

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 *Physcomitrella patens*

2016年9月

小原 咲紀

# 目 次

## 第 1 章 序論

## 第 2 章 ヒメツリガネゴケ由来キチナーゼ(PpChi)およびキチンエリシター受容体 (PpCERK)の発現解析

### 第 1 節 緒論

### 第 2 節 実験材料

#### 第 1 項 材料および試薬

#### 第 2 項 プライマー

### 第 3 節 実験方法

#### 第 1 項 PpChi 遺伝子および PpCERK 遺伝子の検索

#### 第 2 項 配列比較による構造予測

#### 第 3 項 推定分子量および推定等電点の算出

#### 第 4 項 ヒメツリガネゴケの培養と継代

##### 1) 孢子からの培養

##### 2) 継代培養

#### 第 5 項 ゲノム DNA の抽出

#### 第 6 項 検量線用 template の合成

#### 第 7 項 内在性コントロールの選択

#### 第 8 項 成長段階における転写量の変動

#### 第 9 項 キチンオリゴ糖処理

#### 第 10 項 Total RNA の調製

#### 第 11 項 ランダムヘキサマーによる cDNA の合成

#### 第 12 項 発現解析

### 第 4 節 実験結果

#### 第 1 項 PpChi および PpCERK の構造および推定分子量・等電点

#### 第 2 項 内在性コントロールの選択と成長段階における転写量の変動

- 第3項 キチンオリゴ糖処理に対する遺伝子転写量の変動
- 第5節 考察

### **第3章 ヒメツリガネゴケ由来キチナーゼ (PpChi) 遺伝子のクローニング**

- 第1節 緒論
- 第2節 実験材料
  - 第1項 材料および試薬
  - 第2項 プライマー
  - 第3項 コンピテントセルの調製
- 第3節 実験方法
  - 第1項 cDNA 合成
  - 第2項 PCRによる制限酵素サイト付き PpChi 遺伝子配列の増幅
    - 1) 1st PCR
    - 2) 2nd PCR
  - 第3項 アガロースゲル電気泳動
  - 第4項 TA クローニング
    - 1) アガロースゲルからの PCR 産物の抽出
    - 2) ライゲーション反応
  - 第5項 形質転換
  - 第6項 インサートチェック
  - 第7項 プラスミド抽出
  - 第8項 塩基配列の確認
  - 第9項 推定分子量および推定等電点の算出
- 第4節 実験結果
  - 第1項 PpChi の塩基配列および推定アミノ酸配列
  - 第2項 推定分子量・推定等電点
  - 第3項 データベースとの比較
  - 第4項 相同性比較
- 第5節 考察

## 第4章 ヒメツリガネゴケ由来キチナーゼ (PpChi) の発現系・精製法の構築

### 第1節 緒論

### 第2節 実験材料

- 第1項 材料および試薬
- 第2項 プライマー
- 第3項 コンピテントセルの調製
- 第4項 培地の調製
- 第5項 グリコールキチンの調製

### 第3節 実験方法

- 第1項 部位特異的変異導入
- 第2項 制限酵素処理
- 第3項 発現用ベクターへのサブクローニング
  - 1) アガロースゲルからの DNA 断片の抽出
  - 2) ライゲーション反応
- 第4項 形質転換
- 第5項 インサートチェック
- 第6項 *E. coli* BL21 (DE3) によるリコンビナント PpChi の発現
- 第7項 キチナーゼ活性測定
- 第8項 SDS-PAGE
- 第9項 タンパク質の定量
- 第10項 組換えタンパク質の精製
  - 1) PpChi-Ia
  - 2) PpChi-IV
  - 3) PpChi-Vb
- 第11項 *E. coli* Rosetta-gami によるリコンビナント PpChi の発現
- 第12項 GST 融合タンパク質の発現と精製
  - 1) GST 融合タンパク質の発現
  - 2) GST 融合タンパク質の精製
- 第13項 *Brevibacillus* によるリコンビナント PpChi の発現
  - 1) *Brevibacillus* の形質転換

2) *Brevibacillus* の形質転換組換え体を用いた目的タンパク質の発現

第 14 項 タンパク質の巻き戻し (透析法)

1) 透析法

2) 組換えタンパク質の精製

第 4 節 実験結果

第 1 項 *E. coli* BL21 (DE3) によるリコンビナント PpChi の発現

第 2 項 組換えタンパク質の精製

1) PpChi-Ia

a) SP Sepharose FF カラムを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー

b) HiTrap Q HP を用いた陰イオン交換カラムクロマトグラフィー

c) HiTrap SP HP カラムを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー

2) PpChi-IV

a) Phenyl Superose カラムを用いた疎水相互作用クロマトグラフィー

b) Mono-Q カラムを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー

3) PpChi-Vb

a) HiTrap Q HP カラムを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー

第 3 項 分子量測定

第 4 項 *E. coli* Rosetta-gami によるリコンビナント PpChi の発現

第 5 項 GST 融合タンパク質の発現と精製第 6 項

第 6 項 *Brevibacillus* によるリコンビナント PpChi の発現

第 7 項 タンパク質の巻き戻し (透析法)

1) 透析法

2) 組換えタンパク質の精製

第 5 節 考察

## 第 5 章 ヒメツリガネゴケ由来キチナーゼ (PpChi) の酵素化学的諸性質

第 1 節 緒論

第 2 節 実験材料

第 1 項 材料および試薬

第 3 節 実験方法

#### 第1項 pHの影響

- 1) 最適pH
- 2) pH安定性

#### 第2項 温度の影響

- 1) 最適温度
- 2) 熱安定性

#### 第3項 (GlcNAc)<sub>4-6</sub>に対する分解パターン

#### 第4項 高分子基質に対する動力的解析

#### 第5項 低分子基質に対する動力的解析

#### 第6項 抗真菌活性

### 第4節 実験結果

#### 第1項 pHの影響

- 1) 最適pH
- 2) pH安定性

#### 第2項 温度の影響

- 1) 最適温度
- 2) 熱安定性

#### 第3項 (GlcNAc)<sub>4-6</sub>に対する分解パターン

#### 第4項 高分子・低分子基質に対する動力的解析

#### 第5項 抗真菌活性

### 第5節 考察

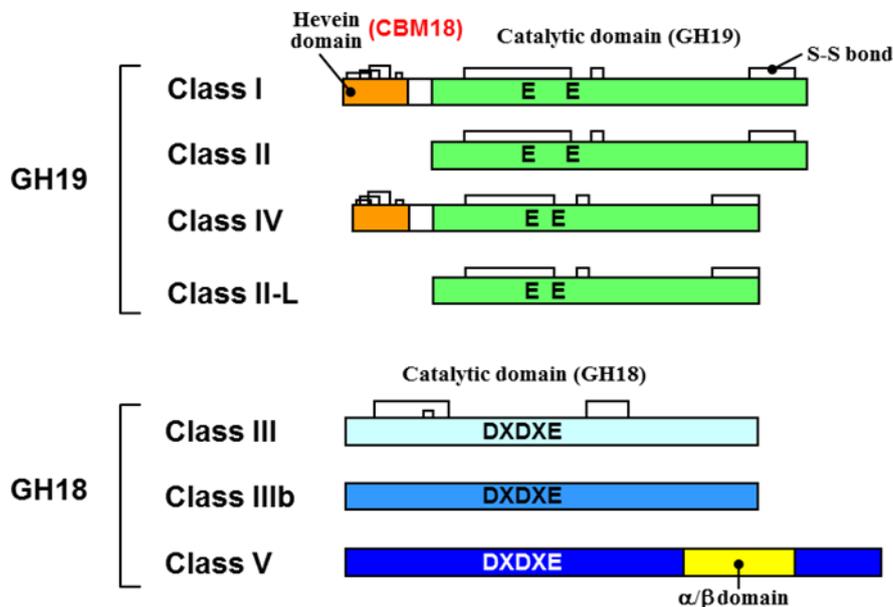
## 第6章 結論

## 引用文献

## 謝辞

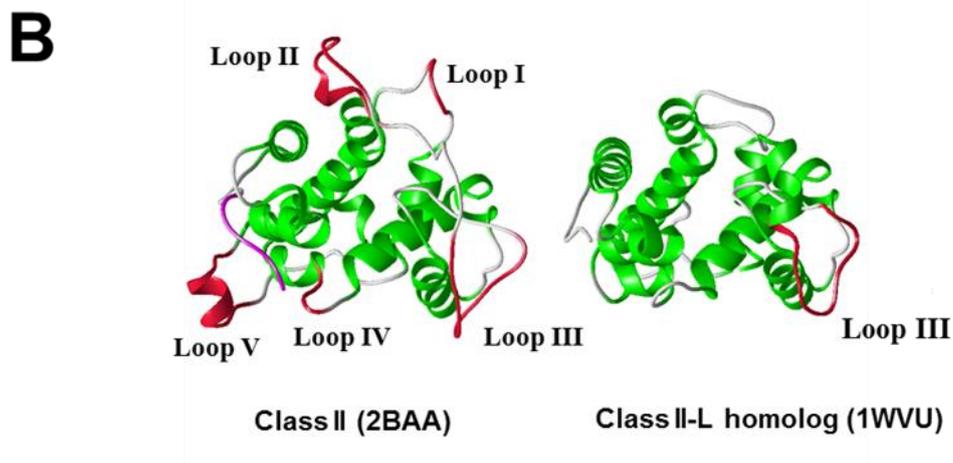
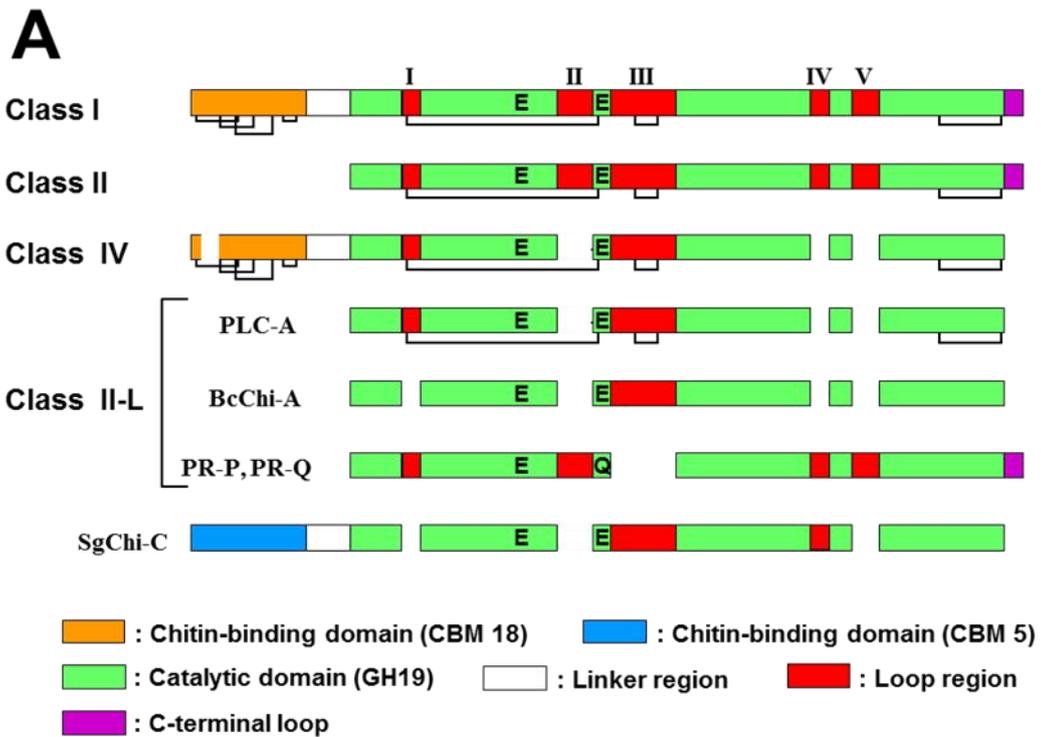
## 第1章 序論

キチナーゼ(EC 3.2.1.14)は、*N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc) が  $\beta$ -1,4 結合したポリマーであるキチンを加水分解する酵素である。キチナーゼは触媒ドメインの構造により糖質加水分解酵素ファミリー18 (GH18) および 19 (GH19) の 2 つに分類されている (<http://www.cazy.org/>)。ファミリー18 キチナーゼは広く生物界に存在しており、ファミリー19 キチナーゼは主に陸上植物および一部の細菌類で見られる。さらに、植物キチナーゼは、その一次構造の相同性から、大きく 5 つのクラスに分類されている (Fig. 1-1)。植物クラス I キチナーゼは、N 末端のヘベイン様キチン結合ドメイン (糖結合モジュール family 18, CBM18) と C 末端の触媒ドメイン (糖質加水分解酵素 family 19) がリンカーを介して連結された構造で、クラス II キチナーゼは、クラス I キチナーゼと相同性の高い触媒ドメインのみから成る。クラス IV キチナーゼは、クラス I キチナーゼ同様キチン結合ドメインを持つが、いくつかの欠損部位により分子量が小さい。



**Fig. 1-1. Classification of plant chitinases.**

Schematic representation of five classes (I-V) and two subclasses (II-L and IIIb) of plant chitinases. Open squares indicate linker regions. Solid lines indicate disulfide bonds. GH and CBM indicate glycoside hydrolase and carbohydrate binding module, respectively.



**Fig. 1-2. Variation of plant GH19 chitinases.**

**A**, Schematic representation of GH-19 chitinases. PLC-A, pokeweed leaf chitinase-A (Q7M1Q9); BcChi-A, *Bryum coronatum* chitinase-A (BAF99002); PR-P and PR-Q, pathogenesis-related protein P and Q from *Nicotiana tabacum* (CAA35790 and CAA35789); SgChi-C, Chitinase-C from *Streptomyces griseus* (BAA23739). I-V indicate loop regions in catalytic domain of class I and class II chitinases. Solid lines indicate disulfide bonds. **B**, Ribbon models of barley 26-kDa chitinase (left) and a catalytic domain of Chi-C from *S. griseus* (right). Green ribbons indicate  $\alpha$ -helices. Red color indicates the regions which are lost in some plant class II-L chitinases or bacterial GH-19 chitinases.

クラス II-L キチナーゼは、クラス II キチナーゼのサブクラスであり、キチン結合ドメインをもたず、GH19 の触媒ドメインのいくつかの欠損部位により分子量が小さい。欠損領域は触媒ドメイン内部の 5 つのループ構造と C 末端ループ構造に限られており、その組み合わせには多様性がある (Fig. 1-2)。クラス III, IIIb, V キチナーゼは、触媒残基周辺に DXDXE という共通モチーフを持つ触媒ドメイン (糖質加水分解酵素 family18: GH18) から成っているが、互いの 1 次構造の相同性は 15%以下と極めて低い (Fig. 1-1)。クラス III は植物で最初に見つかった GH18 キチナーゼであり、シンプルな  $(\beta/\alpha)_8$  バレル構造を持ち、植物では報告例が最も多い。IIIb キチナーゼは、クラス III と分子サイズは同程度 (約 30 kDa) だが相同性が低く、クラス III で保存されている 3 つのジスルフィド結合を形成するシステイン残基が無く、オリゴ糖の分解パターンが全く異なることから、クラス III のサブクラスとして提案された (Yamagami *et al.*, 1998)。クラス V キチナーゼは最初にタバコで発見され、クラス III との相同性が極めて低く、分子サイズが 10 kDa 程大きい (約 40 kDa) ことなどから、新たなクラスとして提案された。クラス V キチナーゼは哺乳類や真菌由来のキチナーゼと相同性があり、立体構造解析により、クラス III 等の  $(\beta/\alpha)_8$  バレル構造に  $\alpha/\beta$  ドメインという挿入配列があることが分かっている。それぞれのクラスにおいて等電点の異なる様々なアイソフォームが存在する。

高等植物はキチナーゼを有しているにもかかわらず、その基質であるキチンを生体内に持たないことから、植物キチナーゼは微生物由来のキチンに作用してキチン関連物質を生産することにより、植物 - 微生物間相互作用に関わっていると考えられている。植物キチナーゼは機能の一つとして、病原性真菌の主な細胞壁成分であるキチンを分解することによって、真菌の侵入および生育を抑制する生体防御タンパク質であることが報告されている (Selitrennikoff 2001; Theis and Stahl 2004)。病原性真菌の感染によりキチナーゼの活性や遺伝子発現が大幅に増加することや、キチナーゼの過剰発現により植物の病原性真菌に対する抵抗性が上がることも報告されている (Schlumbaum 1986; Collinge 1993; Graham and Sticklen 1994)。しかしながら、植物のキチナーゼには、抗真菌活性を全く示さないものや、(Taira *et al.* 2005a; Taira *et al.* 2005b)、非生物学的ストレスによって誘導されるもの、病原菌の感染によって誘導されないものもある (Graham and Sticklen, 1994)。植物と菌根菌との共生成立の過程では、植物キチナーゼが誘導されるという報告 (Salzer *et al.*,

2000) や、キチンオリゴ糖の誘導体である根粒形成シグナル因子 (Nod factor) を植物キチナーゼが分解できるとの報告もある (Ovtsyna et al., 2000)。一方で、アラビノガラクトタンパク質等が植物キチナーゼの内在性の基質である可能性が議論され、その分解を通じて発生・分化に関わるとの見方もある (van Hengel et al., 2001)。内在性の基質の有無に関わらず、植物キチナーゼの生理的役割は多様であるといえる (Kasprzewska, 2003)。

細胞外ドメインとしてキチン結合モチーフである LysM ドメインを持つ、キチンエリシター受容体キナーゼ (CERK) がシロイヌナズナより見つかった (Miya et al 2007)。Nod factor の認識に関わる受容体の細胞外ドメインもまた、LysM ドメインである (Limpens et al. 2003; Radutoiu et al. 2003)。それゆえ、植物キチナーゼとキチン結合タンパク質は、植物と微生物との相互作用に参与する重要な分子として注目されている。

キチナーゼの生理的役割を解明するために、その発現時期や局在性、様々なストレスやホルモンに対する応答性などについて調べられており、様々な議論がなされているが、その生理機能の解明までには至っていない。その問題点として、高等植物はキチナーゼの種類が多だけでなく、類似した遺伝子の数も多く、解析が困難であることをあげることができる。

植物キチナーゼの生理的役割は、植物の進化とともに変化または多様化してきたと考えられる。植物キチナーゼが微生物との相互作用に関わるとすれば、共進化によってその役割が変化し、また、植物キチナーゼが発生・分化に関わるとすれば、その役割は植物の進化と大きく関係すると思われる。したがって、進化段階の異なる植物において、どのような構造と機能を持ったキチナーゼが存在するかを調べることにより、その生理的役割についての知見が得られると期待できる。

進化的に古い植物の方が、キチナーゼの数や種類が少ないと予測されることから、陸上植物の中で最も原始的な植物とされるコケ植物のなかでも、ゲノムプロジェクトが終了しているヒメツリガネゴケ (*Physcomitrella patens*) を材料とし、そのキチナーゼ (PpChi) について研究が進められている。本研究では、PpChi およびキチンエリシター受容体キナーゼ (PpCERK) の遺伝子について、転写量の変動を解析した。続いて、有意に発現している 6 種のキチナーゼ候補遺伝子の cDNA をクローニングし、さらに発現系を構築した。得られた組換えタンパク質の酵素化学的諸性質を調

べ，遺伝子発現のプロファイルと総合して植物におけるキチナーゼの機能について議論した。

## 第2章 ヒメツリガネゴケ由来キチナーゼ(PpChi)およびキチンエリシター受容体(PpCERK)の発現解析

### 第1節 緒論

高等植物はキチンを持たないにも関わらず、キチンを分解する酵素キチナーゼを持っている。植物は病原菌に感染すると、単子葉植物、双子葉植物の別なく患部組織にキチナーゼが誘導される (Koga 1992)。病原菌はオートクレーブ処理した後でも、接触するだけでキチナーゼを誘導することができる (古賀 1994)。キチナーゼの発現量を増大させたトランスジェニック植物は、病原性真菌に対する抵抗力が増大することからも、その生理的役割のひとつは病原性真菌の細胞壁成分であるキチン質を分解することによって感染を防ぐ生体防御作用であると考えられている (平良 2016)。また、植物と菌根菌との共生成立の過程で、植物キチナーゼが誘導されるという報告 (Salzer et al., 2000) や、キチンオリゴ糖の誘導體である根粒形成シグナル因子 (Nod factor) を植物キチナーゼが分解できるとの報告もあり (Ovtsyna et al., 2000)、キチナーゼは植物 - 微生物間の相互作用に関与していると思われる。

植物キチナーゼの機能を解析する上で、高等植物にはキチナーゼの種類と類似した遺伝子の数が多く、解析が困難になっている。そこで、進化的に古い植物の方がキチナーゼの数や種類が少ないと予測されることから、陸上植物の中で最も原始的な植物であると考えられるコケ植物を用いて解析することとした。コケ植物蘚類ヒメツリガネゴケ (*Physcomitrella patens* subsp. *patens*) はゲノムサイズが 500Mbp と小さく、形質転換、遺伝子ターゲティング、栄養繁殖が可能である。また、世代交代が 3 ヶ月と早く、培養も比較的容易であることから、近年、進化の観点からよく研究されているコケ植物のモデル植物である。ゲノム解読は 2006 年に完了し、2008 年に公開されている (Rensing et al. 2008)。

植物のキチン受容体として、細胞外にキチン結合モチーフである LysM ドメインを持ち、細胞内にタンパク質キナーゼドメインを持つキチンエリシター受容体キナーゼ (CERK) がシロイヌナズナより発見された (Miya et al. 2007)。CERK は病原微生物より遊離したキチン関連物質を認識し、キチナーゼを含む PR タンパク質 (pathogenesis-related proteins) の発現を誘導する。

本章では、コケ植物の生体防御システムにおけるキチナーゼの役割について調べるために、ヒメツリガネゴケ由来キチナーゼ (PpChi) とキチンエリシター受容体キチナーゼ(PpCERK)のキチンエリシター処理条件下での発現を解析した。

## 第2節 実験材料

### 第1項 材料および試薬

ヒメツリガネゴケの孢子体は、大学共同利用機関法人 自然科学研究機構 基礎生物学研究所の長谷部研究室より分譲していただいた。人工気象器は、株式会社トミー精工の植物インキュベータ CLE-303 を使用した。RNeasy Plant Mini kit は QIAGEN 社より、SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR は Invitrogen 社より購入した。プライマーの合成は、Life Technologies 社に依頼した。Power SYBR® Green Master Mix (2x) は Applied Biosystems 社より購入し、リアルタイム PCR システムは Applied Biosystems 社の 7300 Real Time PCR System を用いた。その他の試薬は、全て市販の特級またはそれに準ずるものを用いた。

### 第2項 プライマー

検量線用 template の合成に用いたプライマーを Table 2-1 に、リアルタイム PCR に用いたプライマーを Table 2-2 に示した。

**Table 2-1. Sequences of oligo DNA primers for real time PCR.**

Gene	Accession No.	Primer	Sequence (5' → 3')
PpChi-Ia	EDQ53501	Chi-Ia temp-F	ATGGAGACACTGTTATCCCTCA
		Chi-Ia temp-R	GCTTCTGCAACCATGTAACTG
PpChi-Ib	EDQ64021	Chi-Ib temp-F	GGAAGTTGAGTGTTGGCATTG
		Chi-Ib temp-R	GAACAGCTTGCGCGTGATGA
PpChi-Ic	EDQ80360	Chi-Ic temp-F	GAGCATTGTGGCACCGGAT
		Chi-Ic temp-R	GTGATTGACGTGCGCAAAGAATG
PpChi-IIa	EDQ53624	Chi-IIa temp-F	TGACACCCTCGCTTATCGCAA
		Chi-IIa temp-R	ATGCATAGGCCAGTGGAAATAAC
PpChi-IIb	EDQ53657	Chi-IIb temp-F	ATGTTAGGAGTGGAAGGGCTC
		Chi-IIb temp-R	ATGGGGAATCTTTCGCTCCAG
PpChi-IIc	EDQ64064	Chi-IIc temp-F	TGGATGGAGCATGGCCAAAGAT
		Chi-IIc temp-R	CGGGTTTACGATTTGCAAGTGTA
PpChi-IV	EDQ60220	Chi-IV temp-F	AGCTCCAGCGCGTGGTA
		Chi-IV temp-R	GTGTACCACCAGCGTTGCA
PpChi-III	EDQ72654	Chi-III temp-F	GAACCCTATTACTTTGGACGAG
		Chi-III temp-R	TACGCGACCCGCGACAACAT
PpChi-Va	EDQ51077	Chi-Va temp-F	ATGACGGTACTTCTAGTCCAC
		Chi-Va temp-R	TCGAGCTAGCTTTGTGAACGT
PpChi-Vb	EDQ63241	Chi-Vb temp-F	TCGTCAGGCAATACCGAGCT
		Chi-Vb temp-R	CACATCTTGTCTGCTTGCATG
PpCERK-a	EDQ51621	CERK-a temp-F	GAGTACCTGGAGCACGGTCT
		CERK-a temp-R	AGGCTGGCGATGCTGGAAG
PpCERK-b	EDQ67338	CERK-b temp-F	GGGAGAGTTCACCATGCTGT
		CERK-b temp-R	GAGCTTCGATGGGGTGGTT
β-Actin	XM 001783849	PpAct temp-F	GTACGATGAATCTGGTCCATC
		PpAct temp-R	ACCGATCTAGAGCTACAAACAG
α-Tubulin	AB096718	PpTub temp-F	TCGAAGCTGGGATTCACATATC
		PpTub temp-R	GTCTGGAACCTCCGTGATATCT
18S rRNA	X80986	Pp18S temp-F	TGACGGAGAATTAGGGTTCG
		Pp18S temp-R	CAATGGATCCTCGTTAAGGG

**Table 2-2. Sequences of oligo DNA primers for standard curve.**

Gene	Accession No.	Primer	Sequence (5' → 3')
PpChi-Ia	EDQ53501	Chi-Ia rt-F	TACAGCGCCCAGGCAGAT
		Chi-Ia rt-R	CACATTCAGACGATTGCAAAAATC
PpChi-Ib	EDQ64021	Chi-Ib rt-F	TGCGCTGATCCAAACAAC
		Chi-Ib rt-R	CATCGTCGGTTCGCAATA
PpChi-Ic	EDQ80360	Chi-Ic rt-F	CCTTAGCAGCTTCTTTCCGAGTT
		Chi-Ic rt-R	GCTATGAAAGCCTCGTACGTA
PpChi-IIa	EDQ53624	Chi-IIa rt-F	CTCAGGGACACCTTCCAGTTG
		Chi-IIa rt-R	CACCTTGCAGACCGCAATCT
PpChi-IIb	EDQ53657	Chi-IIb rt-F	TGGAAGGGCTCGTGTGCAGTA
		Chi-IIb rt-R	TCCGTGAACAAATCGCTTATGGT
PpChi-IIc	EDQ64064	Chi-IIc rt-F	TGGACGTGGAGCCTTTCCT
		Chi-IIc rt-R	TCAGAGCCTTCCCAGTTGGA
PpChi-IV	EDQ60220	Chi-IV rt-F	GCCGCGTTTGTGGTTGTAG
		Chi-IV rt-R	CCCCTTGAGACGCAACAAAT
PpChi-III	EDQ72654	Chi-III rt-F	CTCAAGGTAGCCATCGGTTCA
		Chi-III rt-R	CCACCGTTAATGGCTCTGGTA
PpChi-Va	EDQ51077	Chi-Va rt-F	GCCCTGAGCCTGTTACTAGCA
		Chi-Va rt-R	GCCAGTAGCCTGATTTACAATC
PpChi-Vb	EDQ63241	Chi-Vb rt-F	GGGTGAACGTGATGACCTATGA
		Chi-Vb rt-R	TAATGCTGTGTGTTCCGACAGTAG
PpCERK-a	EDQ51621	CERK-a rt-F	CTCCGGCAAGGAAGCAGTT
		CERK-a rt-R	CACACCCTGCTCCTCCTCAT
PpCERK-b	EDQ67338	CERK-b rt-F	GCGTTGTCGAAGATGTCCAGT
		CERK-b rt-R	GGTGGTTCGAGTATCCGGTAGA
$\beta$ -Actin	XM 001783849	PpACT rt-F	TCGTTGCAAGTATCAGTGATTGC
		PpACT rt-R	CATCTGCGAAATAAACCTCTGTTG
$\alpha$ -Tubulin	AB096718	PpTUB rt-F	TGGACAATGAGGCAATTTACGA
		PpTUB rt-R	TACGTCGGCCGCTCGAT
18S rRNA	X80986	Pp18S rt-F	ACGGCTACCACATCCAAG
		Pp18S rt-R	CGTGTGCGGATTGGGTAA

### 第3節 実験方法

#### 第1項 PpChi 遺伝子および PpCERK 遺伝子の検索

米国立生物工学情報センター (National Center for Biotechnology Information, NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) の遺伝子配列データベースを用いて, PpChi 遺伝子および PpCERK 遺伝子を検索した。

#### 第2項 配列比較による構造予測

配列相同性検索サービス BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) を用いて, PpChi 遺伝子および PpCERK 遺伝子の構造を予測した。

#### 第3項 推定分子量および推定等電点の算出

SIB (Swiss Institute of Bioinformatics) のウェブサイト ExPASy (Expert Protein Analysis System) より, ExPASy CA > Tools > Primary structure analysis > Compute pI/Mw ([http://ca.expasy.org/tools/pi\\_tool.html](http://ca.expasy.org/tools/pi_tool.html))を用いて推定分子量および推定等電点を算出した。

#### 第4項 ヒメツリガネゴケの継代と培養

##### 1) 孢子からの培養

ヒメツリガネゴケゴケの孢子からの培養は, 基礎生物学研究所が公開している方法 (<http://www.nibb.ac.jp/evodevo/0.Top.html>) を基に, 次のように行った。

##### 1-1) 孢子体の回収

孢子体は, 25 °C で葉が 10 枚程度出た茎葉体を 15 °C で, 1 日 1 回茎葉体の先端を水で湿らせ, 4 週間程度培養することにより茎葉体の先端に形成させた。孢子体が弾ける前にピンセットとメスを用いて 3, 4 個ずつマイクロチューブに回収し, 1 日乾燥させた後, 4 °C で保存した。

### 1-2) セロハン膜の洗浄方法

セロハン膜は市販の包装用のものを用いたが、表面が撥水性のものは使用不可である。シャーレ（直径 9 cm）より少し小さく切ったセロハン膜（COLOR CELLOPHANE, オキナ株式会社）12 枚を 500 ml ビーカーに入れて、5 mM EDTA（pH 8.0）溶液中でオートクレーブ（120 °C, 20 min）した。オートクレーブ後、蒸留水により 5~6 回洗浄し、蒸留水を加えて再びオートクレーブした。

### 1-3) 孢子体の滅菌処理と孢子蒔き

以下の操作はクリーンベンチ中で行った。

オートクレーブした Table 2-3.の組成の培地をシャーレ 3 枚に分注し、培地が固化したら 1-2)で準備したセロハン膜を敷いた。次に、孢子体が入ったマイクロチューブに、10%の次亜塩素酸ナトリウム水溶液を加えて 2-3 分ほどピペティングして滅菌した後、次亜塩素酸ナトリウム水溶液を取り除くために滅菌水で 5 回ほどすすいだ。その後、1 ml の滅菌水を加え、チップの先で孢子体を潰して孢子を滅菌水中に出し、その孢子液 200  $\mu$ l をセロハン膜を敷いたシャーレにまいた。最後に、孢子をシャーレ全体にいきわたらせるために 1 ml の滅菌水を加えて、30~50  $\mu$ mole photon/m<sup>2</sup>/s の照度で 16 h : 明, 8 h : 暗の周期で培養した。

**Table 2-3. Spore germination medium**

Reagents	Conc.
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1 $\mu$ M
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	18.4 $\mu$ M
KNO <sub>3</sub>	10 $\mu$ M
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	45 $\mu$ M
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.22 $\mu$ M
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	10 $\mu$ M
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.23 $\mu$ M
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.1 $\mu$ M
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.19 $\mu$ M
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	2 $\mu$ M
KI	0.17 $\mu$ M
Ammonium Tartrate	5 mM
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	10 mM
Agar	0.80%

## 2) 継代培養

継代培養には、前述した培地の  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  濃度を 1 mM とし、オートクレーブ後に D-glucose を 0.5% 添加したものを使用した。以下の操作はクリーンベンチ内で行った。

オートクレーブした培地をシャーレ 5 枚に分注し、固化したら 1-2) で準備したセロハン膜を敷いた。次に、1 ml の滅菌水を入れたポリビンにシャーレ 1 枚分のヒメツリガネゴケの原糸体を加え、ピペットのチップの先ですり潰した。さらに 9 ml の滅菌水を加え、シャーレ 1 枚あたり 2 ml の破碎液を分注し、30~50  $\mu\text{mole photon/m}^2/\text{s}$  の照度で 16 h : 明, 8 h : 暗の周期で培養した。

## 第 5 項 ゲノム DNA の抽出

植物 DNA 抽出キット (innuPREP Plant DNA Kit, Analytik Jena) を用いてゲノム DNA を抽出した。

## 第 6 項 検量線用 template の合成

DNA 濃度 (または遺伝子のコピー数) があらかじめわかっているスタンダードサンプルを使って検量線を作成し、未知濃度のサンプルを定量する絶対定量法によるリアルタイム PCR を行うため、PCR によって合成された DNA 断片を検量線用の template とした。

ヒメツリガネゴケより抽出したゲノム DNA を鋳型として、第 2 節第 2 項の Table2-1 に示したプライマーを用いて PCR を行った。PCR 産物をアガロースゲル電気泳動し、QIAGEN 社の MinElute Gel Extraction Kit を使用してゲルから増幅された DNA 断片を抽出して DNA の濃度を測定し、得られた濃度から遺伝子のコピー数を算出した。

## 第 7 項 内在性コントロールの選択

絶対定量法に最適な内在性コントロール用の遺伝子を選択するために、 $\beta$ -actin (Accession: XM\_001783849),  $\alpha$ -Tubulin (Accession: AB096718), 18S rRNA (Accession: X80986) 遺伝子の発現量変動を測定した。

