

(19)日本国特許庁 (J P)

(12)特 許 公 報 (B 2)

(11)特許番号

特許第3376453号

(P 3 3 7 6 4 5 3)

(45)発行日 平成15年 2月10日(2003.2.10)

(24)登録日 平成14年12月 6日(2002.12.6)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I
C12N 15/09	ZNA	C12N 1/19
1/19		9/42
9/42		C12R 1:84
//(C12N 1/19		C12N 15/00
C12R 1:84)		ZNA A

請求項の数 1 (全 9 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願平10 - 123905	(73)特許権者	501145295 独立行政法人 食品総合研究所 茨城県つくば市観音台 2 丁目 1 番地12
(22)出願日	平成10年 4月20日(1998.4.20)	(73)特許権者	000195568 生物系特定産業技術研究推進機構 埼玉県さいたま市日進町 1 丁目40番地 2
(65)公開番号	特開平11 - 299488	(72)発明者	伊藤 義文 茨城県つくば市並木 2 丁目 1 - 10 207 棟308号
(43)公開日	平成11年11月 2日(1999.11.2)	(72)発明者	スン ムーン パーク 茨城県つくば市並木 4 丁目 1 - 1 421 棟404号
審査請求日	平成11年 7月28日(1999.7.28)	(74)代理人	100074077 弁理士 久保田 藤郎 (外 1 名)
		審査官	本間 夏子

最終頁に続く

(54)【発明の名称】糸状菌及び細菌に対する溶菌活性を有するイネキチナーゼ相補DNAを含む形質転換体

1

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】配列表の配列番号 1 記載のアミノ酸配列からなる蛋白質をコードするイネキチナーゼ相補DNAを含むプラスミドベクターを有する形質転換体であるピキア・パストリス。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、糸状菌及び細菌に対する溶菌活性を有するイネキチナーゼの相補DNAを含む形質転換体であるピキア・パストリスに関する。

【0002】キチナーゼは、昆虫及び甲殻類の外皮や糸状菌の細胞壁の構成成分であるキチンを加水分解する酵素であり、微生物や植物に広く存在する。植物には、クラス I ~ V の 5 種類のキチナーゼが存在するが、このうち、クラス I、II、IV及びVのキチナーゼには、糸状菌

2

の細胞壁を分解する能力はあるが、細菌の細胞壁を分解する能力はない。一方、クラスIIIのキチナーゼは、細菌の細胞壁を分解する能力はあるが、糸状菌の細胞壁を分解する能力はない。本発明は、糸状菌、細菌のいずれに対しても溶菌活性をもつ新規なイネキチナーゼの相補DNAの利用に関する。

【0003】

【従来の技術】植物病原性微生物の感染による収穫量の減少は、農業に甚大な損失を与える。このような微生物による感染予防や感染の拡大阻止手段として、殺菌剤の散布が行われている。しかしながら、近年、これらの殺菌剤の環境や人体への影響に対する懸念から、化学物質に頼らない病原菌感染防除技術の開発が求められている。

【0004】植物には、病原性微生物の侵入を阻止する

10

ための特有の感染防除機構が存在する。具体的には、植物が、病原性微生物が感染したことを感知すると、ファイトアレキシンと呼ばれる化合物や病原性関連蛋白質（PR蛋白質）などの抗菌性蛋白質を生産し、感染から植物体を防御している。PR蛋白質の中でも、微生物に対する作用機構が最も明確なものとして、昆虫及び甲殻類の外皮や糸状菌の細胞壁の構成成分であるキチンを加水分解するキチナーゼが挙げられる。

【0005】前述の如く、植物のキチナーゼには、クラスⅠ～Ⅴの5種類が存在するが、このうち、クラスⅠ、Ⅱ、Ⅳ及びⅤのキチナーゼには、糸状菌の増殖を阻害する抗カビ活性がある。これらのキチナーゼは、特に細胞壁の合成が活発な菌糸の成長点に作用する。その結果、増殖中の細胞が崩壊し、菌糸の伸長が阻害される。中でも、キチン結合領域をもつクラスⅠとⅣの酵素の抗カビ活性は特に高く、病原性糸状菌に対する抵抗性作物を開発するための導入遺伝子として注目されている。

【0006】このような背景から、植物にキチナーゼの相補DNAを導入して、病原性糸状菌に耐性な作物を開発する研究が行われている。しかしながら、該導入遺伝子にコードされるキチナーゼは、糸状菌の細胞壁を分解することはできても、細菌の細胞壁を分解するリゾチーム活性はない。このため、該遺伝子でコードされるキチナーゼを作物に導入しても、病原性細菌に対する耐性までは付与することができず、抵抗性作物としての特性としては不十分であった。

【0007】一方、古くから、植物にリゾチーム活性を有する酵素が存在することが知られている。また、ゴムの木の乳液に存在するヘパミンや幾つかのクラスⅢキチナーゼは、細菌の細胞壁を溶解するリゾチーム活性を有していることも知られている。しかしながら、ヘパミンについては、その相補DNAや遺伝子に関する報告はなく、また、リゾチーム活性を有するキチナーゼの相補DNAについても知られていなかった。

