

図1 β -Tyrによるシロイスナズナ根の生長の抑制

多くない。VPEは植物抽出液を加熱しながらの揮発成分の捕集法であり、植物抽出液をあらかじめ誘導体化により揮発しやすくすることで、オキシリピンやジテルペンのような化合物を夾雑物から分離している。

傷害処理10分後のイネ葉を $\text{H}_2\text{O}/n\text{-PrOH}/\text{HCl}$ (1/2/0.005)溶液で抽出し、 CH_2Cl_2 を加えて攪拌した。有機層を誘導体化処理後、VPEにて揮発成分を捕集し、GC/MSで分析した。その結果、サリチル酸、ベンゼン酸の他に9-oxononanoic acidなど脂質酸化物の増加を確認した。また、*cis*-12-oxo phytodienoic acid(OPDA)と*trans*-OPDAも検出され、本分析系がオキシリピンの分析に適していること

マメ科植物が生産するノッド因子加水分解酵素の構造と機能

近畿大学農学部バイオサイエンス学科
准教授 大沼貴之

序　　論

マメ科植物は一般的に根に根粒をもち、根粒菌と呼ばれる細菌を共生させている。マメ科植物は根粒菌に生活環境と栄養分となる光合成産物を与え、根粒菌は大気窒素から固定した窒素栄養素を植物に与えている。このような共生関係はマメ科植物の生存に有利にはたらき、栄養状態の悪い土地での生育をも可能にしている。根粒の形成は、マメ科植物が根粒菌の生産するノッド因子を、細胞外にLysM(リジンモチーフ)をもつ受容体キナーゼであるノッド因子受容体NFR(Nod Factor Receptor)で認識後、開始されることが明らかにされているが、その後どのように根粒

表1 様々な植物の根の生長に対する β -Tyrの影響。

	β -Tyr	IC20*(μM)
双子葉類	シロイスナズナ (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	0.6
	タバコ (<i>Nicotiana tabacum</i>)	0.8
	タルウマゴヤシ (<i>Medicago truncatula</i>)	2.7
	ヤセイカンラン (<i>Brassica oleracea</i>)	2.8
	トマト (<i>Solanum lycopersicum</i>)	4.8
	ミナトカモジグサ (<i>Brachypodium distachyon</i>)	105
単子葉類	オオムギ (<i>Hordeum vulgare</i>)	154
	アワ (<i>Setaria italica</i>)	382
	イネ (<i>Nipponbare</i>)	>400
	イネ (<i>Kasalath</i>)	>400

*根の生長が20%抑制される濃度

を確認した。興味深いことに、OPDAのピークから1分遅い時間にOPDAと類似したマススペクトルを示すピークを見出した。本ピークはイネから未報告のオキシリピンではないかと推測している。オキシリピン類は、脂肪酸からつくられる植物ホルモンであり、イネからはジャスモン酸とOPDAが知られているだけである。現在、イネのオキシリピン様未知ピークの構造決定を進めている。

謝　　辞

本研究を遂行するに当たり、ご支援を賜りました公益財団法人農芸化学研究奨励会に深く感謝いたします。

参考文献

Schmelz E A et al. (2014) The use of vapor phase extraction in metabolic profiling of phytohormones and other metabolites. *Plant J.*, 39, 790-808.

の形成、維持、根粒数の調節が行われているのか、よくわかっていない。ノッド因子はキチンオリゴ糖の還元末端に脂肪酸が結合した構造から成っている(図1)。最近、マメ科植物であるタルウマゴヤシからノッド因子を加水分解するノッド因子加水分解酵素が発見された(Tian et al., *Plant Physiol.*, 163, 1179-90, 2013)。本酵素はノッド因子におけるキチンオリゴ糖部の β -1,4結合を加水分解する活性を示し、マメ科植物と根粒菌の共生関係を樹立、維持させるのに重要な因子の一つであると考えられる。ノッド因子加水分解酵素は糖質加水分解酵素のファミリーGH18に分類される植物のクラスVキチナーゼと高い配列相同性があり、キチナーゼ活性発現に重要な触媒部位のモチーフDxDxEも有していることから、キチンオリゴ糖をも分解する可能性が示唆されている。一方、クラスVキチナーゼはキチンオリゴ糖だけでなく、ノッド因子を加水分解する活性を示す。以上のことから、ノッド因子を介したマメ科植物と根粒菌の相互作用の解明には、ノッド因子加水分

