

[Research Note]

ブドウクラスIIIキチナーゼアミノ酸配列の品種間比較

高柳 勉・阿野明彦・奥田 徹・横塚弘毅

山梨大学ワイン科学研究センター 〒400-0005 甲府市北新1-13-1

Comparative Analysis of Amino Acid Sequences of Class III Chitinases from *Vitis* Species

Tsutomu TAKAYANAGI, Akihiko ANO, Tohru OKUDA, and Koki YOKOTSUKA

The Institute of Enology and Viticulture, University of Yamanashi

1-13-1 Kitashin, Kofu, Yamanashi 400-0005, Japan

Chitinase genes were cloned from leaf DNAs of four grape cultivars (*V. Vinifera*: Semillon, Cabernet Sauvignon, and Chardonnay; *V. rupestris*: Saint Geroge). The nucleotide sequences of the genes cloned from the four grape cultivars were highly homologous to that of a grape class III chitinase gene (Z68123). The amino acid sequences deduced from the nucleotide sequences of the grape class III chitinases had 297 amino acids. The class III chitinases had conserved amino acids in the catalytic domains of family 18 chitinases. Phylogenetic analysis using the amino acid sequences of chitinases from the five grape cultivars, Semillon, Cabernet Sauvignon, Chardonnay, Saint Geroge and Koshu (AB105374), supported the conventional phylogenetic tree.

Key words: chitinase, class III, amino acid sequences, *Vitis* species

緒 言

キチナーゼ (EC 3.2.1.14) はキチン (poly- β -1, 4-*N*-acetyl-D-glucosamine) を加水分解して*N*-アセチルグルコサミンとそのオリゴ糖を生成する酵素である。多くの植物キチナーゼが植物への病原菌の感染によって誘導されることから、これら誘導キチナーゼは、病気抵抗性反応に関連したタンパク質、すなわちPRタンパク質 (pathogenesis-related protein) の一つのグループ (PR-3) に分類されている (8)。さらに、キチナーゼが*in vitro*の実験系において植物病原菌の生育を阻害することは、キチナーゼが植物の生体防御に寄与していることを強く示唆している (9)。キチナーゼは、その一次構造から、大きく5つのクラス (クラスI~V) に分類される (4, 6)。ブドウに発現するキチナーゼとしては、mRNAよりクローニングされた3種類のキチナーゼ、すなわち、ベレゾーン以降のブドウ果実 (シラー) に発現するクラスIVキチナーゼ (10)、そしてブドウ (ピノ・ノワール) の培養細胞にエリシターを添加した際に誘導されるクラスIおよびIIIキチナーゼ (3) が報告されている。我々は、成熟期の甲州ブドウ果実にエリシターとなるグリコールキチンを塗布することにより、果実のキチナーゼ活性が増加すること

を見出した (11)。そして、グリコールキチン処理により誘導されたキチナーゼを精製し、その*N*末端アミノ酸配列を既報のキチナーゼのそれと比較したところ、クラスIIIキチナーゼに類似した構造を持つことが明らかになった (12)。さらに、甲州ブドウのゲノムDNAからクラスIIIキチナーゼ遺伝子をクローニングし、それを大腸菌で発現させた酵素タンパク質が*Botrytis cinerea*に抗菌性を示すことを明らかにした (1)。このように、クラスIIIキチナーゼはブドウの生体防御において重要な働きを持つ酵素であると考えられる。本研究では、*Vitis vinifera*の3ブドウ品種、カベルネ・ソービニオン、シャルドネ、セミヨンそして*V. rupestris*のセント・ジョージのゲノムDNAからクラスIIIキチナーゼ遺伝子をクローニングし、その塩基配列からアミノ酸配列を推定した。これらブドウ品種のクラスIIIキチナーゼのアミノ酸配列を比較することによりブドウ品種の分子進化を考察した。

