



神奈川県
農業総合研究所

ISSN 0388-8231

神奈川県農業総合研究所

研究報告

第140号

BULLETIN OF THE
KANAGAWA PREFECTURAL AGRICULTURAL RESEARCH INSTITUTE
NO. 140

平成11年8月



神奈川県農業総合研究所研究報告 第140号

所長 石川 喬一
編集委員 ○中村 宏
小林 正伸
半田 貴
佐々木 皓二
米山 裕
推名 清治
片木 新作
岡本 保透
大橋 透

○印：委員長

BULLETIN OF THE
KANAGAWA PREFECTURAL AGRICULTURAL RESEARCH INSTITUTE

Executive

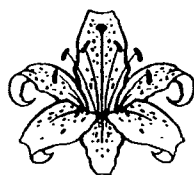
Director Kyo-ichi ISHIKAWA

Editorial Committee

○Hiroshi NAKAMURA
Masanobu KOBAYASHI
Takashi HANDA
Koji SASAKI
Yutaka YONEYAMA
Seiji SUINA
Shinsaku KATAGI
Tamotsu OKAMOTO
Toru OHHASHI

○:Editorial Committee Director

略号



神奈川県農業総合研究所研究報告 第140号

Bull. Kanagawa. Agri. Res. Inst.
No.140

神奈川県農業総合研究所研究報告 第140号

目 次

	(頁)
第I章 緒 言	1
第II章 ペクチン酸リアーゼC遺伝子への部位特異的変異の導入と大量発現系の開発	5
第1節 部位特異的変異の導入	6
1. 緒 言	6
2. 材料および方法	6
3. 結果および考察	9
(1) 部位特異的変異を導入するアミノ酸残基の選抜	9
(2) 部位特異的変異の導入	9
第2節 大腸菌を用いた大量発現系の開発	10
1. 緒 言	10
2. 材料および方法	10
3. 結果および考察	12
(1) 野生型PelCの大量発現	12
(2) 発現した野生型PelCの回収・純化	12
第III章 ペクチン酸リアーゼC変異体の特性変化	13
第1節 大腸菌における発現特性	13
1. 緒 言	13
2. 材料および方法	13
3. 結 果	14
(1) 変異PelCの発現	14
(2) 発現タンパクの局在部位	15
(3) 菌体分画成分のコハク酸脱水素酵素活性	16
(4) トリプシン感受性	16
4. 考 察	17
第2節 ペクチン酸リアーゼ活性の変化	18
1. 緒 言	18
2. 材料および方法	18
3. 結果および考察	19
(1) カルシウムイオン結合部位周辺の変異PelCにおけるPel活性の変化	19
(2) vWiDH領域に位置する変異PelCにおけるPel活性の変化	19

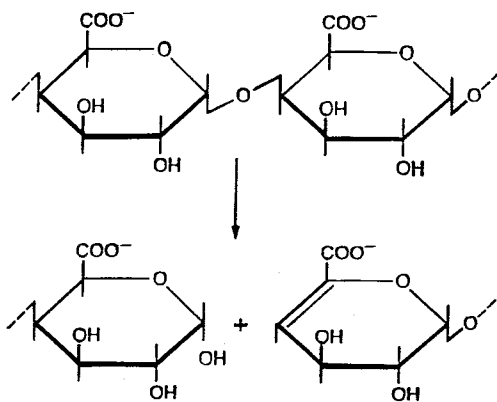
(3) ジスルフィド結合、Pel1ホモログおよびその他の部位に 作成した変異PelCにおけるPel活性の変化	2 0
第3節 カルシウムイオン結合強度および等電点の変化	2 1
1. 緒言	2 1
2. 材料および方法	2 1
3. 結果および考察	2 2
(1) カルシウムイオン結合強度の変化	2 2
(2) 等電点の変化	2 3
第4節 植物組織分解能の変化	2 4
1. 緒言	2 4
2. 材料および方法	2 4
3. 結果および考察	2 4
(1) 植物組織分解能に及ぼすpHとカルシウムイオンの影響	2 4
(2) 植物組織分解能の変化	2 5
第5節 エリシター活性の変化	2 6
1. 緒言	2 6
2. 材料および方法	2 6
3. 結果および考察	2 6
(1) 変異PelC濃度とエリシター活性	2 6
(2) 変異PelCにおけるエリシター活性の変化	2 7
第IV章 <i>E.chrysanthemi</i> EC16が生産するペクチン酸リアーゼアイソザイムの機能解析	2 7
1. 緒言	2 7
2. 材料および方法	2 9
3. 結果	3 1
(1) Pelアイソザイムの特性と機能	3 1
(2) 部位特異的変異PelEの特性と機能	3 2
(3) キメラPelの特性と機能	3 4
4. 考察	3 5
第V章 総合考察	3 6
第VI章 摘要	4 2
[Summary]	4 4
[引用文献]	4 7