【0008】抗カビ活性及びリゾチーム活性の両方を併せ持つキチナーゼの相補DNAは、これまでに発見されていない。勿論、相補DNAから蛋白質を発見させ、抗カビ活性とリゾチーム活性とを持つキチナーゼをコードしていることも、実証されていなかった。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、糸状菌と細菌の両方の細胞壁を溶解する新規なキチナーゼをコードする相補DNAを特定し、該配列を植物に導入することによって、広範な病原性微生物に対して抵抗性を獲得した組換え作物が開発できる可能性を実現することを目的とするものである。

【0010】

【課題を解決するための手段】上記目的を達成するために、本発明者らは鋭意検討を続けた結果、糸状菌と細菌の両方に対する溶菌活性を持つキチナーゼをコードする

相補DNAを、イネから以下のようにして単離することに成功した。

【0011】すなわち、本発明者らは、イネゲノムプロジェクトが単離したS4960クローンに含まれる相補DNAの全塩基配列を決定し、該クローンが、305アミノ酸残基からなる分子量32,260ダルトンの蛋白質をコードする1,109bpの相補DNAを含むことを明らかにした。該蛋白質のアミノ酸配列は、ゴムの木の乳液に含まれるクラスⅢのキチナーゼであるヘパミンの配列と68%の相同性があることから、キチナーゼである可能性が高いと判断した。

【0012】続いて、該蛋白質の発現系を構築するために、数種類の微生物を宿主に用いて、該蛋白質の発現系を構築するための研究を行った。その結果、酵母の一種であるピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) を宿主とした場合に、該蛋白質を効率的に分泌生産できることを見出した。さらに、ピキア・パストリスで生産した該蛋白質を精製し、精製蛋白質がグリコールキチンやキトオリゴ糖を分解するキチナーゼであることを実証した。さらに、精製キチナーゼが、糸状菌であるトリコデルマ・リーゼイ (*Trichoderma reesei*) に対し抗カビ活性を示すと同時に、細菌であるマイクロコッカス・リソデイクティカス (*Micrococcus lysodeikticus*) の菌体を溶解するリゾチーム活性をも示すことを実証した。このようにして、本発明を完成するに至った。

【0013】請求項1記載の本発明は、配列表の配列番号1記載のアミノ酸配列からなる蛋白質をコードするイネキチナーゼ相補DNAを含むプラスミドベクターを有する形質転換体であるピキア・パストリスである。

【0014】

【発明の実施の形態】以下、本発明を詳細に説明する。本発明の形質転換体に含まれるイネキチナーゼ相補DNAは、イネ由来のDNA配列の一部である。本発明者らは、抗カビ活性とリゾチーム活性を持つ植物クラスⅢキチナーゼをコードする全長の相補DNAを取得する目的で、イネゲノムプロジェクト (RGP; Rice Genome Project, Japan) がイネ相補DNAのライブラリーを構築して多数の相補DNAの部分配列を登録しているDNAデータベースに対し、タバコのクラスⅢキチナーゼの相補DNAの配列 (Lawton, K., Ward, E., Payne, G., Moyer, M. and Ryals, J., Plant Mol. Biol., 19: 735-743, 1992) を用いてBlast ホモロジー検索 (Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D.J., Nucleic Acids Res., 25:3389-3402, 1997) を行った。その結果、S4960クローンの部分配列 (405bp) が、タバコのクラスⅢキチナーゼの相補DNAと59%の相同性を持つことを見出した。

【0015】次いで、このS4960クローンに含まれる相補DNAの全塩基配列を決定した。塩基配列の決定

は、通常用いられる手段により達成することができる。例えば、該相補 DNA をファルマシア社製の Flex-prep プラスミド精製キットで調製して得られるプラスミド DNA を鋳型とし、パーキンエルマー社製のダイプライマーサイクルシーケンシングキットを使用してシーケンス反応を行う。さらに、DNA シーケンサー（モデル ABI 377；パーキンエルマー社製）を用いて塩基配列を決定することができる。

【0016】ここで、鋳型として用いるプラスミド DNA の調製は、アルカリ-SDS 法 (Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T., Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989) によっても可能である。

【0017】また、塩基配列の決定は、Sanger の方法 (Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74: 5463-5467, 1977) や Maxam-Gilvert の方法 (Maxam, A. M. and Gilvert, W., Methods Enzymol., 65: 499-560, 1980) 等に従って行うこともできる。

【0018】その結果、S4960 クロームは、1,109 bp の相補 DNA を含むことが明らかとなり、305 アミノ酸残基からなる分子量 32,260 ダルトンの蛋白質をコードしていると推定された（配列表の配列番号 1 参照）。この 1,109 bp の相補 DNA が、本発明の形質転換体に含まれるイネキチナーゼ相補 DNA である。