材料と方法

1. 供試材料

山梨大学ワイン科学研究センターで露地栽培されている4ブドウ品種、すなわち、*V. vinifera*の3品種 (セミヨン、カベルネ・ソービニオン、シャルドネ) および*V. rupestris*の1品種 (セント・ジョージ) を使用した。

2004年4月20日受理

2. ブドウクラスIIIキチナーゼ遺伝子のクローニング

各ブドウ品種の葉から、CTAB法(2)を用いてゲノムDNAを分離した。このゲノムDNAとクラスIIIキチナーゼ遺伝子のクローニング用に設計したプライマー (S01: 5'-TCCCCCGGGACATACACGTTATTCAAG-3', A01: 5'-TGGTTCGACCATTCATCGAGGATGAAAGC-3')を用いてPCRを行った(1)。すなわち、DNA溶液(2.0 μL)、プライマーS01(0.5 μL, 25 pmol)、プライマーA01(0.5 μL, 25 pmol)、*EX Taq*(0.5 μL, 2.5 U, 宝酒造)、*EX Taq* buffer (x 10, 5.0 μL)、dNTP mixture (4.0 μL)、水(37.5 μL)から成る反応液を94℃、30秒間、(94℃、1分間; 55℃、1.5分間; 72℃、1分間; 30サイクル)、72℃、5分間の温度条件でPCRした。プライマーS01には*Sma* I、そしてプライマーA01には*Sal* Iの認識部位をそれぞれ付加してあることから、PCRにより増幅したDNA断片を*Sma* Iと*Sal* Iで処理した後に、同様に制限酵素処理を施したpUC18ベクターにライゲーションした。PCR増幅DNA断片を導入したpUC18を*E. coli* JM109にトランスフォーメーションし、ブルー-ホワイトセレクションによりポジティブクローンを選択した。ポジティブクローンから分離したプラスミドに、PCR増幅DNA断片が導入されていることを、プライマーS01とA01を用いたPCRにより確認した後に、ALFexpress DNA Sequencer(アマシャム・バイオサイエンス)により挿入DNA断片の塩基配列を決定した。

結果と考察

1. ブドウクラスIIIキチナーゼ遺伝子の配列

ブドウの葉からCTAB法により分離したゲノムDNAをテンプレートとし、クラスIIIキチナーゼ増幅用プライマーS01とA01を用いてPCRを行った。その結果、4つのブドウ品種全てに於いて約1 kbpの位置にDNAバンドが確認された。増幅DNAをpUC18ベクターに導入し、形質転換によって大腸菌JM109に導入後、ポジティブクローンを選択した。選択したポジティブクローンからプラスミドを分離し、プライマーS01とA01を用いたインサートチェックにより目的DNAの導入を確認後、塩基配列を決定した。すべての品種において、

Table 1. Nucleotide and amino acid sequence identity (%) of class III chitinases from Koshu, St. George, Chardonnay, Semillon and Cabernet Sauvignon.

	Koshu	St. George	Chardonnay	Semillon	Cabernet S.
Koshu		98.4 ^Z	98.2 ^Z	98.8 ^Z	98.7 ^Z
St. George	97.6 ^Y		98.4 ^Z	98.8 ^Z	98.7 ^Z
Chardonnay	98.0 ^Y	98.0 ^Y		99.4 ^Z	99.6 ^Z
Semillon	98.7 ^Y	98.0 ^Y	99.3 ^Y		99.9 ^Z
Cabernet S.	98.7 ^Y	98.0 ^Y	99.3 ^Y	100.0 ^Y	

^ZNucleotide sequence identity (%)

^YAmino acid sequence identity (%)