*Erwinia chrysanthemi*が生産するペクチン酸リアーゼの 構造と機能に関する研究

北 宜 裕

第I章 緒 言

ペクチン酸リアーゼ(Pel)は、*Erwinia*属^{28, 71, 90, 91, 115)}、*Pseudomonas*属^{12, 92)}、*Xanthomonas*属^{15, 93, 110)}などの植物病原細菌あるいは*Fusarium*属⁵¹⁾、*Colletotrichum*属¹⁵⁵⁾、*Rhizoctonia*属^{2, 9)}等の植物病原糸状菌が植物への感染に伴って生産する主要な病原性因子(virulence factor)の一つで、共同因子であるカルシウムイオン(Ca^{2+})の存在下でポリガラクトuron酸(PGA)を β -トランスエリミネーション機構により切断する酵素(EC4.2.2.2)である(第1-1図)^{32, 128, 141)}。PGAは植物細胞壁マトリクスのペクチン質を構成する主要成分で、植物細胞を相互に接着させる機能を果たしている¹⁰⁵⁾。Pelをその病原性因子とする上記の植物病原微生物類は、宿主への感染に伴ってPelを爆発的に生産し、宿主の細胞壁構成成分であるペクチン質を分解することにより組織を軟化・腐敗させる(第1-2図)^{6, 10, 32, 84, 115)}。



第1-1図 ペクチン酸リアーゼによるポリガラクトuron酸の β -トランスエリミネーション分解

感染場面でペクチン酸リアーゼが果たしている役割

Erwinia chrysanthemi は、1953年にキクの腐敗細菌病として初めて分離・同定され²³⁾、その後、トウモロ

コシ²⁰⁾、ジャガイモ⁹⁸⁾あるいはカーネーション¹²⁹⁾等、23属50種以上にわたる広い植物種から、組織の腐敗、萎ちようあるいは立ち枯れ症状等を引き起こす軟腐性植物病原細菌として分離されている^{42, 43, 115)}。*E. chrysanthemi*は、感染に伴ってPelのほかセルラーゼ¹⁾、キシラーゼ^{20, 75)}、リパーゼ⁷³⁾あるいはプロテアーゼ³⁸⁾等、多数の宿主組織成分を分解する酵素群を分泌する^{6, 32, 84)}。しかし、純化したPelにより植物組織が軟化・分解されること^{8, 10)}、Pelを生産できないか、生産できても菌体外へ分泌できない*E. chrysanthemi*の突然変異体は病原性を示さないこと^{1, 16, 33)}、およびpel遺伝子で形質転換し、Pelを生産できるようになった大腸菌はジャガイモ組織を軟化できるようになること¹¹⁴⁾などから、Pelが*E. chrysanthemi*の病原性因子として最も重要な役割を果たしていることが明確に示された。また、Pelは、Pel活性および植物組織分解能以外に植物にファイトアレキシン生産を誘導するエリシター活性も有している^{39, 113)}。これは、植物細胞壁成分であるPGAが、Pelによって分解されて生ずる遊離オリゴガラクトuron酸に高いエリシター活性があるためとされている⁴⁰⁾。しかし、エリシター活性がどのようにPel活性や植物組織分解能と関係しているのかについては明らかにされていない。

実際の感染場面ではPelの生産制御機構も病原性を発揮する上では極めて重要な要因となっている^{1, 27, 53, 54, 84)}。これまでの詳細な分子レベルでの研究により、PelはPGAの分解産物誘導と自己カタボライト抑制によるスイッチオン・オフ機構^{30, 149, 150)}および2-ケト-3-デオキシグルコン酸による代謝制御機構¹²⁶⁾等によって生産制御されていることが明らかにされている^{84, 130)}。また、複数存在するPelアイソザイムは、サブグループごとにそれぞれ個別に生産制御されていることなどから^{94, 153)}、宿主植物種や感染組織によってさまざまに異なる細胞壁構成成分に対応して分化してきたものと考えられている^{17, 64)}。