#### 第 8 項 成長段階における転写量の変動

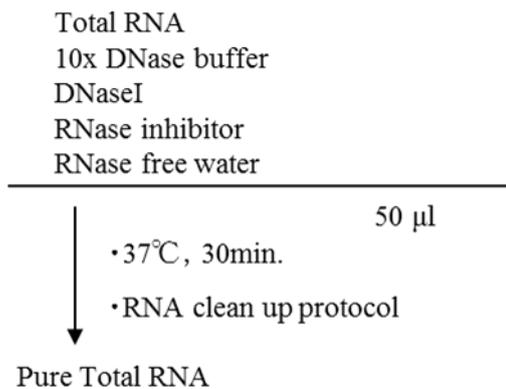
キチナーゼ遺伝子の発現の解析に最適な成長段階を調べるために、継代後 8, 10, 12, 15, 20, 25, 30 日目の PpChi 遺伝子転写量の変動を解析した。

#### 第 9 項 キチンオリゴ糖処理

ヒメツリガネゴケは、継代後 20 日目のものを使用した。キチンオリゴ糖処理には、キトヘキサオース (GlcNAc)<sub>6</sub> を使用した。第 4 項で述べた継代培地 (液体) に (GlcNAc)<sub>6</sub> を加えて氷上で溶解させ、2mM 溶液とした。ヒメツリガネゴケのシャーレ 1 枚 (20ml) あたり 1ml の (GlcNAc)<sub>6</sub> 溶液を添加し、終濃度 100 $\mu$ M とした。また、(GlcNAc)<sub>6</sub> 溶液の代わりに継代培地 (液体) 1ml を添加したものをコントロールとした。

#### 第 10 項 Total RNA の調製

RNeasy Plant Mini kit に添付されているプロトコールに従い、キチンオリゴ糖未処理、処理後 1 時間、3 時間、6 時間のヒメツリガネゴケより Total RNA を抽出した。次に、DNase 処理によるゲノム DNA 分解後、RNeasy Plant Mini kit の RNA Clean up プロトコールに従って DNase を不活性化した (Scheme 2-1)。



#### **Scheme 2-1. DNase treatment.**

#### 第 11 項 ランダムヘキサマーによる cDNA の合成

cDNA は、SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR に添付さ

れているプロトコールにしたがって合成した。1サンプルあたり 300ngの Total RNAを使用し、25 $\mu$ Lのスケールで合成した。cDNA 合成用のプライマーには、ランダムヘキサマーを用いた。

## 第 12 項 発現解析

リアルタイム PCR には、Applied Biosystems の 7300 Real Time PCR System を使用した。検量線の作製には第 6 項で得られた template を、発現解析には前項で得られた cDNA を鋳型として使用した。反応液の組成と反応条件は、Scheme 2-2 に示した。

<b>Power SYBR Green Master Mix (2 x)</b>	<b>12.5 <math>\mu</math>L</b>
<b>Forward primer (10 pmol/mL)</b>	<b>1 <math>\mu</math>L</b>
<b>Reverse primer (10 pmol/mL)</b>	<b>1 <math>\mu</math>L</b>
<b>Sample DNA (cDNA)</b>	<b>5 <math>\mu</math>L</b>
<b>Distilled water</b>	<b>5.5 <math>\mu</math>L</b>
↓	<b>25 <math>\mu</math>L</b>
<div style="border: 1px dashed black; padding: 10px; width: fit-content;"> <p style="margin: 0;">95°C 10 min</p> <p style="margin: 0;">95°C 15 sec 60°C 1 min } × 40</p> <p style="margin: 0;">95°C 15 sec 60°C 1 min 95°C 15 sec</p> </div>	

**Scheme 2-2. Real time PCR**

## 第 4 節 実験結果

### 第 1 項 PpChi および PpCERK の構造および推定分子量・等電点

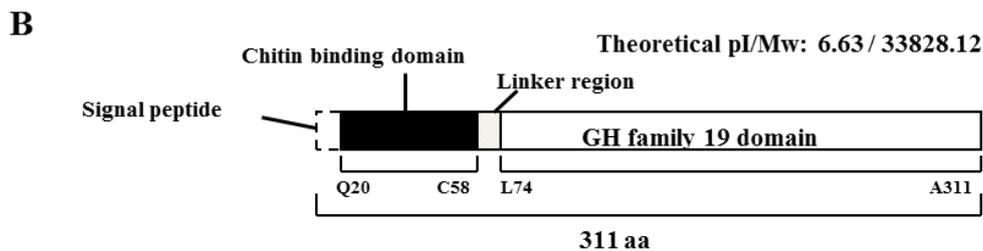
NCBIによる遺伝子検索, BLASTサーチ, 酵素活性サイトの有無より, 10種類の PpChi 候補遺伝子および 2 種類の PpCERK 候補遺伝子を得た。各遺伝子の構造予測, 推定分子量・推定等電点の算出の結果を Fig. 2-1 から 2-12 に示す。また, これらの結果をまとめたものを Table 2-4 に示し, 以後は Table 2-4 の Name に示した名称を用いる。

**A**

```

      10      20      30      40      50      60
1  atgtttgcctagtggaacttgactaagcaatggtggtgctctgattcgggagggcag  20
   M F A L V A L V L S N G G A L I A E A Q
      70      80      90      100     110     120
21  ggggaatgcagccgaaactcgccatgtccaaattggcgcactgttcagcaactggggg  40
   G E C S R N S P C P N L A H C C S N W G
      130     140     150     160     170     180
41  tactcggggttggcaacgactattgtggggagggtgccaggcgggcccgtttatggc  60
   Y C G V G N D Y C G E G C Q G G P C Y G
      190     200     210     220     230     240
61  cctactcctccaggcccttcacctcctctggctccggcctggacgccatcctaactaga  80
   P T P P G P S P P S G S G L D A I L T R
      250     260     270     280     290     300
81  agcgtttgcagaatttctcccgccatctctcttactcttacgacgtgctcatt  100
   S V F E N F F P G H L S F Y S Y D V L I
      310     320     330     340     350     360
101  gaggctgcgaaatcattccctcagttggcagcagggcgacaccgacactcgtaaagaga  120
   E A A K S F P Q F G T T G D T D T R K R
      370     380     390     400     410     420
121  gagatcgctgcttacggggcagtgcaagcacgaaactggaggtctgtctgttcgctt  140
   E I A A Y A A H V K H E T G G L S V R L
      430     440     450     460     470     480
141  gtctcctccaagtcttaacttaagattcaaattgcaaaccggagacaattatgtgcaagc  160
   V S S K F H L R F K L Q T G D N Y C A S
      490     500     510     520     530     540
161  tggcggccagatattccttgcaacggccaatacaatggtcgggtcctctccaactttcc  180
   W R P D I P C N G Q Y N G R G P L Q L S
      550     560     570     580     590     600
181  tggaaactacaattacctcagcaggtcgtacttgggtgtgatctcatcaaaaacc  200
   W N Y N Y L A A G S Y L G V D L I N K P
      610     620     630     640     650     660
201  aatctggtggcaacaataacctcatcgctttcaaacgagcctgtggttttgatgatt  220
   N L V A T N N L I A F K T S L W F W M I
      670     680     690     700     710     720
221  tatggagacactgttatccctcacattcatgatgcgatcggaattggagaccctcc  240
   Y G D T V I P H I H D V M I G N W R P S
      730     740     750     760     770     780
241  agcggcgaccaagctcgaaccggtaccggtttcggcgtaccatagacgttattaac  260
   S A D Q A A N R V P G F G V T I D V I N
      790     800     810     820     830     840
261  ggaggcttggagtgaacaataacagcggccagcagatgccgagtgaaattattacaaa  280
   G G L E C N K Y S A Q A D A R V N Y Y K
      850     860     870     880     890     900
281  gatthttgcaatcgtctgaatgtgaatcctggtggaatctggactgcaaaaatagg  300
   D F C N R L N V N P G G N L D C K N M R
      910     920     930
301  ccattttactcagttaacatggttcagaagcttaa  312
   P F Y S V N M V A E A *

```



**Fig. 2-1. A: Nucleotide and amino acid sequence of EDQ53501.**

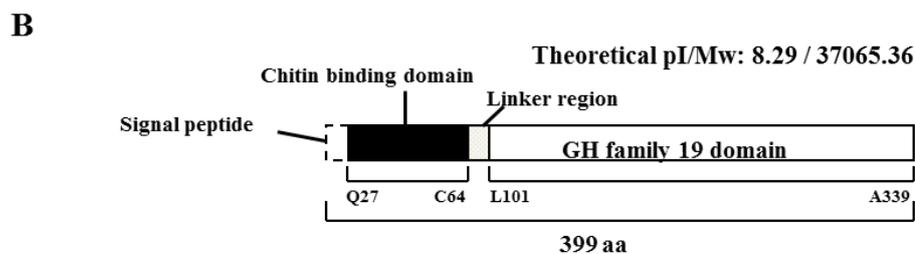
**B: Schematic representation.**

**A**

```

          10      20      30      40      50      60
1  atggagcggaaagttagtggttggcattctggcattgctgctgggtccggtttctgtgctg
   M E R K L S V G I L A L L L V P F L C Y      20
          70      80      90      100     110     120
21 ttgatttagtagctggcagaattgcaacagcacgggtccogtgcgctgatccaaacaac
   L D L V A G Q N C N S T V P C A D P N N      40
          130     140     150     160     170     180
41 tgcgttagccagatattgcggaaccgacgatgcgtactgcgtgatcgggtgccag
   C C S Q Y G Y C G T D D A Y C V I G C Q      60
          190     200     210     220     230     240
61 aacggtcctcggcggacagccctctccgccacctccgccgcaccaccatcggcct
   N G P C R D S P S P P P P P A P P S P P      80
          250     260     270     280     290     300
81 tccccaccaccaccagaccatccgtctcggccacacctcgtcggggctggctgc
   S P P P P P R P S V S P T P S S G A G R      100
          310     320     330     340     350     360
101 ctcatcacgccaagtgttcgagaagctctaccggaactacaacaagacgttttactcc
   L I T R K L F E K L Y P N Y N K T F Y S      120
          370     380     390     400     410     420
121 tacgatgccttcattgctgcaaatgccttccccaaattctgaacgaggggtgctgc
   Y D A F I V A A N A F P K F L N E G C R      140
          430     440     450     460     470     480
141 gaatctcgtttacgtgagctcgtcgttggagtgcacacgtgcagcaagaaccgcagg
   E S R L R E L A A W S A H V Q Q E T A G      160
          490     500     510     520     530     540
161 gagctcgaatcctgcagttcgttccgctgtcctcagatatccattgccttcgacaaaac
   E L E I L Q F V P L S S D I H C L R Q N      180
          550     560     570     580     590     600
181 cctcacagaatgcagtgcttctactgtgacgctacctcgacgaggtacccttctgag
   P H K I A V L V Y C D A T S T R Y P C E      200
          610     620     630     640     650     660
201 ccataccagaagtacttcggctcgtgggcctcttcaactctcctggaatttcaactatggg
   P Y Q K Y F G R G P L Q L S W N F N Y G      220
          670     680     690     700     710     720
221 cctgccgggtgaagctcttggcattgacatcctgaagcaccattcctggttctttcgac
   P A G E A L G I D I L K R P F L V S F D      240
          730     740     750     760     770     780
241 ccogtgttggcctttaaggcctccatattggttttgaacacagcccgcgagggcggcatt
   P V L A F K A S I W F W N T A R E G G I      260
          790     800     810     820     830     840
261 ccttcatacacgacgtgatcatcgggaataacagccatcagcagcagacaaggcagcg
   P S I H D V I I G K Y R P S A A D K A A      280
          850     860     870     880     890     900
281 aaccgcactgctgcgttcggatacaccattaacatcatcaacgggggcatcgagtgtggg
   N R T V G F G Y T I N I I N G G I E C G      300
          910     920     930     940     950     960
301 aaaggactgctaccccacaagcagcgaaccgctcaagtaacttctagagtttagcgaa
   K G T A T P Q A A N R V K Y F L E F S E      320
          970     980     990     1000    1010    1020
321 aagttggaagtgtcaccggggaaaacctcgactgcacaaacaaaatctttcgttag
   K L E V S P G K N L D C T N Q K S F A *      340

```



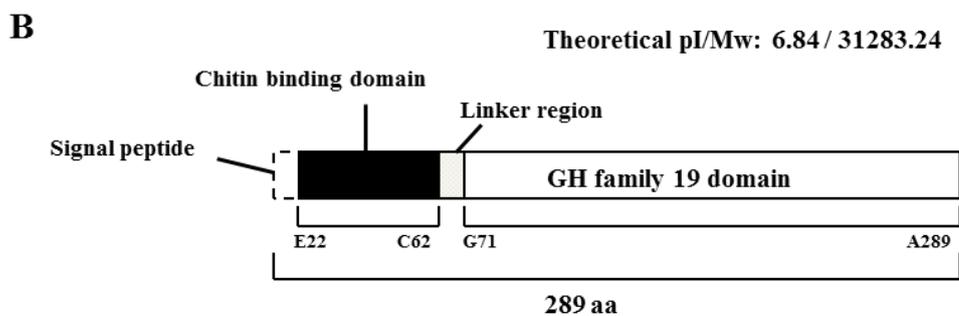
**Fig. 2-2. A: Nucleotide and amino acid sequence of EDQ64021.  
B: Schematic representation.**

**A**

```

          10      20      30      40      50      60
1  atgacctgctgcagggttgctctattgctgctcgtggtttgcttctccggacttgccaaa  20
   M T S C R V A L L L V V C F S G L A K
          70      80      90     100     110     120
21 gctgaggactgtgggtggcaggctaatggtgctagatgctcgcgagcactgtctgttgc  40
   A E D C G W Q A N G A R C S P S T V C C
          130     140     150     160     170     180
41 agtcagtgggctattgtggagtaaccttgagcattgtggcaccggatgccagagcggc  60
   S Q W G Y C G V T P E H C G T G C Q S G
          190     200     210     220     230     240
61 tctgcactggcggtagccctccttcgccaggaggagcggccttagcagcttctttccg  80
   S C T G G S P P S P G G S G L S S F F P
          250     260     270     280     290     300
81 agttccctgtttgataagtgttccccaactgcaattcattctatcgtacgaggctttc  100
   S S L F D K W F P N C N S F Y T Y E A F
          310     320     330     340     350     360
101 atagcggcggctgctttgtaccccggtttggatcttccagaaatccagaaatacaaaag  120
   I A A A A L Y P A F G S S R N P E I Q K
          370     380     390     400     410     420
121 cgagaagtgtcagcattctttgcgcacgtcaatcaacagaacagaaggctctagctcatt  140
   R E V A A F F A H V N H E T E G L V Y I
          430     440     450     460     470     480
141 gaggagatcaacaaatcttttcatactgtcgagagagagacagctatggatgctgctccg  160
   E E I N K S F S Y C R E R D S Y G C A P
          490     500     510     520     530     540
161 gggaaagaagtactacagtagaggctcctctgcaactgtcatggaattacaactacaagctg  180
   G K K Y Y S R G P L Q L S W N Y N Y K L
          550     560     570     580     590     600
181 gcgtcctccaaagtgggattcaacatctgggcagaccagacaagattgctaccgacgtg  200
   A S S K V G F N I W A D P D K I A T D V
          610     620     630     640     650     660
201 actctggcattcaagacggctttgtggttctggatggaacccgccactcccaaacatca  220
   T L A F K T A L W F W M E P A T P K P S
          670     680     690     700     710     720
221 tgtcactccgtcattgtgggtgatcagggttcggaacgaccaccaacatcatcaacgga  240
   C H S V I V G D Q G F G T T T N I I N G
          730     740     750     760     770     780
241 ggcttagagtgtgacccaataattcaccagcacaggcagagaaccgcagcaagtaactac  260
   G L E C G P N N S P A Q A E N R S K Y Y
          790     800     810     820     830     840
261 caggacttctgccccagttaaacgtgtctcctggtggtgcccttacctgcagcaacatg  280
   Q D F C R Q L N V S P G G A L T C S N M
          850     860     870
281 acgccctacggtttactcgtaggcctatag  290
   T P Y G L L V G L *

```



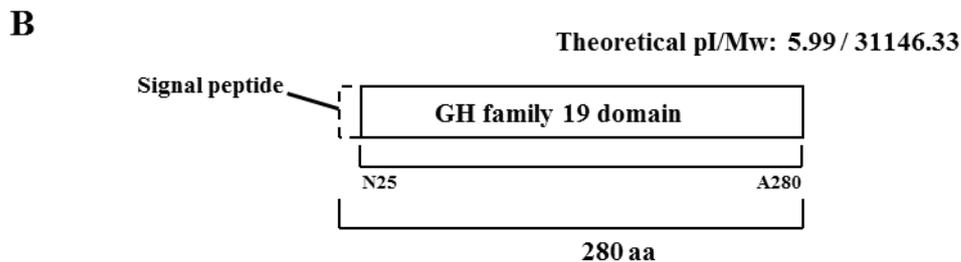
**Fig. 2-3. A: Nucleotide and amino acid sequence of EDQ80360.  
B: Schematic representation.**

**A**

```

          10      20      30      40      50      60
1  atggttctcggagcgtgctcgcaggtgagcaacgctctggtgtgcaccaaggagttcaag  20
   M V L G A C S Q V S N A L V C T K E F K
          70      80      90      100     110     120
21 gagaaaggctgcaacaagactgtgagcgagttgttcaacgcggagatgttcgaggccatg  40
   E K G C N K T V S E L F N A E M F E A M
          130     140     150     160     170     180
41 tttaaagcaccgcaacgacaaggctgccacgcgcaggggttctggagctacgacggcttt  60
   F K H R N D K A A H A Q G F W S Y D G F
          190     200     210     220     230     240
61 atcgcctcagcctaagatgttcgagaaggacggctttggcatggttaggtggcaggatgtg  80
   I A A A K M F E K D G F G M V G G E D V
          250     260     270     280     290     300
81 cagaagcgggagctctcggcgttcttcgctcatgtcgcgcacgaaacctcgtgtggatgg  100
   Q K R E L S A F F A H V A H E T S C G W
          310     320     330     340     350     360
101 agtggagctaaggacggtcctacagcgtggggactgtgctacaaccaagagctcgcgcct  120
   S G A K D G P T A W G L C Y N Q E L A P
          370     380     390     400     410     420
121 gaaaaggattactgcaagacgggcgatttgatgtacccttgcgcaccgggtgctggttac  140
   E K D Y C K T G D L M Y P C A P G A G Y
          430     440     450     460     470     480
141 tacggacgtggagcgtttccocctctactggaactacaactatggtcccacaggagtggct  160
   Y G R G A F P L Y W N Y N Y G P T G V A
          490     500     510     520     530     540
161 ttgaagcaggacctgttacaccacctgaaattctctcccagaacgaaaccattgctgtgg  180
   L K Q D L L H H P E I L S Q N E T I A W
          550     560     570     580     590     600
181 caagcagctgtttggtactggatgacgcctgccaaagacgagaccatctcctcagagatt  200
   Q A A V W Y W M T P A K T R P S P H E I
          610     620     630     640     650     660
201 atgattggcaagtgggtgcccagcaagaatgacaccctcgttatcgcaagcctggcttc  220
   M I G K W V P T K N D T L A Y R K P G F
          670     680     690     700     710     720
221 ggcatgaccatcaatgtcaaggcaagtgatgtcgaatgcccacggcgaagatcctcgc  240
   G M T I N V K A S D V E C G H G E D P R
          730     740     750     760     770     780
241 atgcagtcacgaatctcccactacttgaccttctcagggacaccttcagttggatgac  260
   M Q S R I S H Y L T F L R D T F Q L D D
          790     800     810     820     830     840
261 ccgggctcaaatctagattgcggtctgcaaggtgttattccactggcctatgcatcaatg  280
   P G S N L D C G L Q G V I P L A Y A S M
          tag
281 *      281

```



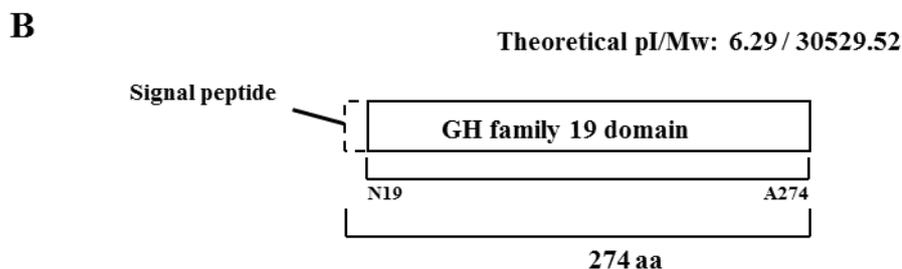
**Fig. 2-4. A: Nucleotide and amino acid sequence of EDQ53624.  
B: Schematic representation.**

**A**

```

      10      20      30      40      50      60
atgttaggagtggaagggtctgtgcagtaaagcttacaaggaccaagggtgcaataaa
1  M L G V E G L V C S K A Y K D Q G C N K                20
      70      80      90      100     110     120
accataagcgtttgttcacggagggaatgttcgaggggatgttcgatgcaccggaacgg
21 T I S D L F T E G M F E G M F M H R N G                40
      130     140     150     160     170     180
cggatggcgcacatgcgcaaggcttttgagttacggcgggttcacgaccgcccaagatg
41 R M A H A Q G F W S Y G G F M T A A K M                60
      190     200     210     220     230     240
ttccagctctccggcttcggttcagtagtgaggatgacacgcagaagaaggagcttgct
61 F Q S A G F G S V G G D D T Q K K E L A                80
      250     260     270     280     290     300
gcgttcttcgctcacgttagctcatgaaacctcatgtgggtggcctggagcgaagattcc
81 A F F A H V A H E T S C G W P G A K D S                100
      310     320     330     340     350     360
ccatacgcacatggggctttgctacaaccgagagctctcacctacctatgaatactgcaag
101 P Y A W G L C Y N R E L S P T Y E Y C K                120
      370     380     390     400     410     420
ggagacgaactcctctaccogtgtgctcctggcgttcttaccacggctcgtggagctttt
121 G D E L L Y P C A P G A S Y H G R G A F                140
      430     440     450     460     470     480
cctctctactggaacttcaattatggcgcgacgggagcggcgttgaagcaggacttatta
141 P L Y W N F N Y G A T G A A L K Q D L L                160
      490     500     510     520     530     540
aatcatcccgagattttgtcgtacaacgaaacggctcgcacatggcaggcagcagatctgttac
161 N H P E I L S Y N E T V A W Q A A I W Y                180
      550     560     570     580     590     600
tggatgactcccgggaagacaaggccctctcctcatcaagttatggttggtaagtgggtg
181 W M T P G K T R P S P H Q V M V G K W V                200
      610     620     630     640     650     660
ccaacaaaaaacgacactctggctaaacgcttgccctgggtttggaatgaccatcaacata
201 P T K N D T L A K R L P G F G M T I N I                220
      670     680     690     700     710     720
agggctagtgaagcagagtgtggccatggcgcagacctccaaatgcacgaccgcatcggg
221 R A S E S E C G H G D D L Q M H D R I G                240
      730     740     750     760     770     780
cactacgttcgcttccatgattacttcggcctcacagatccaggcaagcatgtggac
241 H Y V R F L H D Y F G L T D P G K H V D                260
      790     800     810     820
tgtgcacgcagcaagtagtccaattggaatatgcattagatataa
261 C A S Q Q V V Q L E Y A L V *                275

```



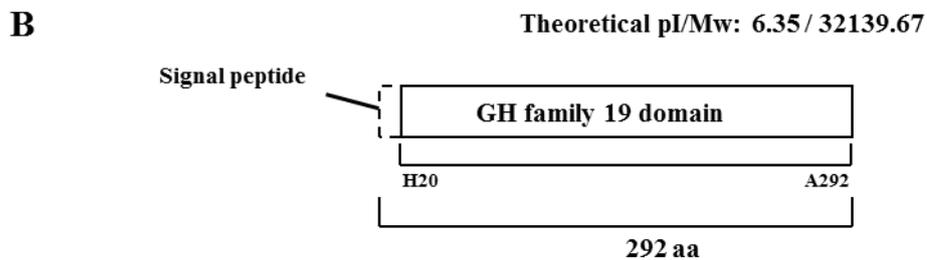
**Fig. 2-5. A: Nucleotide and amino acid sequence of EDQ53657. B: Schematic representation.**

**A**

```

          10      20      30      40      50      60
1  atggctgctgctgccgcactttctggttgcagctctcttgggtgggtggcgtagcgcgcac   20
   M A A A A A L L V A A L L V V G V S A H
          70      80      90     100     110     120
21 ggacgcaaggactgggtgtgcactaaagattgaaggaagacggatgcaacaaaaccatc   40
   G R K G L V C T K E L K E D G C N K T I
          130     140     150     160     170     180
41 agtgatctgttcaoggtgcaaactttcgaggacatgttcaaaccaccgaacgacagagct   60
   S D L F T V Q T F E D M F K H R N D R A
          190     200     210     220     230     240
61 gcgcatgcccgggcttctggacctacgatggcttcatggctgcagctcagatgttcgag   80
   A H A A G F W T Y D G F M A A A Q M F E
          250     260     270     280     290     300
81 aaggacggcttcgctccgtgggtggtagcagatgacagaagcgggagctcgcgcggttc   100
   K D G F A S V G G D D M Q K R E L A A F
          310     320     330     340     350     360
101 ttgccccacgtgcccaacgaaactcgtgtggatggagcatggccaaagatggctctacc   120
   F A H V A H E T S C G W S M A K D G P T
          370     380     390     400     410     420
121 gcatgggactatgctacaaccaagactcgcctccatgaaagactactgcaagactggc   140
   A W G L C Y N Q E L A P M K D Y C K T G
          430     440     450     460     470     480
141 gatttgctgtatccatgtgcaccaggtgctggttactatggacgtggagcctttctctc   160
   D L L Y P C A P G A G Y Y G R G A F P L
          490     500     510     520     530     540
161 tactggaactacaattacggtccaactgggaaggctctgaagcaggacttgttgcacat   180
   Y W N Y N Y G P T G K A L K Q D L L H H
          550     560     570     580     590     600
181 cctgagatcctcgcccaaacgaaaccatagcatggcaagcagctatttggactggatg   200
   P E I L A Q N E T I A W Q A A I W Y W M
          610     620     630     640     650     660
201 acccctgcccaagacaaggccatctcctcatgaagttatgatcgggaagtgggtgccgac   220
   T P A K T R P S P H E V M I G K W V P T
          670     680     690     700     710     720
221 aagaatgatacacttgcaaatcgtaacccggcttggaaatgaccatcaacattaaggcc   240
   K N D T L A N R K P G F G M T I N I K A
          730     740     750     760     770     780
241 agcgcgcttgagtgtggccatggagatgatcctcgcagctgtcacgaatctcccactat   260
   S D V E C G H G D D P R M L S R I S H Y
          790     800     810     820     830     840
261 ttggactttcttcaaaacaaattccaagttcaagatcctgggtgcaaacccttgaactcggc   280
   L D F L Q N K F Q V Q D P G A N L D C G
          850     860     870
281 ctgcaaggtgtagttcctctggcatatgcatcaatttaa
   L Q G V V P L A Y A S I *           293

```



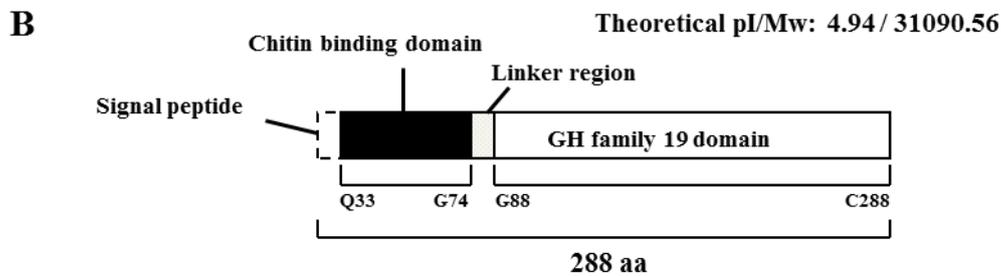
**Fig. 2-6. A: Nucleotide and amino acid sequence of EDQ64064.  
B: Schematic representation.**

**A**

```

          10      20      30      40      50      60
atgggaagaactacagggactagtgtggggcaccagcaccatggtgccgcgtttgtggtt
1  M G R T T G T S V G H Q H H V A A F V V      20
          70      80      90      100     110     120
gtagctctggttagcattggtccgatttgttgcgtctcaaggggagtggtcggaaatccaca
21 V A L V A L V R F V A S Q G E C S E S T      40
          130     140     150     160     170     180
gcctgtcccgacaataccatgtgctgtagccagtataattattgtggaactggcgacgcc
41 A C P D N T M C C S Q Y N Y C G T G D A      60
          190     200     210     220     230     240
tattgtggtgaaggttgcaagaatggtccctgcaacgctggtggtacaacctcctgcgct
61 Y C G E G C K N G P C N A G G T P P A P      80
          250     260     270     280     290     300
gaacctccaacctcaggttcaggttggctgagcttcttcaccgaagaagttttcgacggg
81 E P P T S G S G W S S F F T E E V F D G      100
          310     320     330     340     350     360
tggttcccttcccgaatgctgatttttacacctttgagcgtttcaaggctgcagcgtcc
101 W F P S R N A D F Y T F E R F K A A A S      120
          370     380     390     400     410     420
gottaccogaogttcggtaacgaaggatctgtggatgaccagaagcgagagatcgctgcc
121 A Y P T F G N E G S V D D Q K R E I A A      140
          430     440     450     460     470     480
tttttcggaaacgtcaaccaagaatctggaggcttgaaattcgtcagagagactaacctt
141 F F G N V N Q E S G G L K F V R E T N P      160
          490     500     510     520     530     540
actgaaatatactgcgacacgaccaacccaataaccttgcgcgctggtaagtcctat
161 T E I Y C D T T N T Q Y P C A A G K S Y      180
          550     560     570     580     590     600
tatggcgctggtcccattcagctgtcatggaactacaactacggtgcatgtggagctgct
181 Y G R G P I Q L S W N Y N Y G A C G A A      200
          610     620     630     640     650     660
ctgaaactggccactcctcgccaactccagagttggttagagactgatgccgatgtggcgttc
201 L N L P L L A T P E L V E T D A D V A F      220
          670     680     690     700     710     720
aagacggccctctggttttggatggccaatcagtgccaccaagcaatcatcggtcctcct
221 K T A L W F W M A N Q C H Q A I I G P P      240
          730     740     750     760     770     780
cccagtttcggaaaaaccattcggataatcaatggagcgaagagtgccgacctgtgaaac
241 P S F G K T I R I I N G A K E C G L V N      260
          790     800     810     820     830     840
gacgagagagtaacgaatcgagttacgtactacccaacttctgcaattcattgggcgtc
261 D E R V T N R V T Y Y T N F C N S L G V      280
          850     860
gaccctggcaccgacctacggtgctga
281 D P G T D L R C *      289

```



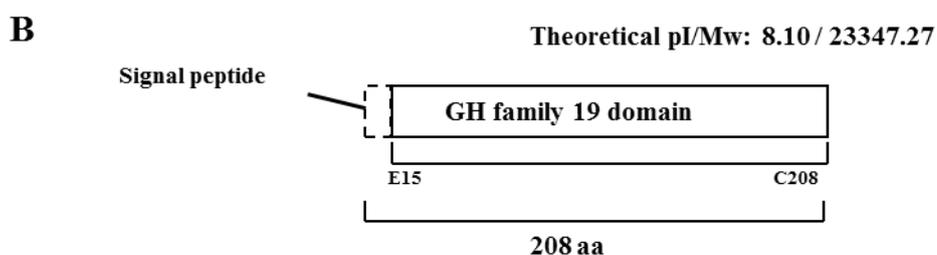
**Fig. 2-7. A: Nucleotide and amino acid sequence of EDQ60220.  
B: Schematic representation**

**A**

```

      10      20      30      40      50      60
atgacagctcttggttctgagcctggtacaaggagcttcagctgagtggtcgagctttata
1  M T A L V L S L V Q G A S A E W S S F I      20
      70      80      90     100     110     120
accaaagctgacttcgatcagaagtatttccagggtcatatttcggtctacacatacgac
21 T K A D F D Q K Y F P G H I S F Y T Y D      40
      130     140     150     160     170     180
agcctcaaggccgctgcagggacgcctttcactcaattcggaattcgggatctcctgaa
41 S L K A A A G T P F T Q F G N S G S P E      60
      190     200     210     220     230     240
gaccagaagcgagagttggcacttgcaagtttaagcaacaatacgagcaaaactgtaat
61 D Q K R E L A L A S L K Q Q Y E Q N C N      80
      250     260     270     280     290     300
atacagtgtaagcaaggttactgtgatacaacatctccctaccatgttctaaagacaaa
81 I Q C K Q G Y C D T T S P Y P C S K T Q      100
      310     320     330     340     350     360
gaaccctattactttggacgaggtcccattcaactgttctggaactacaactacggtgct
101 E P Y Y F G R G P I Q L F W N Y N Y G A      120
      370     380     390     400     410     420
tgtggcgattacataggcaaacgccttcttcaagtcccaggccagatttccacgaaccct
121 C G D Y I G K R L L Q V P G Q I S T N P      140
      430     440     450     460     470     480
gtcattgcatttcagacagctttctggttctggatgactcaaggtagccatcggttcatt
141 V I A F Q T A F W F W M T Q G S H R F I      160
      490     500     510     520     530     540
ctagccaaatcattctccgggactaccagagccattaacgggtggctactccgaagaagg
161 L A K S F S G T T R A I N G G Y S E E G      180
      550     560     570     580     590     600
cgcagacagatggttgcgggtcgcgtattacaagagcttctgcacaatacttggggtc
181 R R Q M L S R V A Y Y K S F C T I L G V      200
      610     620
gaccccggcaccgatctcgaatgctga
201 D P G T D L E C *      209