得られたクローンの塩基配列はピノ・ノワールブドウ(*V. vinifera*)からクローニングされたブドウクラスIIIキチナーゼ(Z68123)(3)と高い相同性を示し(Table 1)、甲州ブドウのゲノムDNAからクローニングされたクラスIIIキチナーゼ(1)と同様にイントロンを含んでいなかった。4ブドウ品種からクローニングされた遺伝子は、ピノ・ノワールと比べると12塩基の欠失が見られ、これは、塩基配列から推定したアミノ酸配列で、4残基の欠失に相当した(Fig. 1)。この欠失位置は、今回クローニングした4ブドウ品種および甲州(1)の塩基配列で同一であった。塩基配列から推定した4ブドウ品種のクラスIIIキチナーゼのアミノ酸配列は、いずれも297のアミノ酸からなり、その分子量と等電点は、カベルネ・ソービニオン(MW=31832, pI=8.87)、シャルドネ(MW=31757, pI=8.67)、セミヨン(MW=31832, pI=8.87)、セント・ジョージ(MW=31909, pI=8.87)であった。

ブドウクラスIIIキチナーゼは、ピノ・ノワールブドウ由来の培養細胞をエリクター処理した時に誘導されるmRNAのcDNAライブラリーからクローニングされている(3)。このクラスIIIキチナーゼ遺伝子は、ブドウの葉に*Plasmopara viticola*を感染させた時に迅速に誘導される。さらに、この遺伝子誘導は近傍の葉にも見られることから、このキチナーゼの誘導は全身獲得抵抗性(systemic acquired resistance, SAR)応答の一つであると考えられている(3)。ブドウクラスIIIキチナーゼタンパク質は、ブドウ組織から分離精製することが困難なために、その酵素学的性質は明らかになっていなかった。そこで我々は、甲州ブドウからブドウクラスIIIキチナーゼ遺伝子をクローニングし、その遺伝子を大腸菌で発現させて組換え酵素を分離精製し、その性質を検討した(1)。その結果、組換えブドウクラ

Koshu	1	MAPTPQSTPLLISLSVLALLQTSYAGGIAIYWQNGNEGTLTQTCNTGKYSYVNI AFLNK	60
St. George	1	MAPTPQSTPLLISLSVLALLQTSYAGGIAIYWQNGNEGTLTQTCNTGKYSYVNI AFLNK	60
Chardonnay	1	MARTPQSTPLLISLSVLALLQTSYAGGIAIYWQNGNEGTLTQTCNTGKYSYVNI AFLNK	60
Semillon	1	MARTPQSTPLLISLSVLALLQTSYAGGIAIYWQNGNEGTLTQTCNTGKYSYVNI AFLNK	60
Cabernet S.	1	MARTPQSTPLLISLSVLALLQTSYAGGIAIYWQNGNEGTLTQTCNTGKYSYVNI AFLNK	60
Pinot Noir	1	MARTPQSTPLLISLSVLALLQTSYAGGIAIYWQNGNEGTLTQTCNTGKYSYVNI AFLNK	60

Koshu	61	FGNGQTPEINLAGHCNPASNGCTSVSTGIRNCQNRGIVMLSI GGGVGSYLSLSSSND AQN	120
St. George	61	FGNGQTPEINLAGHCNPASNGCTSVSTGIRDCQNRGIVMLSI GGGAGSYLSLSSSND AQN	120
Chardonnay	61	FGNGQTPEINLAGHCNPASNGCTSVSTGIRDCQNRGIVMLSI GGGAGSYLSLSSSND AQN	120
Semillon	61	FGNGQTPEINLAGHCNPASNGCTSVSTGIRNCQNRGIVMLSI GGGAGSYLSLSSSND AQN	120
Cabernet S.	61	FGNGQTPEINLAGHCNPASNGCTSVSTGIRNCQNRGIVMLSI GGGAGSYLSLSSSND AQN	120
Pinot Noir	61	FGNGQTPEINLAGHCNPASNGCTSVSTGIRNCQNRGIVMLSI GGGAGSYLSLSSSND AQN	120

