄与することが期待できる。よって、審査委員会は博士(理学)の学位論文として合格と判定する。</p>			