Pelアイソザイムとその遺伝子構造

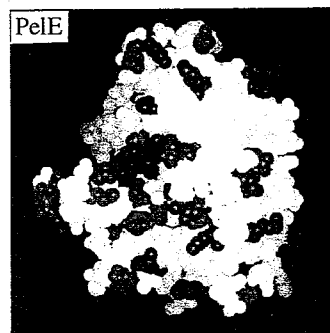
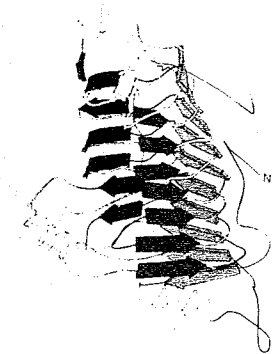
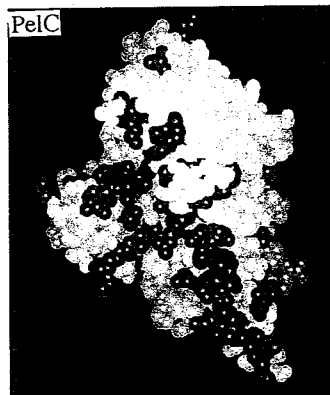
*Erwinia*属の軟腐性植物病原細菌は複数のPelアイソザイムを生産する^{6,32,59)}。*E.chrysanthemi*からは、これまでにエンド型のPelA、PelB、PelC、PelD、PelE^{5,71,152)}、PelI¹³²⁾、PelL⁹⁹⁾、PelZ¹¹⁹⁾ およびエクソ型のPelX²¹⁾の計9種類のPelアイソザイムが分離・純化されるとともにその遺伝子もクローニングされ、それぞれのアイソザイムの機能と遺伝子の構造・発現解析が進められてきた^{5,72,125,144)}。これら9種類のPelアイソザイムは、その機能と遺伝子構造から大きく5群に類別される(第1-1表)¹³²⁾。このうち、I群に類別されるPelA、B、C、DおよびEは、アミノ酸レベルでの相同性、ジスルフィド結合の数および基質の分解特性等から、さらにPelA、D、EとPelB、Cの二つに類別され、それぞれPelADEおよびPelBCサブファミリーと呼ばれている^{133,153)}。このサブファミリー内におけるアミノ酸配列には、60ないし80%の高い相同性が認められるのに対しサブファミリー間では20%程度の相同性しか存在しない。また、PelADEサブファミリーによる最終分解産物は不飽和ガラクトロン酸分子を含む二量体のみであるのに対して、PelBCサブファミリーでは二量体のみならず三量体の不飽和ガラクトロン酸も生成する^{62,120)}。これらのPelアイソザイム以外にも、植物成分によってのみ発現が誘導されるエンド型Pelの存在が確認されるなど^{14,76)}、*E.chrysanthemi*は感染に伴って多くの、異なる特性を有するPelアイソザイムを生産していることが明らかにされている。このように、*E.chrysanthemi*が生化学的性質の異なる複数のアイソザイムを生産していることは、幅広い植物種に寄生する上で極めて重要な要因となっているものと考えられる^{6,17,18,32)}。しかし、これらの複数のPelアイソザイムの機能の差や感染場面での役割等については不明な点が多く残されている。

第1-1表 *E.chrysanthemi*が生産するペクチン酸リアーゼアイソザイムの機能と遺伝子構造に基づいた類別 (Schevchikら, 1997¹³²⁾)

群	Pelアイソザイム	備 考
I	PelA, PelD, PelE	PelADEサブファミリー ¹⁵³⁾
	PelB, PelC	PelBCサブファミリー ^{72,133)}
II	Periplasmic Pel	<i>E.carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i> が生産 ⁵⁹⁾
III	PelI	<i>N.haematococca</i> のPelと高い相同性あり ¹²⁰⁾
IV	PelL, PelX	PelXはexo型 ²¹⁾
V	PelZ	pelCに隣接して存在 ¹¹⁹⁾
その他	Plant-Inducible Pels	存在のみ確認 ^{14,86)}



