

論文内容の要旨

応用生命工学専攻

平成10年度博士課程入学

氏名 趙 銀敏

指導教官名 山根 久和

論文題目

Cloning and characterization of diterpene cyclase genes involved in biosynthesis of phytoalexins in rice

(イネのファイトアレキシン生合成に関与するジテルペン環化酵素遺伝子の単離・解析)

植物は動物のような免疫系を持たないが、カビ、細菌、ウイルスなどの病原体の感染を特異的な機構で認識し、種々の抵抗性反応を示し生存を図っている。このような植物の抵抗性反応を誘導するものを一般にエリシターと呼ぶが、病原体の感染を受けた植物では、病原体や植物の細胞表層由来の断片などがエリシターとなってファイトアレキシンと呼ばれる低分子の抗菌性物質を含む様々な抵抗性反応が誘導される。イネ液体培養細胞は、多くの菌類の細胞表層を構成する多糖であるキチンやβグルカン断片(オリゴ糖)をエリシターとしてナノモルレベルで認識し、様々な防御応答を開始する。

ところで、近年、オーキシン、ジベレリン、サイトカイニン、アブシジン酸、エチレン、ブラシノステロイドに続く第7の植物ホルモンと考えられているジャスモン酸(以下JA)が、エリシターによって誘導される二次代謝産物の生産のためのシグナル伝達物質として機能している例が数多く報告されている。これらの二次代謝産物は、ファイトアレキシン及びその関連物質であることが少なくないことから、エリシター誘導のファイトアレキシン生産においてJAが普遍的なシグナル伝達物質として機能している可能性が高いと考えられる。イネ(*Oryza sativa* L. cv. BL-1)液体培養細胞においては、エリシター(*N*-acetylchitoheptaose)処理によりジテルペン化合物である momilactone A(以下MA)が主要ファイトアレキシンとして生産されることが知られているが、我々の研究グループにより、この系においてもJAがエリシターシグナルの伝達物質として重要な機能を果たしていることが明らかにされている。以上の事実は、個々のイネ液体培養細胞が、エリシターやJAをシグナル伝達物質として受容し、

一連のシグナル伝達経路を経てファイトアレキシンを生産していることを意味する。

そこで、本研究では、上記のような JA の情報伝達機構解明研究の一環として、イネ液体培養細胞におけるジテルペン系ファイトアレキシンの生合成酵素遺伝子を単離し、機能解析を行なうことを目的とした。このような遺伝子が単離同定され、その遺伝子発現制御機構が解明されれば、JA の情報伝達経路解明の足がかりになると考えられる。

I. イネ液体培養細胞におけるファイトアレキシン生合成に関与するジテルペン環化酵素遺伝子のクローニング

イネの葉部においては病原菌の感染により、phytocassanes A-D、momilactones A-C、oryzalexins A-F、S など多種類のジテルペン系ファイトアレキシンの生産が誘導されることが知られている。イネ BL-1 液体培養細胞においては、エリシター処理により主要なファイトアレキシンとして MA が生産されることはすでに述べたが、cv. Koshihikari の培養細胞では momilactone 類、phytocassane 類の生産も誘導される。これらのファイトアレキシンは、Fig. 1 に示すように、geranylgeranyl diphosphate (GGDP) から生合成されると考えられるが、その環化酵素遺伝子は、ジベレリン生合成系の GGDP から *ent*-copalyl diphosphate (*ent*-CDP) への変換を触媒する copalyl diphosphate synthase (CPS)、*ent*-CDP から *ent*-kaurene への変換を触媒する *ent*-kaurene synthase (KS) 等のジテルペン環化酵素遺伝子と相同性を有している可能性が考えられた。そこで、これまでに様々な植物およびカビから単離されてきた CPS、KS 等の保存配列に基づいて設計した degenerate primers を用い、PCR によりイネのジテルペン系ファイトアレキシンの生合成に関与するジテルペン環化酵素のクローニングを試みた。Template として、エリシター処理後 8 時間のイネ液体培養細胞から精製した mRNA を用いて RT-PCR を行なったところ、予想された約 550 bp の DNA 断片が増幅された。この DNA 増幅断片にコードされるアミノ酸配列は他の植物由来のジテルペン環化酵素のものと同様性を示したので、この DNA 増幅断片を含む cDNA 全長のクローニングを rapid amplification of cDNA ends (RACE)-PCR 法により試みた。その結果、550 bp DNA 増幅断片の上流・下流側に相当すると考えられるクローンが得られたが、塩基配列決定の結果、それらは互いに異なるタンパク質をコードしていた。そこで、これらの増幅断片にコードされる遺伝子をそれぞれ *OsDTC1*、*OsDTC2* と名づけ、それぞれの全長を 5'-RACE と 3'-RACE により単離することを試みた。その結果、*OsDTC1* については、ORF 全長を含む cDNA クローニングに成功し、それが 829 アミノ酸残基をコードすることが明らかになった。*OsDTC2* については、N 末端を含む 558 アミノ酸残基をコードする cDNA 断片が取得されている。