```



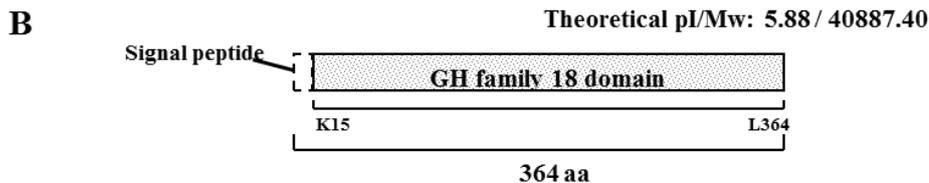
**Fig. 2-8. A: Nucleotide and amino acid sequence of EDQ72654. B: Schematic representation.**

**A**

```

          10      20      30      40      50      60
1  atgacggtacttctagtcacgscocctgascctgttactagcaaacccattgcsatcg  20
   M T V L L V H G P E P V T S K P H C G S
   70      80      90      100     110     120
21 aagattgtgaaatcaggtactggccatattggcaccgatacgtcaaacctcaatttc  40
   K I V K S G Y W P Y W A T D T S N L N F
   130     140     150     160     170     180
41 gaggttccaaacgatgattctttgcatggcacagattgaccggtaacgatgaggtc  60
   E F Q T H V F F A F A Q I D P V T Y E V
   190     200     210     220     230     240
61 gttccgcccccccttctgatgggtttcaatattccaacggtcacaagctagctcga  80
   V P P P P S D G V S I F P T F T K L A R
   250     260     270     280     290     300
81 aaatccaacaagtgcgtcaagacctactctccatcgagggggagttccatgtcacca  100
   K S N K C V K T L L S I G G G S M S P
   310     320     330     340     350     360
101 ttttcgscatggcagctcagctcctaaccgcaagcattcattcagagcagattcag  120
   F S A M A S S A A N R K A F I Q S S I Q
   370     380     390     400     410     420
121 ttggctttaacaatgctcagcgtcttgacctggactggagtttccagatactcaa  140
   L A L N N S F D G L D L D W E F P D T Q
   430     440     450     460     470     480
141 gtagacatggacaacctggccattcttgaaggagttggcggccagggscagaaaaag  160
   V D M D N L A I L L K E W R A E A Q K K
   490     500     510     520     530     540
161 ctacttctcagcgtcgtgacttccgaaacattctctatttcccaaccagcggac  180
   L L L T A A V Y F R N I L Y F W Q P A D
   550     560     570     580     590     600
181 caacaacccggtatccgatcgcgtcaatcaacaagaacctggactggataaatgtagt  200
   Q Q R R Y P I A S I N K N L D W I N V M
   610     620     630     640     650     660
201 tgtttcattaccgscgtcctgggaatctaacacaggtgagcacacggctctgtatgac  220
   C F D Y R G S W E S N T G E H T A L Y D
   670     680     690     700     710     720
221 cccaatctccagtcgtcagcacagacgacgtctcaccgactggatcacagcaggtcta  240
   P N L P V V S T D D A V T D W I T A G L
   730     740     750     760     770     780
241 tatccccacaaattggtagtgggtttggccttctacggaaagcaatggacscctcagagc  260
   Y P H K L V M G L A F Y G K Q W T L Q S
   790     800     810     820     830     840
261 ttggctaatacgggaattggagcggccactcagacagacattagttcgaatacaccccc  280
   L A N T G I G A P T Q T D I S S K Y T P
   850     860     870     880     890     900
281 gtagcgaatgattgtatctacaaaatgacgggtggacgactgattgtagat  300
   V W S E I V V Y L Q N D G W T T V L D D
   910     920     930     940     950     960
301 gcaacggtgcaatgtacagctacaacaccagtccttcagtggtagggatgataat  320
   A T V S M Y S Y N T Q S L Q W V G Y D N
   970     980     990     1000    1010    1020
321 gaggttaccatcaaaaagaagtggaatcccatcagaatcaaaaagctgaagggggtg  340
   E V T I K K K V E Y A I R I K K L K G V
   1030    1040    1050    1060    1070    1080
341 tttgttggagctcaaccagatgactccaattggctcttctcagcaggtacctct  360
   F V W S L N H D D S N W S L A R A G T S
   1090
   caacctccgctctag
361 Q P P L * 365

```



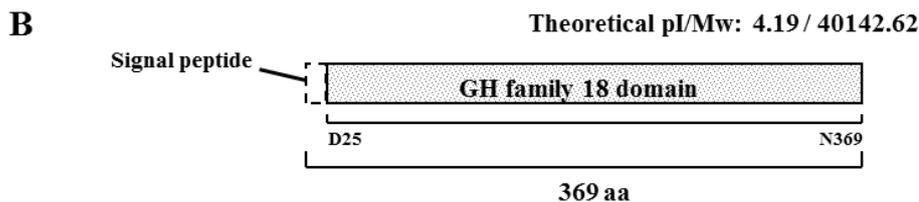
**Fig. 2-9. A: Nucleotide and amino acid sequence of EDQ51077. B: Schematic representation.**

**A**

```

      10      20      30      40      50      60
1  atggcggccagaatatcattgtttggatcttgcctggtgcasattctcagttttcagttg
   M A P R I S L F G I L L V Q I L S F Q L
      70      80      90     100     110     120
21 ttggtatcgccgatttcttcttggctggagcttggtagaggggttactggttgc
   L V S P D F F L A G A V V R G G Y W L Q
      130     140     150     160     170     180
41 gacttggcctagtgaaacataaactcaattacgagacgcattgtactacgctttgca
   D L P L V N I N F N Y E T H V Y Y A F A
      190     200     210     220     230     240
61 ggcttggacccttctcgtaccaggttggctccgaccaccacaatggccagtacg
   G L D P S S Y Q V V A P T T D N G Q Y A
      250     260     270     280     290     300
81 acgttttggccacggcaagagctcaaaccttccgttggtagcctctctccatcg
   T F V A T A K S S N P S V V T L L S I G
      310     320     330     340     350     360
101 ggagtgacgcaaatttaccacattggcgaatggtagcaccatccaccagggcag
   G G A A N F T T F G E M V S T S T R R Q
      370     380     390     400     410     420
121 gccttcattgacagcagatctcctggctcccaatcagttacgaagactggacct
   A F I D S S I S L A R Q Y S Y E G L D L
      430     440     450     460     470     480
141 gactggagtcaccgcaaacgcaagagatggaaaattggcctactgctacaggaa
   D W E S P Q S Q T E M E N L A L L L Q E
      490     500     510     520     530     540
161 tggcggcggctcgccatcggagctcaatcgtcaggcaataccgagcttctcctcaca
   W R A A A H T E A Q S S G N T E L L L T
      550     560     570     580     590     600
181 gctgcttggactaccagtcattctctctacagggctgctgtaatacagttctggcc
   A A V S Y Q S I L L Y T G V G N Q V W P
      610     620     630     640     650     660
201 attaccgcttcaacacatctggactggtagactgatgacctatgattaccagggc
   I T A F N T Y L D W V N V M T Y D Y H G
      670     680     690     700     710     720
221 tcatggagccaaccactactggcgaacacacagcattatcgaacccaactccgagctc
   S W E P T T T G E H T A L Y D P N S D V
      730     740     750     760     770     780
241 gacactgattacggaatcaacaactggctgtcagcagscatgcaagcagacaagatgtc
   D T D Y G I N N W L S A G M Q A D K M C
      790     800     810     820     830     840
261 ttggacttgccttctatggaaacagtggtttcttccagcttggccaacccggagta
   L G L A F Y G K Q W V L A S L A N T G V
      850     860     870     880     890     900
281 gggcgccctccaccagtggtggcgaacccataacatagcagacatcgtgacttacaac
   G A P A T S G G D P I T Y A D I V T Y N
      910     920     930     940     950     960
301 aacgcagggagccactgttgcaagattccactactgtatcaatgtatattacaag
   N A G G A T V E Q D S T T V S M Y S Y K
      970     980     990     1000    1010    1020
321 tctgacttgactggatcggtatgacaatcctgatactatcgctcgaaagttcagtat
   S D L T W I G Y D N P D T I A A K V Q Y
      1030    1040    1050    1060    1070    1080
341 ggcagagtaaatcttctgggttacttcgctggcacttcatcagcagatgcaaat
   A Q S K S L L G Y F A W A L H Q D D A N
      1090    1100    1110
361 ttctccttggcgtcagcaggtatgaattga
   F S L A S A G M N *
      370

```



**Fig. 2-10. A: Nucleotide and amino acid sequence of EDQ63241. B: Schematic representation.**

A

```

      10      20      30      40      50      60
atggcgcaacagaattacaacgacacagaggatagcscatgcaatgcagcaccgtcttcg
1  M A Q Q N Y N D T E G Y A C N A A P S S      20
      70      80      90     100     110     120
acgtcatgcagcactttcgcttctataggacctccagggcagggagtcactacgaaaa
21 T S C S T F A F Y R T F Q A G E S L R K      40
      130     140     150     160     170     180
gttggagactacttcaacaaaactgctgcagccgttccaatgtgagtgagatgaaccta
41 V G D Y F N K T A A A V A N V S G M N L      60
      190     200     210     220     230     240
ctgtccacaactgcttctttaagcagacgcaagccctctacgtccccttggactgcaga
61 L S T T A S L K Q T Q A L Y V P L D C R      80
      250     260     270     280     290     300
tgctgaacgcaaggtcccaaatgcaggtttccacactatcgtaaaaggggacaccttc
81 C L N A R S Q M Q V S H T I V K G D T F     100
      310     320     330     340     350     360
tggctgttctgttaccagataggggtctgacaaggtaccagccatgatgcttcg
101 W L L S V T E Y G G L T R Y Q A M M A S     120
      370     380     390     400     410     420
aatccgtccaaggacgtgtataacctcacaattgscgacacaataacggtccgatattc
121 N P S K D V Y N L T I G D T I T V P I F     140
      430     440     450     460     470     480
tgtscatgtccaactgcggcaggttgcgaatggagcaattatttgatcacgaccact
141 C A C P T A A Q V A N G T N Y L V T T T     160
      490     500     510     520     530     540
gtgtacccttctgaaacgctcgacattatcagtcacggttcgscatctcgacgacgat
161 V Y P S E T L D I I S A R F G I S T T D     180
      550     560     570     580     590     600
ctcagcagggcgaacaactgaaactcgtcgtcgatcctggatgtgaacaccactctgctc
181 L S R A N N V N S S S I L D V N T T L L     200
      610     620     630     640     650     660
gtcccgttcgactttaccgccactggcaacctgagttggctccggttacctctcag
201 V P L A T L P P L A T M D W A P V T S Q     220
      670     680     690     700     710     720
cctcccaggtccacctgcaactgtagcgtccgcaatctcacctgcagtgattacg
221 P P P S P P A T V A S P N A A P A V I T     240
      730     740     750     760     770     780
aaatcggcatcgagacaccactctacatcggaatcgagttggagcgtttgtttgacc
241 K S A S Q T P L Y I G I A V G A F G L T     260
      790     800     810     820     830     840
ttggcgggttttgcattactgctttgttcaaggcatcccgaattcagggacgaaa
261 L A A V F A L L L L F K A S R N S G T K     280
      850     860     870     880     890     900
cccaagacctcaggaagaaatgaagcggcgaacatggtacatcttgattgctcgca
281 P K D L T E E M K R P N M V H L E L L A     300
      910     920     930     940     950     960
ggcatgtcgacatggtcgggtcagagaagccagctctgctttcacatgaagagattcaa
301 G M S D M V G S E K P V L L S H E E I Q     320
      970     980     990     1000    1010    1020
tctgccactcaaggcttcagtcagagaatttcattcaaggatcggtgtacaaggctgt
321 S A T Q G F S P E N F I Q G S V Y K G C     340
      1030    1040    1050    1060    1070    1080
atcaacgctcagcttggcaatcaagcagatgaagggaacatgaccaggagctcaaa
341 I N G Q L V A I K Q M K G N M T Q E L K     360
      1090    1100    1110    1120    1130    1140
atcctttgccaagtccaccacagcaatctagtgaagctggtgggctgtscatggcggg
361 I L C Q V H H S N L V K L V G L C V G G     380
      1150    1160    1170    1180    1190    1200
tcagaaaatttgacctgctgatgagatgccaaacatggatccctcaacgattgcctg
381 S E N L Y L V Y E Y A K H G S L N D C L     400
```

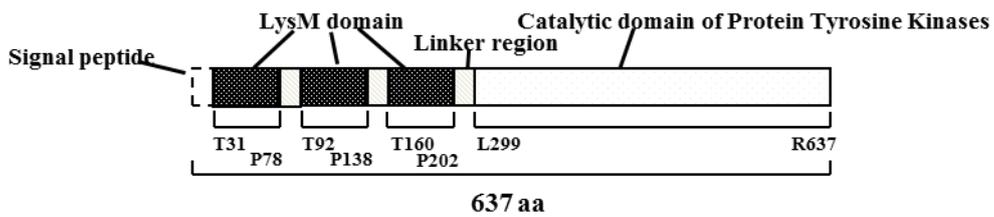
```

1210      1220      1230      1240      1250      1260
cgsaaccaagccgcaatcgccgcaccacattctctcaaaagcgcagcttatctaccgtgg
401 R N Q A A I G R T T F S Q S A A Y L P W      420
      1270      1280      1290      1300      1310      1320
tgttcacgastgcgaattgctctcgatgtagcttctggctagastacatccacaactac
421 C S R V R I A L D V A S G L E Y I H N Y      440
      1330      1340      1350      1360      1370      1380
acaaaccctagcttcgtacacaaagacgtgaagaccagcaacatcctcctggacgagaac
441 T N P S F V H K D V K T S N I L L D E N      460
      1390      1400      1410      1420      1430      1440
ttccgtgccaaaagtgccaatttcggcatggccaatcccgccagcccgacgcgggg
461 F R A K V A N F G M A K S A A S A D A G      480
      1450      1460      1470      1480      1490      1500
cctttactgacccgccacatcaccgscacgcaggscctacatggcggccagtagctggag
481 P L L T R H I T G T Q G Y M A P E Y L E      500
      1510      1520      1530      1540      1550      1560
cacggtctcgtaacgtaaggscggacgtctatgccttcggggtggtgcttggagatc
501 H G L V T V K A D V Y A F G V V V L E I      520
      1570      1580      1590      1600      1610      1620
ctctccgcaaggaagcagtttgcgcccggagaaagatgaggaggacagaggtgtaag
521 L S G K E A V V R P E K D E E E Q G V K      540
      1630      1640      1650      1660      1670      1680
gaacgagcgttatcagacatcatcgtcgatgtcctcaatgcaggcaccgaggactgcaa
541 E R A L S D I I V D V L N A G T A E L Q      560
      1690      1700      1710      1720      1730      1740
acggagcagctccggaagtgcattgacccgcaactgcactccgctaccocatagagatt
561 T E Q L R K F I D P Q L H S A Y P I E I      580
      1750      1760      1770      1780      1790      1800
gcttccagcatcgccagcctggccatgacatgcatcgatcccgatcccaccatgcgaccc
581 A S S I A S L A M T C I D P D P A V R P      600
      1810      1820      1830      1840      1850      1860
ascatgaaggacgtcacatcgccctgcgaagatgtascggcatcactagaatggag
601 S M K D V T F A L S K M L A A S L E W E      620
      1870      1880      1890      1900      1910
tctacagctgagtagcgtcaggcatgtccaccgtcccacatcgaagctcggtaa
621 S T A E Y G S G M S T V P I E A R *      638

```

**B**

Theoretical pI/Mw: 5.74 / 68543.27



**Fig. 2-11. A: Nucleotide and amino acid sequence of EDQ51621.  
B: Schematic representation.**

A

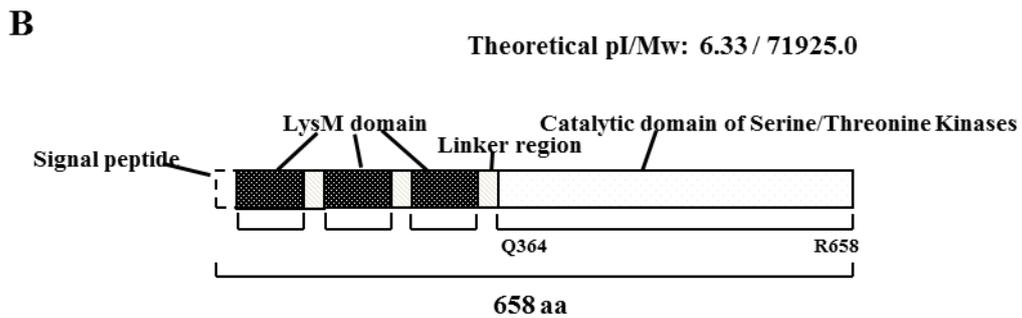
```

      10      20      30      40      50      60
1  atgtttcgacacgcttccggactggtattgatctccgactgctcatctggtctcttgaa 20
   M F R H A S G L V L I S A L L I W S L E
      70      80      90     100     110     120
21  attcatcctattagtctcaacaacagtacagaaataccagcggatcacatgctcgggc 40
   I H P I S A Q Q Q Y R N T S G Y T C S G
      130     140     150     160     170     180
41  actacaagatgccaaacttacgctttctacagaacggcagggtcgcaatcaactctgaca 60
   T T R C Q T Y A F Y R T A G S Q S T L T
      190     200     210     220     230     240
61  tccatagttacgctatcaacactagcgtcgaaggaattgccactgcaagtgatgtgat 80
   S I V T L F N T S V E G I A T A S D V D
      250     260     270     280     290     300
81  cctaacaggacaatocctttcaatgatagagacctctctacatcocctttaattgtagc 100
   P N R T I P F N D R D P L Y I P L N C S
      310     320     330     340     350     360
101 tgtttcaataacttttcgagcacttacgtctcagcagattaagtccggcgatagcag 120
   C F N N T F R A L T S Q Q I K S G D T M
      370     380     390     400     410     420
121 tacaagttcccaatggaacttaccagggctcactacctgggaagccattagcctcgca 140
   Y K F A N G T Y Q G L T T W E A I S V A
      430     440     450     460     470     480
141 aaccccacagtcataatcactaacaatgacgtagcgcactacctggtgataccattgaga 160
   N P T V I I T N M T V G D Y L V I P L R
      490     500     510     520     530     540
161 tgcgcttgcctacgactacccaacgaaggctggttctcgaattttgctcacttactcg 180
   C A C P T T T Q R R A G S R I L L T Y S
      550     560     570     580     590     600
181 atcttccctgatgaaacocctaaagtttatcagcsgtctgttcaacattccggaagtagag 200
   I F P D E T L K F I S G L F N I P E V E
      610     620     630     640     650     660
201 ttacaaactgcaacaacggcgagttcagcaaatctagcagctttactactttgctt 220
   L Q T A N N G A S S A N L A A F T T L L
      670     680     690     700     710     720
221 gttcctcttcgagctttgacctttgagcagatgaaatttccatcacctcctccgcc 240
   V P L P S L V P L S T M K F P S P P P P
      730     740     750     760     770     780
241 tcggtggaagcaccagctccagcaccctccacccttcttctgtgatcaccacaaggat 260
   S V E A P G P A P S T L V P V I T N K D
      790     800     810     820     830     840
261 ccatccaagacgtcaatgtacattggcatcgtctttggtggcttcgggatggctttggct 280
   P S K T S M Y I G I V F G G F G M A L A
      850     860     870     880     890     900
281 tttatocctggcatgtgtgtgtgctactgttaaacgttacaagaacattattcgaag 300
   F I L A C V L C A T V K R Y K N I I R K
      910     920     930     940     950     960
301 atagagtacgagaacagaggcttgttgaacaggaagtcctctgtaacgatatcactct 320
   I E Y E N R G L L N R K S S V T D I D S
      970     980     990     1000    1010    1020
321 cttgacactcgaaactctagcttggttagtgscatgacggatctgtttggctgcgataag 340
   L D T A N S S L V S G M T D L F G C D K
      1030    1040    1050    1060    1070    1080
341 cttacaaaattctcgtatgaagagctggacacggccacaatcatttcagcgaagacaac 360
   L T K F S Y E E L D T A T N H F S E D N
      1090    1100    1110    1120    1130    1140
361 agaatccaggatccgtcttctggcgaattgaacggctcattttagcaatcaagcga 380
   R I Q G S V F L A K L N G S F V A I K R
      1150    1160    1170    1180    1190    1200
381 atgaaaggaaacatgtcggacgagctcaagattctgtcccaggttcaccatggcaatgtg 400
   M K G N M S D E L K I L S Q V H H G N V
```

```

          1210      1220      1230      1240      1250      1260
gtgaagctggttgscatgtgtcaaggactcagatggcgctcggagaatctctacatc
401 V K L V G M C A R D S D G R S E N L Y I          420
          1270      1280      1290      1300      1310      1320
gtctacgagtatgcagagaacggctcgctcagtgactgtcttcacccaatggcatat
421 V Y E Y A E N G S L S D C L H H Q M A Y          440
          1330      1340      1350      1360      1370      1380
ccaacctccaatttctcacggctgtttgattgctgattggaacacaagaatgcagata
441 P T S N F S R S V G L L I W N T R M Q I          460
          1390      1400      1410      1420      1430      1440
gcsgtgacattgcctcgggctagagtagtgcacaactacaccaaccctagcttggtg
461 A V D I A S G L E Y L H N Y T N P S L V          480
          1450      1460      1470      1480      1490      1500
cacaagatgtgaagagcagcaacatccttctggacaaaaacttctgccaagtagcc
481 H K D V K S S N I L L D K N F R A K V A          500
          1510      1520      1530      1540      1550      1560
aatttcgaaatggcaaacctctgacagcgggagcctggcccccctcatgactgagcac
501 N F G M A K P A D S G E P G P L M T E H          520
          1570      1580      1590      1600      1610      1620
atcgtcggcacacaagctacatggctccagagtatctagagcagcgtttggtctcgacc
521 I V G T Q G Y M A P E Y L E H G L V S T          540
          1630      1640      1650      1660      1670      1680
aaggccacatgttctccttcgggtggtcctcctggagctcctatctggcgggagcgc
541 K A D V F S F G V V L L E L L S G R E A          560
          1690      1700      1710      1720      1730      1740
atctgcaacgacggcggggagagttcaccatgctgtcggcgacaactctccaagttctt
561 I C N D G G G E F T M L S A T I S N V L          580
          1750      1760      1770      1780      1790      1800
agcggcagcaccagatgscaaagctgcaagcttggatggacccccattgcagaacgct
581 S G D D Q M A K L Q A W M D P R L Q N A          600
          1810      1820      1830      1840      1850      1860
taccgagcagacatcgcctcagcgtggccatcctggcgaagctcgtgcctggagacggat
601 Y P S D I A L S V A I L A K S C V E T D          620
          1870      1880      1890      1900      1910      1920
ccgaggtcgcgccccacatgaagcagatcagtttcgccttgtcgaagatgtccagtcgc
621 P R S R P D M K Q I S F A L S K M S S A          640
          1930      1940      1950      1960      1970
tcgaggagtgcaaatgtctaccggatactcgaaccaccocatcgaagctcgtga
641 S Q E W Q M S T G Y S N H P I E A R *          659

```



**Fig. 2-12. A: Nucleotide and amino acid sequence of EDQ67338.  
B: Schematic representation.**

**Table 2-4. PpChi and PpCERK candidate genes and their some information.**

Locus tag	Gene	Annotation	Class	Name
PHYPADRAFT_150026	EDQ53501	21..54=Hevein or type 1 chitin binding domain; 79..296=Glycoside hydrolase family 19 chitinase domain	I	PpChi-Ia
PHYPADRAFT_137102	EDQ64021	31..65=Hevein or type 1 chitin binding domain; 102..332=Glycoside hydrolase family 19 chitinase domain	I	PpChi-Ib
PHYPADRAFT_55609	EDQ80360	24..60=Hevein or type 1 chitin binding domain; 79..277=Glycoside hydrolase family 19 chitinase domain	I	PpChi-Ic
PHYPADRAFT_149874	EDQ53624	32..267=Glycoside hydrolase family 19 chitinase domain	II	PpChi-IIa
PHYPADRAFT_60959	EDQ53657	26..261=Glycoside hydrolase family 19 chitinase domain	II	PpChi-IIb
PHYPADRAFT_136977	EDQ64064	44..279=Glycoside hydrolase family 19 chitinase domain	II	PpChi-IIc
PHYPADRAFT_219988	EDQ60220	34..69=Hevein or type 1 chitin binding domain; 93..288=Glycoside hydrolase family 19 chitinase domain	IV	PpChi-IV
PHYPADRAFT_75754	EDQ72654	35..208 =Lysozyme_like domain	II-L	PpChi-II-L
PHYPADRAFT_153222	EDQ51077	20..354=The class V plant chitinases have a glycosyl hydrolase family 18 (GH18) domain	V	PpChi-Va
PHYPADRAFT_138151	EDQ63241	30..363=The class V plant chitinases have a glycosyl hydrolase family 18 (GH18) domain	V	PpChi-Vb
PHYPADRAFT_152558	EDQ51621	160..202=LysM domain; 334..609=Tyrosine kinase, catalytic domain	-	PpCERK-a
PHYPADRAFT_132645	EDQ67338	364..630=Protein Kinases, catalytic domain	-	PpCERK-b

## 第2項 内在性コントロールの選択と成長段階における転写量の変動

Fig. 2-13. に3種の内在性コントロールにて補正した PpChi-Ia の転写量の変動を示した。 $\alpha$ -Tubulin の変動が最も小さく、補正前の転写量と比較して補正值が最も安定していた。また、継代後15日目までは、大幅な転写量の変動が見られた。これらの結果より、キチンオリゴ糖処理に対する遺伝子転写量の変動の解析には、内在性コントロールとして $\alpha$ -Tubulin、サンプルは継代後20日目のヒメツリガネゴケ茎葉体を使用することとした。

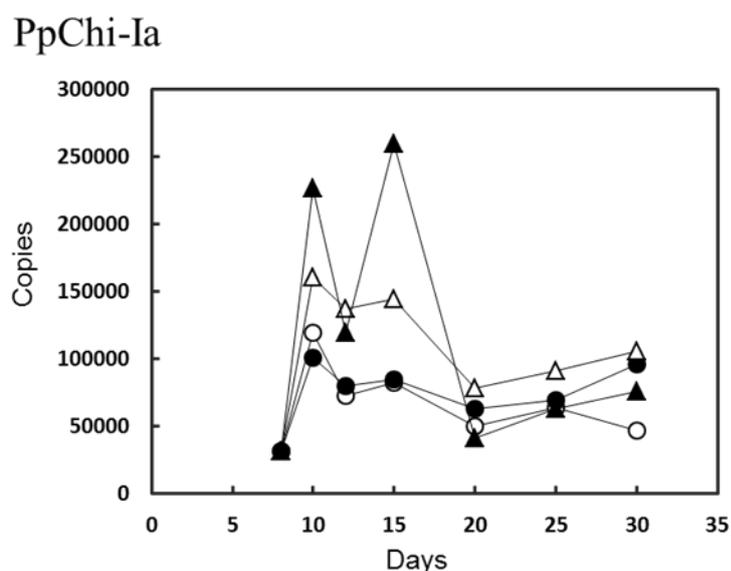
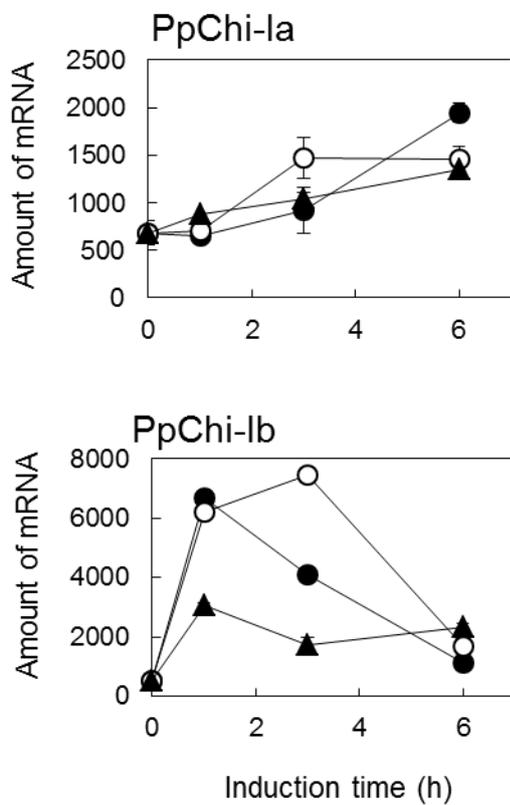


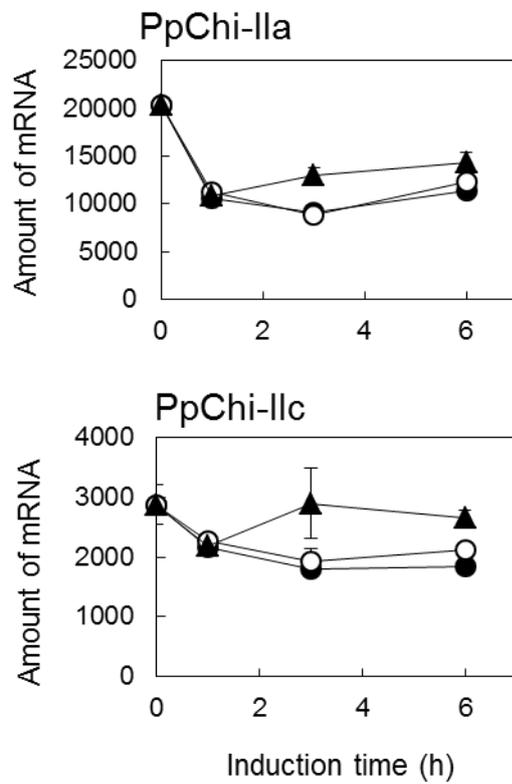
Fig. 2-13. Gene expression in each growth stage and comparison of the correction value by the endogenous control. ○, Before correction; ●,  $\alpha$ -Tubulin; △, 18S rRNA; ▲,  $\beta$ -Actin.

## 第3項 キチンオリゴ糖処理に対する遺伝子転写量の変動

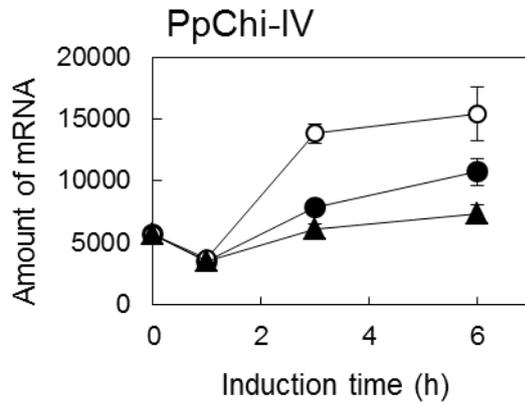
重合度の異なるキチンオリゴ糖で処理したヒメツリガネゴケの遺伝子転写量の解析結果を Fig. 2-14 から 2-18 に示す。10種類の PpChi と2種類 PpCERK のうち、6種類 PpChi (Ia, Ib, IIa, IIc, IV, Vb) と2種類の PpCERK (a, b) に有意な発現が認められた。遺伝子転写量の変動は、キチンオリゴ糖処理後増加または減少する2つのパターンに分けられ、キチナーゼのクラスとの相関が認められた。また、キチンオリゴ糖の重合度によって遺伝子に違いがみられた。



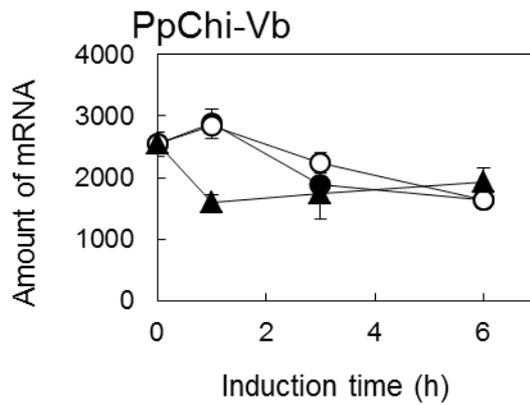
**Fig. 2-14. Expression analysis of Class I chitinase genes by RT-qPCR. Expression profiles of each chitinase gene after 100 mM (GlcNAc)<sub>n</sub> (n=6, 4, 2) treatment. ●, (GlcNAc)<sub>6</sub>; ○, (GlcNAc)<sub>4</sub>; ▲, (GlcNAc)<sub>2</sub>.**



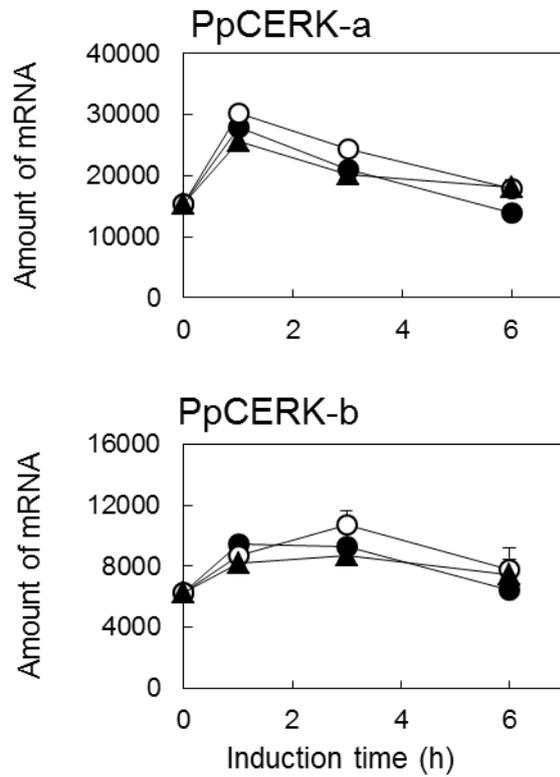
**Fig. 2-15. Expression analysis of Class II chitinase genes by RT-qPCR. Expression profiles of each chitinase gene after 100 mM (GlcNAc)<sub>n</sub> (n=6, 4, 2) treatment. ●, (GlcNAc)<sub>6</sub>; ○, (GlcNAc)<sub>4</sub>; ▲, (GlcNAc)<sub>2</sub>.**



**Fig. 2-16.** Expression analysis of Class IV chitinase genes by RT-qPCR. Expression profiles of each chitinase gene after 100 mM (GlcNAc)<sub>n</sub> (n=6, 4, 2) treatment. ●, (GlcNAc)<sub>6</sub>; ○, (GlcNAc)<sub>4</sub>; ▲, (GlcNAc)<sub>2</sub>.