第1-2図 *Pseudomonas marginalis*により引き起こされたキャベツ腐敗病の病徴



第1-3図 スペースフィリングモデルおよびリボンダイアグラムによるPelCおよびPelEの分子構造の比較⁶⁷⁾

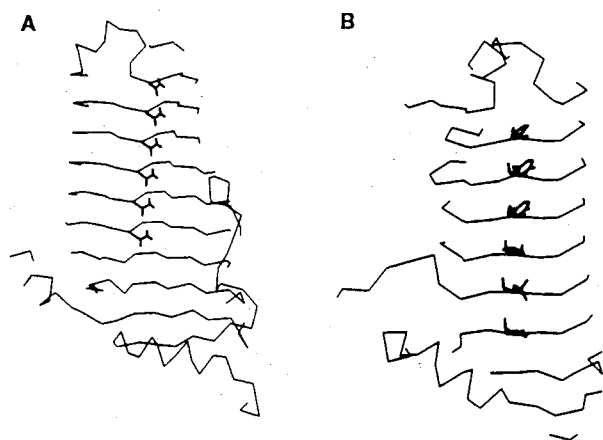
いずれも左がスペースフィリングモデルで右がリボンダイアグラム。スペースフィリングモデルでの表示は次のとおり。青：塩基性アミノ酸残基、赤：酸性アミノ酸残基、白：その他のアミノ酸残基、黄色：カルシウムイオン、緑：2価の金属補因子

ペクチン酸リアーゼの3次元立体構造

すでに述べたように、これまでにPelをコードする多くの遺伝子がクローニングされ、その構造解析が進められるとともに、大腸菌を用いたpel遺伝子発現システムの開発により大量のPelタンパクを得ることができるようになった。このような状況の中で、*E.chrysanthemi*

EC16 が生産し、PelBCサブファミリーに属するPelC^{161,163} およびPelADEサブファミリーに属するPelE^{94,95} の3次元立体構造が、それぞれ1993年および1994年に相次いで決定された(第1-3図)。いずれも、植物病理学分野において初めて病原性因子の3次元立体構造が明らかにされたものであるが、タンパク構造としてもこれまでに例のない、全く新しいトポロジーであった。そこで、PelCの3次元立体構造を決定したYoderらは、この新規のトポロジーを、“parallel β helix structure”、すなわち“平行型 β ヘリックス構造”と命名した¹⁶¹。

並行型 β ヘリックス構造の特徴は、大きな右廻りの螺旋状に重層した並行型 β ストランドによって形成された3枚の β シートが、Pel分子のコア構造を形成していることである(第1-3図)。すなわち、並行型 β ストランドが、6ないし10本づつ積み重なって大きく右廻りにねじれながら螺旋状の平行型 β ヘリックスストランド骨格を形成する。さらに、3つのターンごとに上下の隣接する並行型 β ストランドが互いに水素結合することによって3枚の β シートが形成され、堅固な並行型 β ヘリックスのコア構造が作り上げられている。コア内部に存在するアミノ酸残基の側鎖はすべてコアの中心方向を向き、隣接する側鎖との間でスタッキング構造を形成しているためコア内部の電子密度は極めて高くなっている。特にアスパラギンのアミド基の水素原子の一つが、その上下に隣あったアスパラギンのカルボニル基の酸素原子と強く水素結合することによって形成されるアスパラギン・スタック(第1-4図A)およびフェニルアラニン、アラニンおよびロイシン等によって形成される芳香環・疎水性アミノ酸スタック(第1-4図B)は、堅固な並行型 β ヘリックス構造を維持する上で極めて重要な役割を果たし



第1-4図 ペクチン酸リアーゼC (PelC)の並行型 β ヘリックスのコア構造内に認められるアスパラギンスタック(A)および芳香環・疎水性アミノ酸スタック(B) (Yoderら、1993¹⁶¹)

ている。

第1-3図に示したように、PelCとPelEとはアミノ酸レベルで22%の相同性しか認められないものの、いずれも同じ並行型 β ヘリックスコア構造を有している^{97,99}。しかし、そのコアから突出するループは、大きさとコンフォメーションが大きく異なり、両アイソザイムに固有な立体構造を形成している。この立体構造の共通点と差異がPelCとPelEの機能とどのように関係しているのかは明らかにされておらず、その解析が待たれているところである。