【0019】このイネキチナーゼ相補 DNA がキチナーゼをコードするものであることは、該 DNA 配列から予想される蛋白質のアミノ酸配列についてのホモロジー検索の結果、ゴムの木のキチナーゼであるヘバミン (Jekel, P. A., Hartmann, B. H., and Beintema, J. J., Eur. J. Biochem., 200: 123-130, 1991) と 68% の相同性を有することから明らかである。

【0020】このようにして、全塩基配列が明らかとなった 1,109 bp の相補 DNA を含むプラスミドを、大腸菌 DH5 (Bethesda Research Laboratories 製) に形質転換した。形質転換は、例えば Inoue らの方法 (Inoue, H., Nojima, H. and Okayama, H., Gene, 96: 23-28, 1990)、塩化カルシウム法 (Cohen, S. N., Chang, A. C. Y. and Hsu, L., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69: 2110-2114, 1972)、エレクトロポレーション法 (三浦 謹一郎ら編、新基礎生化学実験法、遺伝子工学、1988、丸善株式会社) 等の通常用いられる方法で行うことができる。形質転換した大腸菌は、工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されており、その受託番号は FERM BP-6286 である。

【0021】なお、上述の方法は一例にすぎず、その他の方法、例えば S4960 の相補 DNA をプローブとして、イネの相補 DNA ライブラリーからコロニーまたはブランクハイブリダイゼーション法 (Sambrook, J., Fr

itsch, E. F. and Maniatis, T., Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989) によっても、同一の配列をもつ相補 DNA を得ることもできる。

【0022】この相補 DNA を用いて、以下の操作によりコードされるキチナーゼを生産し、抗力ビ活性と細胞壁溶解活性を実証した。まず、該酵素のアミノ酸配列（配列表の配列番号 1 参照）の 30~305 番目の成熟酵素領域を、オリゴ E-1（配列表の配列番号 2 参照）とオリゴ E-2（配列表の配列番号 3 参照）の 2 つの合成オリゴヌクレオチド（北海道システムサービス社製）をプライマーとして、該クローンプラスミドから、KOD DNA ポリメラーゼ（東洋紡製）を使用した PCR 法 (Methods in Molecular Biology, 15 巻, 1993) で増幅した。増幅された DNA 断片をベクタープラスミド pET-22b (+) (Novagen 社製) に連結してプラスミド pOIS5 を得た。

【0023】さらに、オリゴ P-1（配列表の配列番号 4 参照：北海道システムサービス社製）とオリゴ P-2（配列表の配列番号 5 参照：北海道システムサービス社製）とをプライマーに、プラスミド pOIS5 DNA を鋳型として、PCR 反応 (KOD DNA ポリメラーゼを使用) を行い、増幅された DNA 断片を、プラスミドベクター pPIC9 (Invitrogen 社製) にクローン化することによって、組換えプラスミド pOIS9 を作成した。エレクトロポレーション法を用いて、pOIS9 をヒストジニン要求性のピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) G115 株 (Invitrogen 社製) に形質転換し、該相補 DNA を染色体に持つ形質転換体ピキア・パストリス IIIa を得た。

【0024】この形質転換体であるピキア・パストリスを培養し、該酵母の生産する酵素のアミノ酸配列を特定すること、あるいはキチナーゼ活性を測定することにより、イネキチナーゼ相補 DNA の発現を確認することができる。

【0025】本発明の形質転換体に含まれるイネキチナーゼ相補 DNA は、糸状菌のみならず細菌に対しても溶菌効果を示す新規な (植物クラス III) キチナーゼをコードするものである。これまでに、細菌の細胞壁を溶解するリゾチーム活性を持つキチナーゼをコードする相補 DNA について報告はない。また、抗力ビ活性とリゾチーム活性を併せ持つキチナーゼも本発明によって初めて見出されたものである。さらに、該活性のある植物キチナーゼを効率的に生産する微生物の発現系は、従来確立されていなかったものであり、本発明のイネキチナーゼ相補 DNA を含む形質転換体であるピキア・パストリスは、広範な病原性微生物に対して抵抗性を獲得した組換え作物が開発できる可能性を示すものである。

【0026】

【実施例】次に、本発明を実施例により詳しく説明する

が、本発明はこれらによって制限されるものではない。

実施例 1

(1) S 4 9 6 0 の入手

イネゲノムプロジェクトのイネ相補 DNA ライブラリーにクラス III キチナーゼをコードするクローンが含まれている可能性について検討した。タバコのクラス III キチナーゼの相補 DNA の配列 (Lawton, K., Ward, E., Payne, G., Moyer, M. and Ryals, J., Plant Mol. Biol., 19:735-743, 1992) を用いて、DNA データベースに登録されている DNA 配列に対して Blast ホモロジー検索 (Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D. J., Nucleic Acids Res., 25:3389-3402, 1997) し、有意な相同性が認められた配列の中に、イネゲノムプロジェクトが単離した二つのクローンが含まれていることを見出した。

