

イネのキチナーゼ遺伝子の単離と関連研究

京都大学大学院農学研究科
中崎鉄也

キチンは、キトサンと共に 1980 年代から「最後のバイオマス」として注目されてきた物質であり、応用面では既に、人工皮膚、生体吸収性縫合糸、人工腱、人工靭帯等の医療素材や化粧品材料あるいは食品添加剤として利用されている。キチナーゼは、このキチンを分解する酵素であり、既に、多くの植物種から検出され、抗菌作用をもつ酵素として注目されている。近年、植物キチナーゼは、耐病性付与を目的とした育種の遺伝子素材として用いられるようになってきた。ここではキチナーゼ遺伝子の特性・構造について紹介する。

キチンとキチナーゼ

物質としてのキチンは、N-アセチルグルコサミンが β -1,4結合して形成される直鎖状の多糖で、セルロースと極めて似た化学構造になっている(図1)。キチンを体の構成成分としてもつ生物種は、カビ、キノコ等の真菌類、一部の藻類および進化のレベルで、原生動物から有鬚動物までの各種分類群に属する動物にほぼ限定される。各種の動物では、主に、その外骨格を構築しているクチクラ層に分布し、表皮・殻の構成成分として、骨格維持に機能している。菌類・藻類では、細胞壁の構造的強度を維持するための構成成分であり、高等植物におけるセルロースの役割を担っている。高等植物においては、植物体中にキチンは存在せず、構成成分あるいは代謝産物として積極的に利用されているものではないと考えられている。

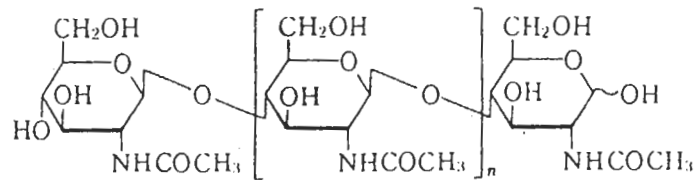


図1. キチンの化学構造 (生化学辞典より)

キチナーゼは、キチンを分解する酵素であり、キチンを自身の構成成分としている生物種においては、キチン合成酵素と共にキチンの代謝を制御する酵素としての役割を担っている。各種の動物種においては、脱皮する際に捨てられる古い表皮中のキチンを分解し、その分解物を新しい表皮形成に再利用するための重要な酵素として機能している。この表皮中のキチンの分解過程では、エンド型キチン分解酵素とエキソ型キチン分解酵素が作用する(図2)。すなわち、キチンは、まずエンド型キチン分解酵素によって加水分解され、N-アセチルキオリゴ糖となり、これにエキソ型キチン分解酵素が作用し、N-アセチルグルコサミンにまで分解される。前者のエンド型キチン分解酵素がキチナーゼであり、後者のエキソ型キチン分解酵素はN-アセチルヘキソサミニダーゼと称される。

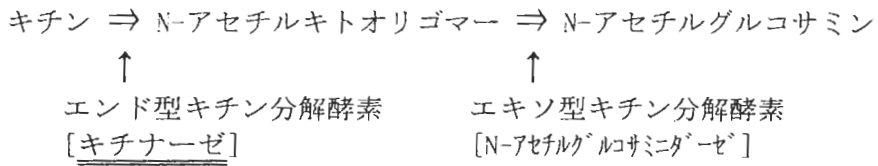


図2. 酵素的キチン分解過程

カビ・キノコ等の菌類キチナーゼは、自然界に多量に存在するキチンを分解・循環させる重要な役割を担っていると共に、自身の細胞壁の形態形成あるいは他のカビや昆虫への感染時に機能すると考えられている。また、細菌類からもキチナーゼは同定されており、これらは、キチンを分解資化することに機能し、菌類キチナーゼと同様にキチン関連物質の自然循環に貢献していると考えられている。

PRタンパク質としての植物キチナーゼ

前述の通り、キチンを自身の構成成分としない植物においても、多く種でキチナーゼが生産されていることが明らかになっている。現在、この植物体中に生産されるキチナーゼは、感染特異的 (pathogenesis - related; PR) タンパク質の一つであり、生体防御機構の主要な構成要素としての役割を担っていると考えられている。