Pelタンパクのホモローグ

E. chrysanthemi EC16が生産するPelCおよびPelEに引き続いて、これまでに*Bacillus subtilis*のペクチン酸リアーゼ(BsPel)¹¹⁷、*Aspergillus niger*のペクチンリアーゼ(PLA¹⁰³、PLB¹⁵⁰)、*E. carotovora* subsp. *carotovora*のポリガラクトクロナーゼ¹¹⁸、*Aspergillus aculeatus*のラムノガラクトクロナーゼ(RgA)¹¹⁶、*Salmonella typhimurium*のP22フェージのテールスパイクタンパク¹³⁹、*Bordetella pertussis*のP.69パータクチン^{45,100}、*E. coli*が生産するUDP-N-アセチルグルコサミンシトランスフェラーゼ¹²⁴、*Pseudomonas aeruginosa*のアルカリプロテアーゼ¹³等、多くのタンパク質で並行型 β ヘリックス構造が見つかった。そこで、この新規のタンパク構造モチーフを一括して、 β ロールと呼ぶようになった¹³⁷。これらの β ロールモチーフを有するタンパクは、いずれも細胞外に分泌されるか細胞表面に存在し、病原性に強く関与する因子であることは興味深い^{65,66}。

このほか、機能は解明されていないものの、トマト²²、タバコ^{22,127}、トウモロコシ¹⁵¹あるいはスギ¹⁴⁵等の柱頭あるいは花粉で特異的に発現している複数の遺伝子において、Pelと高い推定アミノ酸配列の類似性を有するものが次々に分離されている^{86,123,157}。これらの遺伝子の翻訳産物として推定されるタンパクは、いずれもPelと同じ並行型 β ヘリックス構造を取っているものと予測されている⁵⁸。そのなかで、Taniguchiらは¹⁴⁵、日本スギの花粉からPelと高いアミノ酸配列の類似性を有するアレゲン関連遺伝子であるcry j Iをクローニングするとともに、その発現産物であるCry j Iタンパクを単離したところ、それがPel活性を有することを確認した。したがって、上記の植物起源のPelホモローグは、いずれもPel活性を有しているものと推定され、花粉発芽や活

発な細胞伸長等における細胞壁合成系に参与しているのではないかと考えられている⁵⁸⁾。

第1-2表 3次元立体構造に基づいたPelファミリータンパク群の
アミノ酸アライメント解析 (Henrissatら, 1995⁵⁹⁾)

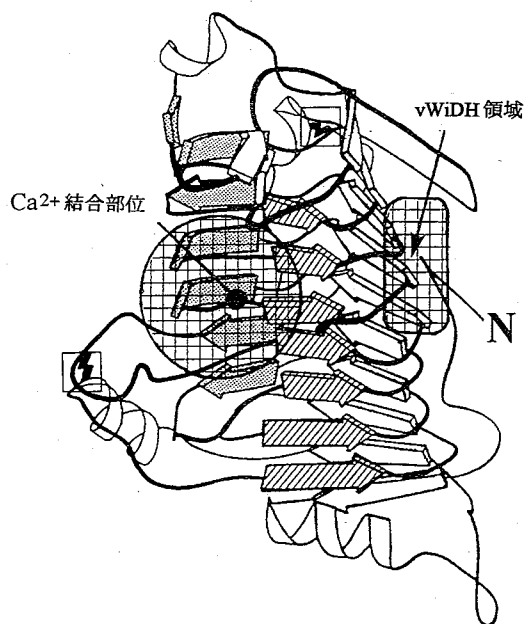
Pelファミリー タンパク群	機能	保存されているアミノ酸残基		
		総数	Ca ²⁺ 結合部位	vWiDH領域
細胞外分泌性 ペクチン酸リ アーゼ群(12) ¹⁾	β -エリミネーションによる ポリガラクトロン酸の分解	27 (7) ²⁾	D131, R218 D170, K190 R223	D144, H145, T206 T92, T179, S181 T10, H228, K342
ペクチン リアーゼ群(7)	β -エリミネーションによる ペクチンの分解	27 (5)	D131, R218	D144, H145, T206 T10, K91, H228, E253
植物タンパク ホモログ群 ³⁾ (12)	不明	82 (15)	D131, R218 D170, R223	D144, H145, T206 T92, T179, S181
全体(31) ⁴⁾	-	10 (3)	D131, R218 P220	D144, H145, T206 W142