**Fig. 2-17.** Expression analysis of Class V chitinase genes by RT-qPCR. Expression profiles of each chitinase gene after 100 mM (GlcNAc)<sub>n</sub> (n=6, 4, 2) treatment. ●, (GlcNAc)<sub>6</sub>; ○, (GlcNAc)<sub>4</sub>; ▲, (GlcNAc)<sub>2</sub>.



**Fig. 2-18. Expression analysis of CERK genes by RT-qPCR.**  
**Expression profiles of each chitinase gene after 100 mM**  
**(GlcNAc)<sub>n</sub> (n=6, 4, 2) treatment. ●, (GlcNAc)<sub>6</sub>; ○, (GlcNAc)<sub>4</sub>;**  
**▲, (GlcNAc)<sub>2</sub>.**

## 第5節 考察

遺伝子検索の結果、ヒメツリガネゴケのゲノム上に 10 種類の PpChi 候補遺伝子と 2 種類の PpCERK 候補遺伝子を同定することができた。PpChi 遺伝子は ClassI が 3 種類、ClassII が 3 種類、ClassIV が 1 種類、ClassIII が 1 種類、ClassV が 2 種類に分類された。PpCERK 遺伝子は、プロテインキナーゼの N 末端側に 3 ヶ所の LysM ドメインを持つ構造であった。予想どおり、ヒメツリガネゴケは高等植物と比較してキチナーゼ遺伝子の数が少なかったことから、機能解析に適していることが分かった。

これらの遺伝子について、リアルタイム PCR にて転写量を解析するために、本実験系における最適な内在性コントロールと成長段階を検討した。 $\beta$ -Actin,  $\alpha$ -Tubulin, 18S rRNA 遺伝子を用いて補正した結果、補正前の転写量と比較して、 $\beta$ -Tubulin による補正值が最も安定していた。また、継代後 8, 10, 12, 15, 20, 25, 30 日目の PpChiI-a の変動について調べた結果、継代後 15 日目までは大幅な転写量の変動が見られた。これらの結果より、キチンオリゴ糖処理に対する遺伝子転写量変動解析には、内在性コントロールとして $\alpha$ -Tubulin, サンプルは継代後 20 日目のヒメツリガネゴケ茎葉体を使用することとした。

重合度の異なるキチンオリゴ糖(GlcNAc)<sub>n</sub> (n=6, 4, 2)で処理したヒメツリガネゴケを材料として、各キチナーゼ遺伝子の転写量をリアルタイム PCR で解析した結果、10 種類の PpChi 候補遺伝子と 2 種類 PpCERK 候補遺伝子のうち、6 種類 PpChi (Ia, Ib, IIa, IIc, IV, Vb) と 2 種類の PpCERK (a, b) の有意な発現が認められた。遺伝子転写量の変動は、キチンオリゴ糖処理後増加する、または、減少する 2 つのパターンに分けられ、キチナーゼのクラスとの相関が認められた。また、キチンオリゴ糖の重合度によって転写量に違いがみられた。これらの結果から、ヒメツリガネゴケもキチンエリシターを CERK が認識し、キチナーゼを含む PR タンパク質の発現が誘導されるという生体防御機構が存在することが示唆された。さらに、キチナーゼのクラスやキチンオリゴ糖の重合度によって転写量の変動プロファイルに違いがみられたことから、キチナーゼは生体内において、クラスごとに異なる役割を果たしていることが示唆された。

### 第3章 ヒメツリガネゴケ由来キチナーゼ(PpChi)遺伝子のクローニング

#### 第1節 緒論

キチナーゼは Carbohydrate-Active Enzymes (CAZy) データベースにおける分類により、糖質加水分解酵素ファミリー18 と 19 に分けられる。さらに、その一次構造の違いから、いくつかのクラスに分類される。このように、植物キチナーゼの構造は多様であり、その生理機能も多様であると考えられる。キチンオリゴ糖処理に対するキチナーゼ遺伝子転写量の変動の結果(第2章)より、ヒメツリガネゴケの PpChi は、クラスごとに異なる役割を果たしている可能性が示された。それぞれのキチナーゼの役割について調べるために、リコンビナント PpChi を作製することとした。そこで、ヒメツリガネゴケ茎葉体から mRNA を抽出し、有意な発現が確認された 6 種のキチナーゼ候補遺伝子の cDNA のクローニングを試みた。

#### 第2節 実験材料

##### 第1項 材料および試薬

RNeasy Plant Mini kit は QIAGEN 社より、GeneRacer Kit および SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR は Invitrogen 社より購入した。トリプトンはナカライテスク社より、酵母エキスはオリエンタル酵母工業社より、LB ブイヨン はメルク社より、それぞれ購入した。

プライマーの合成は Life Technologies 社に依頼した。その他の試薬は、全て市販の特級またはそれに準ずるものを用いた。

##### 第2項 プライマー

クローニングに用いたプライマーを Table 3-1. に示した。

**Table 3-1. Sequences of primers containing recognition site of restriction enzyme**

Primer	Sequence (5' → 3')
PpChi-Ia_f(Forward)	<u>CATATGCAGGGGAATGCAGC</u>
PpChi-Ia_r(Reverse)	<u>GGATCCTTAAGCTTCTGCAACC</u>
PpChi-Ib_f	<u>CATATGCAGAATTGCAACAGCACG</u>
PpChi-Ib_r	<u>GGATCCCTAAGCGAAAGATTTTTGG</u>
PpChi-IIa_f	<u>CATATGTGCAACAAGACTGTGAGC</u>
PpChi-IIa_r	<u>GGATCCCTACATTGATGCATAGG</u>
PpChi-IIc_f	<u>CATATGCACGGACGCAAGGGA</u>
PpChi-IIc_r	<u>GGATCCTTAAATTGATGCATATGCC</u>
PpChi-IV_f	GGAATTCC <u>CATATG</u> CAAGGGGAGTGTTCCGG
PpChi-IV_r	GCGGATCCTCAGCACCGTAGGTCGG
PpChi-Vb_f	<u>CATATGGCTGTGGTGAGAGGG</u>
PpChi-Vb_r	<u>GGATCCTTAAATTGATGCATATGCC</u>

Single and double underlines indicate NdeI and BamHI restriction sites, respectively.

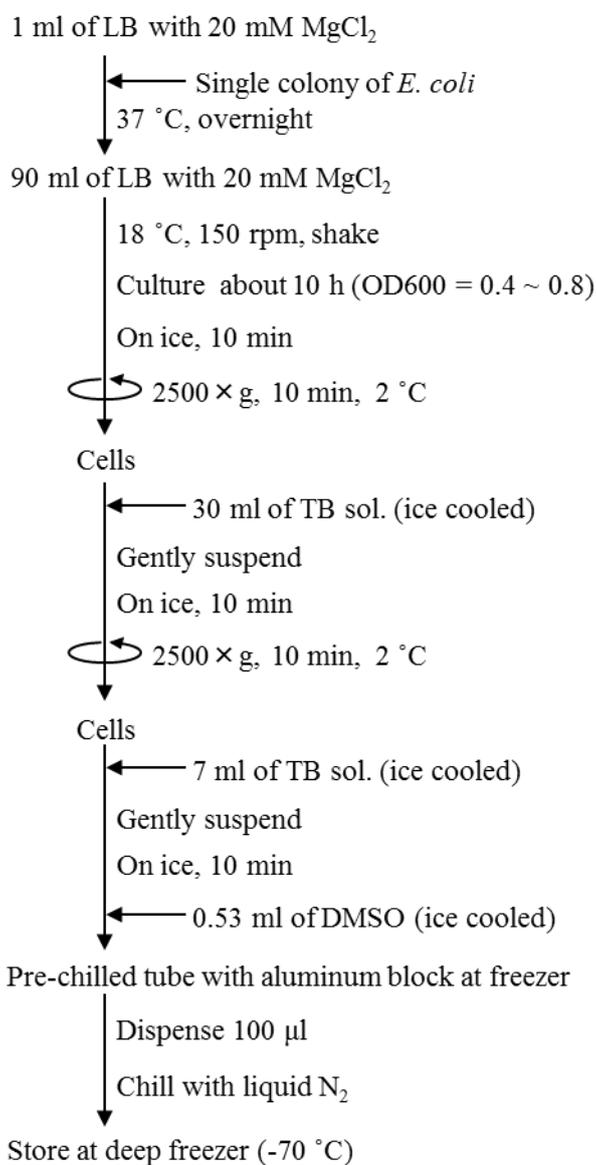
### 第3項 コンピテントセルの調製

LBプレート(1% トリプトン, 0.5% 酵母エキス, 1% NaCl, 1.5% 寒天)大腸菌のストックをストリークし, 37°Cで一晩培養し得られた単コロニーより Scheme 3-1.に従ってコンピテントセルを調製した。LB液体培地は, LBブイオンを2.5%になるように水で溶かし, オートクレーブ(120°C, 15分)後, MgCl<sub>2</sub>を終濃度が20mMになるように加えて調製した。Transformation buffer(TB)は, Table 3-2.の組成のbufferをKOHでpHを6.7に合わせた後, 終濃度が55mMとなるようにMnCl<sub>2</sub>・4H<sub>2</sub>Oを添加して0.22µmのシリンジフィルターで濾過滅菌したもの(4°C保存)を用いた。

**Table 3-2. Transformation buffer (TB)**

Components	amount
PIPES	0.3 g
CaCl <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O	0.17 g
KCl	1.86 g
H <sub>2</sub> O	95 ml

Adjust the pH of the solution to 6.7 with 1 M KOH. Add 1.09 g of MnCl<sub>2</sub>•24H<sub>2</sub>O, and then add H<sub>2</sub>O to bring the final volume to 100 ml. Filter the solution with 0.22 μm syringe filter.



**Scheme 3-1. Preparation of competent cells**

### 第3節 実験方法

#### 第1項 cDNA 合成

cDNA は, GeneRacer Kit (invitrogen 社) を用いて, 添付されているプロトコールに従って合成した。

#### 第2項 PCR による制限酵素サイト付き PpChi 遺伝子配列の増幅

##### 1) 1st PCR

ORF (open reading frame) のシグナルペプチドを除いた領域の 5'末端および 3'末端に対し, Table 3-1. に示した *NdeI* および *BamHI* サイトを付加したプライマーを作成し, 前項で合成した cDNA を用いて, Table 3-3-1 および Table 3-3-2 に示す条件で PCR を行った。

**Table 3-3-1. Reaction mixture for PCR**

Component	Amount
10 × <i>EX</i> Taq Buffer	1.0 μl
TaKaRa <i>EX</i> Taq (0.5 units/μl)	0.5 μl
dNTP Mix (2.5 mM)	0.8 μl
Template DNA	0.4 μl
Forward primer (10 μM)	0.5 μl
Reverse primer (10 μM)	0.5 μl
Distilled water	6.3 μl
Total	10.0 μl

**Table 3-3-2. PCR condition**

Temperature	Time	Cycle
95 °C	1.0 min	× 1
95 °C	0.5 min	× 30
55 °C	0.5 min	
72 °C	1.5 min	
72 °C	10.0 min	× 1

##### 2) 2nd PCR

前項で得られた PCR 産物を鋳型に用いて 1st PCR と同じ条件で 2nd PCR を行い, 制限酵素サイトを付加した PCR 産物を得た。

#### 第3項 アガロースゲル電気泳動

終濃度 1% のアガロースを TAE 緩衝液 (40 mM Tris, 40 mM 酢酸, 1 mM EDTA, pH 8.0) に加熱溶解し, これを泳動用プレートに流し込みゲルを作成した。泳動

buffer として TAE 緩衝液を用いた。サンプルと 1/5 量のローディングバッファ (0.25%ブロモフェノールブルー, 1 mM EDTA, 30%グリセロール) を混合してゲルに供し, 定電圧 (100 V) で泳動した。泳動後のゲルは GelRed (Biotium 社) 5,000 倍希釈液に室温で 15-30 分浸して染色した。染色したゲルは, トランスイルミネーターで観察した。

#### 第 4 項 TA クローニング

##### 1) アガロースゲルからの PCR 産物の抽出

PCR 産物のアガロースゲルからの抽出は, MonoFas DNA 精製キット I (ジューエルサイエンス社)を用いて, 添付されているプロトコールに従って行った。

##### 2) ライゲーション反応

ゲル抽出液に含まれる DNA 量と pGEM-T Vector のモル比を 3:1 とし, Table 3-4. に示す組成で 4 °C で一晩 (または室温で 1 時間) ライゲーション反応を行った。

**Table 3-4. Reaction mixture for ligation.**

Component	Amount
2×Rapid Ligation Buffer	5.0 µl
pGEM-T Vector (50 ng/µl)	0.5 µl
T4 DNA Ligase (3 Weiss units/ml)	1.0 µl
PCR products	2.0 µl
Distilled water	1.5 µl
Total	10.0 µl

Incubate the reactions 1 hour at room temperature. Alternatively, incubate the reactions overnight at 4°C for the maximum number of transformants.

#### 第 5 項 形質転換

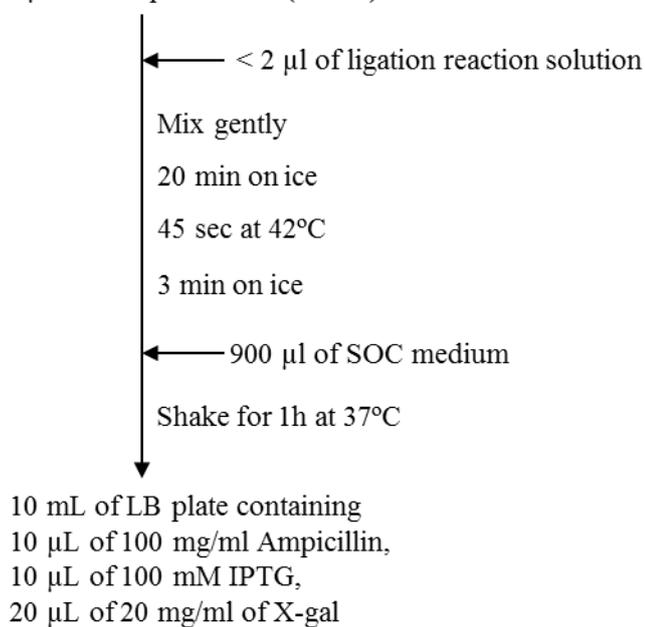
形質転換の手順は Scheme 3-2.に示した。コンピテントセルは *E. coli* DH5αを使用した。SOC 培地は, Table 3-5.の組成の培地をオートクレーブ (120 °C, 15 分) 後, 2 M の Mg<sup>2+</sup>溶液 (終濃度 20 mM) と 20 mL の 1 M glucose 溶液を加えた。

**Table 3-5. SOC medium**

Components	amount	final conc.
Bacto Tryptone	20 g	2.0%
Bacto Yeast extract	5 g	0.5%
5M NaCl	2 ml	10 mM
2M KCl	1.25 ml	2.5 mM
H <sub>2</sub> O	Fill up to 1 L	

After autoclave the solution, add 10 ml of 2M MgCl<sub>2</sub> (final conc. 20 mM) and 20 ml of a sterile 1 M glucose.

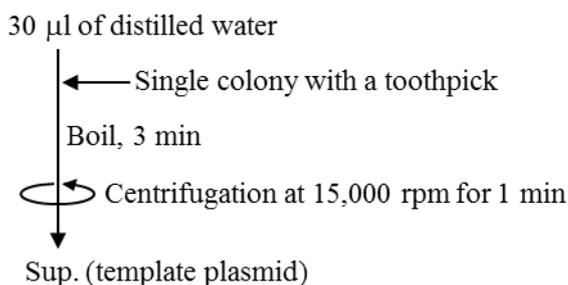
100 µl of Competent cell (DH5α)



**Scheme 3-2. Transformation**

#### 第6項 インサートチェック

インサートチェックは Scheme 3-3.に示す Boil 法により調製したプラスミドを鋳型に、プライマーT7 と sp6 を用いて Table 3-6-1 および Table 3-6-2.の条件でコロニーを直接 PCR に供し、反応産物をアガロースゲル電気泳動にて確認した。



**Scheme 3-3. Boil prep for insert check**

**Table 3-6-1. Reaction mixture for colony direct PCR**

Component	Conc.
2 × Go Taq Green Master Mix	5.0 $\mu$ l
T7 primer (10 $\mu$ M)	0.5 $\mu$ l
sp6 primer (10 $\mu$ M)	0.5 $\mu$ l
Template DNA	1.0 $\mu$ l
Distilled water	3.0 $\mu$ l
Total	10.0 $\mu$ l

**Table 3-6-2. PCR condition for colony direct PCR**

Temperature	Time	Cycle
95 °C	1.0 min	× 1
95 °C	0.5 min	× 30
55 °C	0.5 min	
72 °C	2.0 min	× 1
72 °C	10.0 min	

#### 第7項 プラスミド抽出

インサートが確認されたコロニーを培養し、菌体から Plasmid Mini Purification Kit (北海道システムサイエンス社) を用いて、添付されているプロトコールに従ってプラスミドを抽出した。

#### 第8項 塩基配列の確認

Table 3-7.に示した組成を株式会社ファスマックシーケンスサービスに外注し、塩基配列を確認した。

**Table 3-7. Mixture for DNA sequencing.**

Component	Amount
Plasmid DNA	300-600 ng
Primer	6.4 pmol
Fill up to 14 $\mu$ l with sterilized water	

#### 第9項 推定分子量および推定等電点の算出

ProtParam tool (<http://web.expasy.org/protparam/>) を用いて推定分子量および推定等電点を算出した。

#### 第4節 実験結果

##### 第1項 PpChi の塩基配列および推定アミノ酸配列

各 cDNA の塩基配列および推定アミノ酸配列の結果を Fig. 3-1 から Fig. 3-6 示す。

```

          10      20      30      40      50      60
CAGGGGGAATGCAGCCGAAACTCGCCATGTCCAAATTGGCGCACTGTTGCAGCAACTGG
1  Q G E C S R N S P C P N L A H C C S N W                20
          70      80      90      100     110     120
GGGTACTGCGGGGTTGGCAACGACTATTGTGGGAGGGTTGCCAGGGCGGGCCGTATTAT
21 G Y C G V G N D Y C G E G C Q G G P C Y                40
          130     140     150     160     170     180
GGCCCTACTCCTCCAGGCCCTTACCTCCCCTGGCTCCGGCCTGGACGCCATCCTAACT
41 G P T P P G P S P P S G S G L D A I L T                60
          190     200     210     220     230     240
AGAAGCGTTTTTCGAGAATTTCTCCCGGCCATCTCTCTTCTACTCTTACGACGTGCTC
61 R S V F E N F F P G H L S F Y S Y D V L                80
          250     260     270     280     290     300
ATTGAGGCTGCGAAATCATTCCCTCAGTTTGGCACGACGGGCGACACCGACACTCGTAAG
81 I E A A K S F P Q F G T T G D T D T R K                100
          310     320     330     340     350     360
AGAGAGATCGCTTGCTTACGCGGCGCATGTC AAGCACGAAACTGGAGGACTCACC AAAATC
101 R E I A A Y A A H V K H E T G G L T K I                120
          370     380     390     400     410     420
ACGGAGCAAACCGGAGACAATTATTGTGCAAGCTGGCGCCAGATATTCC TTGCAACGGC
121 T E Q T G D N Y C A S W R P D I P C N G                140
          430     440     450     460     470     480
CAATACAATGGTCGCGGTCTCTCCAAC TTCTGGA ACTACAATTACC TCGCAGCAGGC
141 Q Y N G R G P L Q L S W N Y N Y L A A G                160
          490     500     510     520     530     540
TCGTACTGGGTGTCGATCTCATCAACAAACCAATC TGGTGGCAACAAATAACCTCATC
161 S Y L G V D L I N K P N L V A T N N L I                180
          550     560     570     580     590     600
GCTTTCAAAACGAGCC TG TGGTTTGGATGATTTATGGAGACTGT TATCCCTCACATT
181 A F K T S L W F W M I Y G D T V I P H I                200
          610     620     630     640     650     660
CATGATGTCATGATCGGG AATTGGAGACCC TCCAGCGCCGACCAAGCTGCGAACC GCGTA
201 H D V M I G N W R P S S A D Q A A N R V                220
          670     680     690     700     710     720
CCCGGTTTCGGCGTCACC ATAGACGTTATTAACGGAGGCTTGGAGTGCAACAAATACAGC
221 P G F G V T I D V I N G G L E C N K Y S                240
          730     740     750     760     770     780
GCCCAGGCAGATGCCCGAGTGAATTATTACAAAGATTTTGC AATCGTC TGAATGTGAAT
241 A Q A D A R V N Y Y K D F C N R L N V N                260
          790     800     810     820     830     840
CCTGGTGGTAATCTGGACTGCAAAAATATGAGGCCATTTTACTCAGTTAACATGGTTGCA
261 P G G N L D C K N M R P F Y S V N M V A                280

GAAGCTTAA
281 E A *                283

```

**Fig. 3-1. Nucleotide sequence of PpChi-Ia cDNA with its deduced amino acid sequence.**

```

          10      20      30      40      50      60
CAGAATTGCAACAGCACGGTCCCGTGGCTGATCCAAACAAC TGCTGTAGCCAGTATGGA
1  Q N C N S T V P C A D P N N C C S Q Y G                20
          70      80      90      100     110     120
TATTGCGGAACCGACGATGCGTACTGCGTGATCGGGTGCCAGAACGGTCCCTGCCGCGAC
21 Y C G T D D A Y C V I G C Q N G P C R D                40
          130     140     150     160     170     180
AGCCCC TCTCCGCCACCTCCGCCGCACCACCATCGCCGCCTTCCCCACCACCACCACC
41 S P S P P P P P A P P S P P S P P P P P                60
          190     200     210     220     230     240
AGACCATCCGTCTCGCCCACACCCTCGTCTGGGGCTGGTCGCCCTCATCACGCGCAAGCTG
61 R P S V S P T P S S G A G R L I T R K L                80
          250     260     270     280     290     300
TTCGAGAAGCTCTACCCGAAC TACAACAAGACGTTTTACTCCTACGATGCC TTCATTGTC
81 F E K L Y P N Y N K T F Y S Y D A F I V                100
          310     320     330     340     350     360
GCTGCAAAATGCCTTCCCCAAATTC TGAACGAGGGGTGTCGCGAATCTCGTTTACGTGAG
101 A A N A F P K F L N E G C R E S R L R E                120
          370     380     390     400     410     420
CTCGCTGCTTGGAGTGCACACGTGCAGCAAGAAACCGCAGGCCTGGTTTACGTTGAGGAA
121 L A A W S A H V Q Q E T A G L V Y V E E                140
          430     440     450     460     470     480
ATTTCAAAATCTAGTGTCTACTGTGACGCTACCTCGACGAGGTACCC TTGTGAGCCATAC
141 I S K S S V Y C D A T S T R Y P C E P Y                160
          490     500     510     520     530     540
CAGAAGTACTTCGGTCTGGGCCCTTCAACTCTCCTGGAATTTCAACTATGGGCCTGCC
161 Q K Y F G R G P L Q L S W N F N Y G P A                180
          550     560     570     580     590     600
GGTGAAGCTCTTGGCATTGACATCC TGAAGCGACCATTCCTGGTTTCTTTTCGACCCCGTG
181 G E A L G I D I L K R P F L V S F D P V                200
          610     620     630     640     650     660
TTGGCC TTTAAGGCCTCCATATGGTTTTTGG AACACAGCCCGCAGGGCGGCATTCTTCC
201 L A F K A S I W F W N T A R E G G I P S                220
          670     680     690     700     710     720
ATACACGACGTGATCATCGGGAAATACAGGCCATCAGCAGCAGACAAGGCAGCGAACCGC
221 I H D V I I G K Y R P S A A D K A A N R                240
          730     740     750     760     770     780
ACTGTCGGCTTCGGATACACCATTAACATCATCAACGGGGCATCGAGTGTGGGAAAGGA
241 T V G F G Y T I N I I N G G I E C G K G                260
          790     800     810     820     830     840
ACTGCTACCCACAAGCAGCGAACC GCGTCAAGTACTTCTAGAGTTTAGCGAAAAGTTG
261 T A T P Q A A N R V K Y F L E F S E K L                280
          850     860     870     880     890
GAAGTGTACCCGGGGAAAAACCTCGACTGCACAAACCAAAAA TCTTTTCGCTTAG
281 E V S P G K N L D C T N Q K S F A *                298

```

**Fig. 3-2. Nucleotide sequence of PpChi-Ib cDNA with its deduced amino acid sequence.**

```

          10      20      30      40      50      60
TGCAACAAGACTGTGAGCGAGTTGTCAACGCGGAGATGTTTCGAGGCCATGTTTAAGCAC
1  C N K T V S E L F N A E M F E A M F K H      20
          70      80      90      100     110     120
CGCAACGACAAGGCTGCCACGCGCAGGGTTCTGGAGCTACGACGGCTTTATCGCTGCA
21 R N D K A A H A Q G F W S Y D G F I A A      40
          130     140     150     160     170     180
GCTAAGATGTTTCGAGAAGGACGGCTTTGGCATGGTAGGTGGCGAGGATGTCAGAAGCGG
41 A K M F E K D G F G M V G G E D V Q K R      60
          190     200     210     220     230     240
GAGCTCTCGGCCTCTTCGCTCATGTCGCGCACGAAACCTCGTGTGGATGGAGTGGAGCT
61 E L S A F F A H V A H E T S C G W S G A      80
          250     260     270     280     290     300
AAGGACGGTCCACAGCGTGGGGACTGTGCTACAACCAAGAGCTCGCGCCTGAAAAGGAT
81 K D G P T A W G L C Y N Q E L A P E K D      100
          310     320     330     340     350     360
TACTGCAAGACGGGCGATTTGATGTACCCTTGCACCGGGTGTGGTTACTACGGACGT
101 Y C K T G D L M Y P C A P G A G Y Y G R      120
          370     380     390     400     410     420
GGAGCGTTTCCCCTCTACTGGAACATAACTATGGTCCCACAGGAGTGGCTTTGAAGCAG
121 G A F P L Y W N Y N Y G P T G V A L K Q      140
          430     440     450     460     470     480
GACCTGTTACACCACCCTGAAATTCCTCCCAGAACGAAACCATTGCGTGGCAAGCAGCT
141 D L L H H P E I L S Q N E T I A W Q A A      160
          490     500     510     520     530     540
GTTTGGTACTGGATGACGCCTGCCAAGACGAGACCATCTCCTCACGAGATTATGATTGGC
161 V W Y W M T P A K T R P S P H E I M I G      180
          550     560     570     580     590     600
AAGTGGGTGCCGACGAAGAATGACACCCTCGCTTATCGCAAGCCTGGCTTCGGCATGACC
181 K W V P T K N D T L A Y R K P G F G M T      200
          610     620     630     640     650     660
ATCAATGTCAAGGCAAGTGATGTGCAATGCGGCCACGGCGAAGATCCTCGCATGCAGTCA
201 I N V K A S D V E C G H G E D P R M Q S      220
          670     680     690     700     710     720
CGAATCTCCCACTACTTGACCTTCCACAGGGACACCTCCAGTTGGATGACCCGGGCTCA
221 R I S H Y L T F L R D T F Q L D D P G S      240
          730     740     750     760     770
AATCTAGATTGCGGTCTGCAAGGTGTTATTCCACTGGCCTATGCATCAATGTAG
241 N L D C G L Q G V I P L A Y A S M *      258

```

**Fig. 3-3. Nucleotide sequence of PpChi-IIa cDNA with its deduced amino acid sequence.**

```

          10      20      30      40      50      60
CACGGACGCAAGGGACTGGTGTGCACTAAAGAGTTGAAGGAAGACGGATGCAACAAAACC
1  H G R K G L V C T K E L K E D G C N K T      20
          70      80      90     100     110     120
ATCAGTGATCTGTTACCGGTGCAAACCTTCGAGGACATGTTCAAACACCGCAACGACAGA
21 I S D L F T V Q T F E D M F K H R N D R      40
          130     140     150     160     170     180
GCTGCGCATGCCGCGGGCTTCTGGACCTACGATGGCTTCATGGCTGCAGCTCAGATGTTT
41 A A H A A G F W T Y D G F M A A A Q M F      60
          190     200     210     220     230     240
GAGAAGGACGGCTTCGCC TCCGTGGGTGGTGACGATATGCAGAAGCGGGAGCTCGCGGG
61 E K D G F A S V G G D D M Q K R E L A A      80
          250     260     270     280     290     300
TTCTTCGCCCACGTCGCCACGAAACGTCGTGGATGGAGCATGGCCAAAGATGGTCCT
81 F F A H V A H E T S C G W S M A K D G P      100
          310     320     330     340     350     360
ACCGCATGGGGACTATGCTACAACCAAGAGCTCGCTCCCATGAAAGACTACTGCAAGACT
101 T A W G L C Y N Q E L A P M K D Y C K T      120
          370     380     390     400     410     420
GGCGATTTGCTGTATCCATGTGCACCAGGTGCTGGTTACTATGGACGTGGAGCCTTTCCT
121 G D L L Y P C A P G A G Y Y G R G A F P      140
          430     440     450     460     470     480
CTCTACTGGAACTACAATTACGGTCCAAC TGGGAAGGCTCTGAAGCAGGACTTGTTCAT
141 L Y W N Y N Y G P T G K A L K Q D L L H      160
          490     500     510     520     530     540
CATCCTGAGATCCTCGCCCAAACGAAACCATAGCATGGCAAGCAGCTATTTGGTACTGG
161 H P E I L A Q N E T I A W Q A A I W Y W      180
          550     560     570     580     590     600
ATGACCCTGCCAAGACAAGGCCATCTCCTCATGAAGTTATGATCGGGAAGTGGGTGCCG
181 M T P A K T R P S P H E V M I G K W V P      200
          610     620     630     640     650     660
ACGAAGAATGATACACTTGCAAATCGTAAACCCGGCTTTGGAATGACCATCAACATTAAG
201 T K N D T L A N R K P G F G M T I N I K      220
          670     680     690     700     710     720
GCCAGCGACGTTGAGTGTGGCCATGGAGATGATCCTCGCATGCTGTCACGAATCTCCAC
221 A S D V E C G H G D D P R M L S R I S H      240
          730     740     750     760     770     780
TATTTGGACTTTCTTCAAACAAATCCAAGTTCAAGATCCTGGTGCAAACCTTGACTGC
241 Y L D F L Q N K F Q V Q D P G A N L D C      260
          790     800     810     820
GGCCTGCAAGGTGTAGTTCCTCTGGCATATGCATCAATTTAA
261 G L Q G V V P L A Y A S I *      274

```

**Fig. 3-4. Nucleotide sequence of PpChi-IIc cDNA with its deduced amino acid sequence.**

	10	20	30	40	50	60	
	CAAGGGGAGTGTTCGGAATCCACAGCCTGTCCCGACAATACCATGTGCTGTAGCCAGTAT						
1	Q	G	E	C	S	E	20
	70	80	90	100	110	120	
	AATTATTGTGGAAGTGGCGACGCCATTGTGGTGAAGTTGCAAGAATGGTCCCTGCAAC						
21	N	Y	C	G	T	G	40
	130	140	150	160	170	180	
	GCTGGTGGTACACCTCCTGCGCCTGAACCTCCAACCTCAGGTCAGGTTGGTTCGAGCTTC						
41	A	G	G	T	P	A	60
	190	200	210	220	230	240	
	TTCACCGAAGAAGTTTTCGACGGGTGGTTCCTTCCCGCAATGCTGATTTTACACCTTT						
61	F	T	E	E	V	F	80
	250	260	270	280	290	300	
	GAGCGTTTCAAGGCTGCAGCGTCCGCTTACCCGACGTTCGGTAACGAAGGATCTGTGGAT						
81	E	R	F	K	A	A	100
	310	320	330	340	350	360	
	GACCAGAAGCGAGAGATCGCTGCCTTTTTCGAAACGTCAACCAAGAATCTGGAGGCTTG						
101	D	Q	K	R	E	I	120
	370	380	390	400	410	420	
	AAATTCGTCAGAGAGACTAACCCACTGAAATATACTGCGACACGACCAACACCCAATAC						
121	K	F	V	R	E	T	140
	430	440	450	460	470	480	
	CCTTGCGCCGCTGGTAAGTCCTATTATGGGCGTGGTCCCATTTCAGCTGTCATGGAACCTAC						
141	P	C	A	A	G	K	160
	490	500	510	520	530	540	
	AACTACGGTGCATGTGGAGCTGCTCTGAAC TTGCCAC TCCTCGCCACTCCAGAGTTGGTA						
161	N	Y	G	A	C	G	180
	550	560	570	580	590	600	
	GAGACTGATGCCGATGTGGCGTTCAAGACGGCCCTCTGGTTTGGATGGCCAATCAGTGC						
181	E	T	D	A	D	V	200
	610	620	630	640	650	660	
	CACCAAGCAATCATCGGTCCTCCTCCAGTTTCGGAAAAACCATTCCGATAATCAATGGA						
201	H	Q	A	I	I	G	220
	670	680	690	700	710	720	
	GCGAAAGAGTGGCGCCTTGTAACGACGAGAGATAACGAATCGAGTTACGTACTACACC						
221	A	K	E	C	G	L	240
	730	740	750	760	770		
	AACTTCGCAATTCATTGGGCGTCGACCCTGGCACCGACCTACGGTGTCTGA						
241	N	F	C	N	S	L	257