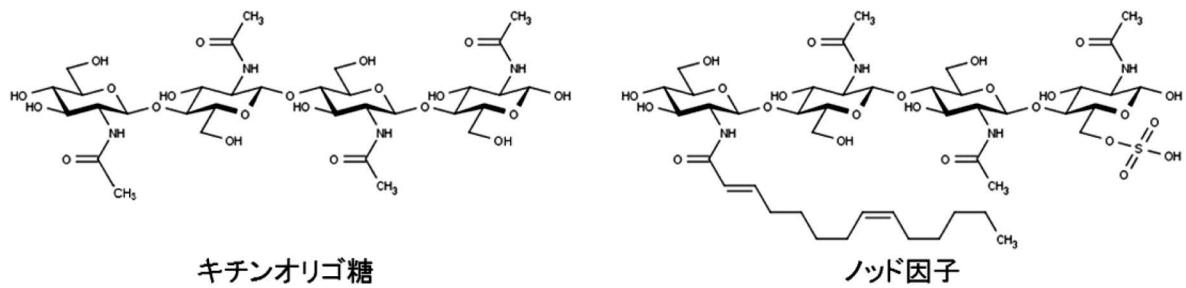


図1 キチンオリゴ糖とノッド因子の化学構造.

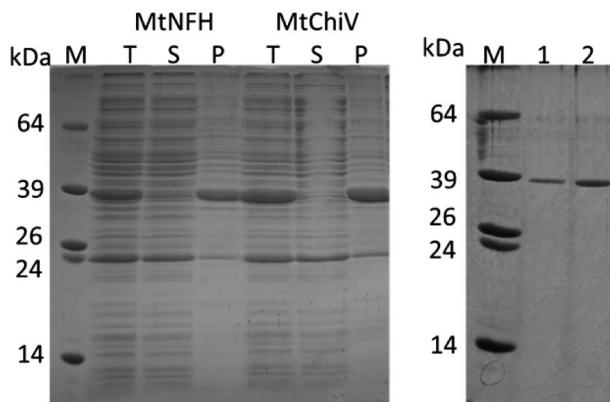


図2 (A) 大腸菌で発現した MtNFH と MtChiV の SDS-PAGE (15% ゲル).
T, 18°C で発現後の大腸菌抽出液; S, T の可溶性画分; P, T の不溶性画分. (B) 精製した MtNFH (Lane 1) と MtChiV (Lane 2) の SDS-PAGE.

解酵素およびクラス V キチナーゼと、それらの基質との構造機能相関を明らかにすることが重要と考えられた。本研究では、ノッド因子加水分解酵素とクラス V キチナーゼの酵素学的性質および基質認識機構を明らかにし、マメ科植物に特有な形質である根粒形成のメカニズムの一端を明らかにすることを目的とした。

方法と結果

タルウマゴヤシのノッド因子加水分解酵素 (MtNFH) (Accession no. KC833513) およびクラス V キチナーゼ (MtChiV) (Accession no. KC833513) をコードする遺伝子を人工合成遺伝子として得、成熟タンパク質領域を発現するように大腸菌発現ベクターである pRam Vector (Luci-

gen) にクローニングした。この際発現ベクターは、発現タンパク質が N 末端側に His x6 タグをもつ融合タンパク質として発現するように設計した。発現ベクター pRam-MtNFH および pRam-MtChiV を発現用大腸菌である *E. coli* 10G に導入し、形質転換体を得た。組換え型 MtNFH および MtChiV の発現は、大腸菌培養液吸光度が $OD_{600} = 0.5 \sim 0.6$ に達した対数増殖期に培地に終濃度 0.2% になるようにラムノースを添加することにより行った。タンパク質の発現は 37°C と 18°C、発現時間はそれぞれ 4 時間と 18 時間行った。発現後大腸菌抽出液の SDS-PAGE の結果を示す (図2A)。分子量 39 kDa 付近に MtNFH (理論分子量 39198.2) および MtChiV (41256.4) の発現が確認された。発現された両タンパク質は不溶性であったことから、8 M 尿素を含む 10 mM Tris-HCl 緩衝液 pH 8.0 で可溶化後、Ni-NTA カラムを用いたクロマトグラフィーにより SDS-PAGE で均一なまでに精製した (図2B)。

考 察

本研究で構築した発現システムの組換え型 MtNFH と MtChiV 発現量は、大腸菌培養液 1 L 当たり ~ 15 mg 程度であることがわかった。両酵素の精製標品を得たことから、リフォールディング後、キチンオリゴ糖およびノッド因子の加水分解実験と結合実験を行うことにより、両酵素の基質特異性を明らかにできるものと考えている。

謝 辞

本研究を遂行するに当たり、ご支援賜りました公益財団法人農芸化学研究奨励会に深く感謝いたします。