1) 解析に用いたタンパクの総数、2) 保存されているアミノ酸残基のうちグリシンの総数、3) 柱頭特異的発現タンパク(11種)および花粉アレルギータンパク(1種)を含む。

PelのPGA分解メカニズム

PelはCa²⁺の存在下、 β -トランスエリミネーション機構により、PGAの非還元末端側のガラクトロン酸分子のC₄とC₅炭素の間に2重結合を生成させてPGAを切断する(第1-1図)^{6, 32, 120, 128, 141)}。しかし、PelタンパクがCa²⁺と共同してPGA分子にどのように作用して β -トランスエリミネーション分解しているのかは明らかにされていない。Henrissatら⁵⁸⁾は、上記の植物起源のPelホモログを含むタンパクを一括してPelスーパーファミリーとし、そのうちの27種のタンパクについてPelCの3次元立体構造を基にした多因子相同性解析を行った。これは、いずれのPelホモログともPelCと同じ並行型 β ヘリックス構造をとっているものとし、個々のタンパクにおいて並行型 β ヘリックス構造を形成するために不可欠なアミノ酸配列を固定したうえで、残りのアミノ酸配列にアライメントをかけるという方法である。解析の結果、Pelスーパーファミリーに属するすべてのタンパクに共通する10のアミノ酸残基が抽出された(第1-2表)。そこで、これらのアミノ酸残基の位置をPelC分子上の位置に当てはめたところ、カルシウムイオン結合部位(Ca²⁺結合部位)に3残基が、また、その180°反対側に位置し、すでに外分泌性Pelタンパク群の間で高度に保存されている領域として知られている“vWiDH領域”^{56, 144)}に3残基が位置していることが明らかになった

(第1-5図)。これら6残基のうち4残基は触媒活性の高い酸性または塩基性アミノ酸残基で¹⁶⁰⁾、いずれもPelスーパーファミリー内では不変残基として保存されていることから、これらはPel活性に極めて重要な役割を果たしているものと予想され、その機能解明が待たれているところである。



第1-5図 Pelファミリータンパク群で高度に保存されているアミノ酸残基が集中している二つの部位¹⁾のPelC上の位置

¹⁾ カルシウムイオン結合部位およびvWiDH領域

本研究の目的

以上のように、多犯性の植物病原細菌である*E. chrysanthemi*の病原性因子として重要な役割を果たしているPelの酵素機能を明らかにすることは、植物と病原細菌との相互関係を分子レベルで理解する上で極めて重要な意味を持つ。特にPelの活性中心や基質であるPGAの認識に参与しているアミノ酸残基が同定できれば、実用的な農薬として利用可能な阻害剤の開発につながる可能性がある¹⁵⁵⁾。また、Pel活性をノックアウトした遺伝子で有用作物を形質転換することによって、軟腐性病害に対し抵抗性を有する作物品種の育成も可能となる。

E. chrysanthemi EC16が生産するPelA、B、CおよびEについては、その構造遺伝子がクローニングされ、大腸菌によって野生型タンパクと同じPelタンパクが生産できることが確認されている^{31, 72, 144)}。遺伝子がクローニングされていれば、酵素機能の解析に分子生物学的な手法

として部位特異的変異が利用できる。これらのpel遺伝子内に部位特異的変異を導入し、大腸菌に変異Pelタンパクを生産させその機能変化を解析すれば、直接的にPel活性の中心やCa²⁺の機能あるいはPGAの分解メカニズム等を明らかにすることができるはずである。