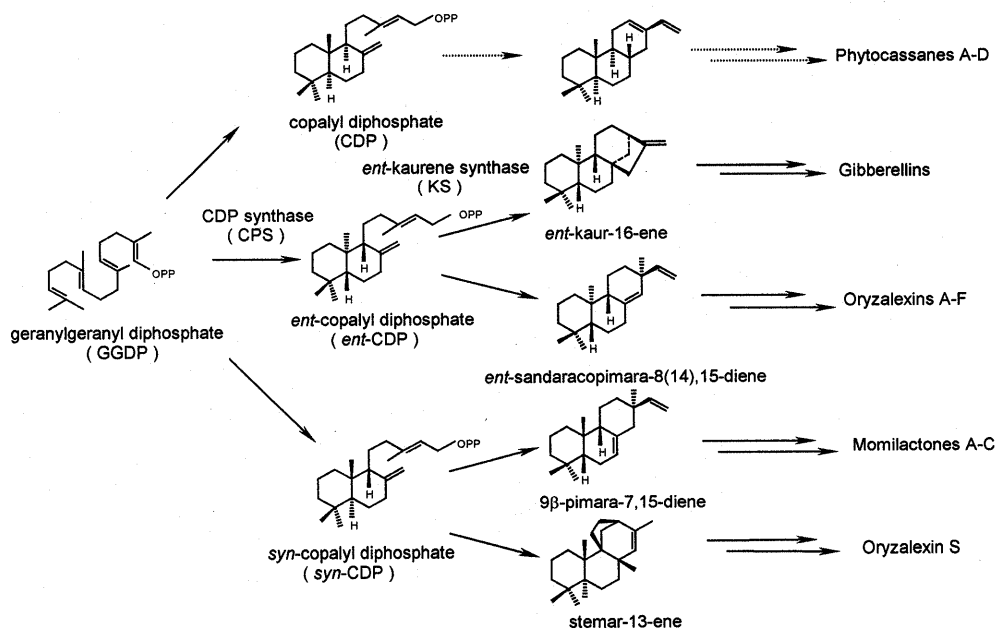


Fig. 1 Biosynthetic pathways of momilactone A and its related compounds

II. 他のテルペン環化酵素との一次構造の比較と RT-PCR による発現解析

OsDTC1, *OsDTC2* にコードされるタンパク質の推定アミノ酸配列を他のテルペン環化酵素と比較してところ、テルペン環化酵素の中でジテルペン環化酵素においてのみ極めて高度に保存され、モノテルペン、セスキテルペン、トリテルペン等の環化酵素には見られない SAYDTAW モチーフが *OsDTC1*, *OsDTC2* の両酵素に存在しており、これらがともにジテルペン環化酵素であるものと推定された。*OsDTC1*, *OsDTC2* はジベレリン生合成系の酵素である KS とは 35-39% の identity を示したが、CPS との identity はそれより低く、20% 以下であった。KS 活性には DDXXD モチーフが関与し、同モチーフの最初のアスパラギン酸が二価金属イオン (Mg^{2+}) を介した酵素と基質由来のリン酸基との複合体形成に重要な役割を担っていると考えられているが、DDXXD モチーフは *OsDTC1*, *OsDTC2* の両酵素に見出された。しかしながら CPS 活性に関与していることが知られている DXDD モチーフは *OsDTC1*, *OsDTC2* ともに存在しなかった。以上より、*OsDTC1*, *OsDTC2* ともに GGDP を基質とする環化反応には関与せず、CDP, *ent*-CDP, あるいは *syn*-CDP を基質とする環化反応を触媒する可能性が示唆された。