【 0 0 2 7 】そこで、イネゲノムプロジェクトから、これらのクローンのうちの一つである S 4 9 6 0 を入手した。S 4 9 6 0 の相補 DNA の部分配列 (4 0 5 b p) は、タバコのクラス III キチナーゼと 5 9 % の相同性を有していた。

【 0 0 2 8 】 (2) S 4 9 6 0 に含まれる相補 DNA の塩基配列の解明

ファルマシア社製の Flex - prep プラスミド精製キットを用いて該クローン DNA を精製して得られたプラスミド DNA を鋳型とし、パーキンエルマー社製のダイプライマーサイクルシーケンシングキットを使用してシーケンス反応を行なった。塩基配列は、DNA シーケンサー (モデル ABI 3 7 7 ; パーキンエルマー社製) で決定した。

【 0 0 2 9 】その結果、当該クローンは 1 , 1 0 9 b p の相補 DNA を含むことが明らかとなり、3 0 5 アミノ酸残基からなる分子量 3 2 , 2 6 0 ダルトンの蛋白質をコードしていると推定された (配列表の配列番号 1 参照)。予想された蛋白質のアミノ酸配列で、Blast ホモロジー検索 (Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D. J., Nucleic Acids Res., 25:3389-3402, 1997) を行ったところ、ゴムの木のキチナーゼであるヘバミン (Jekel, P. A., Hartmann, B. H., and Beintema, J. J., Eur. J. Biochem., 200:123-130, 1991) と 6 8 % の相同性があることが判明した。

【 0 0 3 0 】 (3) ピキア・パストリスにおける相補 DNA がコードする蛋白質の生産の検討

先に、S 4 9 6 0 が含む相補 DNA がコードする蛋白質の発現を、大腸菌の幾つかの宿主 - ベクター系を用いて種々の培養条件下で試みたが、発現した蛋白質は活性のない不溶性蛋白質として封入体を形成した。そこで、真核微生物である酵母の 1 種、ピキア・パストリス (Invitrogen 社製) での発現について検討を行った。

【 0 0 3 1 】 (a) ヒスチジンタグの付加

S 4 9 6 0 が含む相補 DNA がコードする蛋白質のアミノ酸配列 (配列表の配列番号 1 参照) のうち、3 0 ~ 3 0 5 番目の残基からなる成熟蛋白質の C 末端にヒスチジンタグを付けるために、オリゴ E - 1 (配列表の配列番号 2) とオリゴ E - 2 (配列表の配列番号 3) の二つの合成オリゴヌクレオチド (北海道システムサービス社製) をプライマーとして、S 4 9 6 0 クローンプラスミドから、KOD DNA ポリメラーゼ (東洋紡製) を使用した PCR 法 (Methods in Molecular Biology, 15 巻, 1993) で増幅した。反応は、東洋紡の推奨する条件で行った。

【 0 0 3 2 】 (b) 組換えプラスミド p O I S 5 の作製増幅された DNA 断片を制限酵素 N c o I と H i n d I I I で切断した後、同じ制限酵素で切断したベクタープラスミド p E T - 2 2 b (+) (Novagen 社製) に宝製のライゲーションキット (Ver. 1) を用いて連結した。連結したプラスミド DNA を、Inoue らの方法 (Inoue, H., Nojima, H. and Okayama, H., Gene, 96:23-28, 1990) で、大腸菌 DH 5 (Bethesda Research Laboratories 製) に形質転換した。

【 0 0 3 3 】形質転換体から、プラスミド DNA をアルカリ溶菌法 (Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2 nd ed. ColdSpring Harbor Laboratory, New York, 1989) で調製した後、制限酵素による解析を行い、目的とする組換えプラスミド p O I S 5 を得た。この p O I S 5 について上記 DNA シーケンスを行なったところ、正しい塩基配列を持つことが確認された。

【 0 0 3 4 】 (c) 組換えプラスミド p O I S 9 の作製さらに、ヒスチジンタグが付いた成熟蛋白質をピキア・パストリスで生産するために、制限酵素 S n a B 1 と N o t I 部位を持つオリゴ P - 1 (配列表の配列番号 4 ; 北海道システムサービス社製) とオリゴ P - 2 (配列表の配列番号 5 ; 北海道システムサービス社製) をプライマーに、プラスミド p O I S 5 DNA を鋳型として PCR 反応 (KOD DNA ポリメラーゼを使用) を行なった。

【 0 0 3 5 】増幅された DNA 断片の塩基配列を DNA シーケンスで確認した後、S n a B 1 及び N o t I で切断した。これをプラスミドベクター p P I C 9 (Invitrogen 社製) の - 因子のシグナル配列の C 末端に位置する同制限酵素部位の間に読み取り枠が連続するように in frame にクローン化した。こうして、組換えプラスミド p O I S 9 を作成した。

【 0 0 3 6 】 (d) 形質転換体ピキア・パストリス III a の作製 p O I S 9 を制限酵素 B g I I I で切断し、ヒスチジン要求性のピキア・パストリス G115 株 (His-; Invitrogen 社製) にエレクトロポレーション法で形質転換した。エ