PR タンパク質とは、「病原体が植物に感染し、植物が病的状態あるいはそのような状態に陥ると、宿主である植物から誘導されるタンパク質」と定義されているタンパク質群である。植物体が病原菌に侵された場合、感染した部位には通常、病斑が認められる。この病斑の形成は、病原菌によって感染細胞が死滅させられていくということの他に、感染細胞自らが死滅することによって病斑部から周辺部位への病原菌感染を積極的に防ぐという植物体自身の防御反応として捉えることができる。この視点で、1970年に、TMV (タバコモザイクウイルス) に感染して壊死病斑の見られるタバコ成熟葉中のタンパク質が解析され、特異的に誘導されるタンパク質が最初に PR タンパク質として認識された。現在、PR タンパク質は 10 を越える群に分類されているが、キチナーゼは、この内の PR - 3, 8, 11 に分類される (表. 1)。

表 1. PR タンパク質の分類 (Van-Loon et al. 1994より)

Family	"Type member"	Properties
PR-1	Tabacco PR-1a, b, c	antifungal
PR-2	Tabacco PR-2	β -1,3-glucanase
PR-3	Tabacco P, Q	chitinase
PR-4	Tabacco "R"	antifungal
PR-5	Tabacco S	antifungal
PR-6	Tomato Inhibitor I	proteinase-inhibitor
PR-7	Tomato P6g	endoproteinase
PR-8	Cucumber chitinase	chitinase
PR-9	Tabacco "lignin-forming peroxidase"	peroxidase
PR-10	Paseley "PR-1"	"ribonuclease-like"
PR-11	Tabacco class V chitinase	chitinase

植物キチナーゼの分類

NCBI (National Center of Biotechnology Information) の検索システムで "chitinase" と "plant" の 2 つのキーワードで塩基配列データベースを検索すると、1997 年 9 月時点で 48 件、タンパク質データベースでは、54 件がピックアップできる。これらの種々のキチナーゼは、主として、タンパク質の一次構造 (アミノ酸配列、推定される配列も含む) によっていくつかのクラスに分類されている。先の PR タンパク質の分類との対応では、PR-3 には、クラス I, II および IV が含まれ、PR - 8 にクラス III, PR - 11 にクラス V が分類される。

クラス III 植物キチナーゼは、他のクラスの植物キチナーゼよりも酵母 (*Yeast; Saccharomyces cerevisiae*) や *Candida albicans* あるいは接合菌類 (*Rhizopus niveus*, *R. oligosporus*) の菌類キチナーゼとより高い同一性を示し、いくつかの双子葉植物と単子葉植物のオオムギで同定されている。また、イネでは、13 のクラス III 様 EST (expressed sequences tags) が見ついている。一方、エンド型キチナーゼ活性をもつが他の植物キチナーゼと相同性のない酵素がタバコで単離されており、クラス V に分類されている。このキチナーゼは、細菌類 (*Bacillus circulans*, *Serratia marcescens* 等) のエキソ型キチナーゼの配列と相同な領域をもっている。

PR-3 に分類される、クラス I, II および IV は、いずれもシグナルペプチドをもち、その酵素活性部位に相同な領域を共有する植物キチナーゼである (図 3)。これらは、分岐進化 (divergent evolution) によって生じたアイソザイムスーパーファミリー (Isozyme superfamily) であると考えられている。クラス I キチナーゼは、単子葉植物、双子葉植物の両方で見ついているが、そのアミノ末端領域にキチン結合領域を含むシステインリッチドメイン (cysteine-rich domain) をもっている。多くのクラス I キチナーゼは、カルボキシ末端付加配列 (carboxy-terminal extension) をコードしており、このカルボキシ末端シグナル (carboxy-terminal vacuolar targeting signal) によって液胞中へ放出される。一方、クラス II キチナーゼは、双子葉植物に多く見られ、システインリッチドメインを欠いている。カルボキシ末端付加配列も欠いているため、これら酵