そこで、本研究では、*E. chrysanthemi* の病原性にPelが果たしている役割を明らかにするため、Pelの3次元立体構造と機能に関する分子生物学的解析を行った。第2章では、pelC遺伝子への部位特異的変異の導入とT7発現システムを用いた変異タンパクの大量発現系および発現タンパクの効率的な回収・純化手法の開発について取りまとめた。第3章では、第2章で作成した部位特異的変異pelCの発現解析、可溶性タンパクとして得られた変異PelCのPel活性、カルシウムイオン結合特性、等電点、植物組織分解能およびエリシター活性の変化等について検討し、PelCの活性中心とPel活性に重要な機能を果たしているアミノ酸残基を同定するとともに、感染に伴う軟化・腐敗要因とPelが有するエリシター活性の特性を明らかにした。第4章では、*E. chrysanthemi* EC16が生産するPelA、B、CおよびEの4種のPelアイソザイムの機能評価を、PelEの部位特異的変異体および各アイソザイム間で作成したキメラ遺伝子等を活用して行った。第5章では、以上の結果に加え、別途共同研究で行った不活性の変異PelCとPGAとの酵素-基質複合体結晶構造解析結果¹³⁾を総合してPelタンパクの構造機能相関解析を行い、Pelが*E. chrysanthemi* EC16の病原性に果たしている役割についての総合的な考察を加えた。

本研究は平成5年から7年までの2年間、神奈川県自治総合研究センター主宰の海外大学院等派遣研修で、米国カリフォルニア大学リバーサイド校(UCR)のNoel T. Keen教授およびFrances Journak教授(現カリフォルニア大学アーバイン校(UCI))の研究室で実施した研究成果を核として、これを帰国後、神奈川県農業総合研究所生物資源部において発展させた成果を取りまとめたものである。

本研究に取り組むきっかけを与えて下さり、研究を進める上で常に最先端の情報と貴重なご助言をいただくとともに、公私にわたり米国での研究生生活をご支援下さったUCRのN.T.Keen教授およびUCIのF.Journak教授、Keen教授をご紹介下さった神戸大学農学部教授真山滋志博士、そして本研究の中心となる部位特異的変異体の作成や塩基配列の確認等において絶大なるご協力をいただいたUCRのKeen研究室のCarol M.Boyd氏に対し心

から感謝申し上げる。

また、本研究を進める上で静岡大学農学部教授露無慎二博士には同じ研究分野の先達として貴重なご助言をいただいた。Keen研究室のCastro Wattad博士、Fredri Bruhmann博士およびDavid Slaymaker博士、Jurnak研究室のMarilyn Yoder博士、Robert Scavetta博士、Susan Heffron博士、Michael R.Garrett氏および神奈川県農業総合研究所生物資源部の各位には、実験を進める上でさまざまなご指導、御助言あるいはご協力をいただいた。これらの方々に対し心からお礼申し上げます次第である。

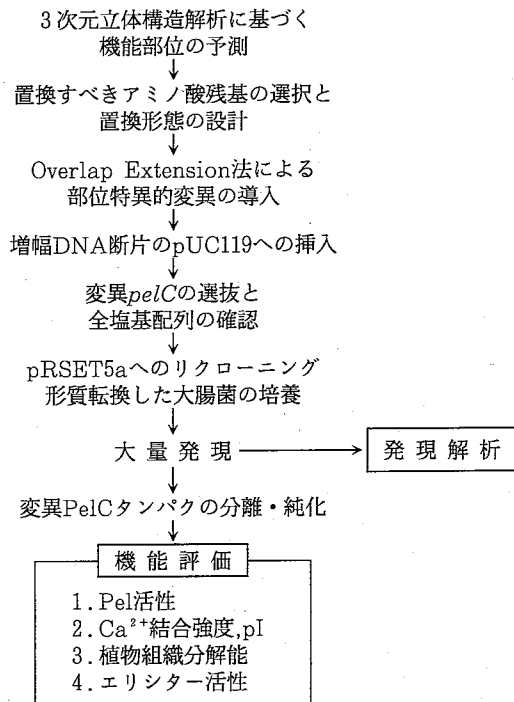
本論文を草するにあたり、京都大学農学部植物病理学研究室教授古澤巖博士には、同副学長として極めてご多忙の中、常に援助を惜しまずご校閲の労とご助言をいただいた。また、同植物病理学研究室講師三瀬和之博士ならびに同助手高野義孝博士には終始ご鞭撻とご援助をいただいた。記して深く感謝の意を表す。

このほか、神奈川県海外大学院等派遣研修にあたっては、神奈川県総務部、環境農政部の関係各位に公私にわたって多大なるご配慮をいただいた。これらの方々に対してこの場を借りて厚くお礼申し上げます。