レクトロポレーションは、Invitrogenの実験手引き書に記載された条件で行なった。その後、MD最小寒天培地（1.34%イーストナイトロゲンベース、 4×10^{-5} % ビオチン、1%グルコース、1.5%寒天）でヒスチジン非要求性のコロニーを選抜することにより、目的の形質転換体ピキア・パストリス IIIa を得た。

【0037】(e) 形質転換体ピキア・パストリス IIIa からの精製キチナーゼの誘導

キチナーゼの誘導は、Invitrogenの実験手引き書に準じて行なった。すなわち、まずピキア・パストリス IIIa を 50 ml の BMGY 培地（1%バクト酵母エキス、2%ペプトン（シグマ社製）、pH 6.0 の 100 mM リン酸カリウム、1.34%バクトイーストナイトロゲンブロス、 4×10^{-5} % ビオチン、1%グリセロール）で 30 で 20 時間震とう培養した。培養後、遠心（3000 × g、5 分）で細胞を集め、50 ml の BMMY 培地（グリセロールの代わりにメタノールを含む以外は BMGY 培地と同じ組成）に再懸濁し、再び 30 で 24 時間振とう培養した。

【0038】(f) キチナーゼの精製（アフィニティークラムクロマトグラフィー）

予備的な実験により、発現した該蛋白質は培地中に分泌生産されることが既に明らかであった。そこで、培養上清を直接ニッケルカラムに通し、該蛋白質の C 末端の 6 つのヒスチジン残基（ヒスタグ）を介してニッケルカラムに吸着することを利用したアフィニティークラムクロマトグラフィーにより該蛋白質を精製した。

【0039】具体的には、3000 × g で 5 分間遠心して得た培養上清を、ファルマシア社製のヒストラップカラム（カラム容積；1 ml）に通した。カラムを 5 ml の 0.5 M NaCl と 10 mM イミダゾールを含む 20 mM リン酸緩衝液（pH 7.5）で洗浄した後、該蛋白質を 5 ml の 0.5 M NaCl と 500 mM イミダゾールを含む 20 mM リン酸緩衝液（pH 7.5）で溶出した。

【0040】(g) 精製キチナーゼの電気泳動及び N 末端のアミノ酸配列解析

上記操作で該蛋白質が純粋に精製されたか否かの確認のため、SDS ポリアクリルアミド電気泳動及び等電点電気泳動の二種類の電気泳動並びに N 末端のアミノ酸配列の解析を行なった。

【0041】まず、SDS ポリアクリルアミド電気泳動は、パイオラッド社製のレディーゲル J（12.5%ポリアクリルアミド）ゲルを用いて、Laemmli の方法（Nature, 227: 680-685, 1970）で行なった。すなわち、精製該蛋白質 3 μg をサンプルバッファー（Laemmli, U. K., Nature, 227: 680-685, 1970）10 μl で処理して電気泳動を行ない、コマープリリアントブルーで蛋白質を染色した。得られた泳動写真を図 1 に示す。図 1 において、左のレーンは分子量マーカーを、右のレーンは精

製イネキチナーゼを示す。図 1 より明らかな通り、染色したゲルには、精製画分は該蛋白質の推定分子量 30,931 に一致する分子量 30,000 ダルトンの蛋白質のバンドのみが検出された。このことから、該蛋白質の分子量は、30,000 ダルトンと算出された。

【0042】また、精製された該蛋白質 1 μg をファルマシア製の PhastGel IEF3-9 ゲルに供し、ファーストシステム電気泳動装置（ファルマシア製）で等電点電気泳動を行なった。ゲル上の蛋白質を、ファルマシアの推奨する方法に従い染色した。結果を図 2 に示す。図 2 において、左のレーンは等電点マーカー蛋白質、右のレーンは精製イネキチナーゼの泳動結果である。図 2 の結果及び等電点マーカー蛋白質の移動度から作成した検量線から、精製イネキチナーゼの等電点は 8.2 と算出された。

【0043】さらに、該精製蛋白質の N 末端アミノ酸配列を自動プロテインシーケンサー（ヒューレットパッカード社製；モデル G1000A）で分析した。その結果、該精製蛋白質の N 末端アミノ酸配列は、- 因子のシグナル配列切断部位の C 末端配列 Glu-Ala-Glu-Ala-Tyr で始まり、- 因子の塩基配列の後ろに該蛋白質をコードする DNA 断片を連結するために S n a B I 部位を導入した際に本来の 29 番目の Ala が変化した Val、さらにその後は該蛋白質のアミノ酸配列である Gly-Asp-Ile-Ala であった。このアミノ酸配列を分析した結果、該蛋白質の配列に相当するアミノ酸以外のアミノ酸は全く検出されなかった。以上の結果から、該蛋白質が純粋に精製されたと判断した。

