

氏名	みつなが たくじ 光永 拓司
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	乙第45号
学位授与年月日	平成16年 9月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	Molecular Cloning of a Genomic DNA Encoding Yam Class IV Chitinase and its Intracellular Localization (ヤマイモクラスIVキチナーゼの遺伝子クローニングとその細胞内局在性について)
学位論文審査委員	(主査) 古賀大三 (副査) 松田英幸 宮田浩文 森嶋伊佐夫 加藤昭夫

学位論文の内容の要旨

キチナーゼは高等植物に存在し、この酵素は、植物の病原菌等の細胞壁の主な構成物であるキチンを加水分解する。一方、高等植物には、内在性の基質は存在しない。また、いくつかの純化されたキチナーゼを用いて、試験管内やフィールド実験において菌類の生育阻害を示す報告がされている。そのため、植物キチナーゼは、病原菌に対する自己防御機能において重要な役割を担っていると思われる。キチナーゼはその一次構造から、大きくはグリコシルヒドラーゼのファミリー18と19に分類され、さらに、少なくとも4つクラスに分類される。クラスI、IIとIVキチナーゼはファミリー19に、クラスIIIキチナーゼはクラス18に属している。

これまで、当研究室においてヤマイモ塊茎から5つのキチナーゼA、E、F、H1とGを純化し、その特性を明らかにしてきた。キチナーゼE、FとH1は病原菌であるフザリウム菌に対して高い溶菌活性を示し、特にキチナーゼE(クラスIV)はイチゴうどん粉病菌に対してバイオ農薬としての可能性を示した。

本研究においては、キチナーゼEの構造を調べるため、ヤマイモの葉よりクラスIVキチナーゼをコードしている遺伝子のクローニングを行った。遺伝子のクローニングは、一部の既知DNA配列からデザインした遺伝子特異的プライマーとランダムプライマーの組み合わせによるエクステンションPCR法により行った。この方法により、1.6kbのDNA断片がクローニングされた。このDNA断片は約1kbのコーディング領域、約350bpの5'側の隣接配列と304bpの3'側の隣

接配列からなり、コーディング領域は 124bp のイントロンを間に挟み、2つのエキソンで構成されていた。5'側の隣接配列には TATA box が、3'側の隣接配列にはポリアデニル化シグナル配列 (AATAAA) と思われる配列が存在した。これらの結果から、このクローニングしたDNAは有効な転写単位であることが示唆された。

推定されたアミノ酸配列はシグナル配列、キチン結合領域、リンカー配列及び触媒領域から構成され、また、他の植物のクラスIVキチナーゼと 50~59%の相同性を示した。また、クラスI、IIやIVキチナーゼとのアライメント比較により本キチナーゼはクラスIVに属することが示唆された。さらにオオムギクラスIIキチナーゼの立体構造を基にしたホモロジーモデリングにより、クラスIVはクラスIやIIと比べ、より短い基質糖鎖部分でも認識することが可能であることが示唆された。このことから、ヤマイモクラスIVキチナーゼは、病原菌による攻撃に対してより適応した立体構造を有していると思われる。

さらに、本クラスIVキチナーゼは他植物のクラスIVと異なり、C末端側の最後のシステインの後に8個のアミノ酸が付加していた。このC末端付加配列の役割を明らかにするため、タバコ植物と培養細胞にこの遺伝子とC末端付加配列部分を取り除いた遺伝子をアグロバクテリウム法により導入し、外来キチナーゼ発現させ、その局在性について調べた。C末端付加配列のついたキチナーゼ遺伝子を導入した形質転換体においては、そのキチナーゼは細胞内に蓄積されていた。一方、C末端付加配列を取り除いたキチナーゼ遺伝子を導入した形質転換体では、そのキチナーゼは分泌した。その結果、ヤマイモクラスIVキチナーゼのC末端付加配列は細胞内輸送配列としての役割を有することが示唆され、おそらく液胞輸送シグナルであろうと推定された。よって、C末端付加配列を持つ本ヤマイモクラスIVキチナーゼは液胞に局在していると思われる。

