

氏名	コーソン サイバカッサー Kosonh Xayphakatsa
学位(専攻分野)	博士(農学)
学位記番号	農博第1705号
学位授与の日付	平成20年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	農学研究科農学専攻
学位論文題目	Analysis of biological functions of a class II chitinase gene <i>Cht11</i> in rice ( <i>Oryza sativa</i> L.) (イネにおけるクラスIIキチナーゼ遺伝子 <i>Cht11</i> の生物学的機能の解析)
論文調査委員	(主査) 教授 谷坂隆俊 教授 井上國世 教授 山末祐二

### 論文内容の要旨

感染特異的タンパク質 (PRタンパク質) の一つ、PR-3キチナーゼは、菌類の細胞壁の主要な構成要素であるキチンを加水分解する酵素であり、植物体の生体防御機構の中で主要な役割を担っている。PR-3キチナーゼは、他のPRタンパク質と同様、多重遺伝子族によってコードされており、植物体には数多くのアイソザイムが存在する。アイソザイムの中には、抗菌活性のみならず、根粒着生、胚発生および耐凍性などに関与するものがあることから、PR-3キチナーゼアイソザイムはそれぞれ異なった機能を有すると考えられている。イネにおいては、12個のPR-3キチナーゼアイソザイム遺伝子座 (*Cht1-Cht12*) が存在する。これまでの研究から、クラスIキチナーゼCHT1は、クラスIVキチナーゼCHT4およびCHT5と比較して、キチン加水分解反応の最大速度 ( $V_{max}$ ) は低いが、抗菌活性が高いこと、およびその発現はいもち病感染によって顕著に誘導されることが明らかにされており、イネの生体防御機構において主要な役割を担っていると考えられている。しかし、クラスIIキチナーゼに関しては、ほとんど解析が行われておらず、その役割は明らかにされていない。本研究は、イネクラスIIキチナーゼ遺伝子 *Cht11* の発現時期・組織特異性および外生植物ホルモンの投与に対する発現量の変化を調査するとともに、大腸菌組換えタンパク質発現系を用いてCHT11タンパク質の精製を試み、CHT11の酵素化学的特性および *Cht11* 遺伝子の生物学的機能を解析したものである。以下に成果の概要を示す。

1. イネ品種日本晴の、播種後30, 60, 120および150日の葉身、葉鞘、根および幼穂原基を採取し、*Cht11* 遺伝子の組織および時期特異的発現をリアルタイムPCRによって調査したところ、*Cht11* 遺伝子は播種後60日の葉身で強く発現していることが認められた。ついで、3.5葉期の日本晴に、いもち病菌 (レース003.0) の孢子懸濁液および蒸留水 (コントロール) を噴霧し、病斑を形成した葉身における *Cht11* 遺伝子の発現量を調査したところ、病斑を形成した葉身の *Cht11* の発現量がコントロールよりも低く、*Cht11* 遺伝子の発現はいもち病感染によって抑制されていることが明らかになった。PRタンパク質遺伝子の発現は、サリチル酸 (SA)、ジャスモン酸 (JA) およびアブシジン酸 (ABA) によって制御されることが知られている。そこで、3.5葉期の日本晴に1 mM SA, 100  $\mu$ M MeJA, 100  $\mu$ M ABAおよび蒸留水 (コントロール) 処理を行ったところ、SAおよびABA処理葉における *Cht11* の発現量がコントロールのそれぞれ2.5倍および255倍になることが認められた。一方、MeJA処理葉における *Cht11* の発現量はコントロールの0.6倍であった。これらのことから、*Cht11* の発現はSAおよびABAによって誘導され、MeJAによって抑制されることが明らかになった。

2. CHT11タンパク質の酵素化学的特性を明らかにするために、大腸菌組換え体タンパク質発現系を用いてCHT11タンパク質の精製法の確立を試みた。グルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) を連結した *Cht11* 遺伝子を大腸菌の中で発現させて、その後の培養条件がGST融合CHT11タンパク質 (GST-CHT11) の可溶化に及ぼす効果を調査したところ、16°C、12時間が最適な培養条件であることが明らかになった。つぎに、GST-CHT11をアフィニティークロマトグラフィーによって精製したところ、70kDaの非特異的タンパク質が混入していることが観察された。この非特異的タンパク質はヒートショックタンパク質の一つであるDnakであると考えられたため、3 mM ATP-Mgを含むバッファーを用いてCHT11の精製を

