

# 琉球大学学術リポジトリ

亜熱帯・熱帯植物の植物成長抑制物質代謝関連酵素  
および抗真菌タンパク質の探索と機能解析～熱帯植  
物の多様性を利用した抗真菌タンパク質の探索と機  
能解析～

メタデータ	言語: 出版者: 南方資源利用技術研究会 公開日: 2014-10-26 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 平良, 東紀, 翁長, 彰子, 福田, 雅一, 伊藤, 進 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/20.500.12000/0002016716">http://hdl.handle.net/20.500.12000/0002016716</a>

## 亜熱帯・熱帯植物の植物成長抑制物質代謝関連酵素および抗真菌タンパク質の探索と機能解析 ～熱帯植物の多様性を利用した抗真菌タンパク質の探索と機能解析～

○平良東紀, 翁長彰子, 福田雅一, 伊藤進  
琉球大学農学部亜熱帯生物資源科学科

### 【目的】

食料問題の解決には、植物病原菌の約 8 割を占める真菌(カビ)に対する抵抗性タンパク質遺伝子の探索・利用が必須である。また、医療における真菌症や食品・生活用品のカビの発生を抑える有効で安全な抗真菌剤の開発が求められている。植物由来キチン分解酵素(キチナーゼ)は病原性真菌の主な細胞壁多糖であるキチンを分解することで、その増殖・侵入を押さえる抗真菌タンパク質の1つである。本研究では、島嶼亜熱帯・熱帯植物遺伝子の多様性を利用して、植物キチナーゼの構造と抗真菌活性の相関について調べることを目的とする。琉球列島の野生維管束植物の種数は単位面積あたり日本本土の 45 倍あり(島袋,「沖縄の生物」沖縄生物教育研究会, pp23-32, 1984), これらの多様な植物遺伝子資源を利用する本手法は、我が国では唯一の島嶼亜熱帯・熱帯地域である琉球列島のメリットを生かした研究である。

### 【方法】

島嶼亜熱帯・熱帯地域に自生する様々な植物の各組織の水抽出液を用いて、キチナーゼの探索を行った。キチナーゼ活性はグリコールキチンを基質として用い測定した。活性の比較的高かった各植物組織の水抽出液より各種カラムクロマトグラフィーによりキチナーゼを精製した。抗真菌活性は *Trichoderma viride* を供試菌株として用いて評価した。精製したキチナーゼの等電点は PhastSystem (GE ヘルスクエア)を用いた等電点電気泳動法により、N 末端およびトリプシン分解によって得られたペプチド鎖のアミノ酸配列はプロテインシーケンサ(PPSQ-23A, 島津製作所)を用いた自動エドマン法により決定した。得られた部分アミノ酸配列から縮重プライマーを作成し、mRNA を鋳型に RT-PCR 法および RACE 法によって cDNA クローニングを行った。大腸菌による発現系を構築し変異体解析を行い、構造と機能の相関を調べた。

### 【結果および考察】

これまでに、パイナップル(*Ananas comosus*), ガジュマル(*Ficus microcarpa*), ソテツ(*Cycas revoluta*), リュウキュウイノモトソウ(*Pteris ryukyuensis*), ミドリカタヒバ(*Selaginelladoederleinii*), ナガハハリガネゴケ(*Bryum coronatum*)から合計12種のキチナーゼを精製し、このうち7種の遺伝子の cDNA クローニングに成功している。それぞれに特徴ある構造および性質が見られた。各種キチナーゼの構造と抗真菌活性との比較から、キチン結合ドメインと塩基性の触媒ドメインを持つキチナーゼが強い抗真菌活性を持つ事が示唆された。パイナップルキチナーゼを用いた変異体解析により、等電点の高いキチナーゼ程、高い抗真菌活性を有する事が分かった。また、リュウキュウイノモノソウから得られたキチナーゼは LysMドメイン(ペプチドグリカン結合モチーフ)とキチナーゼの触媒ドメインから成る新規のキチナーゼであることが分かった。変異体解析により、LysMドメインが真菌細胞壁キチンへの結合を通して本キチナーゼの抗真菌活性の発揮に寄与することが分かった。本研究の応用により、強い抗菌活性を示すタンパク質遺伝子を植物に導入することで、病原抵抗性に優れた作物の作出が可能となる。この技術開発は 21 世紀の食料問題を解決する一翼を担うことが期待される。また、医薬品や防腐剤としての応用も期待される。