【0044】(h) キチナーゼ活性の測定

次に、該精製蛋白質を用いて、該蛋白質がキチナーゼ活性を有することを立証する実験を行なった。キチナーゼの活性測定に汎用されているグリコールキチン（Imoto, T. and Yagishita, K., Agric. Biol. Chem., 35:1154-1156, 1971）を 0.2% 含む 0.1 M のトリ塩酸緩衝液（pH = 8.4）に該蛋白質を添加し、37 で保温した。溶液中の還元糖を Monrea と Reese の方法（Can. J. Microbiol., 15:689-696, 1969）により測定したところ、反応時間や加えた蛋白質量に依存した還元糖の増加が観察された。

【0045】該蛋白質のキチナーゼ活性に関して酵素学的に解析した結果は、次の通りである。

分子量：30,000 ダルトン（実験値）；30,931 ダルトン（計算値）

等電点：8.2（実験値）

N 末端アミノ酸配列：Glu-Ala-Glu-Ala-Tyr-Val-Gly-Asp-Ile-Ala

至適反応 pH：8.4（グリコールキチン）；3.0 - 5.0（リゾチーム活性）

グリコールキチンに対する Km : 0 . 4 m g / m l
V_{max} ; 5 . 2 単位 / m g

【 0 0 4 6 】 反応至適 pH は 8 . 4 で、グリコールキチンに対する Km 及び V_{max} は、それぞれ 0 . 4 m g / m l と 5 . 2 単位 / m g 蛋白質であった。また、該精製蛋白質は、N-Acetyl-hexa-D-glucosamine を N-Acetyl-di-D-glucosamine に分解した。

【 0 0 4 7 】 (i) 蛋白質の抗カビ活性測定

該精製蛋白質の抗カビ活性を、トリコデルマ・リーゼイ (*Trichoderma reesei*) IF031329 株を指示菌として、Roberts と Selitrennikoff (J. Gen. Microbiol., 134:169-176, 1988) によって記載された方法で調べた。培地は、Difco 社のポテトデキストロース (P D) 寒天培地を用いた。P D 寒天平板培地の中央に、滅菌したパルプデスク (T O Y O 社製、直径 1 c m) を置き、約 3 , 0 0 0 個のトリコデルマ・リーゼイ IF031329 の胞子を接種した。胞子を接種したパルプデスクから 3 c m 離れた位置に、5 ~ 6 枚の滅菌パルプデスクを同心円状に等間隔に置いた。このパルプデスクに精製蛋白質 5 ~ 1 0 m g を吸収させ、2 5 で 3 ~ 4 日間培養し、該蛋白質を吸収させたパルプデスクの周囲での菌糸の生育阻害を顕微鏡観察した。

【 0 0 4 8 】 結果を図 3 (顕微鏡写真、倍率 : 1 0 0 倍) に示す。この図から明らかなように、トリコデルマ・リーゼイ IF031329 の菌糸は、該蛋白質により生育阻害を受けた。すなわち、図中の A は対照で、牛血清アルブミンを吸収させたパルプデスクの周囲でのトリコデルマ・リーゼイ IF031329 の生育状況を観察したものであり、菌糸の正常な伸長が認められた。一方、図中の B は精製蛋白質 (イネキチナーゼ) を吸収させたパルプデスクの周囲でのトリコデルマ・リーゼイ IF031329 の生育状況を観察したものであり、菌糸の伸長が著しく阻害されていることがわかる。このことから、精製蛋白質の抗

配列番号 : 1

配列の長さ : 1 1 0 9

トポロジー : 一本鎖

配列の種類 : 相補 DNA

起源

生物名 : イネ (*Oryza sativa* L.)

株名 : 日本晴

直接の起源

プラスミド名 : S 4 9 6 0

配列の特徴 : m a t p e p t i d e

特徴を決定した方法 : E

配列

CGGACGCTGA ATTCGATCGA GAATCACC ATG ATG ACA AGT AGA ATG TTT TCG 52
Met Met Thr Ser Arg Met Phe Ser

5

GCA ATG CAG ATG CTG ATC ATG GTG GTG GTG GCA TTG GCC GGG CTA GCT 100

カビ活性が証明された。

【 0 0 4 9 】 (j) 蛋白質の抗菌活性

一方、細菌細胞壁を溶解するリゾチーム活性は、マイクロコッカス・リソデイクティカス (*Micrococcus lysodeikticus*) (Sigma 社製) に対する溶菌活性を Richard らの方法 (Richard, T. M., McCollum, T. G., Niedz, R. P., Hearn, C. J., McDonald, R. E., Berdis, E. and Doosdar, H., *Planta*, 200: 289-295, 1996) によって調べた。

10 【 0 0 5 0 】 すなわち、0 . 0 3 % のマイクロコッカス・リソデイクティカスの凍結乾燥菌体を含む 1 . 5 % 寒天平板 (pH 4 . 8) に精製蛋白質 (5 μ g / 5 μ l) と卵白リゾチーム (5 μ g / 5 μ l) を滴下し、3 7 で 1 6 時間保温した後に溶菌斑の生成の有無を観察した。その結果、この条件下では、精製蛋白質は卵白リゾチーム以上の溶菌活性を示した。以上のことから、本発明の形質転換体に含まれる相補 DNA が新規な特性を有するキチナーゼをコードしていることが実証された。