**Fig. 3-5. Nucleotide sequence of PpChi-IV cDNA with its deduced amino acid sequence.**

	10	20	30	40	50	60															
	GCTGTGGTGAGAGGGGGTTACTGGTTGCAAGACTTGCCGCTAGTGAACATAAACTTCAAT																				
1	A	V	V	R	G	G	Y	W	L	Q	D	L	P	L	V	N	I	N	F	N	20
	70	80	90	100	110	120															
	TACGAGACGCATGTGTACTACGCGTTTGCAGGCTTGGACCCTCCTCGTACCAGGTTGTG																				
21	Y	E	T	H	V	Y	Y	A	F	A	G	L	D	P	S	S	Y	Q	V	V	40
	130	140	150	160	170	180															
	GCTCCGACCACCGACAATGGCCAGTACGCGACGTTTGTGGCCACGGCGAAGAGCTCAAAC																				
41	A	P	T	T	D	N	G	Q	Y	A	T	F	V	A	T	A	K	S	S	N	60
	190	200	210	220	230	240															
	CCTTCCGTTGTGACGCTCCTCTCCATCGGCGGAGGTGCAGCAAATTTACCACATTTGGC																				
61	P	S	V	V	T	L	L	S	I	G	G	G	A	A	N	F	T	T	F	G	80
	250	260	270	280	290	300															
	GAAATGGTGAGCACATCCACCAGGCGGCAGGCTTCATTGACAGCAGTATCTCGCTGGCT																				
81	E	M	V	S	T	S	T	R	R	Q	A	F	I	D	S	S	I	S	L	A	100
	310	320	330	340	350	360															
	CGCCAATACAGTTACGAAGGACTGGACCTAGACTGGGAGTCACCGCAAAGCCAAACAGAG																				
101	R	Q	Y	S	Y	E	G	L	D	L	D	W	E	S	P	Q	S	Q	T	E	120
	370	380	390	400	410	420															
	ATGGAAAATTTGGCGCTACTGCTACAGGAATGGCGCGCGGCTGCGCATACGGAGGCTCAA																				
121	M	E	N	L	A	L	L	L	Q	E	W	R	A	A	A	H	T	E	A	Q	140
	430	440	450	460	470	480															
	TCGTCAGGCAATACCGAGCTTCTCCACAGCTGCTGTGAGCTACCAGTCAATTCTGCTC																				
141	S	S	G	N	T	E	L	L	L	T	A	A	V	S	Y	Q	S	I	L	L	160
	490	500	510	520	530	540															
	TACACGGGTGTCGGTAATCAGGTCTGGCCGATTACCGCTTTC AACACATACTTGGACTGG																				
161	Y	T	G	V	G	N	Q	V	W	P	I	T	A	F	N	T	Y	L	D	W	180
	550	560	570	580	590	600															
	GTGAACGTGATGACCTATGATTACCACGGCTCATGGGAGCCAACCACACTACTGGCGAACAC																				
181	V	N	V	M	T	Y	D	Y	H	G	S	W	E	P	T	T	T	G	E	H	200
	610	620	630	640	650	660															
	ACAGCATTATACGACCCCAACTCCGACGTCGACACTGATTACGGAATCAACAAC TG GCTG																				
201	T	A	L	Y	D	P	N	S	D	V	D	T	D	Y	G	I	N	N	W	L	220
	670	680	690	700	710	720															
	TCAGCAGGCATGCAAGCAGACAAGATGTGCTTGGGACTTGCTTCTATGGAAAGCAGTGG																				
221	S	A	G	M	Q	A	D	K	M	C	L	G	L	A	F	Y	G	K	Q	W	240
	730	740	750	760	770	780															
	GTTCTTGCCAGTCTTGCCAACACCGGAGTAGGGGCGCCTGCCACCAGTGGTGGCGACCCC																				
241	V	L	A	S	L	A	N	T	G	V	G	A	P	A	T	S	G	G	D	P	260
	790	800	810	820	830	840															
	ATAACATATGCAGACATCGTGACTTACAACACGCAGGAGGCCACACTGTTGAGCAAGAT																				
261	I	T	Y	A	D	I	V	T	Y	N	N	A	G	G	A	T	V	E	Q	D	280
	850	860	870	880	890	900															
	TCCACTACTGTATCAATGTATAGTTACAAGTCTGACTTGACTTGGATCGGGTATGACAAT																				
281	S	T	T	V	S	M	Y	S	Y	K	S	D	L	T	W	I	G	Y	D	N	300
	910	920	930	940	950	960															
	CCTGATACTATCGCTGCGAAAGTTCAGTATGCGCAGAGTAAATCTTTGCTGGGTACTTC																				
301	P	D	T	I	A	A	K	V	Q	Y	A	Q	S	K	S	L	L	G	Y	F	320
	970	980	990	1000	1010	1020															
	GCCTGGGCACTTCATCAGGACGATGCGAATTTCTCCTTGGCGTCAGCAGGTATGAATTGA																				
321	A	W	A	L	H	Q	D	D	A	N	F	S	L	A	S	A	G	M	N	*	340

**Fig. 3-6. Nucleotide sequence of PpChi-Vb cDNA with its deduced amino acid sequence.**

## 第2項 推定分子量・推定等電点

各遺伝子の推定分子量・推定等電点の算出の結果を Table 3-8 に示す。

**Table 3-8. Theoretical isoelectric points and molecular masses of PpChi candidate genes.**

Name	Theoretical pI / Molecular mass
PpChi-Ia	5.85 / 30759.4
PpChi-Ib	8.34 / 34299.9
PpChi-IIa	5.84 / 28721.5
PpChi-IIc	6.37 / 30446.5
PpChi-IV	4.55 / 27789.6
PpChi-Vb	4.17 / 36853.6

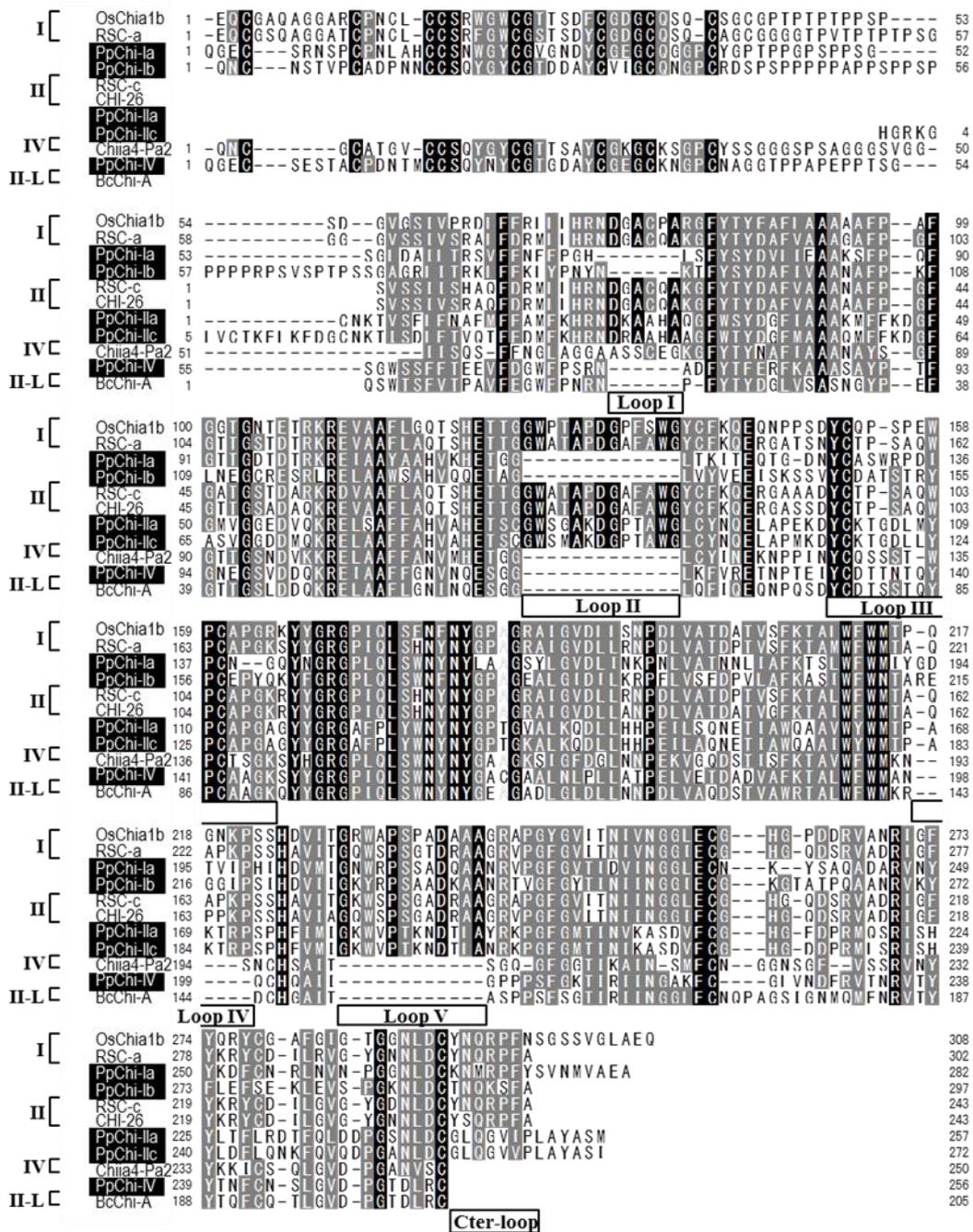
## 第3項 データベースとの比較

cDNA クローニングによって得られた塩基配列をデータベースから得られるロボティックにアノテーションされた推定 mRNA の塩基配列と比較した結果、PpChi-IIa, IIc, IV, Vb では完全に一致したが、PpChi-Ia および Ib では推定 mRNA とは異なる配列があった。ゲノム配列と比較した結果、推定 mRNA 配列と本研究で得られた cDNA の配列は、何れもゲノム配列と完全に一致する領域があり、本配列の違いはエキソンの違いに起因することが明らかとなった (Fig. 3-7)。推定 mRNA と取得 cDNA 配列は何れもフレームシフトによるストップコドンの出現は無く、N 末端と C 末端配列は一致した。キチン分解活性に必須な酸触媒残基であるグルタミン酸残基 (PpChi-Ia では 113Glu, PiChi-Ib では 131 残基目) は両方の配列で保持されているが、塩基触媒残基であるグルタミン酸残基 (PpChi-Ia では 122Glu, PiChi-Ib では 140 残基目。Fig. 3-7 のアスタリスクで示している) が cDNA にはあるが、推定 mRNA には相当する領域にグルタミン酸残基は見当たらなかった。



#### 第4項 相同性比較

得られた cDNA から推定されるアミノ酸配列と他の植物由来のキチナーゼとの構造依存的マルチプルアライメントを行った (Fig. 3-8 および 3-9)。PpChi-Ia および Ib はクラス I キチナーゼではあるが、ループ I およびループ II の抜けたクラス I 様のキチナーゼであることが分かった。PpChi-IIa および IIc はループ領域が全てそろったクラス II, PpChi-IV は触媒ドメインのループ I, II, IV, V および C 末端ループの欠損したクラス IV, PpChi-Vb は他のクラス V キチナーゼと同様の  $\alpha/\beta$  ドメイン領域を持つクラス V キチナーゼであることが分かった。系統樹解析においても、PpChi-Ia, Ib, IIa, IIc はクラス I および II キチナーゼと、PpChi-IV はクラス IV および II-L と、PpChi-Vb はクラス V キチナーゼと、それぞれ遺伝的な距離が近いことが明らかとなった。



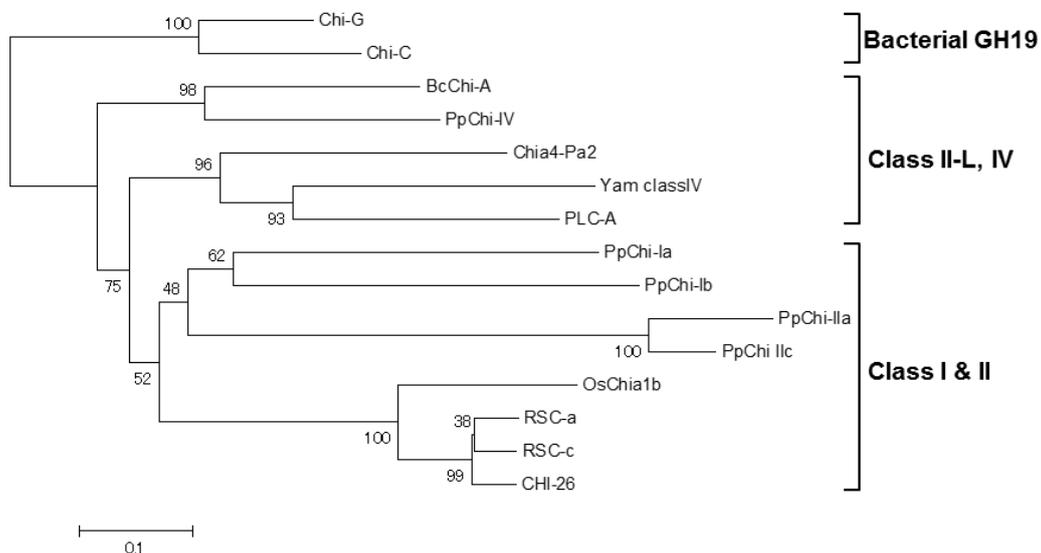
**Fig. 3-8. Multiple sequence alignments among PpChi-Ia, Ib, IIa, IIc, and IV, and other plant GH19 chitinases.**

I, II, II-L, and IV indicate plant class I, II, II-L, and IV chitinases, respectively. Identical residues are shown in white with a black background. Similar residues, constituting more than half of them, are shown in white with a gray background. Dashes indicate gaps. OsChia1b, class I chitinase from *Oryza sativa* (Q7DNA1); RSC-a, class I chitinase from *Secale cereale* (Q9FRV1); CHI-26, class II chitinase from *Hordeum vulgare* (P23951); RSC-c, class II chitinase from *S. cereale* (Q9FRV0); Chia4-Pa2, class IV chitinase from *Picea abies* (AAQ17051); BcChi-A, class II-L chitinase from *Bryum coronatum* (BAF99002).



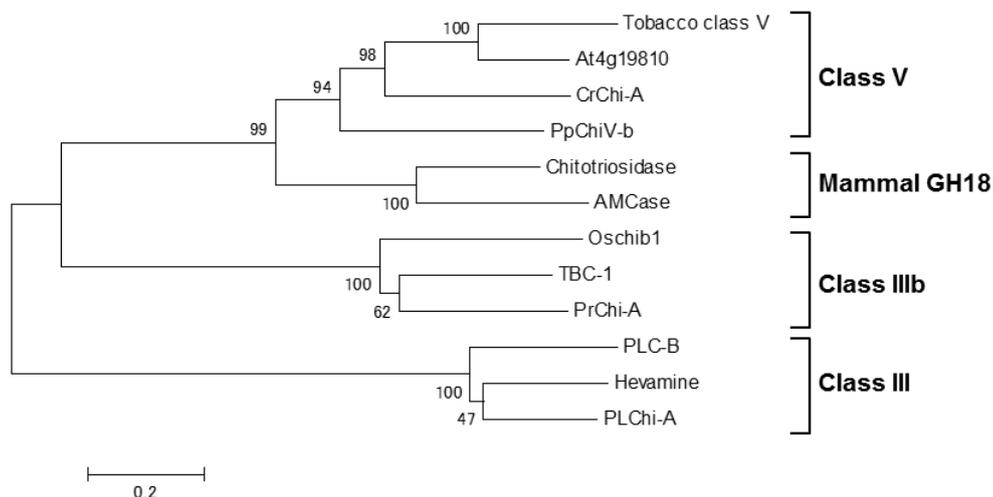
**Fig. 3-9. Structure-based sequence alignments among PpChi-Vb, plant GH18 chitinases and mammal chitinases.**

III, IIIb, and V indicate plant class III, IIIb, and V chitinases, respectively. “mam.” indicates GH18 chitinases from mammals. Identical residues are shown in white with a black background. Similar residues, constituting more than half of them, are shown in white with a gray background. Dashes indicate gaps. “h” and “s” indicate  $\alpha$ -helices and  $\beta$ -strands, respectively. The  $\alpha$ -helices and  $\beta$ -strands shown on the top of sequences are the secondary structures of Hevamine (PDB ID: 2HVM). The  $\alpha$ -helices and  $\beta$ -strands at the bottom of the sequences are the secondary structures of human chitotriosidase (PDB ID: 1HKK). Hevamine, plant class III chitinase from *Hevea brasiliensis* (P23472); PLChi-A, plant class III chitinase from pineapple leaves (BAG38685); TBC-1, plant class IIIb chitinase from *Tulipa bakeri* (Q9SLP4); PrChi-A, plant class IIIb chitinase from *Pteris ryukyuensis* (BAE98134); CrChi-A, *C. revoluta* chitinase-A (BAD98525); Tobacco class V, plant class V chitinase from *Nicotiana tabacum* (CAA54374); Chitotriosidase, chitinase from *Homo sapiens* (AAG10644).



**Fig. 3-10. Phylogenetic analysis of PpChi-Ia, Ib, IIa, IIc and IV, and other GH19 chitinases.**

A phylogenetic tree was constructed based on an alignment of partial amino acid sequences of all GH-19 chitinases by using the neighbor-joining method (Saitou and Nei 1987) implemented in the Clustal W program. The sequence regions used for the alignment are indicated in Fig. 3-8. Phylogenetic analyses were conducted in MEGA6 (Tamura et al. 2007).



**Fig. 3-11. Phylogenetic analysis of PpChi-V and GH18 chitinases.**

A phylogenetic tree was constructed based on an alignment of partial amino acid sequences of all GH-18 chitinases by using the same method in Fig. 3-10. The sequence regions used for the alignment are indicated in Fig. 3-9.

## 第5節 考察

cDNA クローニングによって得られた塩基配列とデータベースから得られる推定 mRNA の塩基配列とを比較した結果, PpChi-IIa, IIc, IV, Vb は完全に一致した。しかし, PpChi-Ia および Ib においては推定 mRNA とは異なる配列が得られた。ゲノム配列と比較した結果, 得られた塩基配列と推定 mRNA の塩基配列の違いはエキソンの違いであった (Fig. 3-7)。本研究で得られた cDNA の配列とゲノム DNA の配列を比較して, エキシソンの配列を確定した。確定したエキソンの配列には, キチン分解活性に必須な触媒残基であるグルタミン酸残基が存在していた。一方, データベースに登録されている推定 mRNA には, このグルタミン酸残基は存在していなかった。従って, 本研究で得られた cDNA の配列が, PpChi-Ia および Ib の mRNA の正しい塩基配列であると判断した。

得られた cDNA から推定されるアミノ酸配列と他の植物由来のキチナーゼとの構造依存的マルチプルアライメントを行った結果 (Fig. 3-8 および 3-9), PpChi-Ia および Ib はクラス I キチナーゼに属するが, ループ I およびループ II が抜けたクラス I 様のキチナーゼであることが分かった。このループの有無が, キチン分解活性に何らかの影響を与えることが予想される。PpChi-IIa および IIc はループ領域が全てそろったクラス II, PpChi-IV は触媒ドメインのループ I, II, IV, V および C 末端ループの欠損したクラス IV, PpChi-Vb は他のクラス V キチナーゼと同様の  $\alpha/\beta$  ドメイン領域を持つクラス V キチナーゼであることが分かった。系統解析によって, PpChi-Ia, Ib, IIa, IIc はクラス I および II キチナーゼと, PpChi-IV はクラス IV および II-L と, PpChi-Vb はクラス V キチナーゼと遺伝的な距離が近いことが明らかとなった。これらのことから, ヒメツリガネゴケの 6 種のキチナーゼ候補遺伝子の cDNA を取得することができたと判断した。

## 第4章 ヒメツリガネゴケ由来キチナーゼ(PpChi)の発現系・精製法の構築

### 第1節 緒論

ヒメツリガネゴケの茎葉体より抽出した mRNA を鋳型に RT-PCR 法によって 6 種のキチナーゼ候補遺伝子の cDNA を合成し、クローニングによって制限酵素サイト付き PpChi 遺伝子を得た。本章では、PpChi の性質について調べるために、それぞれの PpChi 遺伝子を発現し、組換えタンパク質を精製する実験系の構築を目的とした。

### 第2節 実験材料

#### 第1項 材料および試薬

プライマーの合成は、Life Technologies 社に依頼した。制限酵素 *NdeI*, *BamHI*, *EcoRI* は TOYOBO 社, QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit は Agilent Technologies 社, トリプトンはナカライテスク株式会社, 酵母エキスは関東化学株式会社, キチンは生化学工業株式会社より購入した。Phenyl Superose カラムはファルマシア社, Mono-Q カラム, SP Sepharose Fast Flow, HiTrap SP HP カラム, HiTrap Q HP カラム, GSTrap FF カラム (1 ml) は GE ヘルスケア社より購入した。その他の試薬は、全て市販の特級またはそれに準ずるものを用いた。

#### 第2項 プライマー

インサートチェックに用いたプライマーは、第3章、第2節、第2項、Table 3-1. と同様のものを使用した。サイトダイレクト, GST 融合タンパク質のクローニングに用いたプライマーは、Table 4-1. に示した。

#### 第3項 コンピテントセルの調製

コンピテントセルは、第3章、第2節、第3項と同様に調製した。

#### 第4項 培地の調製

形質転換体の培養に用いた培地は、アンピシリン（100 µg/ml）含有の LB 培地（1% トリプトン、0.5% 酵母エキス、1% NaCl, pH 7.2）を使用した。

**Table 4-1. Primers for site-directed mutagenesis, subcloning to several expression vectors, and sequencing**

Primer	Sequence (5' → 3')
PpChi-Ib_SD_f	TTGGCCTTTAAGGCCTCAATCTGGTTTTGGAACA
PpChi-Ib_SD_r	TGTTCCAAAACCATATTGAGGCCTTAAAGGCCAA
PpChi-Vb_SD_f	GGTGCGCACCCATAACTTATGCAGACATC
PpChi-Vb_SD_r	GATGTCTGCATAAGTTATGGGGTCCGCCACC
PpChi-Ib_f_BamHI	<u>GGATCCC</u> CAGAATTGCAACAGCAC
PpChi-Ib_r_EcoRI	<u>GAATTC</u> CCTAAGCGAAAGATTTTTGGTTT
PpChi-IIa_f_BamHI	<u>GGATCC</u> TGCAACAAGACTGTGA
PpChi-IIa_r_EcoRI	<u>GAATTC</u> CCTACATTGATGCATAGGCCA
PpChi-IIc_f_BamHI	<u>GGATCCC</u> ACGGACGCAAG
PpChi-IIc_r_EcoRI	<u>GAATTC</u> TTAAATTGATGCATATGCCAGA
pGEX_f_seq_primer	GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG
pGEX_r_seq_primer	CCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGG

Single and double underlines indicate BamHI and EcoRI restriction sites, respectively.

#### 第 5 項 グリコールキチンの調製

グリコールキチンは、Yamada と Imoto (1981) の方法に従って調製した。キチン 5 g を 42% 水酸化ナトリウム溶液 100 ml に懸濁し、室温で真空ポンプを用いて減圧下 (-20 mmHg) で 4 時間膨潤させた。ガラスフィルター (17G-1) 上でろ過し、同水酸化ナトリウム溶液 200 ml で洗浄した。キチンが 15 g 以下になるまでプレスした後、細かく粉碎し、-70°C に冷却した氷 50 g を加え激しく攪拌して、ゲル化した。ゲル中の水酸化ナトリウム濃度が 14% になるように 18% 水酸化ナトリウム溶液を加え、氷中で攪拌しながら、エチレンクロロヒドリン 10 ml を 30 分かけて滴下した。室温で一晩放置した後、氷中で攪拌しながら無水酢酸 10 ml を 30 分かけて滴下してアセチル化した。30 分攪拌した後、酢酸で中和した。これを透析膜 (MW 12,000 カット) に移し、4 °C で流水 (水道水) により 2 日間透析した。透析膜内液を取り出してミキサーで攪拌した後、蒸留水に対して透析を続けた。2 日後、同様に透析膜内液を取り出してミキサーで攪拌し、さらに蒸留水で 2 日間透析を続けた。透析後、

透析膜内液を遠心分離し，上清をエバポレーターで 6 倍濃縮した溶液をグリコールキチン標品とした。得られたグリコールキチンをオートクレーブ（120 °C，15 分）した後，分注し 4 °C で保存した。

### 第 3 節 実験方法

#### 第 1 項 部位特異的変異導入

クローニングした PpChi-Ib, Vb 遺伝子には，コーディング領域内に制限酵素 *NdeI* サイトが存在していた。コーディング領域内に *NdeI* サイトがあると，ベクター交換の際に不都合があるため，**QuikChange II Site – Directed Mutagenesis Kit** を用いて，添付されているプロトコールに従ってアミノ酸配列に置換が生じないようにコーディング領域内の *NdeI* サイトの 1 塩基を変異させた。プライマーは Table 4-1. に示したものを使用し，反応組成は Table 4-2-1 に，反応条件は Table 4-2-2 および 3-2-3 に示した。サーマルサイクラーによって変異鎖合成反応を行った後，37 °C 以下に冷やした反応溶液に *DpnI* (10 U/μl) を 0.2 μl 添加し，37 °C で 1 時間反応させる事でテンプレートプラスミドの分解を行った。反応溶液を大腸菌 DH5α コンピテントセルと混合し，常法に従って形質転換体を得た。

**Table 4-2-1. Reaction mixture for site-directed mutagenesis.**

Component	Amount
10 × Reaction Buffer	1.0 µl
Template DNA (1-10 ng)	0.5 µl
dNTP Mix	0.8 µl
PfuUltra HF DNA polymerase (2.5 U / µl)	0.4 µl
Primer f (5 µM)	0.5 µl
Primer r (5 µM)	0.5 µl
Distilled water	6.3 µl
Total	10.0 µl

**Table 4-2-2. Cycling parameters for site-directed mutagenesis in PpChi-Ib gene.**

Temperature	Time	Cycle
95 °C	0.5 min	× 1
95 °C	0.5 min	
55 °C	1.0 min	× 12
68 °C	4.0 min	

**Table 4-2-3. Cycling parameters for site-directed mutagenesis in PpChi-Ib gene.**

Temperature	Time	Cycle
95 °C	0.5 min	× 1
95 °C	0.5 min	
55 °C	1.0 min	× 12
68 °C	4.5 min	

## 第 2 項 制限酵素処理

制限酵素サイトが付加されたことが確認された PpChi のプラスミドと、発現用ベクター pET22b のプラスミドを制限酵素 *NdeI*, *BamHI* によって酵素処理した。

**Table 4-3. Mixture of restriction enzyme reaction.**

Component	Insert	Vector
10 × M buffer	1 µl	2 µl
PpChi/pGEM	3 µl	—
pET22b	—	10 µl
BamHI (10 units/µl)	1 µl	1 µl
NdeI (20,000 units/ml)	1 µl	1 µl
Distilled water	4 µl	6 µl
Total	10 µl	20 µl

## 第 3 項 発現用ベクターへのサブクローニング

#### 1) アガロースゲルからの DNA 断片の抽出

制限酵素処理した反応液はアガロース電気泳動に供し、第 2 章、第 3 節、第 6 項に示した手順でアガロースゲルから DNA 断片を抽出した。

#### 2) ライゲーション反応

ゲルから抽出した DNA を低量し、発現用の pET22b Vector とのモル比を 3:1 とし、Table 4-4.に示す組成で 4 °C で一晩（または、室温で 1 時間）ライゲーション反応を行った。

**Table 4-4. Reaction mixture for ligation.**

Component	Amount
2×Rapid Ligation Buffer	5.0 µl
pET22b Vector	1.0 µl
T4 DNA Ligase (3 Weiss units/ml)	1.0 µl
PCR products	2.0 µl
Distilled water	1.0 µl
Total	10.0 µl

#### 第 4 項 形質転換

コンピテントセルに *E. coli* DH5α を用いて、第 2 章、第 3 節、第 7 項と同様に行った。

#### 第 5 項 インサートチェック

第 2 章、第 3 節、第 8 項と同様に行った。プライマーは T7 と T7-ter. を使用した。

#### 第 6 項 *E. coli* BL21(DE3) によるリコンビナント PpChi の発現

それぞれのクローンのシングルコロニーをアンピシリン含有 LB 培地 3 ml に接種し、37°C で一晩振とう培養した。培養液をアンピシリン含有 LB 培地 100 ml に 1 ml 加え、OD<sub>600</sub> = 0.4~0.8 になるまで 37°C で振とう培養した。その後、100 mM IPTG を添加し(PpChi-Ia, Ib, IIa, IIc, IV, Vb それぞれの終濃度は 0.1, 0.1, 1.0, 1.0, 1.0, 1.0 mM) , さらに 24 時間、18 °C で培養を継続した。菌体は 4 °C、10,000 rpm

で5分間遠心することにより回収し、菌体量の7倍量の20 mM Tris-HCl (pH 8.0)を加えて懸濁した後、超音波にて破碎した。破碎液を遠心分離し、上清を可溶性画分(粗酵素)、沈澱物を不溶性画分とした。

#### 第7項 キチナーゼ活性測定

グリコールキチンを用いて、Imoto と Yagisita (1971) の方法に従ってキチナーゼの活性を測定した。0.2%グリコールキチンを含む0.1 Mの緩衝液(PpChi-Ia, PpChi-IV, pH 4.0; PpChi-Vb, pH 5.0) 0.25 mlに酵素サンプル溶液10 µlを加え、37 °Cで15分間煮沸した。これに0.5 M炭酸ナトリウムを含む0.05%フェリシアン化カリウム溶液1 mlを加え、15分間煮沸した。その後水中で冷却した後、420 nmにおける吸光度を測定した(吸光度 A)。また、反応系に酵素サンプル溶液と同量の蒸留水を加えた反応液を同様に反応させ、420 nmにおける吸光度を測定した(吸光度 B)。吸光度 Bから吸光度 Aを差し引いた値( $\Delta$ 420 nm)をキチナーゼ活性とした。1 unit は、37 °Cで1分間に*N*-アセチルグルコサミンを1 µmol遊離させる量とした。

#### 第8項 SDS-PAGE

SDS-PAGEは、0.1% SDSおよび5% β-メルカプトエタノール存在下で試料を3分間煮沸処理後、15%ポリアクリルアミドゲルを用い、Laemmliらの方法(1970)に従って行った。泳動後のタンパク質の染色にはクマシーブリリアントブルーR-250を用いた。不溶性画分は1% SDSで溶解して試料とした。サイズマーカーはPageRuler Unstained Protein Ladder #26614 (Thermo Scientific 社)を用いた。

#### 第9項 タンパク質の定量

タンパク質の定量は280 nmの吸収値とBCA法により測定した。牛血清アルブミンで検量線を作成し、Thermo Scientific社のPIERCE BCA Protein Assay Kitを用いて行った。

#### 第10項 組換えタンパク質の精製

##### 1) PpChi-Ia

第8項で得られた可溶性画分を10 mM 酢酸ナトリウム緩衝液(pH 5.0)で透析し、凝集したタンパク質を10,000×gで20分間遠心分離することにより除去し、その上清を同緩衝液で平衡化したSP Sepharose Fast Flow カラム(10 mm×50 mm)に供した。非吸着タンパク質を洗浄後、0.5 M NaClを含む同緩衝液で吸着タンパク質を2 ml ずつ溶出した。活性の高かった画分を10 mM トリス-塩酸緩衝液(pH 8.0)で透析し、同緩衝液で平衡化したHiTrap Q HP カラム(1 ml)を用いた陰イオン交換クロマトグラフィーに供した。流速0.5 ml/min, 塩化ナトリウム濃度を0から0.5 Mまで40分の直線的塩濃度勾配により、吸着タンパク質を溶出・分離した。最も活性の高かった画分を10 mM 酢酸ナトリウム緩衝液(pH 5.0)で透析し、同緩衝液で平衡化したHiTrap SP HP カラム(1 ml)を用いた陽イオン交換クロマトグラフィーに供した。流速0.5 ml/min, 塩化ナトリウム濃度を0から0.5 Mまで40分の直線的塩濃度勾配により、吸着タンパク質を溶出・分離した。組換えタンパク質は精製後、SDS-PAGEにより確認した。

## 2) PpChi-IV

第8項で得られた可溶性画分を10 mM 酢酸ナトリウム緩衝液(pH 4.0)で透析後、凝集したタンパク質を10,000×gで20分間遠心分離することにより除去した。得られた上清を10 mM 酢酸ナトリウム緩衝液(pH 5.0)で透析し、4 M 硫酸アンモニウムを含む80 mM 酢酸ナトリウム緩衝液(pH 5.0)と3:1で混合し、1 M 硫酸アンモニウムを含む20 mM 酢酸ナトリウム緩衝液(pH 5.0)で平衡化したPhenyl Superose カラム(0.5×5 cm)を用いた疎水相互作用クロマトグラフィーに供した。流速0.5 ml/min, 同緩衝液にて非吸着画分を溶出後、硫酸アンモニウムの濃度を1から0 Mまで40分の直線的濃度勾配により、吸着タンパク質を溶出・分離した。最も活性の高かった画分を10 mM 酢酸ナトリウム緩衝液(pH 5.0)で透析し、同緩衝液で平衡化したMono-Q カラム(5×50 mm)を用いた陰イオン交換クロマトグラフィーに供した。流速0.5 ml/min, 塩化ナトリウム濃度を0から0.2 Mまで40分の直線的塩濃度勾配により、吸着タンパク質を溶出・分離した。組換えタンパク質は精製後、SDS-PAGEにより精製度を確認した。

## 3) PpChi-Vb

第8項で得られた可溶性画分を10 mM酢酸ナトリウム緩衝液(pH 4.0)で透析後、凝集したタンパク質を10,000×gで20分間遠心分離することにより除去した。得られた上清を10 mM酢酸ナトリウム緩衝液(pH 5.0)で透析し、同緩衝液で平衡化したHiTrap Q HPカラム(1 ml)を用いた陰イオン交換クロマトグラフィーに供した。流速0.5 ml/min, 塩化ナトリウム濃度を0から0.3 Mまで40分の直線的塩濃度勾配により、吸着タンパク質を溶出・分離した。組換えタンパク質は精製後、SDS-PAGEにより確認した。