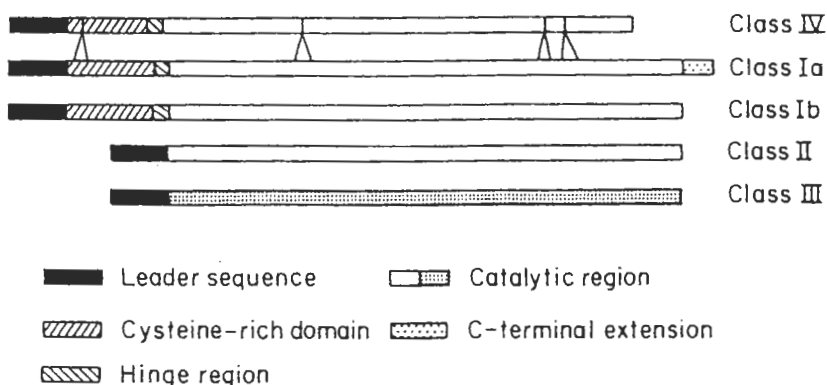


図 3. キチナーゼタンパク質の構造 (Collinge et al. 1993 より).

素はアポプラスト (apoplast) 中に局在すると考えられる。また、このクラスには、クラス I には認められない 14 コドンの欠失を持つ *Lycopersicon esculentum*, *Nicotiana tabacum* や *Petunia hybrida* のキチナーゼと、この欠失の見られない *Solanum tuberosum* や *Hordeum vulgale* のキチナーゼを含んでいる。クラス IV キチナーゼは、システインリッチドメインをもち、活性部位の 2ヶ所に欠失のある細胞外 (extracellular) キチナーゼから構成される。このクラスのキチナーゼは主に双子葉植物で同定されている。

植物キチナーゼの抗菌作用に作用に関しては、病原菌の生育・発芽に対する効果が調べられていおり、いずれのタイプに関しても、キチナーゼによる生長阻害・発芽阻害が確認されている。その作用力は、クラス間で差異は認められ、例えば、システインリッチドメインをもつキチナーゼの方がより抗菌活性が高いこと等が報告されている。また、キチナーゼ遺伝子をカリフラワーモザイクウイルスの 35S プロモーター等に連結し、常時発現する遺伝子を構築し、これを植物体に形質転換によって導入した植物で耐病性が向上したとする実験結果も幾つか報告されていっている。

前述のとおり、植物では、病原菌の感染によってキチナーゼを含む各種の PR タンパク質の合成が誘導される。PR - 3 に分類されるキチナーゼの誘導に関しては多くの報告があり、ジャガイモ疫病菌、テンサイ褐斑病菌等の各種の菌類感染による誘導が確認されている。その他、TMV や AMV (アルファルファモザイクウイルス) といったウイルスの感染、あるいは、各種のストレス、化学物質によっても誘導される。つまり、植物は、作用するキチンが存在しない時点で、キチナーゼを生産する。このことは、植物は各種のストレスが生じた時点で、その後には予想される菌感染に対処する準備を始める機構を進化させていることを示唆する。

イネ籾殻中のキチナーゼの同定

イネにおいては、既に 10 以上のキチナーゼが報告されている。さらに、イネの登熟期の籾殻中にもユニークな一次構造を持つキチナーゼが存在することが明らかになった。これは、イネの休眠性関連タンパク質の 2次元電気泳動法による探索過程で、休眠誘導条件下で強く発現するタンパク質 (RHP) として検出された。この RHP の特徴を明らかにするため、N-末端 20 残基のアミノ酸配列を調査し、得られたアミノ酸配列と既知タンパク質のアミノ酸配列との相同性を調べたところ、RHP のN-末端は、トウモロコシ、*Brassica naps* および *Beta vulgaris* のキチナーゼの活性部位と高い相同性を示すと共に、データベースに登録されている EST に同一のアミノ酸配列をコードしているものが登録されていることが明らかになった。この cDNA の塩基配列情報を基に、cDNA の領域の上流および下流を含む塩基配列を TAIL - PCR (Liu et al. 1995) の方法を適用して遺伝子を単離し、塩基配列を調査した。その結果、活性部位および C-末端部位は、クラス IV キチナーゼの特徴をもつが、クラス IV キチナーゼが共通してもつシステインリッチドメインを欠いている、ユニークな一次構造であることが明らかになった (図 4)。さらに、遺伝子の上流域約 700 bp の塩基配列には、既知のイネキチナーゼの上流域に存在するエリシター誘導性に関連するとされる DNA モチーフと相同な配列は見当たらず、誘導条件が既知のイネキチナーゼとは異なることが推察された。また、イネの亜種の *Japonica*, *Indica* に共通して少なくとも一つのイントロンが存在すること、また、*Indica* に