Koshu	121	VAVYLWNNFLGGQSSSRPLGDAVL DGD FDI E LGSTLHWDDLARALS--GFSK-RGRKVY	177
St. George	121	VANYLWNNFLGGQSSSRPLGDAVL DGD FDI E LGSTLHWDDLARALS--GFSK-RGRKVY	177
Chardonnay	121	VANYLWNNFLGGQSSSRPLGDAVL DGD FDI E LGSTLHWDDLARALS--GFSK-RGRKVY	177
Semillon	121	VANYLWNNFLGGQSSSRPLGDAVL DGD FDI E LGSTLHWDDLARALS--GFSK-RGRKVY	177
Cabernet S.	121	VANYLWNNFLGGQSSSRPLGDAVL DGD FDI E LGSTLHWDDLARALS--GFSK-RGRKVY	177
Pinot Noir	121	VANYLWNNFLGGQSSSRPLGDAVL DGD FDI E LGSTLHWDDLARALSRIEFQQRGRKVY	180
***** * *****			
Koshu	178	LTAAPQCPFDPKFLGTALNTGLFDYVWVQFYNNPQCQYSSGNTNLLNSWNRWTS SINSQ	237
St. George	178	LTAAPQCPFDPKFLGTALNTGLFDYVWVQFYNNPSCQYSSGNTNLLNSWNRWTS SINSR	237
Chardonnay	178	LTAAPQCPFDPKFLGTALNTGLFDSVWVQFYNNPQCQYSSGNTNLLNSWNRWTS SINSR	237
Semillon	178	LTAAPQCPFDPKFLGTALNTGLFDYVWVQFYNNPQCQYSSGNTNLLNSWNRWTS SINSR	237
Cabernet S.	178	LTAAPQCPFDPKFLGTALNTGLFDYVWVQFYNNPQCQYSSGNTNLLNSWNRWTS SINSR	237
Pinot Noir	181	LTAAPQCPFDPKVPGTALNTGLFDYVWVQFYNNPQCQYSSGNTNLLNSWNRWTS SINST	240

Koshu	238	-IFMGLPASSAAAGSGFIPANVLT SQILPVIKRS PKYGGV MLWSKYDDQSGYSSSIKSSV	297
St. George	238	-IFMGLPASSAAAGSGFIRANVLT SQILPVIKRS PKYGGV MLWSKYDDQSGYSSSIKSSV	297
Chardonnay	238	-IFMGLPASSAAAGSGFIPANVLT SQILPVIKRS AKYGGV MLWSKYDDQSGYSSSIKSSV	297
Semillon	238	-IFMGLPASSAAAGSGFIPANVLT SQILPVIKRS AKYGGV MLWSKYDDQSGYSSSIKSSV	297
Cabernet S.	238	-IFMGLPASSAAAGSGFIPANVLT SQILPVIKRS AKYGGV MLWSKYDDQSGYSSSIKSSV	297
Pinot Noir	241	GSFMGLPASSAAAGRGFIPANVLT SQILPVIKRS PKYGGV MLWSKYDDQSGYSSSIKSSV	301

Fig. 1. Amino acid sequences deduced from the nucleotide sequences of class III chitinase genes cloned from Koshu (AB105374) (1), Saint Geroge (St. George), Chardonnay, Semillon and Cabernet Sauvignon (Cabernet S.) genomic DNAs and Pinot Noir cDNA (Z68123) (3). The conserved amino acids in the catalytic domains of family 18 chitinases (13) are boxed. Asterisks indicate consensus sequences.

スIIIキチナーゼは*B. cinerea*に対して抗菌作用を示し、このキチナーゼがブドウの病気抵抗性応答において重要な役割を持つことが酵素の性質から示された (1)。

植物キチナーゼは、そのアミノ酸配列から大きく5つのクラスに分けられている (4, 6)。クラスIキチナーゼはN末端側にキチン結合領域を含むCys-rich

domainを持ち、C末端側には液胞への輸送に関わるシグナルペプチドを持つ。クラスIIキチナーゼはCys-rich domainと液胞輸送のシグナルペプチドを欠くが、クラスIキチナーゼと類似した構造を持ち、アポプラストに分泌されると考えられている。クラスIVキチナーゼはクラスIキチナーゼのアミノ酸配列と高い相同性を示し、Cys-rich domainも有するが、二箇所の特徴的な欠損が見られる。クラスIIIキチナーゼは、他の植物キチナーゼとアミノ酸配列の類似性が乏しい。Henrissatらによる疎水クラスター分析(7)に基づく糖質分解酵素の分類に対応させると、クラスI, II, IVのキチナーゼがファミリー19に属するのに対して、クラスIIIキチナーゼはファミリー18に属している。クラスVキチナーゼは、クラスI~IVの植物キチナーゼとの類似性が乏しいエンド型キチナーゼで、疎水クラスター分析による分類はファミリー18に属している(13)。