【 0 0 5 1 】

20 【 発明の効果 】 本発明によれば、イネキチナーゼをコードする相補 DNA を含むプラスミドベクターを有する形質転換体であるピキア・パストリスが提供される。この相補 DNA のコードするイネキチナーゼは、糸状菌のみならず細菌に対して溶菌作用を有する酵素である。これまでに、抗カビ活性のほかに、細菌の細胞壁を溶解するリゾチーム活性を持つキチナーゼをコードする相補 DNA について報告はない。また、抗カビ活性とリゾチーム活性を併せ持つキチナーゼも見出されていない。

30 【 0 0 5 2 】 さらに、本発明のイネキチナーゼ相補 DNA を組み込んだ形質転換体であるピキア・パストリスを利用することにより、広範な病原性微生物に対して抵抗性を獲得した組換え作物の開発が期待される。

【 0 0 5 3 】

【 配列表 】

13	Ala Met Gln Met Leu Ile Met Val Val Val Ala Leu Ala Gly Leu Ala	14
10	15	20
GCC GGA ACG CGC GCC GGC GAC ATC GCG ATC TAC TGG GGC CAG AAC GGC	148	
Ala Gly Thr Arg Ala Gly Asp Ile Ala Ile Tyr Trp Gly Gln Asn Gly		
25	30	35
AAC GAG GGC ACG CTG GCG CAG ACG TGC GCG ACC GGT AAT TAC AGG TTC	196	
Asn Glu Gly Thr Leu Ala Gln Thr Cys Ala Thr Gly Asn Tyr Arg Phe		
45	50	55
GTC ATC GTG GCC TTC CTG CCT GTG TTC GGC AAG GGC CAG ACG CCG GTG	244	
Val Ile Val Ala Phe Leu Pro Val Phe Gly Lys Gly Gln Thr Pro Val		
60	65	70
CTG AAC CTG GCC GGC CAC TGC GAC CCG GCG TCG AAC GGC TGC ACC GGC	292	
Leu Asn Leu Ala Gly His Cys Asp Pro Ala Ser Asn Gly Cys Thr Gly		
75	80	85
GTG GGC GCC GAC ATC AAG TCG TGC CAG AGC CTC GGC ATC AAG GTC ATG	340	
Val Gly Ala Asp Ile Lys Ser Cys Gln Ser Leu Gly Ile Lys Val Met		
90	95	100
TTC TCG ATC GGC GGC GGC GTC GGC AAC TAC GGC CTG TCC TCC CGC GAC	388	
Phe Ser Ile Gly Gly Gly Val Gly Asn Tyr Gly Leu Ser Ser Arg Asp		
105	110	115
GAC GCC AAG CAG GTC GCG GCG TAC CTG TGG AAC AAC TAC CTC GGC GGC	436	
Asp Ala Lys Gln Val Ala Ala Tyr Leu Trp Asn Asn Tyr Leu Gly Gly		
125	130	135
ACG TCG CCG TCA AGG CCG CTC GGC GAC GCC GTC ATG GAC GGC ATC GAC	484	
Thr Ser Pro Ser Arg Pro Leu Gly Asp Ala Val Met Asp Gly Ile Asp		
140	145	150
TTC GAC ATC GAG AGC GGC GGG GGC ATG TAC TGG GAC GAC TTG GCC AGG	532	
Phe Asp Ile Glu Ser Gly Gly Gly Met Tyr Trp Asp Asp Leu Ala Arg		
155	160	165
TAC CTC AAG GCG TAC TCG CCG CAG GGG AGC AGC AAG AAG CCG GTG TAC	580	
Tyr Leu Lys Ala Tyr Ser Arg Gln Gly Ser Ser Lys Lys Pro Val Tyr		
170	175	180
CTG ACG GCG GCG CCA CAG TGC CCC TTC CCG GAC GCG TCG CTC GGC GTC	628	
Leu Thr Ala Ala Pro Gln Cys Pro Phe Pro Asp Ala Ser Leu Gly Val		
185	190	195
GCG CTC AGC ACC GGC CTG TTC GAC TAC GTG TGG GTG CAG TTC TAC AAC	676	
Ala Leu Ser Thr Gly Leu Phe Asp Tyr Val Trp Val Gln Phe Tyr Asn		
205	210	215
AAC CCG CCG TGC CAG TAC AGC TCG TCC AAC GGC GTG GGC AAC CTG GCG	724	
Asn Pro Pro Cys Gln Tyr Ser Ser Ser Asn Gly Val Gly Asn Leu Ala		
220	225	230
AGC GCG TGG AAG CAG TGG ACG TCG ATC CCG GCG GGA CGG GTG TTC CTC	772	
Ser Ala Trp Lys Gln Trp Thr Ser Ile Pro Ala Gly Arg Val Phe Leu		
235	240	245
GGC CTG CCG GCG GCG GCG GAG GCC GCC GGC ACC GGG TTC GTG GAG ACG	820	
Gly Leu Pro Ala Ala Ala Glu Ala Ala Gly Thr Gly Phe Val Glu Thr		
250	255	260
AGC GAC CTG GTG TCG AAG GTG CTC CCC GTG GTG AAG AAG TCT CCC AAG	868	
Ser Asp Leu Val Ser Lys Val Leu Pro Val Val Lys Lys Ser Pro Lys		
265	270	275
		280