は翻訳領域下流に挿入配列が存在することが明らかになった。

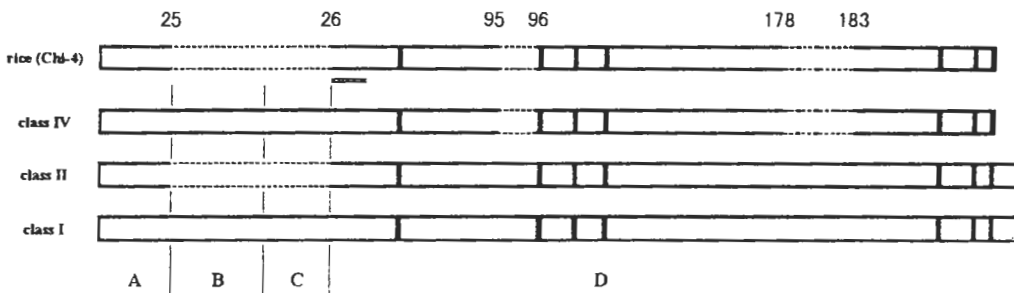


図4. 籾殻から検出されたイネキチナーゼ (Chi-4) の構造。
A; signal peptide, B; cysteine-rich domain, C; hinge region, D;
catalytic domain.

植物キチナーゼの育種的利用

PR タンパク質をコードしている遺伝子の発現は、病原菌感染やエリシターと呼ばれる化学的刺激によって誘導され、一般的には恒常的な強い発現を示さない。しかし、キチナーゼ遺伝子は、塊茎や種子・果実に恒常的に発現していることが報告されており、先の籾殻中のキチナーゼも複数の発育ステージの葉身中での発現が確認されている。また、植物の各器官の内最も外敵の攻撃を受けやすいと考えられる花器の雌蕊においてもキチナーゼが発現していることが明らかになった。これらのことから、植物体内には、キチナーゼが病原菌等の攻撃に対して予防的に準備されている可能性が想像される。

従来病害に対する遺伝的抵抗性の付与に関する育種は、真性抵抗性遺伝子の探索・導入を中心に行われてきた。真性抵抗性遺伝子は、病原菌のレースによってその抵抗性反応が大きく異なる。このため、新しく抵抗性遺伝子の導入した抵抗性品種を育成・普及しても、数年後に新たな病原菌レースの出現によって抵抗性を失うことになる。これが、いわゆる「抵抗性の崩壊現象」であり、真性抵抗性遺伝子を利用した育種の限界が指摘されている。既に、キチナーゼ遺伝子を植物体に導入することによって病害抵抗性の程度が増大する事例が報告されているが、キチナーゼ遺伝子等の、いわば「免疫力」に関係する能力の改良が、従来耐病性育種に代わる新たな戦略になる可能性が考えられる。植物キチナーゼは、イネでそうであるように、複数のアイソザイムが存在する。そして、その発現は様々なシグナル伝達系によって制御されていて、植物は、各種のPRタンパク質群と共に複雑な防御機構を構築していることが次第に明らかになりつつある。従って、各タイプのキチナーゼの植物体内での役割分担、他の抗菌物質との相互作用、それらの発現制御機構等の解明が、新たなキチナーゼの探索・同定と平行して進展することが期待される。

参考文献

- キチンキトサンハンドブック (1995) キチン、キトサン研究会 編
- 植物の遺伝子発現 (1995) 長田・内宮 編