本論文は、液胞型クラスIVキチナーゼの存在を示す最初の報告となる。このような新しいキチナーゼの発見は、植物の自己防御機能を理解する上で注目に値するであろう。さらに、本ヤマイモクラスIVキチナーゼは病害抵抗性植物やバイオ農薬の開発に関する研究に活用されることが期待されている。

論文審査の結果の要旨

植物は外界から身を守るため、生体防御酵素を産生する。その一つにキチナーゼがあるが、タンパク質の構造からファミリー18 (クラス III, V) とファミリー19 (クラス I, II, IV) に分類される。ヤマイモの塊茎から精製されたファミリー19のクラスIVキチナーゼが、とくに病原菌に対し強い溶菌活性を示したことから、本学位論文では、このキチナーゼ遺伝子のクローニングを行なった。つぎに、その塩基配列からアミノ酸配列を推定し、さらに立体構造のコンピュータシミュレーションを行ない、他のキチナーゼと異なる特異性を明らかにした。さらに、本キチナーゼの植物内での局在性を明らかにするため、遺伝子組換え植物 (タバコ) を作成し、その培養細

胞及び植物体を用いて細胞内局在性を明らかにした。

第一章では、病原菌に対し溶菌活性を有するファミリー19のクラスIVのヤマイモキチナーゼのゲノム遺伝子を Extension PCR を用いてクローニングを行った。すなわち、本キチナーゼの一部のアミノ酸配列をもとに作成したプライマーを用いて、PCRにより一部の塩基配列を決定した後、その解明した塩基配列から作成したプライマーとランダムプライマーとの組み合わせで、未知の遺伝子配列を増幅させる方法である。結果として、ヤマイモの葉からファミリー19のクラスIVキチナーゼの全塩基配列を明らかにした。その塩基配列から推定したアミノ酸配列をこれまで報告されているキチナーゼの配列との比較から、本ヤマイモキチナーゼがファミリー19のクラスIVキチナーゼであることを確認した。さらに、本キチナーゼは、他のクラスIVキチナーゼと異なりC末端側に8個の Extension 配列を持つことを明らかにした。

第二章では、その塩基配列をもとに、本キチナーゼのタンパク質立体構造をコンピュータシミュレーションにより図示した。その立体構造から基質のキチン鎖との結合予想図をシミュレートし、これまで結晶化に成功し立体構造が解析されているクラスI/IIのオオムギキチナーゼと比較した。その結果、本ヤマイモキチナーゼ（ファミリー19のクラスIV）は、オオムギのキチナーゼに比べキチン結合領域が糖鎖（N-アセチルグルコサミン）2ユニット分少ないことがわかった。すなわち、オオムギキチナーゼは糖鎖6ユニットと結合するのに比べ、本ヤマイモキチナーゼは4ユニットと結合する。しかし、結合エネルギーには差がなかった。これらのことは、本ヤマイモキチナーゼは基質特異性が広く、種々の病原菌の細胞壁キチンと結合しやすいことを示すことができた。

第三章では、第一章で明らかになったC末端側に存在する8個の Extension 配列の細胞内局在性についての役割を、遺伝子組換えタバコを用いて調べた。方法はアグロバクテリウムによる遺伝子導入法を用いて、問題のC末端 Extension 配列を有するものと欠損したヤマイモキチナーゼ遺伝子をタバコに導入した。遺伝子組換えタバコの培養細胞と植物体の葉を用いて、ヤマイモキチナーゼの細胞局在性を調べた結果、C末端 Extension 配列は細胞内局在化の役割を持つこと（おそらく液胞輸送シグナル）を明らかにした。すなわち、本ヤマイモクラスIVキチナーゼは細胞内局在性のクラスIVキチナーゼであることを明らかにした。

以上、研究成果として、細胞内局在性のクラスIVキチナーゼの存在をはじめて明らかにしたこと、さらに、植物病原菌に対する非常に適した生体防御キチナーゼであることを示したことである。したがって、本酵素及び遺伝子は、病原菌耐性の遺伝子組換え植物の作成やバイオ農薬として、本酵素の農業への応用が期待される。