#### 第11項 大腸菌 *Rosetta-gami*によるリコンビナント PpChiの発現

第6項で得られた発現プラスミドと大腸菌 *Rosetta-gami*のコンピテントセルを用いて形質転換した。得られた形質転換体のシングルコロニーをアンピシリン含有LB培地3 mlに接種し、37 °Cで一晩振とう培養した。培養液をアンピシリン含有LB培地100 mlに1 ml加え、OD<sub>600</sub>=0.4~0.8になるまで37 °Cで振とう培養した。その後、100 mM IPTGを添加し(PpChi-Ib, IIa, IIcの終濃度はそれぞれ1.0 mM), さらに48時間、18 °Cでの振とう培養を継続した。菌体は10,000×gで5分間遠心することにより回収し、菌体量の7倍量の20 mM Tris-HCl (pH 8.0)を加えて懸濁した後、超音波にて破碎した。破碎液を遠心分離し、上清を可溶性画分(粗酵素)、沈澱物を不溶性画分とした。

#### 第12項 GST融合タンパク質の発現と精製

##### 1) GST融合タンパク質の発現

第2章,第3節,第9項で得られたpGEM-T Vectorに連結した各遺伝子(PpChi-Ib, IIa, IIc)のプラスミドを鋳型に、Table 4-1.に示した *Bam*HIおよび *Eco*RIサイトを付加したプライマーを用いて Table 4-5-1.および Table 4-5-2.に示す条件でPCRを行った。

**Table 4-5-1. Reaction mixture for PCR**

Component	Amount
10 × <i>EX Taq</i> Buffer	1.0 µl
TaKaRa <i>EX Taq</i> (0.5 units/µl)	0.5 µl
dNTP Mix (2.5 mM)	0.8 µl
Template DNA	0.4 µl
Forward primer (10 µM)	0.5 µl
Reverse primer (10 µM)	0.5 µl
Distilled water	6.3 µl
Total	10.0 µl

**Table 4-5-2. PCR condition**

Temperature	Time	Cycle
95 °C	1.0 min	× 1
95 °C	0.5 min	× 30
55 °C	0.5 min	
72 °C	1.0 min	
72 °C	10.0 min	× 1

得られた PCR 産物を，第 3 章，第 3 節，第 3 項から第 8 項までと同様にクローニングした。

得られた組換えプラスミドと， pGEX-6P-3 Vector のプラスミドを制限酵素 *Bam*HI および *Eco*RI によって酵素処理した後，第 4 章，第 3 節，第 1 項から第 5 項までと同様に行い，大腸菌 BL21(DE3)の形質転換体を得た。インサートチェックに使用したプライマーは Table 4-1.に示した pGEX\_seq\_primer を用いた。

得られた形質転換体を用いて，第 4 章，第 3 節，第 8 項と同様の手順で GST 融合タンパク質を発現した。添加された IPTG の終濃度は PpCh-Ib, IIa, IIc それぞれ 1.0, 1.0, 1.0 mM である。

## 2) GST 融合タンパク質の精製

GST 融合タンパク質は，GSTrap FF カラム (1 ml, GE Healthcare Life Sciences 社) を用い，取扱説明書に従って精製した。カラムへの送液は，ペリスタポンプ (流速 0.5 ml/min) を用いた。カラムを Binding buffer により平衡化した後，1) で得られたサンプルの上清を供した。非吸着タンパク質を洗浄後，PreScission cleavage buffer を 5 ml 流し，同 buffer に溶かした PreScission Protease (0.5%) を 1 ml をシリンジにより注入した。注入後，カラムの上下端を密閉し，4°C で 4 時間静置した。同 buffer 3 ml をシリンジにより注入し，タンパク質を溶出した。組換えタンパク質は精製後，SDS-PAGE により確認した。使用した緩衝液の組成は Table 4-6 に示した。

**Table 4-6. Buffer used for purification of GST fusion protein.**

	Reagents	Conc.
Binding buffer (PBS, pH 7.3)	NaCl	140 mM
	KCl	2.7 mM
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>3</sub>	10 mM
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.8 mM
PreScission cleavage buffer (pH 8.0)	Tris-HCl	50 mM
	NaCl	100 mM
	EDTA	1 mM
	DTT	1 mM

### 第 13 項 *Brevibacillus* によるリコンビナント PpChi の発現

#### 1) *Brevibacillus* の形質転換

第 4 章, 第 3 節, 第 14 項で得られた pGEX-6P-3 vector と各遺伝子 (PpChi I-b, II-a, II-c) を連結したプラスミドを制限酵素 *Bam*HI および *Eco*RI によって処理しインサート配列を調製した。pNCMO2 vector を同制限酵素で処理した後, 第 3 章, 第 3 節, 第 3 項から第 8 項までと同様の手順でインサート配列と連結しプラスミドを得た。TaKaRa *Brevibacillus* Expression System II のプロトコールに従って, 各遺伝子が連結された pNCMO2 vector プラスミドを *Brevibacillus* のコンピテントセルに形質転換した。

#### 2) *Brevibacillus* の形質転換組換え体を用いた目的タンパク質の発現

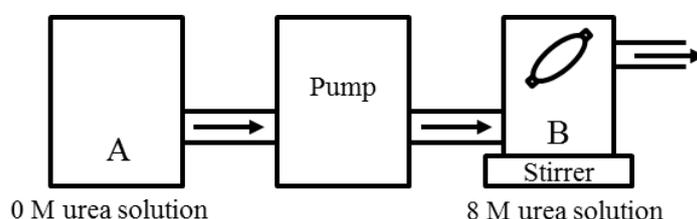
2 ml の 2SYNm (2% グルコース, 4% Bacto Soytone, 0.5% Bacto Yeast Extract, 1 mM CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 50 µg/ml ネオマイシン) および 2 ml の TMNm (1% グルコース, 1% ファイトンペプトン, 0.5% エルリッヒ カツオエキス, 0.2% 粉末酵母エキス S, 0.001% FeSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O, 0.001% MnSO<sub>4</sub>·4 H<sub>2</sub>O, 0.0001% ZnSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O, 10 µg/ml ネオマイシン, pH 7.0 に調整) を分注した試験管に形質転換体のシングルコロニーをそれぞれ植菌し, 30°C, 150 rpm, 48 時間振とう培養した。培養液を遠心分離 (5000×g, 5 分間) し, 上清を分離した。沈殿は等量の PBS (0.8% NaCl, 0.02% KCl, 0.115% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.02% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) で懸濁した。上清および沈殿の懸

濁液を用いて SDS-PAGE とキチナーゼの活性により遺伝子発現を評価した。

#### 第 14 項 タンパク質の巻き戻し (透析法)

##### 1) 透析法

pET22b vector に連結した PpChi-IIa が組み込まれた *E. coli* BL21(DE3) の形質転換体を第 4 章, 第 3 節, 第 8 項と同様に培養し, 得られた沈殿物をさらに 7 倍量の 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) を加えて懸濁した後, 超音波にて破碎した。破碎液を遠心分離し, 沈殿物を回収した。マイクロチューブに沈殿物 5 mg を取り, 8 M 尿素溶液 [0.584 M Tris-HCl (pH 8.6), 8.125 M 尿素, 5.37 mM EDTA] 1 ml を加えて懸濁した。懸濁液に 2-メルカプトエタノール 5  $\mu$ l を加えて, マイクロチューブ内を窒素で満たし, 1 時間還元させた。得られた還元溶液に, 限界まで溶かしたシスチンを含む 8 M 尿素溶液 200  $\mu$ l を加えて 8 M 尿素透析溶液 [0.1 M Tris-HCl (pH 8.), 8 M 尿素, 1 mM EDTA, 3.6 mM 2-メルカプトエタノール, シスチンを限界まで溶解] 100 ml を用いて, 流速 0.1 ml/min, 66 時間かけて透析を行った。透析は, Fig. 3-22. に示すように, 尿素を含まない透析液 400 ml で徐々に希釈した。



**Scheme 4-1. Device to gradually dilute the urea concentration in the dialysate.**

The device is fed into the gradually by pump from 0M urea solution 400ml (A) to 8M urea solution (B).

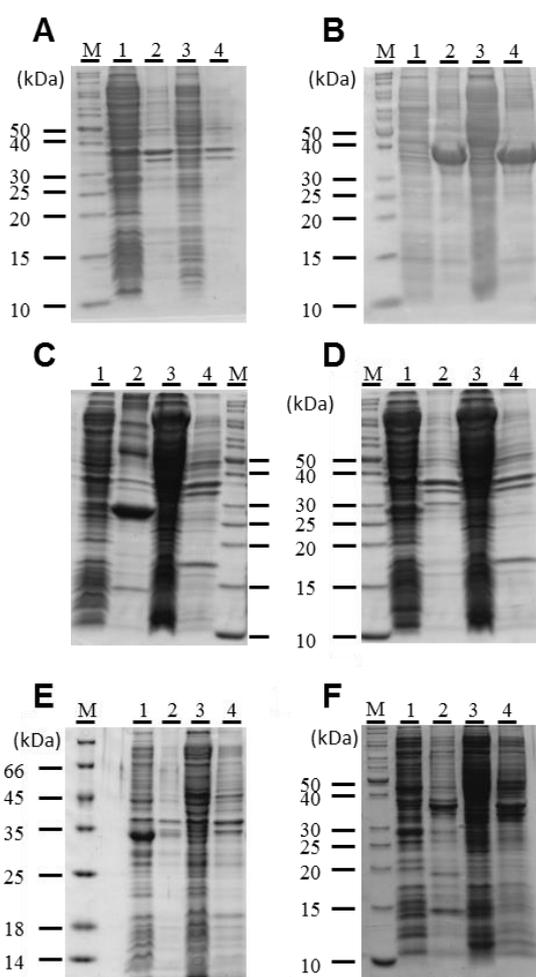
##### 2) 組換えタンパク質の精製

尿素溶液を用いた透析により得られた粗酵素溶液を 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) で透析し, 同緩衝液で平衡化した HiTrap Q HP カラム (1 ml) を用いた陰イオン交換クロマトグラフィーに供した。流速 0.5 ml/min, 塩化ナトリウム濃度を 0 から 0.5 M まで 40 分の直線的塩濃度勾配により, 吸着タンパク質を溶出・分離した。組換えタンパク質は, SDS-PAGE と活性測定により確認した。

## 第4節 実験結果

### 第1項 *E. coli* BL21(DE3)によるリコンビナント PpChi の発現

*E. coli* BL21(DE3) の形質転換体を IPTG により誘導し、24 時間 18°C で培養後、得られた可溶性画分と不溶性画分の SDS-PAGE の結果を Fig. 4-2 に示した。PpChi-Ia, IV, Vb では目的タンパク質が検出され、キチナーゼ活性も確認されたため、精製を進めた。PpChi-Ib, IIa, IIc では、目的タンパク質は可溶性画分に確認されず、活性もなかったため、別の発現方法を試みた。



**Fig. 4-2.** SDS-PAGE for expression of recombinant PpChi by BL21 (DE3).

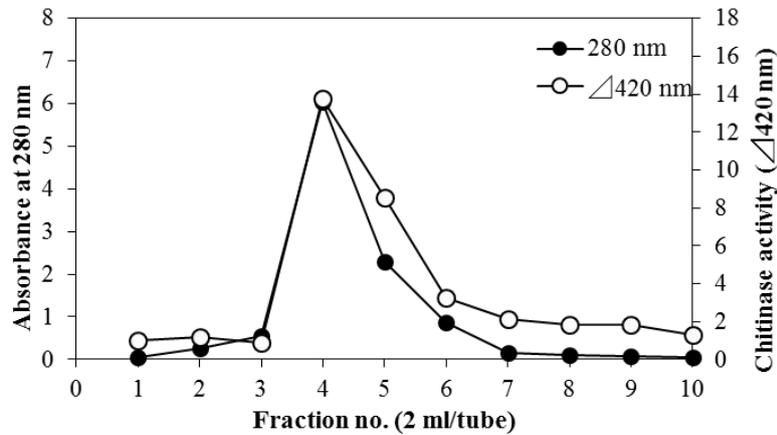
A, PpChi-Ia; B, PpChi-Ib; C, PpChi-II-a; D, PpChi-II-c; E, PpChi-IV; F, PpChi-V-b. Lane M, standard marker proteins (kDa); lane 1, supernatant of induced culture; lane 2, precipitation of induced culture; lane 3, supernatant of non-induced culture; lane 4, precipitation of non-induced culture, respectively.

第2項 組換えタンパク質の精製

1) PpChi-Ia

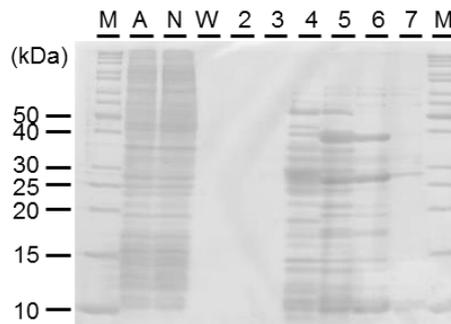
a) SP Sepharose Fast Flow カラムを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー

10 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) での透析後に得られた上清を SP Sepharose Fast Flow カラムを用いた陽イオン交換クロマトグラフィーに供した。その結果を Fig. 4-3. と Fig. 4-4. に示した。活性の高かった画分 4, 5, 6 を混合し, HiTrap Q HP カラムで精製した。



**Fig. 4-3. SP Sepharose FF cation-exchange column chromatography of recombinant PpChi-Ia.**

Sample solution obtained after dialysis against 10 mM sodium acetate buffer (pH 5.0) was applied to a column of SP Sepharose FF equilibrated with the same buffer. The column was washed with the equilibration buffer, and adsorbed proteins were eluted with NaCl from 0.5 M in the buffer. The fraction no.4-6 were collected as active fraction.

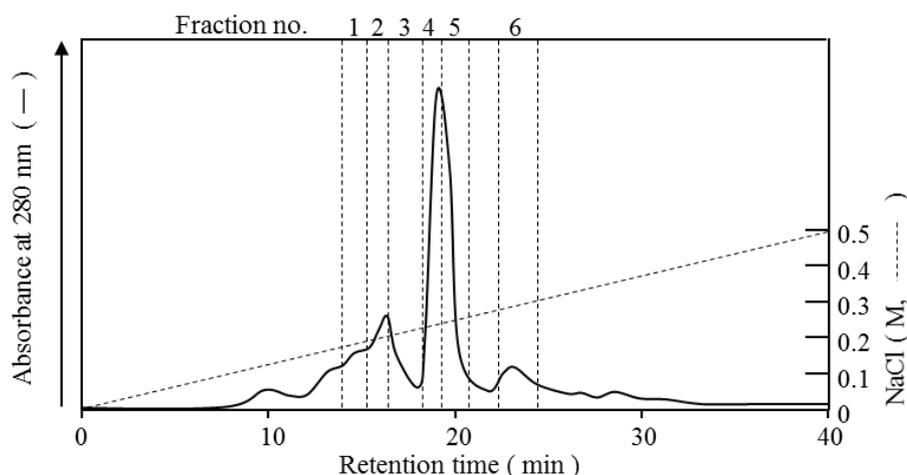


**Fig. 4-4. SDS-PAGE of SP Sepharose FF cation-exchange column chromatography of recombinant PpChi-Ia.**

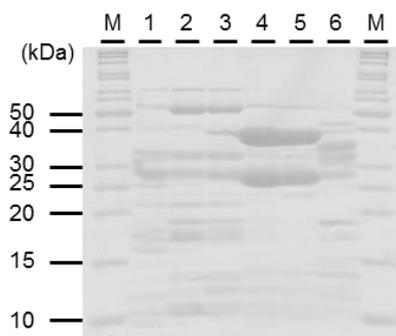
Lane M, standard marker proteins (kDa); lane A, sample solution dialyzed 10 mM sodium acetate buffer (pH 5.0); lane N, non-adsorbed fraction; lane W, wash fraction; lane 2, fraction no. 2; lane 3, fraction no. 3; lane 4, fraction no. 4; lane 5, fraction no. 5; lane 6, fraction no. 6; lane 7, fraction no. 7.

b) HiTrap Q HP を用いた陰イオン交換カラムクロマトグラフィー

SP Sepharose Fast Flow カラムで得られた活性画分 4, 5, 6 を 10 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) で透析し, 同緩衝液で平衡化した HiTrap Q HP カラムを用いた陰イオン交換クロマトグラフィーに供した。その結果を Fig. 4-5. と Fig. 4-6. に示した。活性の高かった画分 1 を, さらに HiTrap SP HP カラムで精製した。



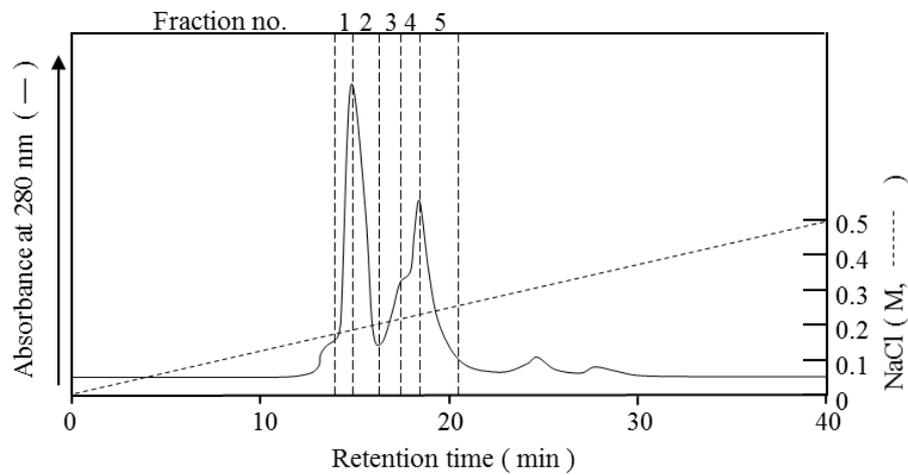
**Fig. 4-5. HiTrap Q HP anion-exchange column chromatography of recombinant PpChi-Ia.** Sample solution obtained after dialysis against 10 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) was applied to a column of HiTrap Q HP equilibrated with the same buffer. The column was washed with the equilibration buffer, and adsorbed proteins were eluted with a linear gradient of NaCl from 0 to 0.5 M in the buffer. The fraction no.1 was collected as active fraction.



**Fig. 4-6. SDS-PAGE of HiTrap Q HP anion-exchange column chromatography of recombinant PpChi-Ia.** Lane M, standard marker proteins (kDa); lane 1, fraction no. 1; lane 2, fraction no. 2; lane 3, fraction no. 3; lane 4, fraction no. 4; lane 5, fraction no. 5; lane 6, fraction no. 6.

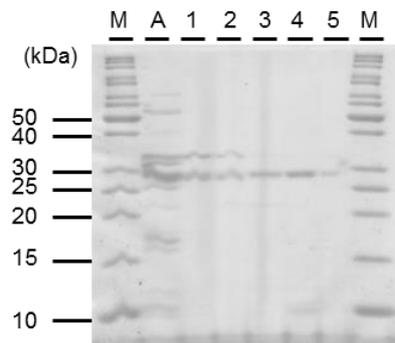
c) HiTrap SP HP カラムを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー

HiTrap Q HP カラムで得られた活性画分 1 を 10 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) で透析し, 同緩衝液で平衡化した HiTrap SP HP カラムを用いた陽イオン交換クロマトグラフィーに供した。その結果を Fig. 4-7. と Fig. 4-8.に示した。活性の高かった画分を SDS-PAGE に供したところ, 画分 4 で単一のバンドが確認できたので, この画分を精製 PpChi-Ia とした。



**Fig. 4-7. HiTrap SP HP cation-exchange column chromatography of recombinant PpChi-Ia.**

Sample solution obtained after dialysis against 10 mM sodium acetate buffer (pH 5.0) was applied to a column of HiTrap SP HP equilibrated with the same buffer. The column was washed with the equilibration buffer, and adsorbed proteins were eluted with a linear gradient of NaCl from 0 to 0.5 M in the buffer. The fraction no.4 was collected as PpChi-Ia.



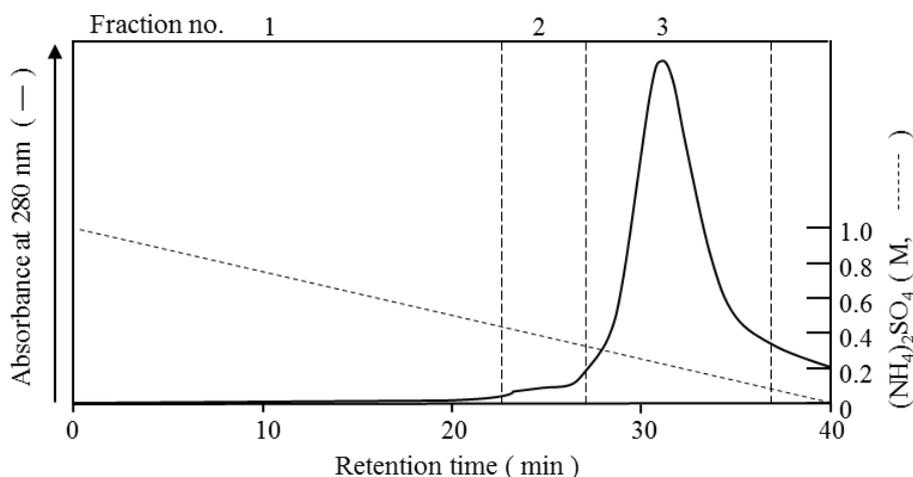
**Fig. 4-8. SDS-PAGE of HiTrap Q HP cation-exchange column chromatography of recombinant PpChi-Ia.**

Lane M, standard marker proteins (in kDa); lane A, before performing the HiTrap Q HP column chromatography; lane 1, fraction no. 1; lane 2, fraction no. 2; lane 3, fraction no. 3; lane 4, fraction no. 4; lane 5, fraction no. 5.

## 2) PpChi-IV

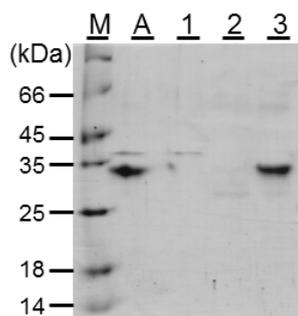
### a) Phenyl Superose カラムを用いた疎水相互作用クロマトグラフィー

10 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) での透析後に得られた上清は、同緩衝液で平衡化した Phenyl Superose カラムを用いた疎水相互作用クロマトグラフィーに供した。その結果を Fig. 4-9. と Fig. 4-10. に示した。活性の高かった画分 3 を Mono-Q カラムで精製した。



**Fig. 4-9. Phenyl Superose hydrophobic interaction column chromatography of recombinant PpChi-IV.**

Sample solution obtained after dialysis against 10 mM sodium acetate buffer (pH 5.0) was mixed with 1/4 times volume of 80 mM sodium acetate buffer (pH 5.0) containing 4 M ammonium sulfate. The mixture was applied to a Phenyl Superose column (0.5 × 5 cm) equilibrated with 20 mM sodium acetate buffer (pH 5.0) containing 1 M ammonium sulfate. The column was washed with the same buffer, and adsorbed proteins were then eluted with a linear gradient of ammonium sulfate from 1.0 to 0 M in the same buffer. The fraction no.3 was collected as active fraction.

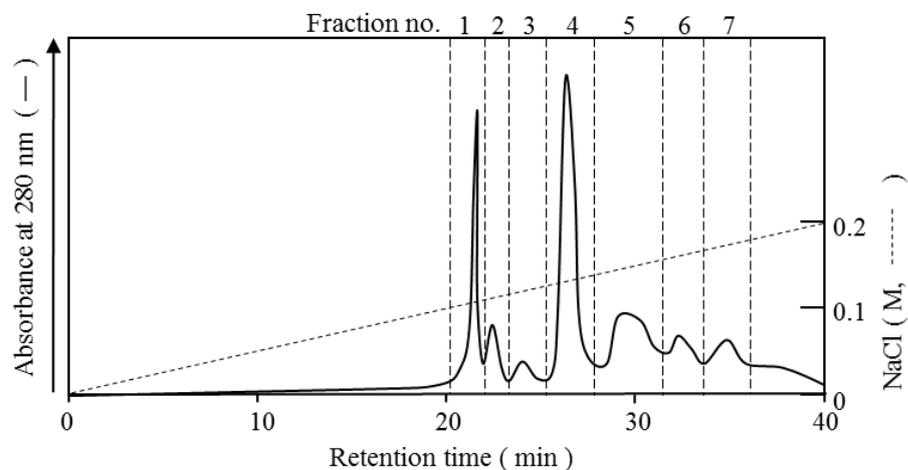


**Fig. 4-10. SDS-PAGE of Phenyl superose hydrophobic interaction column chromatography of recombinant PpChi-IV.**

Lane M, standard marker proteins (kDa); lane A, before performing the Phenyl superose hydrophobic interaction column chromatography; lane 1, fraction no. 1; lane 2, fraction no. 2; lane 3, fraction no. 3.

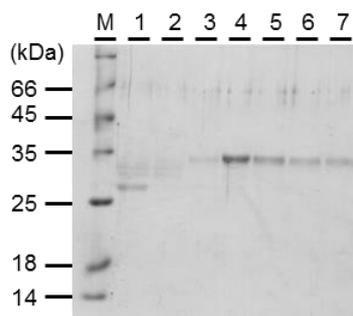
b) Mono-Q カラムを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー

Phenyl Superose カラムで得られた活性画分 3 を 10 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) で平衡化した Mono-Q カラムを用いた陰イオン交換クロマトグラフィーに供した。その結果を Fig. 4-11. と Fig. 4-12. に示した。活性の高かった画分を SDS-PAGE に供したところ、画分 4 で単一のバンドが確認できたので、この画分を精製 PpChi-IV とした。



**Fig. 4-11. Mono-Q anion-exchange column chromatography of recombinant PpChi-IV.**

Sample solution obtained after dialysis against 10 mM sodium acetate buffer (pH 5.0) was applied to a column of Mono-Q equilibrated with the same buffer. The column was washed with the equilibration buffer, and adsorbed proteins were eluted with a linear gradient of NaCl from 0 to 0.2 M in the buffer. The fraction no.4 was collected as PpChi-IV.



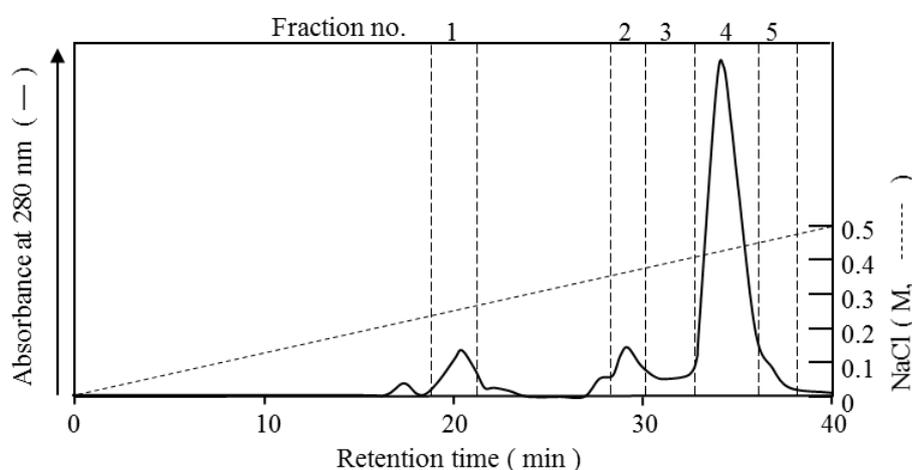
**Fig. 4-12. SDS-PAGE of Mono-Q anion-exchange column chromatography of recombinant PpChi-IV.**

Lane M, standard marker proteins (kDa); lane 1, fraction no. 1; lane 2, fraction no. 2; lane 3, fraction no. 3; lane 4, fraction no. 4; lane 5, fraction no. 5; lane 6, fraction no. 6; lane 7, fraction no. 7.

### 3) PpChi-Vb

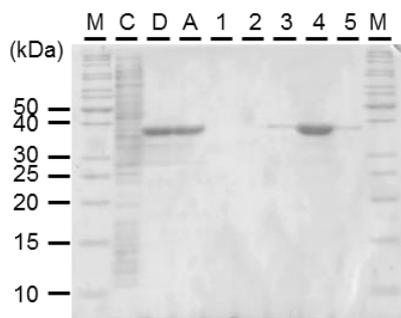
#### a) HiTrap Q HP カラムを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー

10 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) で透析後に得られた上清を同緩衝液で平衡化した HiTrap Q HP カラムを用いた陰イオン交換クロマトグラフィーに供した結果を Fig. 4-13. と Fig. 4-14. に示した。活性の高かった画分を SDS-PAGE に供したところ、画分 4 で単一のバンドが確認できたので、この画分を精製 PpChi-Vb とした。



**Fig. 4-13. HiTrap Q HP anion-exchange column chromatography of recombinant PpChi-Vb.**

Sample solution obtained after dialysis against 10 mM sodium acetate buffer (pH 5.0) was applied to a column of HiTrap Q HP equilibrated with the same buffer. The column was washed with the equilibration buffer, and adsorbed proteins were eluted with a linear gradient of NaCl from 0 to 0.5 M in the buffer. The fraction no.4 was collected as PpChi-Vb.



**Fig. 4-14. SDS-PAGE of HiTrap Q HP anion-exchange column chromatography of recombinant PpChi-Vb.**

Lane M, standard marker proteins (in kDa); lane C, crude enzyme; lane D, sample solution dialyzed 10 mM sodium acetate buffer (pH 4.0); lane A, sample solution dialyzed 10 mM sodium acetate buffer (pH 5.0); lane 1, fraction no. 1; lane 2, fraction no. 2; lane 3, fraction no. 3; lane 4, fraction no. 4; lane 5, fraction no. 5.

### 第3項 分子量測定

SDS-PAGE による分子量は PpChi-Ia, PpChi-IV, PpChi-Vb それぞれ 29.0 kDa, 34.0 kDa, 38.4 kDa と検出された。

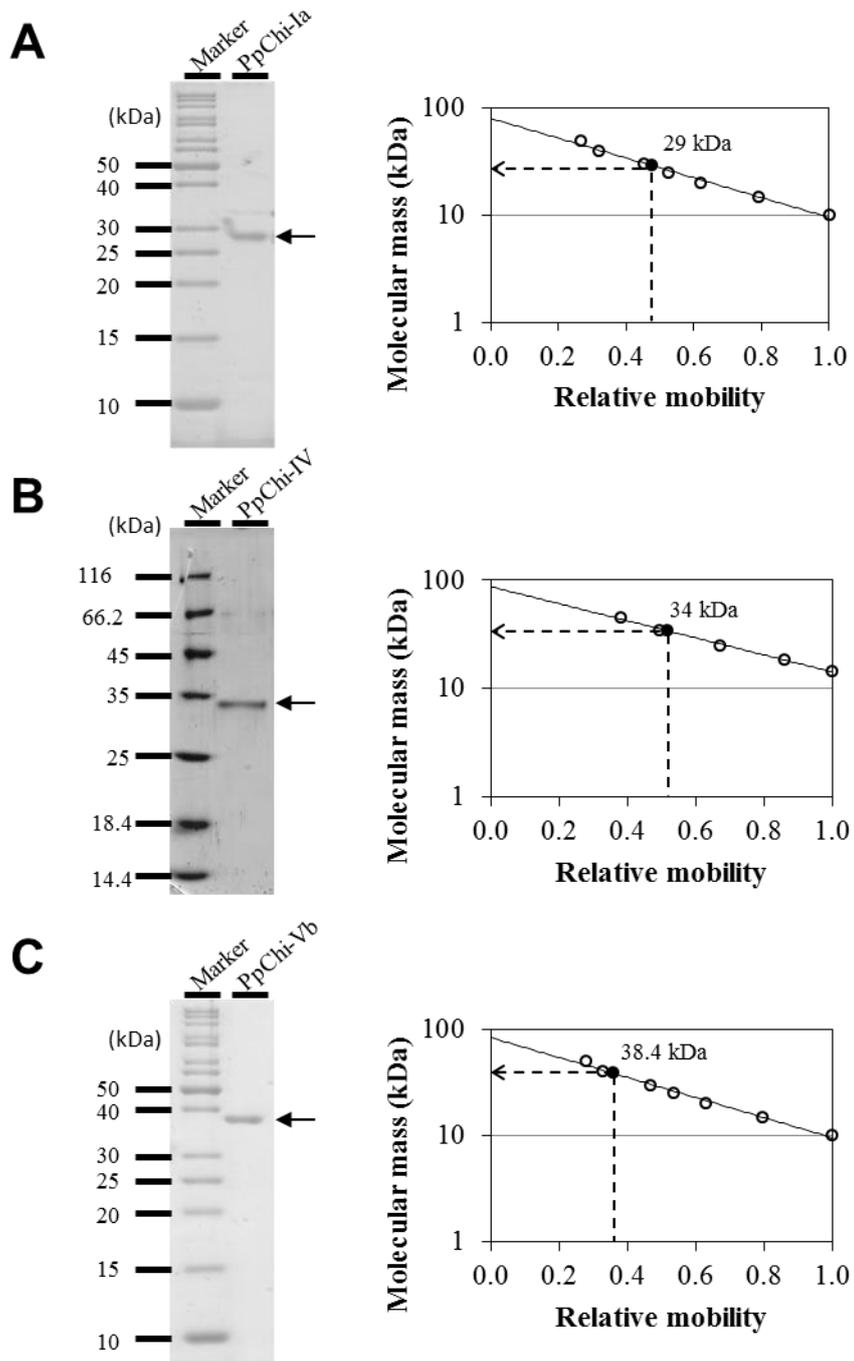
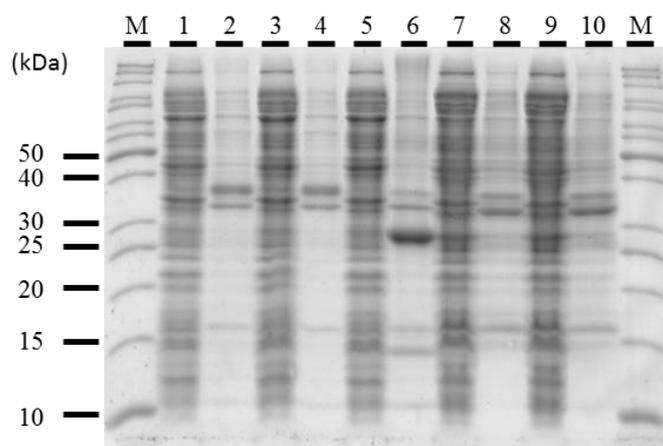


Fig. 4-15. Molecular masses determination

#### 第4項 *Rosetta-gami* を用いた組換えタンパク質の発現

*Rosetta-gami* の形質転換体を IPTG により誘導し、48 時間 18 °C で振とう培養後、得られた可溶性画分と不溶性画分の SDS-PAGE の結果を Fig. 4-16. に示した。

PpChi-Ib については、目的タンパク質は確認されず、活性が非常に低かった。PpChi-IIa については、目的タンパク質は不溶性画分に確認されたものの、活性はなかった。PpChi-IIc については、目的タンパク質は確認されず、活性もなかった。

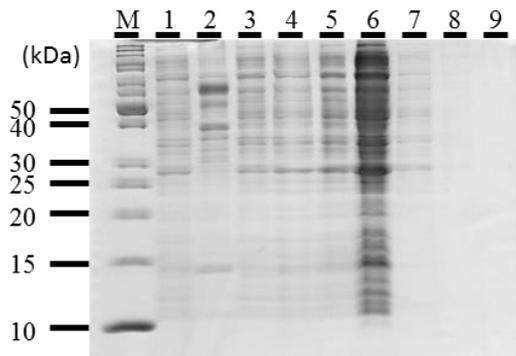


**Fig. 4-16. SDS-PAGE for expression of recombinant PpChi by *Rosetta gami*.**

Lane M, standard marker proteins (in kDa); lane 1, supernatant of PpChi-Ib, colony no. 1; lane 2, deposition of PpChi-Ib, colony no. 1; lane 3, supernatant of PpChi I-b, colony no. 2; lane 4, deposition of PpChi-Ib, colony no. 2; lane 5, supernatant of PpChi-IIa; lane 6, deposition of PpChi-IIa; lane 7, supernatant of PpChi-IIc, colony no. 1; lane 8, deposition of PpChi-IIc, colony no. 1; lane 9, supernatant of PpChi-IIc, colony no. 2; lane 10, deposition of PpChi-IIc, colony no. 2.