本研究およびこれまで報告された(1, 3)クラスIIIキチナーゼの間には若干のアミノ酸配列の差異は認められたが、ファミリー18に共通するアミノ酸配列の保存領域を持っていた(Fig. 1)(13)。この保存領域は、キチナーゼの触媒反応に重要な役割を持っている。ファミリー18キチナーゼの触媒機構は、リゾチームやファミリー19に属するクラスI, II, IVキチナーゼで広く知られている二つのアミノ酸残基が関与する機構とは異なり、一つの酸性アミノ酸で触媒反応が進行する基質補助触媒(Substrate-Assisted Catalysis)というメカニズムで進行すると考えられている(5)。

2. クラスIIIキチナーゼのアミノ酸配列を用いた分子進化系統解析

5ブドウ品種のクラスIIIキチナーゼアミノ酸配列からUPGMA法(GENETYX-MAC, Ver. 12)を用いて分子進化系統樹を作成した(Fig. 2)。クラスIIIキチナーゼは多くの生物に確認され、そのアミノ酸配列は、系統樹の作成に利用されている。Chengらは(4)、GenBankから入手可能な44のクラスIIIキチナーゼアミノ酸配列を用いて分子進化系統樹を作成した。クラスIIIキチナーゼは大きな二つのsub-branchを形成し、*V. vinifera*は多くのナス科植物が属するsub-branchに含まれていた。本研究では、クラスIIIキチナーゼの

アミノ酸配列をもとに5ブドウ品種間の分子進化系統樹を作成した。ピノ・ノワールのクラスIIIキチナーゼのアミノ酸配列は、ピノ・ノワール以外の5品種のブドウに共通して見られる4アミノ酸残基の欠失がピノ・ノワールとの品種間差異に由来しているか否かが明確でないため、系統樹の作成に加えなかった。アミノ酸配列の類似性は、ヨーロッパ系*V. vinifera*のシャルドネ、カベルネ・ソービニオン、セミヨン間が最も高く、次いで東洋系*V. vinifera*の甲州ブドウ(AB105374)、そして、アメリカ系ブドウの(*V. rupestris*)セント・ジョージの順であった。クラスIIIキチナーゼのアミノ酸配列をもとにしたこれら5ブドウ品種の分子進化系統樹は、これまでの系統分類を支持していた。

要 約

4ブドウ品種、すなわち*V. vinifera*の3品種(セミヨン、カベルネ・ソービニオン、シャルドネ)および*V. rupestris*の1品種(セント・ジョージ)の葉DNAからキチナーゼ遺伝子をクローニングした。得られたクローンの塩基配列はブドウクラスIIIキチナーゼと高い相同性を示した。キチナーゼ遺伝子の塩基配列から推定した酵素タンパク質は297のアミノ酸残基からなり、その分子量は31757~31909の範囲であった。これらクラスIIIキチナーゼはファミリー18キチナーゼに共通するアミノ酸配列の保存領域を持っていた。クラスIIIキチナーゼのアミノ酸配列をもとにブドウ品種間の分子進化系統樹を作成した。アミノ酸配列の類似性は、ヨ

