

氏 名 北 宣 裕
 学位(専攻分野) 博 士 (農 学)
 学 位 記 番 号 論 農 博 第 2249 号
 学位授与の日付 平 成 11 年 5 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 *Erwinia chrysanthemi* が生産するペクチン酸リアーゼの構造と機能に関する研究

論文調査委員 (主 査)
 教 授 古 澤 巖 教 授 津 田 盛 也 教 授 遠 藤 隆

論 文 内 容 の 要 旨

ペクチン酸リアーゼは軟腐性植物病原細菌である *Erwinia chrysanthemi* の主要な病原性因子で、カルシウムイオン (Ca^{2+}) の存在下で植物細胞壁成分であるポリガラクトロン酸を β -エリミネーション機構により分解し、感染組織を軟化・腐敗させる。本論文では、*E. chrysanthemi* が生産するペクチン酸リアーゼアイソザイムが感染場面で果たしている役割を分子レベルで明らかにするため、その3次元立体構造と機能についての構造機能相関解析を行った。その結果、(1) ペクチン酸リアーゼの活性中心は Ca^{2+} 結合部位に存在することを明らかにするとともに、感染に伴う植物組織の軟化・腐敗要因を明らかにした。また、(2) 4種のペクチン酸リアーゼアイソザイムの機能解析の結果から、複数のアイソザイムの存在は *E. chrysanthemi* の宿主範囲の維持・拡大に貢献している可能性を示した。さらに、(3) 活性を消失させた変異 PelC とオリゴガラクトロン酸との複合体結晶の構造解析から、ペクチン酸リアーゼ活性に関与する触媒アミノ酸残基を特定するとともに、ポリガラクトロン酸の分解メカニズムを推定した。内容は以下のとおりである。

1. 部位特異的変異を導入した変異 PelC の機能解析

(1) 活性中心と触媒残基の同定

3次元立体構造解析が進んでいる PelC について 34 種類の部位特異的変異体を作成し、それらのペクチン酸リアーゼ活性を解析したところ、 Ca^{2+} 結合部位に作成した変異 PelC でのみ活性が消失した。これらの結果から、PelC の活性中心が Ca^{2+} 結合部位にあること、および触媒に関与するアミノ酸残基を特定することができた。

(2) Ca^{2+} 結合強度と等電点

各変異 PelC の Ca^{2+} 結合強度と等電点の変化から、 Ca^{2+} 結合強度およびタンパク分子全体の電荷がペクチン酸リアーゼ活性に関与していることを明らかにした。

(3) 植物組織分解能

キュウリの皮層組織を用いて変異 PelC の植物組織分解能を定量的に評価した結果、各変異 PelC のペクチン酸リアーゼ活性と植物組織分解能との間に高い正の相関関係が認められた。このことから、*E. chrysanthemi* の感染に伴う植物組織の軟化・腐敗は、本細菌が生産・分泌するペクチン酸リアーゼによって引き起こされることが示された。

2. ペクチン酸リアーゼアイソザイムの特性と機能 *E. chrysanthemi* が生産する 4 種のペクチン酸リアーゼアイソザイム (PelA, B, C, E) の機能を比較したところ、アイソザイム間のペクチン酸リアーゼ活性には差がなく、PelE の活性中心も PelC 同様に Ca^{2+} 結合部位 1 ヲ所にのみ存在することが確認された。一方、植物組織分解能については、PelE は、PelA の 100 倍、PelB および PelC の 10 倍もの高い値を示すなど、アイソザイム間で大きな差が認められた。以上の結果から、複数のペクチン酸リアーゼアイソザイムの存在は、*E. chrysanthemi* の宿主範囲の維持・拡大に貢献している可能性を指摘した。

3. ペクチン酸リアーゼの構造機能相関解析

本研究で得られた結果とペクチン酸リアーゼ活性を消失した変異 PelC と 5 分子のポリガラクトロン酸との複合体結晶の構造解析結果から、ペクチン酸リアーゼ活性に関与するアミノ酸残基を特定し、それらの個別機能を明らかにした。また、

これらの解析結果を基に、ペクチン酸リアーゼによるポリガラクトuron酸の分解メカニズムを推定した。

論文審査の結果の要旨

ペクチン酸リアーゼは、多犯性の植物病原細菌である *E. chrysanthemi* の主要な病原性因子として極めて重要な役割を果たしており、近年、その3次元立体構造も決定されている。しかし、ペクチン酸リアーゼの活性中心や基質であるポリガラクトuron酸の結合に関与するアミノ酸残基等については明らかにされておらず、植物と病原細菌との相互関係を分子レベルで理解する上でその解析が待たれているところであった。本研究は、*E. chrysanthemi* が生産するペクチン酸リアーゼの3次元立体構造と機能について分子生物学な解析を行い、ペクチン酸リアーゼが本細菌の病原性に果たしている役割を明らかにした。評価できる点は以下のとおりである。

1. 本研究では、ペクチン酸リアーゼのうちその3次元立体構造解析が進んでいる PelC に部位特異的変異を導入して、特定のアミノ酸残基のみを置換した変異 PelC を作成し、ペクチン酸リアーゼ活性の中心と触媒アミノ酸残基を明確に同定した。

2. キュウリの皮層組織を用いて部位特異的変異 PelC の示す植物組織分解能を定量的に評価し、植物組織分解能とペクチン酸リアーゼ活性とが高い正の相関関係を示すことを明らかにした。このことにより、*E. chrysanthemi* の感染に伴って引き起こされる植物組織の軟化・腐敗は、植物細胞壁成分のポリガラクトuron酸が本菌の分泌するペクチン酸リアーゼによって分解されることに起因していることが直接的に証明された。

3. *E. chrysanthemi* が生産する4種のペクチン酸リアーゼアイソザイムのペクチン酸リアーゼ活性と植物組織分解能について相互に比較検討し、ペクチン酸リアーゼ活性には差が認められないものの、植物組織分解能には10から100倍もの差が存在することを見出した。これは、*E. chrysanthemi* が進化の過程で基質特異性の微妙に異なるペクチン酸リアーゼアイソザイムを分化させてきたことを示唆しており、本菌が示す広い宿主範囲に対応する現象として興味深い。

4. ペクチン酸リアーゼ活性を失った変異 PelC とオリゴガラクトuron酸との酵素-基質複合体結晶の3次元立体構造解析結果と本研究で得られたペクチン酸リアーゼの機能解析結果をあわせて構造機能相関解析を行い、触媒アミノ酸残基を特定するとともに、それらの個別機能を明らかにした。さらに、ペクチン酸リアーゼ分子と基質との結合様式とポリガラクトuron酸の切断パターンを明らかにし、それをもとにポリガラクトuron酸の分解メカニズムを推定した。

以上のように、本論文は、ペクチン酸リアーゼの3次元立体構造をその機能と関連させて解析することによって、*E. chrysanthemi* の病原性に果たしているペクチン酸リアーゼの役割を分子レベルで明らかにした。また、本研究は、活性中心に特異的に結合するインヒビター農薬の開発あるいはペクチン酸リアーゼに分解されにくい細胞壁を有する抵抗性作物の育成等、効果的な病害防除技術の開発の基礎を築くものとして植物病理学に寄与するところは極めて大きく、新たな展開が期待できるものとして評価できる。

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11年4月15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。