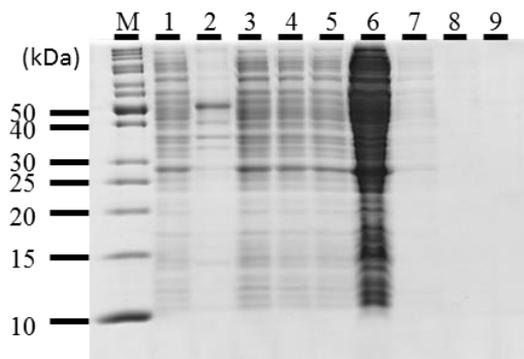
#### 第5項 GST融合タンパク質の発現と精製

GSTrap FF カラム (1 ml) を用いたカラムクロマトグラフィーの結果を Fig. 4-17. と Fig. 4-18. と Fig. 4-19. に示した。得られた画分を SDS-PAGE に供したところ、目的タンパク質は確認されなかった。また、キチナーゼ活性もなかった。



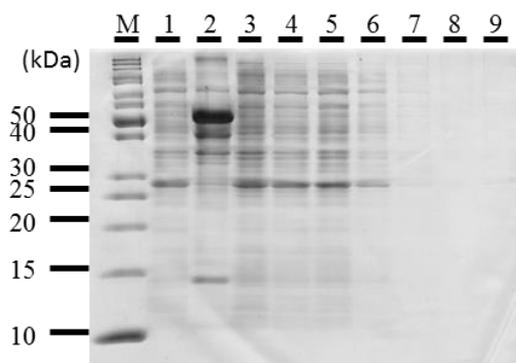
**Fig. 4-17. SDS-PAGE of GST fusion protein of recombinant PpChi-Ib.**

Lane M, standard marker proteins (in kDa); lane 1, crude enzyme soluble fraction; lane 2, crude enzyme insoluble fraction; lane 3, non-absorbed fraction no. 1; lane 4, non-absorbed fraction no. 2; lane 5, non-absorbed fraction no. 3; lane 6, wash fraction no.1; lane 7, wash fraction no.2; lane 8, wash fraction no.3; lane 9, elution fraction.



**Fig. 4-18. SDS-PAGE of GST fusion protein of recombinant PpChi-IIa.**

Lane M, standard marker proteins (in kDa); lane 1, crude enzyme soluble fraction; lane 2, crude enzyme insoluble fraction; lane 3, non-absorbed fraction no. 1; lane 4, non-absorbed fraction no. 2; lane 5, non-absorbed fraction no. 3; lane 6, wash fraction no.1; lane 7, wash fraction no.2; lane 8, wash fraction no.3; lane 9, elution fraction.

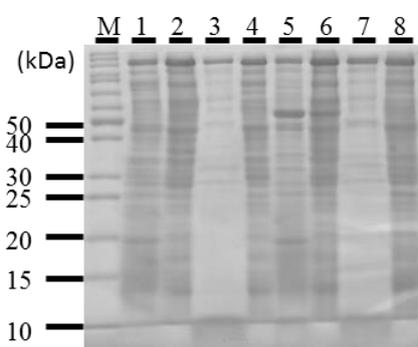


**Fig. 4-19. SDS-PAGE of GST fusion protein of recombinant PpChi-IIc.**

Lane M, standard marker proteins (in kDa); lane 1, crude enzyme soluble fraction; lane 2, crude enzyme insoluble fraction; lane 3, non-absorbed fraction no. 1; lane 4, non-absorbed fraction no. 2; lane 5, non-absorbed fraction no. 3; lane 6, wash fraction no.1; lane 7, wash fraction no.2; lane 8, wash fraction no.3; lane 9, elution fraction.

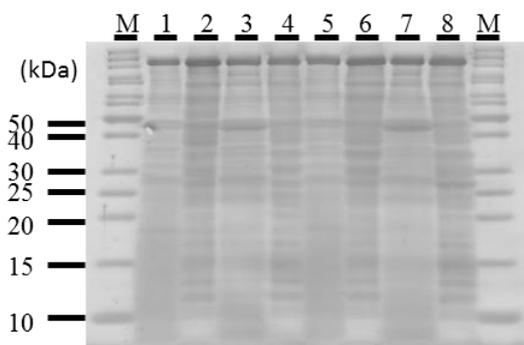
#### 第6項 *Brevibacillus* によるリコンビナント PpChi の発現

2SYNm と TMNm 培地を用いて *Brevibacillus* の形質転換体を培養し、分離した上清および沈殿の懸濁液を SDS-PAGE に供した結果を Fig. 4-20. と Fig. 4-21. と Fig. 4-22. に示した。BLA (*Bacillus licheniformis*  $\alpha$ -amylase) については、予想されるサイズのタンパク質が確認されたことから、発現系は問題ないことが示された。しかし、他 3 つのタンパク質については、予想されるサイズのタンパク質が確認されなかった。また、活性も検出されなかったことから、発現していないと判断した。



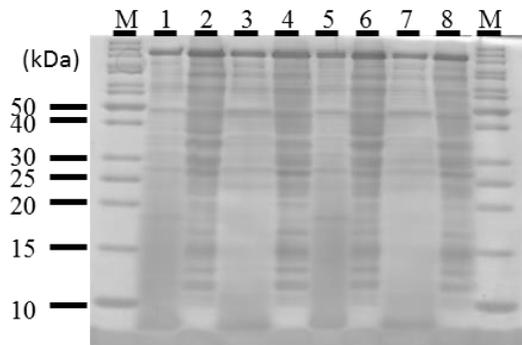
**Fig. 4-20. SDS-PAGE of *Brevibacillus* expression of recombinant PpChi-Ib.**

Lane M, standard marker proteins (in kDa); lane 1, supernatant of PpChi-Ib incubated by MT medium; lane 2, deposition of PpChi-Ib incubated by MT medium; lane 3, supernatant of PpChi-Ib incubated by 2SY medium; lane 4, deposition of PpChi-Ib incubated by 2SY medium; lane 5, supernatant of BLA incubated by MT medium; lane 6, deposition of BLA incubated by MT medium; lane 7, supernatant of BLA incubated by 2SY medium; lane 8, deposition of BLA incubated by 2SY medium.



**Fig. 4-21. SDS-PAGE of *Brevibacillus* expression of recombinant PpChi-IIa.**

Lane M, standard marker proteins (in kDa); lane 1, supernatant of colony no.1 incubated by MT medium; lane 2, deposition of colony no.1 incubated by MT medium; lane 3, supernatant of colony no.1 incubated by 2SY medium; lane 4, deposition of colony no.1 incubated by 2SY medium; lane 5, supernatant of colony no.2 incubated by MT medium; lane 6, deposition of colony no.2 incubated by MT medium; lane 7, supernatant of colony no.2 incubated by 2SY medium; lane 8, deposition of colony no.2 incubated by 2SY medium.



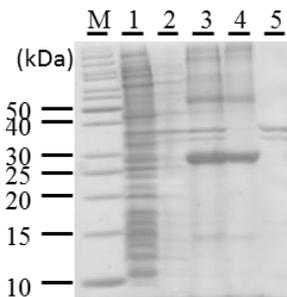
**Fig. 4-22. SDS-PAGE of *Brevibacillus* expression of recombinant PpChi-IIc.**

Lane M, standard marker proteins (in kDa); lane 1, supernatant of colony no.1 incubated by MT medium; lane 2, deposition of colony no.1 incubated by MT medium; lane 3, supernatant of colony no.1 incubated by 2SY medium; lane 4, deposition of colony no.1 incubated by 2SY medium; lane 5, supernatant of colony no.2 incubated by MT medium; lane 6, deposition of colony no.2 incubated by MT medium; lane 7, supernatant of colony no.2 incubated by 2SY medium; lane 8, deposition of colony no.2 incubated by 2SY medium.

## 第7項 タンパク質の巻き戻し（透析法）

### 1) 透析法

尿素溶液を用いて透析し、SDS-PAGE に供した結果を Fig. 4-23.に示した。透析により得られた粗酵素溶液は、予想されるサイズのタンパク質が確認されたが、活性はなかった。

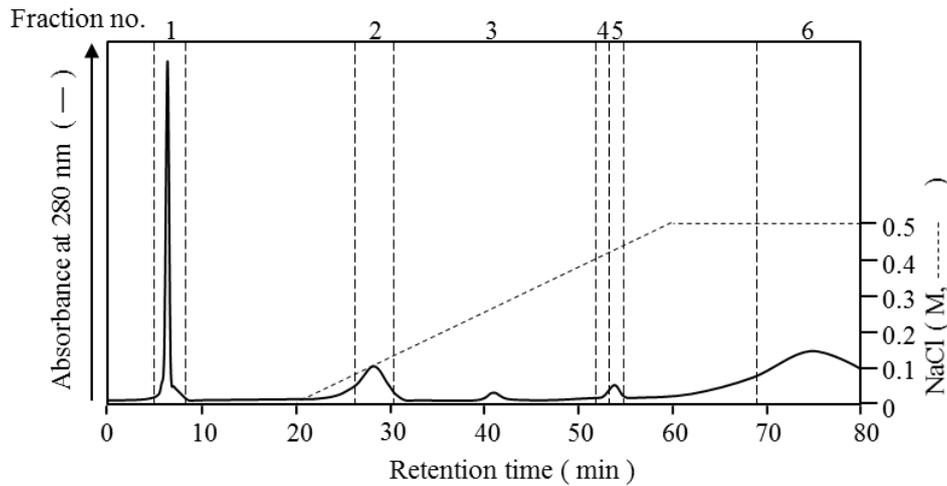


**Fig. 4-23. SDS-PAGE of unwinding proteins by dialysis.**

Lane M, standard marker proteins (kDa); lane 1, first ultrasonication; lane 2, second ultrasonication; lane 3, Oxidation-reduction solution; lane 4, supernatant after dialysis; lane 5, deposition after dialysis.

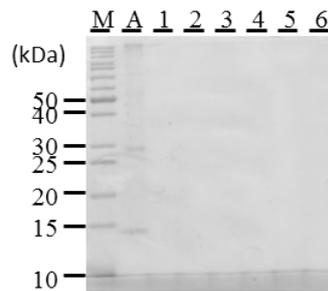
## 2) 組換えタンパク質の精製

透析法により得られた粗酵素溶液を 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) で透析し, 同緩衝液で平衡化した HiTrap Q HP カラム(1 ml)を用いた陰イオン交換クロマトグラフィーに供した。その結果を Fig. 4-24.に示した。SDS-PAGE および活性測定の結果から, 可溶化されていないこと判断した。



**Fig. 4-24. HiTrap Q HP anion-exchange column chromatography of recombinant PpChi-Ia.**

Sample solution obtained after dialysis against 10 mM phosphate buffer (pH 7.0) was applied to a column of HiTrap Q HP equilibrated with the same buffer. The column was washed with the equilibration buffer, and adsorbed proteins were eluted with a linear gradient of NaCl from 0 to 0.5 M in the buffer.



**Fig. 4-25. HiTrap Q HP anion-exchange column chromatography of recombinant PpChi-IIa.**

Lane M, standard marker proteins (in kDa); lane A, sample solution before HPLC; lane 1, fraction no. 1; lane 2, fraction no. 2; lane 3, fraction no. 3; lane 4, fraction no. 4; lane 5, fraction no. 5; lane 6, fraction no. 6.

## 第 5 節 考察

組換え PpChi-Ia, IV, Vb は発現用ベクター pET22b に連結後, *E. coli* BL21 (DE3) の形質転換体を得て, IPTG 誘導による培養によって発現したことが確認された。また, 培養したものを集菌・破碎後, PpChi-IV, 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わかった。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, IV, 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-IV のクローニングにより得られた cDNA から予測される分子量は 27.8 kDa である。理由は定かではないが, PpChi-IV を構成するアミノ酸に偏りがあることで, SDS-PAGE の結果にずれが生じた可能性がある。

PpChi-Ib, IIa, IIc は, PpChi-Ia などと同じ方法では, 活性のある組換えタンパク質を得ることができなかつた。そこで, *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を試した。しかしながら, いずれの方法でも発現させることができなかつた。その原因は不明であるが, 未検討の方法を試してみるしかなさそうである。今後は, 昆虫細胞での発現系や小麦胚芽無細胞発現系などの異種発現系を試みるとともに, ヒメツリガネゴケを大量培養して Native のキチナーゼを抽出・精製するなどして, 残り 3 種のキチナーゼを取得することも検討する必要がある。

## 第5章 ヒメツリガネゴケ由来キチナーゼ(PpChi)の酵素化学的諸性質

### 第1節 緒論

発現が確認された三種の組換えキチナーゼ, PpChi-Ia, PpChi-IV, PpChi-Vb は, それぞれカラムを用いて精製することができた。これらの酵素化学的諸性質や抗真菌活性の有無は, ヒメツリガネゴケにおけるキチナーゼの生理的役割を理解するために必要不可欠な情報である。本章では, 得られた3種の組換え PpChi の酵素化学的諸性質や抗真菌活性を比較した。

### 第2節 実験材料

#### 第1項 材料および試薬

基質として, N-アセチルグルコサミンのオリゴマーを使用した。カラムは TSK-Gel amide-80 カラム (東ソー) を使用した。その他の試薬は, 全て市販の特級またはそれに準ずるものを用いた。

### 第3節 実験方法

#### 第1項 pH の影響

緩衝液は, グリシン-HCl (pH 2.0, pH 3.0), 酢酸ナトリウム (pH 4.0, pH 5.0), クエン酸ナトリウム (pH 4.0, pH 5.0), リン酸ナトリウム (pH 6.0, pH 7.0), トリス-塩酸 (pH 8.0, pH 9.0), グリシン-NaOH (pH 10.0, pH 11.0, pH 12.0) を用いた。

##### 1) 最適 pH

上記の pH 2.0 から pH 11.0 の緩衝液を用いて, 第4章, 第3節, 第9項の方法で活性を測定した。

##### 2) pH 安定性

pH 2.0 から pH 11.0 の 20 mM 緩衝液それぞれ 20  $\mu$ l に酵素サンプル溶液 20  $\mu$ l を加え, 4  $^{\circ}$ C で 12 時間保持した。40  $\mu$ l のうち 10  $\mu$ l を用いて, 第4章, 第3節, 第9

項の方法で残存活性を測定した。マイクロチューブへの吸着性が疑われるタンパク質の場合には、シリコナイズ処理したマイクロチューブまたは低吸着処理・加工されているマイクロチューブを用いた。

## 第2項 温度の影響

### 1) 最適温度

緩衝液は酵素の最適 pH を用いて保持温度を 0~90°C にそれぞれ設定し、第4章、第3節、第9項の方法で活性を測定した。

### 2) 熱安定性

20 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) 20  $\mu$ l に酵素サンプル溶液 20  $\mu$ l を加え、0~90°C で 60 分保持した後、それぞれ 10  $\mu$ l を用いて、第4章、第3節、第9項の方法で残存活性を測定した。マイクロチューブへの吸着性が疑われるタンパク質の場合には、シリコナイズ処理したマイクロチューブまたは低吸着処理・加工されているマイクロチューブを用いた。

## 第3項 (GlcNAc)<sub>4-6</sub>に対する分解パターン

PpChi-Ia, IV は 5 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0), PpChi-Vb は 5 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.0) を使用した。4 mM (GlcNAc)<sub>n</sub> を含む緩衝液を 25°C で 5 分間保温し、酵素溶液を終濃度 2  $\mu$ M または 1  $\mu$ M になるように加えて全体を 20  $\mu$ l とし、25°C で 1, 5, 10, 20, 30 分間反応させた後、速やかに氷冷した。70%アセトニトリルで平衡化した TSK-Gel amide-80 カラム (東ソー) に反応混合液 5  $\mu$ l を供し、同溶液を用いて溶出した (流速 0.7 ml/min, 220 nm)。

## 第4項 高分子基質に対する動力学的解析

基質として様々な濃度のグリコールキチン (PpChi-Ia, 0.2-3.2 mg/ml; PpChi-IV, 0.12-1.00 mg/ml; PpChi-Vb, 0.06-1.00 mg/ml) を使用した。緩衝液は、PpChi-Ia と PpChi-IV には 0.1 M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0), PpCh-Vb には 0.1 M ク

エン酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.0) を用いて、第 4 章、第 3 節、第 9 項の方法で活性を測定した。

#### 第 5 項 低分子基質に対する動力学的解析

低分子基質として 4 mM N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)の 4 量体、緩衝液は PpChi-Ia と PpChi-IV が 5 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0), PpChi-Vb は 5 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.0) を使用した。4 mM (GlcNAc)<sub>4</sub>を含む緩衝液を 25 °C で 5 分間保温し、酵素溶液を加え全体を 20 µl とした。10 分間 25 °C で反応させた後、速やかに氷冷した。70%アセトニトリルで平衡化した TSK-Gel amide-80 カラム(東ソー)に反応混合液 10 µl を供し、同溶液を用いて溶出した(流速 0.7 ml/min, 220 nm)。

#### 第 6 項 抗真菌活性

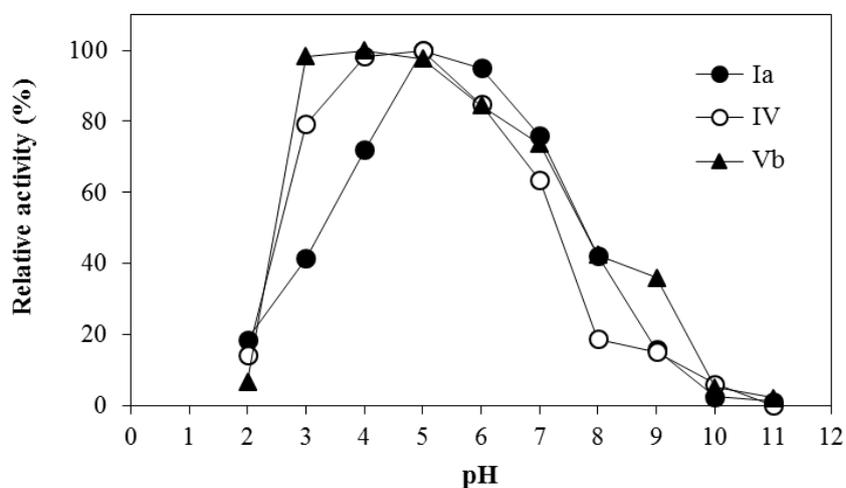
1.5%寒天および 1.5%グルコースを含むポテト培地 (PDA) に 0.1 M になるように NaCl を加えてオートクレーブ処理し、プレートを作製した。前もって、PDA プレートに糸状性真菌 *Trichoderma viride* を培養し、菌糸が均一に生育している部位をコルクボーラーで抜き取った(直径 6 mm)。抜き取った寒天を別の PDA プレートの中央に置き、室温で 12 時間放置した。プレートの中央から 15 mm の位置にコルクボーラーで直径 6 mm のウェルを作成し、キチナーゼサンプル 300 pmol を添加した。抗真菌活性の有無は、ウェル周辺の菌糸伸長の阻害度から判定した。

## 第4節 実験結果

### 第1項 pHの影響

#### 1) 最適 pH

PpChi-Vb は、酢酸ナトリウム緩衝液にて強い阻害を受けた。そのため、pH 4-5 はクエン酸ナトリウム緩衝液を用いて実験した。組換え PpChi-Ia, IV, Vb それぞれの最適 pH は pH 5.0, pH 5.0, pH 4.0 付近であった。

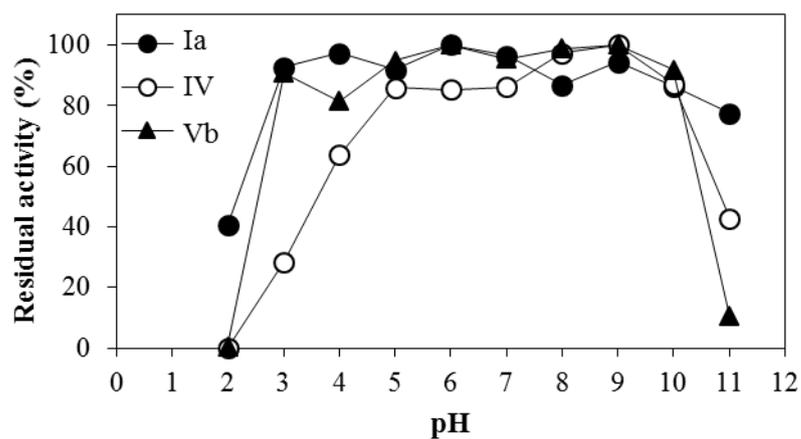


**Fig. 5-1. Optimum pH of each recombinant PpChi.**

Closed circle (●), open circle (○) and triangle (▲) indicate the results of recombinant PpChi-Ia, PpChi-IV and PpChi-Vb, respectively. The effect of pH on activity was examined after incubation at 37°C for 15 min in 0.1 M buffers. The buffers used were as follows: glycine-HCl, pH 2 and 3; sodium acetate (citric acid when PpChi-Vb), pH 4 and 5; sodium phosphate, pH 6 and 7; Tris-HCl, pH 8 and 9; glycine-NaOH, pH 10 –12. The values are shown as percentages of the maximum activity observed at pH 5.0 or pH 4.0 for each enzyme, which is taken as 100%.

## 2) pH 安定性

各 pH における 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 それぞれ pH 3.0 - pH 10.0, pH 5.0 - pH 10.0, pH 3.0 - pH 10.0 付近で 80%以上の活性を保持していた。



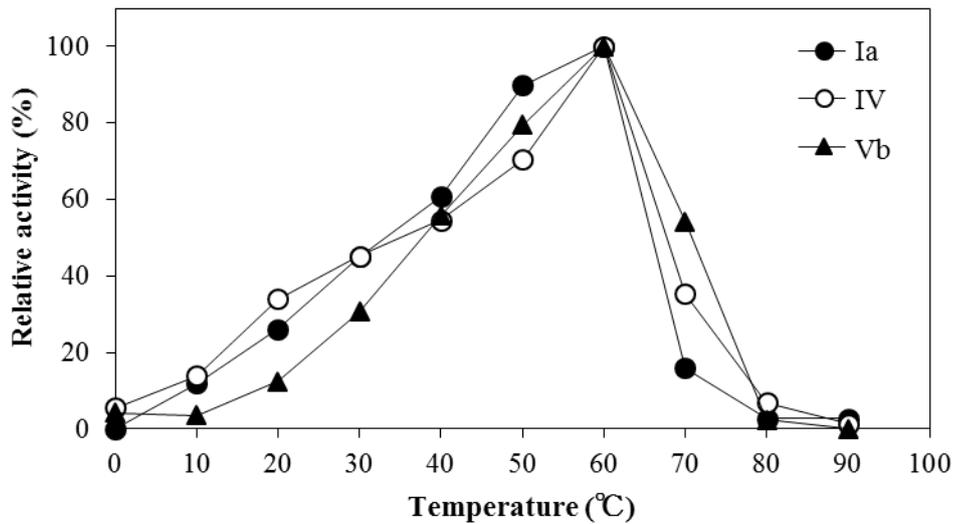
**Fig. 5-2. pH stability of each recombinant PpChi.**

Closed circle (●), open circle (○) and triangle (▲) indicate the results of recombinant PpChi-Ia, PpChi-IV and PpChi-Vb, respectively. The pH stability was assessed by measuring residual activity after incubation at 4°C for 12 h in buffers with various pH values. The original activity is taken as 100% for each.

## 第2項 温度の影響

### 1) 最適温度

組換え PpChi-Ia, IV, Vb の最適温度は、何れも 60°C 付近であった。

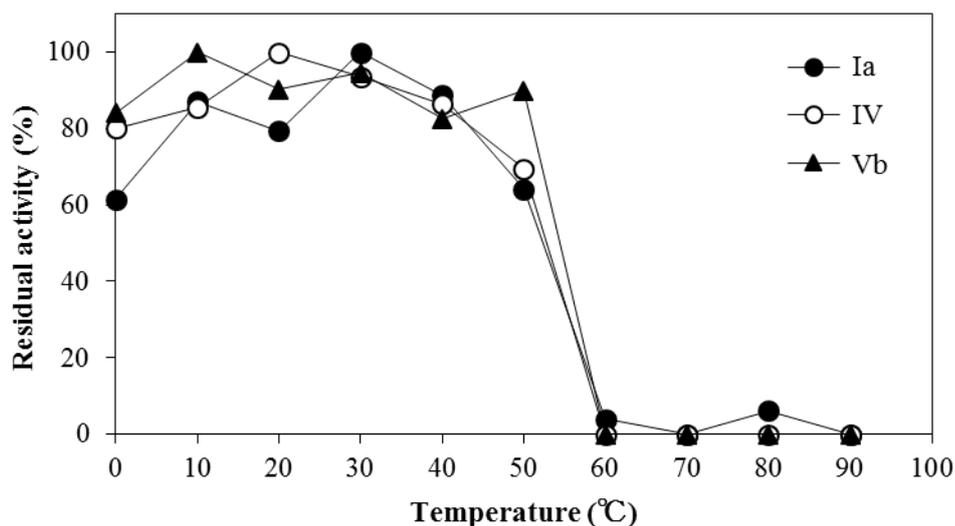


**Fig. 5-3. Optimum temperature of each recombinant PpChi.**

Closed circle (●), open circle (○) and triangle (▲) indicate the results of recombinant PpChi-Ia, PpChi-IV and PpChi-Vb, respectively. The effect of temperature on activity was examined after incubation for 15 min in 0.1 M sodium acetate buffer (pH 5.0) for PpChi-Ia and PpChi-IV, in 0.1 M citric acid buffer (pH 4.0) for PpChi-Vb. The values are shown as percentages of the maximal activity observed at 60 °C for each enzyme, which is taken as 100%.

## 2) 熱安定性

各温度で 60 分間熱処理した後の残存活性を測定した結果, 組換え PpChi-Ia, IV, Vb 共に 0°C - 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。



**Fig. 5-4. Thermal stability of each recombinant PpChi.**

Closed circle (●), open circle (○) and triangle (▲) indicate the results of recombinant PpChi-Ia, PpChi-IV and PpChi-Vb, respectively. The thermal stability was examined by measuring residual activity after incubation in 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0) for 1 h. The original activity is taken as 100% for each.

## 第3項 (GlcNAc)<sub>4-6</sub>に対する分解パターン

### 1) PpChi-Ia

PpChi-Ia の (GlcNAc)<sub>4-6</sub> に対する分解パターンの結果を Fig. 5-5 に示した。

PpChi-Ia は PpChi-IV および Vb と比較すると, 4 量体および 5 量体の分解速度が遅かった (Fig. 5-5, B and C)。6 量体を 2 量体と 4 量体に分解した。

### 2) PpChi-IV

PpChi-IV の (GlcNAc)<sub>4-6</sub> に対する分解パターンの結果を Fig. 5-6. に示した。

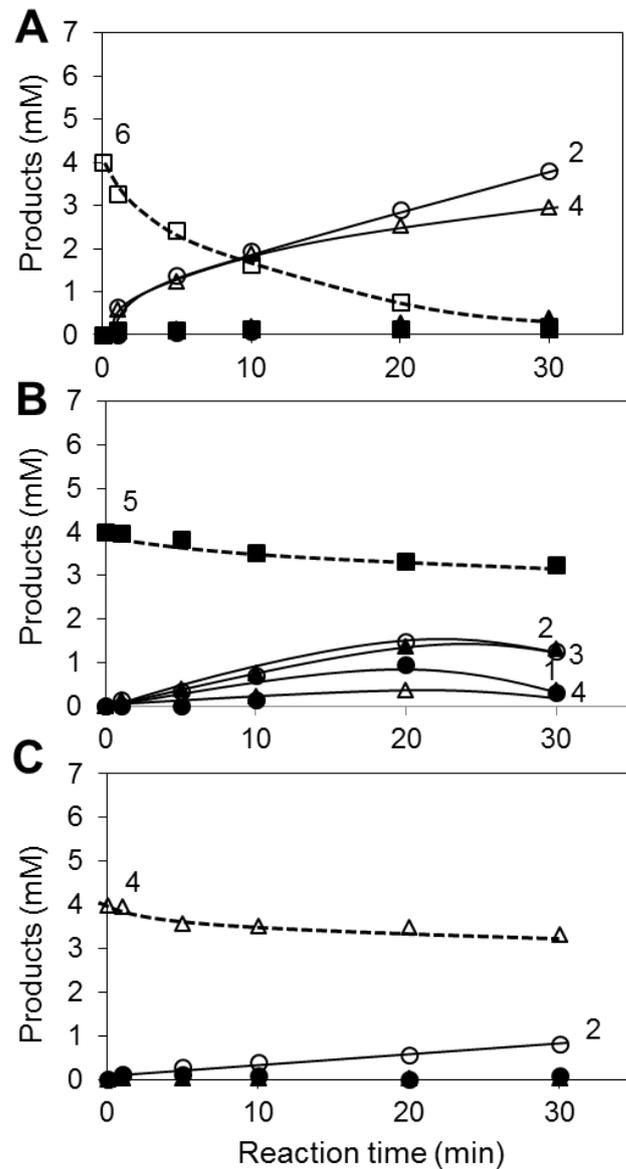
PpChi-IV は 4, 5, 6 量体を分解した。6 量体からは 2, 3, 4 量体を生成したが, 反農産物の経時変化を見ると, 6 量体から生じた 4 量体がさらに分解されて 2 量体が生成していることが分かった。5 量体からは 2 量体と 3 量体が生成された。4

量体からは主に 2 量体が生成された。

### 3) PpChi-Vb

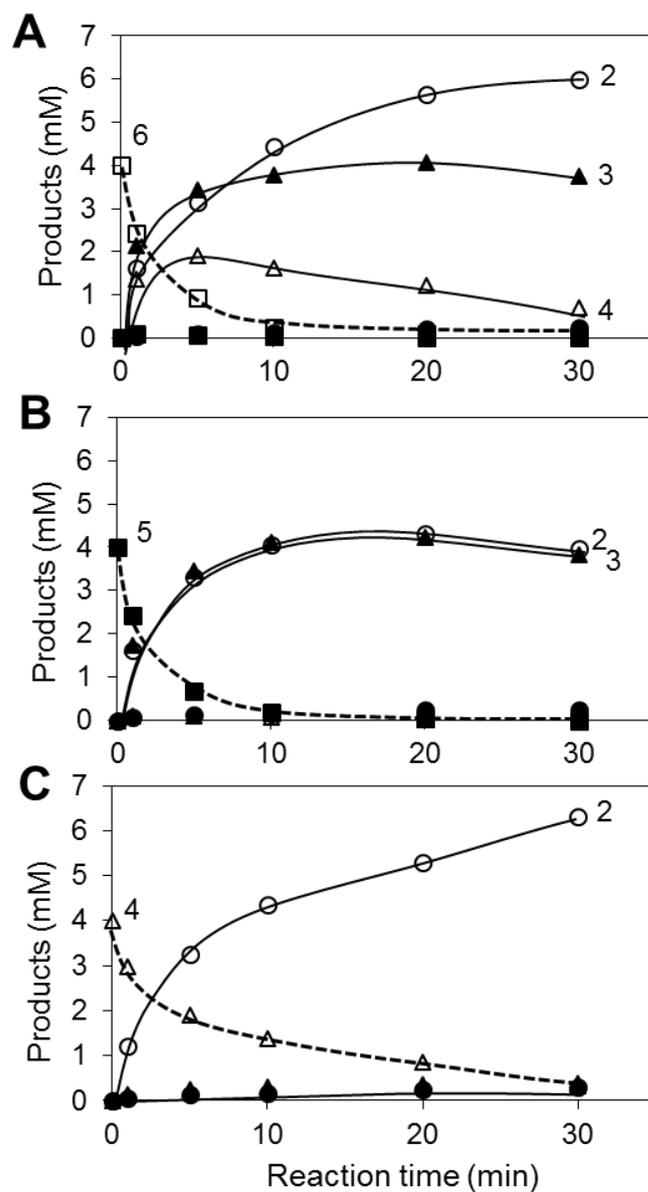
PpChi-Vb の (GlcNAc)<sub>4-6</sub> に対する分解パターンの結果を Fig. 5-7. に示した。