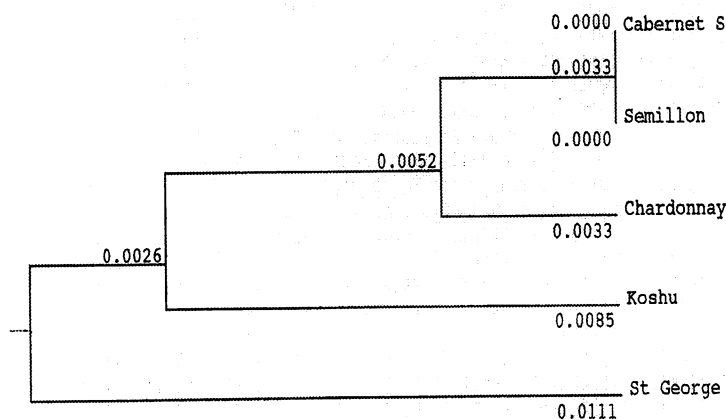


Fig. 2. Phylogenetic tree based on the amino acid sequences deduced from class III chitinase genes cloned from Cabernet Sauvignon (Cabernet S.), Chardonnay, Koshu (1) and Saint George (St. George) leaf DNAs. The phylogenetic tree was constructed by UPGMA method (GENETYX-MAC Ver. 12).

ヨーロッパ系 *V. vinifera* のシャルドネ、カベルネ・ソービニオン、セミヨン間が最も高く、次いで東洋系 *V. vinifera* の甲州ブドウ、そして、アメリカ系ブドウの (*V. rupestris*) セント・ジョージの順であり、この結果は、従来の系統分類を支持していた。

文 献

1. Ano, A., T. Takayanagi, T. Uchibori, T. Okusa, and K. Yokotsuka. Characterization of a class III chitinase from *Vitis vinifera* cv. Koshu. *J. Biosci. Bioeng.* 95: 645-647 (2003).
2. Bowers, J. E., E. B. Bandman, and C. P. Merdith. DNA fingerprint characterization of some wine grape cultivars. *Am. J. Enol. Vitic.* 44: 266-274 (1993).
3. Busam, G., H. H. Kassemeyer, and U. Matern. Differential expression of chitinases in *Vitis vinifera* L. responding to systemic acquired resistance activators or fungal challenge. *Plant Physiol.* 115: 1029-1038 (1997).
4. Cheng, C. M., A. Palloix, and V. Lefebvre. Isolation, mapping and characterization of allelic polymorphism of Chi3-P1, a class III chitinase of *Capsicum annuum* L. *Plant Sci* 163: 481-489 (2002).
5. 深溝慶・佐々木千絵・小島美紀. キチナーゼ・キトサナーゼの構造生物学. *化学と生物*, 39巻, 6号: 377-383 (2001).
6. Hamel, F., R. Boivin, C. Tremblay, and G. Bellemare. Structural and evolutionary relationships among chitinases of flowering plants. *J Mol Evol* 44: 614-624 (1997).
7. Henrissat, B. A. Bairoch. Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Biochem. J.* 316: 695-696 (1996).
8. Linthorst, H. J. Pathogenesis-related proteins of plant. *Crit. Rev. Plant Sci.* 10: 123-150 (1991).
9. Mauch, F., B. Mauch-Mani, and T. Boller. Antifungal hydrolases in pea tissue. II. Inhibition of fungal growth by combinations of chitinase and beta-1,3-glucanase. *Plant Physiol.* 88: 936-942 (1988).
10. Robinson, S. P., A. K. Jacobs, and B. Dry. A class IV chitinase is highly expressed in grape berries during ripening. *Plant Physiol.* 114: 771-778 (1997).
11. 高柳 勉・内堀貴之・吉川正輝・横塚弘毅. ブドウの葉および果実におけるキチナーゼの誘導. *日本ブドウ・ワイン学会誌*, 10巻, 3号: 131-136 (1999).
12. Uchibori, T., K. Yokotsuka, and T. Takayanagi. Purification and characterization of elicitor-induced chitinase from grape berries. *J. Appl. Glycosci.* 47: 163-168 (2000).
13. 渡邊剛志. 生物界において多様な役割を果たすキチナーゼ. *化学と生物*, 35巻, 6号: 408-414 (1997).