進めたところ、70kDaのタンパク質を含むほとんどすべての非特異的タンパク質が除去された。そこで、PreScission Proteaseを用いてGSTを切り離し、再度、アフィニティークロマトグラフィーを行ったところ、単一のCHT11タンパク質が獲得された。すなわち、本方法によって、800mlの大腸菌培養液から4.1mgのCHT11タンパク質を精製・獲得することができた。

3. 精製したCHT11タンパク質の酵素化学的特性を調査した。基質にカルボキシメチルキチンを用いてCHT11タンパク質の温度およびpH依存性を調査したところ、CHT11タンパク質の至適温度およびpHは、それぞれ35-40℃およびpH 5.5-6.5であることが明らかになった。また、CHT11タンパク質の最大活性がpH 4.0および7.0で50%に低下したこと、およびオオムギクラスIIキチナーゼのGlu67およびGlu89が酵素活性に重要なアミノ酸残基であることから、CHT11タンパク質の活性残基はGlu69およびGlu91であると考えられた。

4. *Trichoderma viride*の病原性株および非病原性株を用いて、CHT11タンパク質の抗菌活性を調査した。両菌株の生育は100および300 $\mu$ gのCHT11タンパク質によって阻害されたが、その程度は300 $\mu$ gの場合においてもわずかであった。このことから、CHT11タンパク質の抗菌活性はそれほど高くないと考えられた。

5. 以上の結果から、*Cht11*遺伝子は、イネ植物体の正常な成長・発育を進める遺伝子であることが明らかになった。ABAは乾燥応答のシグナル伝達物質として知られている。したがって、ABA処理によって発現量が著しく増加した*Cht11*遺伝子はイネの耐乾性にかかわっている可能性があるかと推察された。

## 論文審査の結果の要旨

感染特異的タンパク質（PRタンパク質）の一つであるPR-3キチナーゼは、植物体の生体防御機構の中で主要な役割を担っている。イネにおいては、12個のPR-3キチナーゼアイソザイム遺伝子座が存在するが、それらの多くについては生物学的機能が明らかにされていない。本研究は、イネクラスIIキチナーゼ*Cht11*遺伝子の発現時期・組織特異性および外生植物ホルモンの投与に対する発現量の変化を調査するとともに、大腸菌組換えタンパク質発現系を用いてCHT11タンパク質の精製を試み、精製されたCHT11を用いてその酵素化学的特性および病原菌に対する反応を解析したものである。本研究の評価すべき点は以下のとおりである。

1. 健全なイネ植物体における*Cht11*遺伝子の発現時期および発現組織をリアルタイムPCRによって調査し、*Cht11*は播種後60日の葉身でもっとも活発に発現することを明らかにした。また、*Cht11*遺伝子の発現量が、いもち病斑を形成した葉身より形成しなかった葉身で顕著に高かったことを認め、*Cht11*遺伝子の発現はいもち病感染によって抑制されると指摘した。さらに、サリチル酸およびアブシジン酸処理は*Cht11*遺伝子の発現を著しく高めることを明らかにした。

2. GSTを連結した*Cht11*遺伝子を大腸菌の中で発現させて、その後の培養条件がGST融合CHT11タンパク質の可溶化に及ぼす効果を調査し、可溶化には16℃、12時間が最適な培養条件であることを明らかにした。また、精製過程において混入した70kDaの非特異的タンパク質は、3 mM ATP-Mgを添加したバッファーを用いてカラム洗浄することにより除去できることを明らかにした。本研究において確立した精製法を用いて、800mlの大腸菌培養液から4.1mgのCHT11タンパク質を獲得することに成功した。

3. 基質にカルボキシメチルキチンを用いてCHT11タンパク質の温度およびpH依存性を調査し、CHT11タンパク質の至適温度およびpHは、それぞれ35-40℃およびpH 5.5-6.5であることを明らかにした。

4. *Trichoderma viride*病原性株および非病原性株を用いて、CHT11タンパク質の抗菌活性を調査し、培地上での両菌株の生育が100および300 $\mu$ gのCHT11タンパク質によって阻害されること、しかし、300 $\mu$ gのCHT11タンパク質を用いた場合においても阻害の程度がきわめて小さかったことから、CHT11タンパク質の抗菌活性はほとんどないと指摘した。

5. 以上の結果から、*Cht11*は、イネの正常な成長・発育にかかわる遺伝子であると結論した。

以上のように、本論文は、イネにおいて初めてクラスIIキチナーゼをコードする*Cht11*遺伝子の生物学的機能を明らかにするとともに、クラスIIキチナーゼCHT11の酵素化学的特性を解明したものであり、植物育種学のみならず、植物遺伝学、タンパク質工学、酵素化学、植物病理学および植物生理学の発展に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成20年2月14日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。