15
TAC GGA GGG ATC ATG CTG TGG TCG CGG TAC TAT GAC GGG CTC ACG GGG 916
Tyr Gly Gly Ile Met Leu Trp Ser Arg Tyr Tyr Asp Gly Leu Thr Gly
285 290 295
TAC AGC GAC AAG GTG AAG TCC AGC GTT TGA GCTAGCCAGG GTAAGCTCGT GTC 969
Tyr Ser Asp Lys Val Lys Ser Ser Val Stop
300 305
AGGTCGGCGT TCGCGTAGAA TCACACGTGC CGCGCGTTCC CTGCAAGATG GAGTAGTTTC 1029
TACACATTTTC AGAACAAAGC AAACATGTAC AATAAGATGG CCGGCTTGTA TACTCATTTA 1089
GAAGCAGAAA AAATTGTGAG 1109

【 0 0 5 4 】配列番号： 2

配列の長さ： 2 9

トポロジー：一本鎖

配列の種類：合成オリゴヌクレオチド
起源

生物名：イネ (Oryza sativa L.)

株名：日本晴

直接の起源

プラスミド名：pS6940

配列の特徴：mat peptide

特徴を決定した方法：E

配列

CCACCATGGG CGACATCGCG ATCTACTGG 29

【 0 0 5 5 】配列番号： 3

配列の長さ： 2 7

トポロジー：一本鎖

配列の種類：合成オリゴヌクレオチド
起源

生物名：イネ (Oryza sativa L.)

株名：日本晴

直接の起源

プラスミド名：pS6940

配列の特徴：mat peptide

特徴を決定した方法：E

配列

AAGAAGCTTC ACCTTGTCGC TGTAACC 27

【 0 0 5 6 】配列番号： 4

配列の長さ： 3 3

トポロジー：一本鎖

配列の種類：合成オリゴヌクレオチド
起源

生物名：イネ (Oryza sativa L.)

株名：日本晴

10 直接の起源

プラスミド名：pOIS5

配列の特徴：mat peptide

特徴を決定した方法：E

配列

TACTACGTAG GCGACATCGC GATCTACTGG GGC 33

【 0 0 5 7 】配列番号： 5

配列の長さ： 3 4

トポロジー：一本鎖

配列の種類：合成オリゴヌクレオチド

20 起源

生物名：イネ (Oryza sativa L.)

株名：日本晴

直接の起源

プラスミド名：pOIS5

配列の特徴：mat peptide

特徴を決定した方法：E

配列

TGC GGCCGCT CAGCGGTGGC AGCAGCCAAC TCAG

【 図面の簡単な説明 】

30 【 図 1 】 精製イネキチナーゼの SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動による解析結果を示す泳動写真である。

【 図 2 】 精製イネキチナーゼの等電点電気泳動による解析結果を示す泳動写真である。

【 図 3 】 カビの形態を示す顕微鏡写真 (× 1 0 0) で、精製イネキチナーゼによる抗カビ活性を示す。

【 符号の説明 】

40 A は牛血清アルブミンを吸収させたパルプデスクの周囲でのトリコデルマ・リーゼイ IF031329 の生育状況を示す写真であり、B は、精製イネキチナーゼを吸収させたパルプデスクの周囲でのトリコデルマ・リーゼイ IF031329 の生育状況を示す写真である。

【図 1】

図面代用写真



【図 2】

図面代用写真



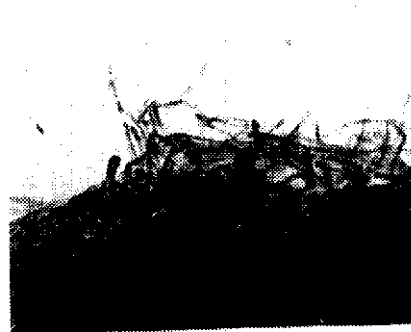
【図 3】

図面代用写真

A



B



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷ 識別記号
(C 1 2 N 9/42
C 1 2 R 1:84)

F I

(72)発明者 チョン ナム ハイ
茨城県つくば市観音台 2 丁目 1 - 2 海
外宿泊棟410号室

(58)調査した分野(Int.Cl.⁷, DB名)

C12N 15/00 - 15/90

C12N 9/42

C12N 1/19

SwissProt/PIR/Genes
eq

GenBank/EMBL/DDBJ/G
eneSeq

BIOSIS/WPI(DIALOG)

(56)参考文献 DNA Res. (1997) Vol.
4, No. 6, p. 379 - 385