ところで、現在までにクローニングされている植物由来のジテルペン環化酵素においては、その N 末端にセリン、スレオニンのような水酸基を持つアミノ酸残基および塩基性アミノ酸残基を多く含んでおり、その領域はプラスチド(葉緑体に代表される色素体)移行シグナルペプチド(トランジットペプチド)として機能することが知られている。*OsDTC1*, *OsDTC2* ともに Signal P program による検索結

果、N 末端側にトランジットペプチド様配列が存在していることが示された。したがって、これらの酵素はリボソーム上で生合成されたのちプラスチドに移行し、成熟酵素タンパク質としてプラスチド内に局在しているものと考えられる。イネ培養細胞における *OsDTC1*、*OsDTC2* mRNA の発現解析を RT-PCR により行なったところ、*OsDTC1*、*OsDTC2* ともにエリシター処理後 8 時間で極大を示し、以後漸減することが示された。イネ液体培養細胞において、エリシターを処理すると処理後 8 時間くらいから MA の生産が始まり、24-48 時間後で集積量が最大に達することが知られている。したがって、*OsDTC1*、*OsDTC2* はともに MA の生産が始まる時期に合成されプラスチドへ移行して安定に機能しているものと考えられる。

Ⅲ. 組換えタンパク質調製と機能解析

OsDTC2 全長を pGEX ベクターに連結し、グルタチオン S-トランスフェラーゼとの融合タンパク質となるように発現ベクターを設計した。得られたプラスミド (pGEX-*OsDTC1*) を大腸菌に導入し、組換え融合タンパク質の調製を試みた。大腸菌は 30°C で培養し、組換えタンパク質の生産誘導は、大腸菌の生育が対数期後半に達した時に isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside を終濃度 1 mM となるように添加することによって行なった。菌体破碎液の可溶性画分を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動をしたところ、pGEX-*OsDTC1* プラスミドを持つ大腸菌抽出物から GST-*OsDTC1* タンパク質と思われるバンドを検出することができた。そこで、Glutathione Sepharose 4B アフィニティーカラムにより精製し、得られたタンパク質の N 末端アミノ酸配列を決定したところ、予想される融合タンパク質のものと一致したことから、GST-*OsDTC1* の生産が確認された。

OsDTC1 のジテルペン合成酵素活性を調べるために、GST-*OsDTC1* または GST (コントロール) を含む大腸菌の抽出物と基質として GGDP 及び CDP (CDP、*ent*-CDP、あるいは *syn*-CDP)、コファクターとして 500 mM MgCl₂·6H₂O を加えて 30°C で 1 時間インキュベーションした。反応液を *n*-hexane により抽出し、得られた抽出物を GC-MS により分析した。*OsDTC1* はアミノ酸配列から予想した通り GGDP を基質とした変換実験では変換活性を示さなかったが、CDP 及びその異性体を基質とした場合は変換活性を示した。CDP を基質にした場合にはジテルペン炭化水素 A、*ent*-CDP を基質にした場合はジテルペン炭化水素 B への変換が認められた。A、B は、お互いに鏡像体であると考えられるが、まだ同定には至っていない。一方、*syn*-CDP を基質とした場合は、標品が入手困難なため同定には至っていないが momilactone 類の生合成中間体である 9 β -pimara-7,15-diene と推定されるジテルペン炭化水素 C と未同定のジテルペン炭化水素 D への変換が認められた。化合物 A(B)、C、D はいずれもエリシター処理したイネ液体培養細胞において内生のジテルペン炭化水素として検出されている化合物であり、以上の事実は、*OsDTC1* がイネにおけるジテルペン系ファイトアレキシンの生合成酵素の一つとして機能していることを強く示唆するものと考えられる。反応産物 A、B、C、D の同定、*OsDTC2* の機能解明を行なうことが急務と考えている。