PpChi-Vb は 4, 5, 6 量体を分解した。6 量体と 5 量体からは何れも 2, 3, 4 量体が生成されたが、単量体は検出されなかった。また、4 量体を基質とした場合は、単量体が検出されていないにもかかわらず、3 量体が生成された。クロマトグラムを確認したところ、6 量体が生成されていることを確認した。これらのことは、糖転移反応によって 6 量体が生成された後、6 量体の加水分解によって 3 量体が形成されることを示唆している。



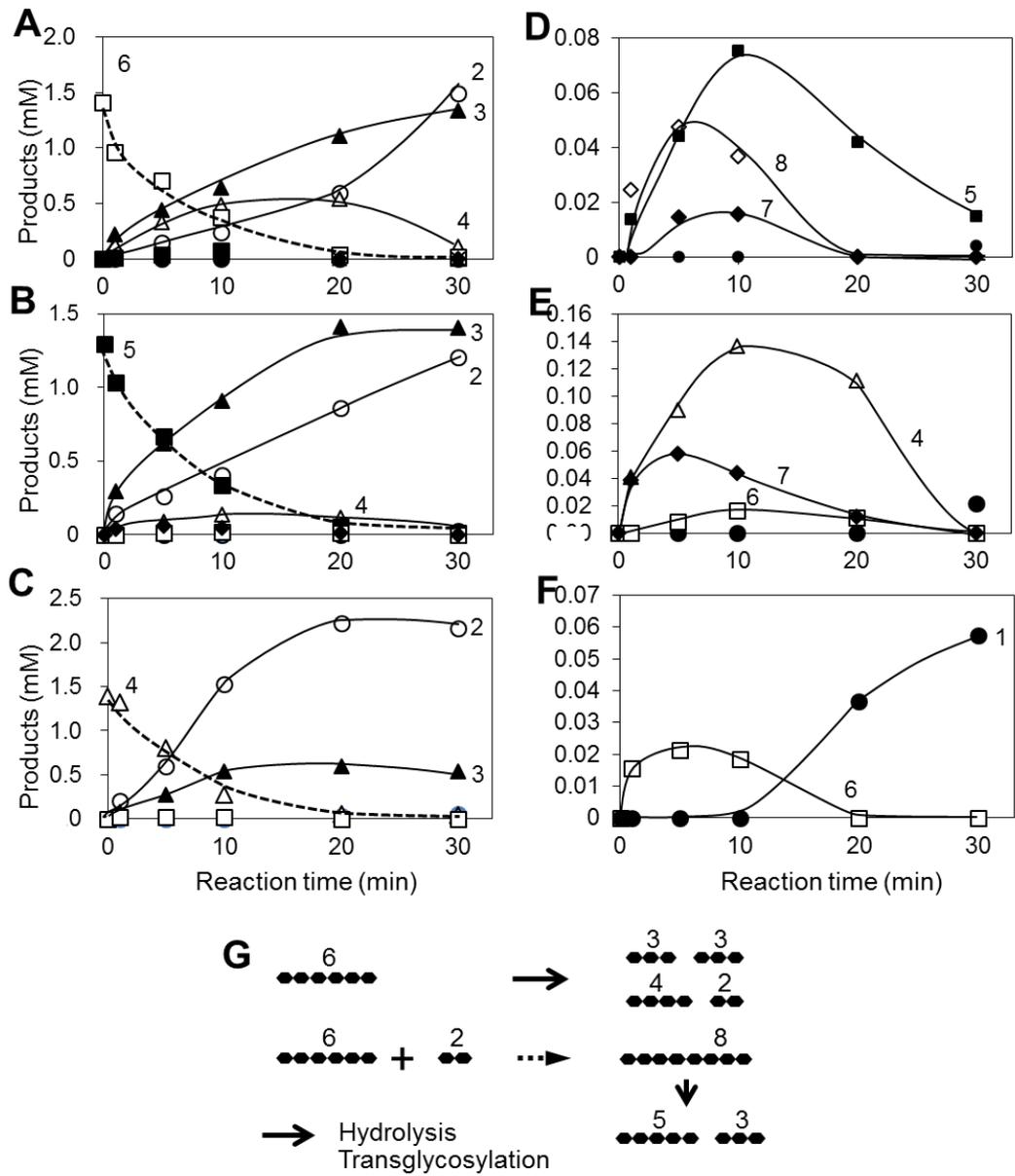
**Fig. 5-5. Cleavage pattern of (GlcNAc)<sub>n</sub> (n = 4-6) by PpChi-Ia.**

A, (GlcNAc)<sub>6</sub>; B, (GlcNAc)<sub>5</sub>; C, (GlcNAc)<sub>4</sub>. (GlcNAc)<sub>1</sub> (●), (GlcNAc)<sub>2</sub> (○), (GlcNAc)<sub>3</sub> (▲), (GlcNAc)<sub>4</sub> (△), (GlcNAc)<sub>5</sub> (■), (GlcNAc)<sub>6</sub> (□) indicate the hydrolysis products, respectively. 10  $\mu$ l of enzyme solution (final conc. 2  $\mu$ M) and 80  $\mu$ l of 5 mM (GlcNAc)<sub>n</sub> were added to 10  $\mu$ l of 10 mM sodium acetate buffer (pH 5.0), and the mixture was incubated at 25  $^{\circ}$ C for 1, 5, 10, 20 and 30 min. The reaction was stopped by cooling to 0  $^{\circ}$ C in an ice bath, and the reactant solution was analyzed by UFLC using a TSK-GEL Amide-80 column (4.6 mm  $\times$  250 mm). (GlcNAc)<sub>n</sub> was eluted with a 70% acetonitrile solution at a flow rate of 0.7 ml/min, and the absorbance was measured at 220 nm.



**Fig. 5-6. Cleavage pattern of (GlcNAc)<sub>n</sub> (n = 4-6) by PpChi-IV.**

A, (GlcNAc)<sub>6</sub>; B, (GlcNAc)<sub>5</sub>; C, (GlcNAc)<sub>4</sub>. (GlcNAc)<sub>1</sub> (●), (GlcNAc)<sub>2</sub> (○), (GlcNAc)<sub>3</sub> (▲), (GlcNAc)<sub>4</sub> (△), (GlcNAc)<sub>5</sub> (■), (GlcNAc)<sub>6</sub> (□) indicate the hydrolysis products, respectively. 8  $\mu$ l of enzyme solution (final conc. 2  $\mu$ M) and 10  $\mu$ l of 8 mM (GlcNAc)<sub>n</sub> were added to 2  $\mu$ l of 100 mM sodium acetate buffer (pH 5.0), and the mixture was incubated at 25 °C for 1, 5, 10, 20 and 30 min. The reaction was stopped by cooling to 0 °C in an ice bath, and the reactant solution was analyzed by UFLC using a TSK-GEL Amide-80 column (4.6 mm  $\times$  250 mm). (GlcNAc)<sub>n</sub> was eluted with a 70% acetonitrile solution at a flow rate of 0.7 ml/min, and the absorbance was measured at 220 nm.



**Fig. 5-7. Time courses of (GlcNAc)<sub>6-4</sub> hydrolysis and transglycosylation catalyzed by PpChi-Vb.** Time-courses of the reaction products of (GlcNAc)<sub>6-4</sub> by PpChi-Vb (A, B and C) and enlarged view of time-courses (D, E and F). The reaction was conducted in 5 mM sodium acetate buffer (pH 4.0) at 25° C. Concentrations of the enzyme and the substrate were 1 μM and 1.3 mM, respectively. ◇, NAG<sub>8</sub>; ◆, NAG<sub>7</sub>; □, (GlcNAc)<sub>6</sub>; ■, (GlcNAc)<sub>5</sub>; △, (GlcNAc)<sub>4</sub>; ▲, (GlcNAc)<sub>3</sub>; ○(GlcNAc)<sub>2</sub>; ●, GlcNAc. (G) Reaction model of hydrolysis and transglycosylation from (GlcNAc)<sub>6</sub>.

#### 第4項 高分子・低分子基質に対する動力的解析

高分子基質であるグリコールキチンに対して、 $K_m$  値にはあまり差が無かったが、 $V_{max}$  は PpChi-Ia が PpChi-IV の約 3 倍、PpChi-Vb の 6 倍の分解活性を示した。低分子基質である (GlcNAc)<sub>4</sub> に対して、 $K_m$  値にはあまり差が無かったが、PpChi-IV の  $V_{max}$  は、PpChi-Ia の約 50 倍、PpChi-Vb の約 500 倍の分解活性を示した。

**Table 5-1. Kinetic analysis of PpChi as to glycol chitin.**

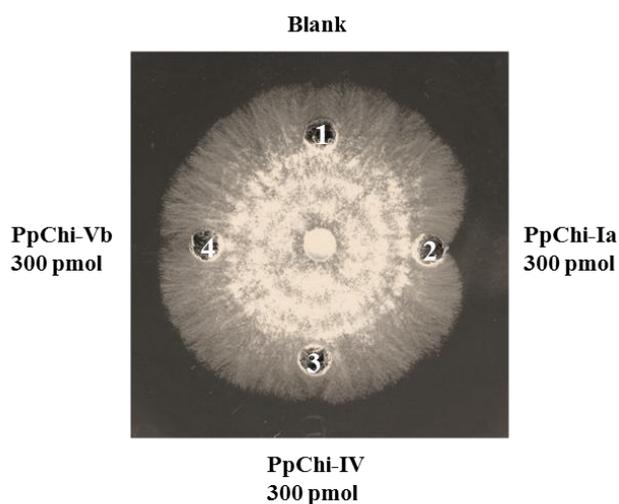
	$K_m$ (mg/ml)	$V_{max}$ (units/mol)	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	$k_{cat}/K_m$ (mg/ml/s)
PpChi-Ia	0.15	$3.0 \times 10^{10}$	$5.0 \times 10^8$	$3.3 \times 10^9$
PpChi-IV	0.24	$0.9 \times 10^{10}$	$1.5 \times 10^8$	$6.3 \times 10^8$
PpChi-Vb	0.1	$4.5 \times 10^9$	$7.5 \times 10^7$	$7.5 \times 10^8$

**Table 5-2. Kinetic analysis of PpChi as to (GlcNAc)<sub>4</sub>.**

	$K_m$ (M)	$V_{max}$ (units/mol)	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	$k_{cat}/K_m$ (s <sup>-1</sup> M <sup>-1</sup> )
PpChi-Ia	$7.4 \times 10^{-4}$	$3.8 \times 10^8$	$6.4 \times 10^6$	$8.6 \times 10^9$
PpChi-IV	$2.3 \times 10^{-3}$	$2.1 \times 10^{10}$	$3.5 \times 10^8$	$1.5 \times 10^{11}$
PpChi-Vb	$8.3 \times 10^{-4}$	$3.9 \times 10^7$	$6.4 \times 10^5$	$7.8 \times 10^8$

#### 第5項 抗真菌活性

PpChi-Ia は 300 pmol で糸状性真菌である *T. viride* の菌糸の伸長を抑制する効果が認められたが、PpChi-IV および Vb にはなかった (Fig. 5-8)。



**Fig. 5-8. Antifungal activity of PpChi against *T. viride*.**  
Test samples were placed into the wells. 1, Sterile water; 2, PpChi-Ia (300 pmol); 3, PpChi-IV (300 pmol); 4, PpChi-Vb (300 pmol).

## 第 5 節 考察

pH の影響を調べた結果、得られた組換え PpChi-Ia, IV, 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, IV, Vb の最適温度はいずれも 60°C で、熱安定性も 0-40 °C で 80%以上の活性を保持していた。これらの結果から、得られた 3 種の組換え PpChi の pH と熱に対する安定性は、どれも似ていることが分かった。

低分子基質である (GlcNAc)<sub>4-6</sub> の分解パターンを調べた結果、それぞれの性質の違いが明らかであった。PpChi-Ia は 4 量体、5 量体に対する分解活性は低いが、6 量体を 2 量体と 4 量体に分解しており、高分子基質であるグリコールキチンに対しては、PpChi-IV の約 3 倍、PpChi-Vb の 6 倍の分解活性を示した。これらのことから、ポリマーを中心に分解することが示唆された。PpChi-IV は 4, 5, 6 量体を分解し、最終的な分解産物は、2 量体が最も多かった。また、生体防御応答を引き起こすことが可能なキチンオリゴ糖である 4 量体に対する分解活性は、PpChi-IV は PpChi-Ia の 50 倍、PpChi-Vb の 500 倍であった。このことは、PpChi-IV の 4 量体基質に対する分解活性がひとときわ高いことを示している。PpChi-Vb は、4, 5, 6 量体を同じように分解していたが、分解産物には単量体は含まれていなかった。さらに、4 量体を基質とした場合には、単量体が生産されていないにもかかわらず、3 量体が生産されていた。これらのことから、PpChi-Vb には、糖転移活性があることが示唆された。0.1 M NaCl を含む PDA 培地を用いて抗真菌活性を検討した結果、PpChi-Ia は 300 pmol で糸状性真菌である *T. 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 Vb にはなかった。これらの結果から、PpChi-Ia は真菌細胞壁の主成分であるキチンに直接作用し、4 糖以上のオリゴ糖を遊離させ、生体防御応答を促進する役割があると示唆された。一方、PpChi-IV は 4 量体を積極的に分解し、行き過ぎた生体防御応答を抑制・終息させる役割があることが推察される。PpChi-Vb の持つ糖転移活性は、生体防御応答をより強く刺激できる高重合度のオリゴ糖を生産できる可能性がある。

## 第6章 結論

植物キチナーゼは病原性真菌の細胞壁の主な構成成分であるキチンを分解することによってその侵入や増殖を抑制する生体防御タンパク質のひとつであると考えられている。しかしながら、植物キチナーゼが非生物性ストレスによって誘導されたり、構成的に発現したり、ある生育段階で特異的に発現したりという報告や抗真菌活性を全く示さないキチナーゼの報告もあり、その生理的役割については、様々な可能性が議論されている (Kasprzewska, 2003)。

植物キチナーゼの生理的役割を解明するためには、その構造および生化学的性質と共に、発現時期や局在性、ストレスによる誘導性を調べる一方、植物が進化のどの段階でどのようなキチナーゼを獲得したのかを調べることが重要であると考えられた。

本研究では、進化的に古い植物の方がキチナーゼの数や種類が少ないと予測されることから、陸上植物の中で最も原始的な植物であると考えられるコケ植物、なかでも、ゲノムプロジェクトが終了しているヒメツリガネゴケ (*Physcomitrella patens*)由来キチナーゼ(PpChi)について研究した。遺伝子検索の結果、糖質加水分解酵素ファミリー19に属するものとして、クラスIが3つ、クラスIIが3つ、クラスIVが1つ、クラスIIIが1つの計8種類、糖質加水分解酵素ファミリー18に属するものとしてクラスVの2種類が得られた。これら10種のキチナーゼ候補遺伝子と2種類のCERK候補遺伝子について、転写量をqRT-PCR法により定量した結果、PpChi6種類とPpCERK2種類が有意に発現していることが判明した。それらの遺伝子転写量のプロファイルは、キチナーゼのクラスと相関が認められ、さらに、発現の誘導に使用したキチンオリゴ糖の重合度によって転写量が異なっていた。ヒメツリガネゴケ茎葉体より抽出したRNAを鋳型としたRT-PCR法によるcDNAクローニングにて、有意に発現している6種のcDNAクローンを得ることができた。これらのcDNAの塩基配列とデータベースに登録された推定mRNAの塩基配列とを比較した結果、PpChi-IIa, IIc, IV, Vbは完全に一致した。しかし、PpChi-IaおよびIbは、推定mRNAと一部配列が異なっていた。ゲノムDNAの配列情報と比較した結果、推定mRNA配列と本研究で得られたcDNAの配列には、いずれもゲノム配列と完全に一致する共通領域があり、両配列間の違いは、mRNAの配列を

登録する際のエキソンの推定位置の違いに起因することが明らかとなった。推定 mRNA と cDNA 配列は何れもフレームシフトによるストップコドンの出現は無く、N 末端と C 末端配列は一致した。キチン分解活性に必須な酸触媒であるグルタミン酸残基もゲノム DNA と cDNA の両方の配列で保持されていた。しかし、推定 mRNA には、相当する領域にグルタミン酸残基が見当たらなかった。よって、本研究にて得られた cDNA の配列が、本来の mRNA の配列であることが明らかとなった。

得られた cDNA から推定されるアミノ酸配列と他の植物由来のキチナーゼとを、構造依存的マルチプルアライメントで比較した。クラス I キチナーゼである OsChia1b および RSC-a と比較した結果、PpChi-Ia および Ib はクラス I キチナーゼではあるが、ループ I および II の抜けたクラス I 様のキチナーゼであった。クラス II キチナーゼである RSC-c および CHI-26 と比較した結果、PpChi-IIa および IIc はループ領域の全てそろったクラス II であった。クラス IV キチナーゼである Chia4-Pa2 と比較した結果、PpChi-IV は触媒ドメインのループ I, II, IV, V および C 末端ループの欠損したクラス IV と一致した。クラス V キチナーゼである CrChi-A および NtChi-V と比較した結果、PpChi-Vb は他のクラス V キチナーゼと同様の DXDXE 領域および□□□ドメイン領域を持つクラス V キチナーゼであることが分かった。系統樹解析においても、PpChi-Ia, Ib, IIa, IIc はクラス I および II キチナーゼと、PpChi-IV はクラス IV および II-L と、PpChi-Vb はクラス V キチナーゼと遺伝的な距離が近いことが明らかとなった。これらのことは、ヒメツリガネゴケは、数は少ないものの高等植物のほとんど全てのクラスのキチナーゼを持っていることを示しており、植物におけるキチナーゼの機能と役割、そしてその進化を研究するための格好の生物資源であると考えられる。

候補遺伝子のコード領域を pET22b に連結し、*E. coli* による発現・精製システムを構築した。得られた組換え PpChi-Ia, IV, Vb の酵素化学的諸性質を調べた。pH の影響を調べた結果、得られた組換え PpChi-Ia, IV, 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 3.0- pH 10.0, pH 5.0- pH 10.0, pH 3.0- pH 10.0 の範囲で 80%以上の活性を保持していた。また、熱に対する性質を調べた結果、得られた 3 種のキチナーゼ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 の範囲で 80%以上の活性を保持していた。これらの結果から、得られた 3 種のキチナーゼの pH と熱に対する性質はどれも似ていることが分かつ

た。低分子基質である(GlcNAc)<sub>4-6</sub>の分解パターンを調べた結果、それぞれの性質の違いが明らかであった。PpChi-Iaは4量体と5量体をあまり分解しないが、6量体を2量体と4量体に分解したことから、ポリマーを中心に分解することが示唆された。PpChi-IVは4, 5, 6量体を分解し、最終的な分解産物は、2量体が最も多かった。また、低分子基質に対する動力学的解析の結果から、他2つのPpChiよりも(GlcNAc)<sub>4</sub>に対して親和性と分解速度が高かったことから、4量体の基質に対する分解活性が高いことが示唆された。PpChi-Vbは、4, 5, 6量体を同じように分解していたが、どれも単量体を生産していなかった。さらに、4量体を基質とした場合には、単量体が生産されていないにもかかわらず、3量体が生産されていた。これらのことから糖転移活性があることが示唆された。0.1 M NaClを含むPDA培地で抗真菌活性の結果、PpChi-Iaは弱い抗真菌活性を示したものの、PpChi-IV, Vbは示さなかった。

抗真菌活性を有する植物キチナーゼは大麦、タバコ、ライ麦、イネ等で報告されている (Jacobsen et al. 1990; Iseli et al. 1993; Taira et al. 2002; Truong et al. 2003)。ライ麦種子由来キチナーゼ c (RSC-c) は、わずかな量 (2 $\mu$ M) で菌糸の成長を十分に抑制するが、ナガハハリガネゴケ由来キチナーゼ A (BcChi-A) は、100  $\mu$ M でも全く抗真菌活性を確認できない (Taira et al. 2011)。PpChi-Ia は 300 pmol で菌糸の伸長を阻害したことから、中程度の抗真菌活性を持つと言える。本研究で PpChi-Ia に抗真菌活性が確認されたことから、*P. patens* のクラス I キチナーゼが、病原性真菌の侵入を防いでいる可能性が示唆された。

Yamada et al. (1993)は、3量体以下のキチンオリゴ糖は、イネの培養細胞に対してエリシター活性を持たないことを示した。本研究でも、いくつかのPpChiのキチンオリゴ糖に対する応答は、4量体と6量体のほうが2量体よりも強かった。PpChi-Iaが4量体や2量体よりも効果的に6量体を分解するのに対して、PpChi-IVは4量体、6量体ともに効率よく分解することができた。GH19のキチナーゼでは、ループ領域がキチンオリゴ糖の分解に強く影響している。Taira et al. (2011)は、すべてのループ領域を持つRSC-cのキチンオリゴ糖6量体に対する活性は、4量体に対する活性の約100倍であることを報告している。一方で、ループI, II, IV, VとC末端ループが欠失したBcChi-Aは、RSC-cと比較して、6量体では10倍、5量体では100倍、4量体では1000倍のキチン分解活性を持つ。これらの結果から、ルー

プ領域が欠失した GH19 キチナーゼは、より短い基質を分解する役割を担っているものと考えられる。

本研究では、クラス II キチナーゼの諸性質について検討することはできなかった。しかし、PpChi-IIa と IIc の構造は RSC-c の構造と似ていることを考慮すると、その酵素化学的性質も類似しているものと考えられる。すべてのループ領域を持つ PpChi-IIa と IIc は、4 量体に対する活性が低いと予想される。PpChi-IIa と IIc の発現がキチンオリゴ糖処理によって抑制されたことを考え合わせると、コケ植物の防御システムにおいて、病原性真菌の細胞壁よりキチンエリシターを切り出す役割を果たしているのかもしれない。

PpChi-IV の 4 量体に対する活性は PpChi-Ia よりも高く、キチンオリゴ糖処理に対する PpChi-IV の応答は、ほかの PpChi 遺伝子よりも遅かった。また、4 量体処理に対する発現量は、6 量体よりも多かった。病原性真菌の感染初期には、6 量体よりも重合度の高いキチンエリシターの量が多く、後半に 4 量体の量が増加することにより、クラス IV キチナーゼが防御システムの終盤において働いている可能性がある。

多くのバクテリア由来 GH18 キチナーゼには、糖転移活性が確認されている。一方、植物キチナーゼでは、ソテツ由来キチナーゼ (CrChi-A) が唯一の例であり (Taira et al. 2009)、本研究にて糖転移活性を明らかにした PpChi-Vb は、2 例目の報告となる。被子植物由来クラス V キチナーゼの糖転移活性に関する報告はないことから、被子植物由来キチナーゼの糖転移機能は、進化の過程で失われてしまったのかもしれない。クラス V キチナーゼは、糖転移活性によりキチンオリゴ糖の重合度を高めることで、エリシター活性を促進している可能性が考えられる。しかし、キチンオリゴ糖処理に対する発現応答は弱く、PpChi-Vb の機能は生体防御とは関係ないのかもしれない。

本研究によって明らかになった遺伝子発現のプロファイルと酵素活性に基づいて、ヒメツリガネゴケにおけるキチナーゼの生理的役割を次のように考察した (Fig. 6-1)。

ヒメツリガネゴケに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の主成分であるキチンを分解し、キチンオリゴ糖を遊離する。遊離したキチンオリゴ糖は、キチンエリシターとしてキチンエリ

シター受容体キナーゼに認識される。キチンエリシター受容体キナーゼからの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 が、その糖転移活性によって、より生体防御応答を強く刺激できる高重合度のキチンオリゴ糖 (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、防御応答の終盤では、PpChi-IV が積極的にキチンオリゴ糖を分解し、キチンエリシター受容体が認識できない 4 量体以下の大きさにまでしてしまうことで、これらの防御応答反応を抑制・終息させるのであろう。

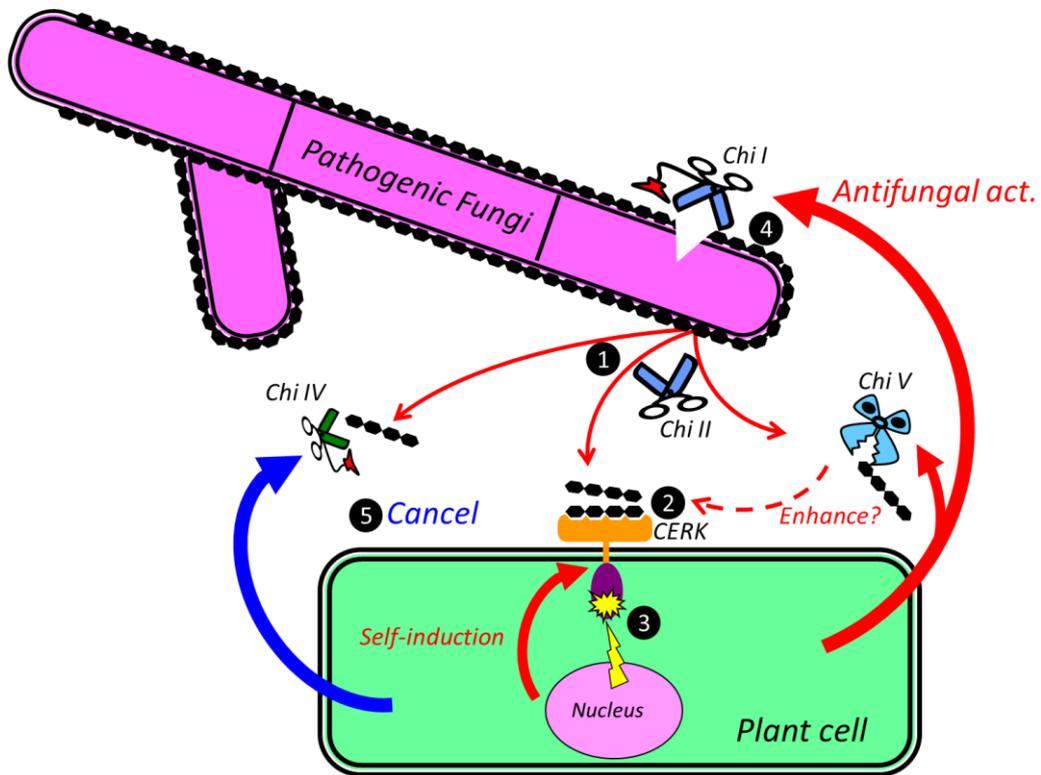


Fig. 6-1. Predicted functions of PpChis in vivo.

## 引用文献

Collinge DB, Kragh KM, Mikkelsen JD, Nielsen KK, Rasmussen U, Vad K (1993) Plant chitinases. *The Plant Journal* 3: 31–40

Graham LS, Sticklen MB (1994) Plant chitinases. *Canadian Journal of Botany* 72: 1057-1083

Imoto T, Yagishita K (1971) A simple activity measurement of lysozyme. *Agricultural and Biological Chemistry* 35: 1154-1156

Iseli B, Boller T, Neuhaus JM (1993) The N-terminal cysteine-rich domain of Tobacco class I chitinase is essential for chitin binding but not for catalytic or antifungal activity. *Plant Physiology* 103: 221-226

Jacobsen S, Mikkelsen JD, Hejgaard J (1990) Characterization of two antifungal endochitinases from barley grain. *Physiologia Plantarum* 79: 554-562

Kasprzewska A (2003) Plant chitinases - Regulation and function. *Cellular and Molecular Biology* 8: 809-824

Koga D, Hirata T, Sueshige N, Tanaka S, Ide A (1992) Induction patterns of chitinases in yam callus by inoculation with autoclaved *Fusarium* by Inoculation with Autoclaved *Fusarium oxysporum*, ethylene, and chitin and chitosan oligosaccharides. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 56: 280-1992

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685

Limpens E, Franken C, Smit P, Willemse J, Bisseling T, Geurts R (2003) LysM domain receptor kinases regulating rhizobial Nod factor-induced infection.

Science 302: 630-633

Miya A, Albert P, Shinya T, Desaki Y, Ichimura K, Shirasu K, Narusaka Y, Kawakami N, Kaku H, Shibuya N (2007) CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104: 19613-19618

Ovtsyna AO, Schultze M, Tikhonovich IA, Spaink HP, Kondorosi E, Kondorosi A, Staehelin C (2000) Nod factors of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* and their fucosylated derivatives stimulate a nod factor cleaving activity in pea roots and are hydrolyzed in vitro by plant chitinases at different rates. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13:799-807

Radutoiu S, Madsen LH, Madsen EB, Felle HH, Umehara Y, Grønlund M, Sato S, Nakamura Y, Tabata S, Sandal N, Stougaard J (2003) Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases. *Nature* 425: 585-592

Rensing SA, Lang D, Zimmer AD et al. (2008) The *Physcomitrella* genome reveals evolutionary insights into the conquest of land by plants. *Science* 319: 64-69

Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425

Salzer P, Bonanomi A, Beyer K, Vögeli-Lange R, Aeschbacher RA, Lange J, Wiemken A, Kim D, Cook DR, Boller T (2000) Differential expression of eight chitinase genes in *Medicago truncatula* roots during mycorrhiza formation, nodulation, and pathogen infection. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13: 763-777

Schlumbaum A, Mauch F, Vögeli U, Boller T (1986) Plant chitinases are potent inhibitors of fungal growth. *Nature* 324: 365-367

- Selitrennikoff CP (2001) Antifungal proteins. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 2883-2894
- Taira T, Ohnuma T, Yamagami T, Aso Y, Ishiguro M, Ishihara M (2002) Antifungal activity of rye (*Secale cereale*) seed chitinases: the different binding manner of class I and class II chitinases to the fungal cell walls. *Biosci. Biotechnol Biochem.* 66: 970-977
- Taira T, Ohdomari A, Nakama N, Shimoji M, Ishihara M (2005) Characterization and antifungal activity of gazyumaru (*Ficus microcarpa*) latex chitinases: both the chitin-binding and the antifungal activities of class I chitinase are reinforced with increasing ionic strength. *Biosci Biotechnol Biochem.* 69 : 811-818
- Taira T, Toma N, Ishihara M (2005) Purification, characterization, and antifungal activity of chitinases from pineapple (*Ananas comosus*) leaf. *Biosci Biotechnol Biochem.* 69: 189-196
- Taira T, Hayashi H, Tajiri Y, Onaga S, Uechi GI, Iwasaki H, Ohnuma T, Fukamizo T (2009) A plant class V chitinase from a cycad (*Cycas revoluta*): biochemical characterization, cDNA isolation, and posttranslational modification. *Glycobiology* 19: 1452-1461
- Taira T, Mahoe Y, Kawamoto N, Onaga S, Iwasaki H, Ohnuma T, Fukamizo T (2011) Cloning and characterization of a small family 19 chitinase from moss (*Bryum coronatum*). *Glycobiology* 21:644-654
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Mol. Biol. Evol* 24: 1596-1599
- Theis T, Stahl U (2004) Antifungal proteins: tergets, mechanisms and prospective applications. *Cellular and Molecular Life Sciences* 61: 437-455

Truong NH, Park SM, Nishizawa Y, Watanabe T, Sasaki T, Itoh Y (2003) Structure, heterologous expression, and properties of rice (*Oryza sativa* L.) family 19 chitinases. *Biosci. Biotechnol Biochem.* 67: 1063-1070

Yamada H, Imoto T (1981) A convenient synthesis of glycolchitin, a substrate of lysozyme. *Carbohydr Res.* 92: 160-162

Yamada A, Shibuya N, Kodama O, Akatsuka T (1993) Induction of Phytoalexin Formation in Suspension-cultured Rice Cells by N-Acetylchitin oligo saccharides. *Biosci. Biotechnol Biochem.* 57: 405-409

Yamagami T, Mine Y, Ishiguro M (1998) Complete amino acid sequence of chitinase-a from bulbs of gladiolus (*Gladiolus gandavensis*). *Biosci. Biotechnol Biochem.* 62: 386-389

van Hengel AJ, Tadesse Z, Immerzeel P, Schols H, van Kammen A, de Vries SC (2001) N-acetylglucosamine and glucosamine-containing arabinogalactan proteins control somatic embryogenesis. *Plant Physiol.* 125: 1880-1890

古賀大三 (1994) 植物キチナーゼと生体防御 病原菌抵抗性植物の作出は可能か? 化学と生物 Vol. 32 712-722

平良東紀 (2016) 植物キチナーゼの構造, 抗真菌活性および進化 キトサン研究 Vol. 22 1-12

田中隆介 (2014) ヒメツリガネゴケ由来各種キチナーゼの諸性質 修士論文

長谷部光泰 (2008) 植物の比較ゲノム解析からみえてきたもの 蛋白質 核酸 酵素 Vol. 53

## 謝辞

本研究の過程において、終始御指導と御鞭撻を賜りました鹿児島大学学術研究院理工学域理学系の内海俊樹教授、琉球大学農学部亜熱帯生物資源科学科の平良東紀教授に心より感謝を申し上げます。

本論文の審査過程において、数々の御助言と御指導賜りました鹿児島大学同上の伊東祐二教授、九町健一准教授に深謝致します。

本研究活動において、御教示並びに御激励を賜りました鹿児島大学大学院理工学研究科の阿部美紀子教授に厚く御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、多大なる御協力を頂きました琉球大学農学研究科生物資源科学専攻の田中隆介さんに深く感謝致します。

本研究を進めるにあたり、御助力いただきました鹿児島大学理学部生命化学科植物微生物研究室の皆様に感謝致します。

社会人学生として本研究を遂行するにあたり、鹿児島大学大学院理工学研究科技術部の皆様に多大なる御協力と御激励を頂きましたことを御礼申し上げます。そして、共に研究活動に励み、貴重な御意見、御激励を頂きました御幡晶さんに深く感謝致します。

最後に、本研究活動を応援し、支えてくれた家族に深く感謝致します。