第2章 ペクチン酸リアーゼC遺伝子への部位特異的変異の導入と大量発現系の開発

タンパク質が持つ機能を知るためには、従来は特定のアミノ酸残基の側鎖を化学的に修飾したり、特定のアミノ酸配列を認識して切断するペプチダーゼを利用する手法が取られてきた¹⁴⁾。しかし、近年は遺伝子組換え技術を用いて構造遺伝子内の特定のアミノ酸残基に部位特異的変異を導入することにより本来の機能を消失させたり、基質特異性を変化させたりするタンパク質工学手法が積極的に利用されるようになった^{35, 46, 55, 63)}。特に、遺伝子がクローニングされ、その発現タンパクの3次元立体構造が明らかにされている場合には、部位特異的変異の利用は極めて有効な手段となる。立体構造が未知の場合でも、アミノ酸配列が50%以上相同であれば一般に3次元立体構造における相同性も高いので³⁷⁾、高度に保存されているアミノ酸残基が抽出されれば、そこを標的にして部位特異的変異を導入すればよい。実際に、複数のアイソザイムが存在するセルラーゼでは、この方法を用いてその活性中心の特定に成功している⁵⁷⁾。

ここでは、3次元立体構造が解明され、分子内の重要なアミノ酸残基の機能解析が進んでいるPelCについて、



第2-1-1図 部位特異的変異を利用したPelCの機能解析手順

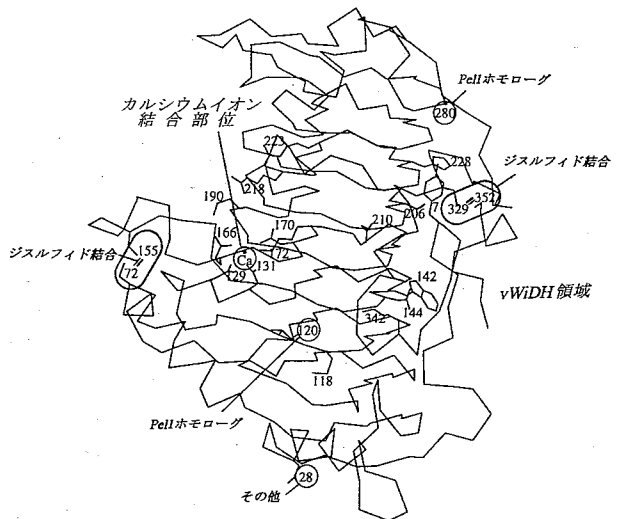
第2-1-1図に示したフローチャートにしたがってpelC遺伝子内に部位特異的変異を導入した。また、得られた変異pelCを大量発現させるため、T7ファージのRNAポリメラーゼプロモーター (T7プロモーター) でドライブされたT7発現システム¹⁴³⁾を用いた野生型PelCタンパクの大量発現ベクターを構築するとともに、発現タンパクを効率的に回収・純化する手法を開発した。

第1節 部位特異的変異の導入

1. 緒言

これまでに、部位特異的変異を導入した酵素タンパクの機能解析によって、トリプシン³⁵⁾、トリオスリン酸イソメラーゼ¹⁴²⁾、フルクトース1,6-2リン酸アルドラーゼ¹²²⁾等の多くの酵素で、その酵素活性あるいは基質特異性²⁵⁾等に関与するアミノ酸残基が特定されてきた⁸⁵⁾。植物病理学分野においても同様な手法でFusarium moniliformeが産生するポリガラクトクロナーゼの活性に重要な役割を果たすアミノ酸残基²⁴⁾、タバコモザイクウイルスの外被タンパク質¹⁴⁶⁾およびトマト葉かび病菌の非病原性遺伝子産物である“AVR9”⁸³⁾のエリシター活性に関与するアミノ酸残基が同定されている。

そこで、本章では、*E. chrysanthemi*が産生するPelアイソザイムのうち、その3次元立体構造解析が進んでいるPelCに注目し、オーバーラップエクステンション(O



第2-1-2図 PelC分子に導入した置換アミノ酸残基の位置

LE)法^{60,61,107,164,165)}によりその構造遺伝子内への部位特異的変異の導入を試みた。

2. 材料および方法

(1) 置換アミノ酸残基の選択と置換形態の設計

PelCの3次元立体構造解析結果^{161,163)}を基にして、その構造と機能に強く関与していると推定される1)Ca²⁺結合部位、2)Pelスーパーファミリーの高度保存領域であるvWIDH領域、3)ジスルフィド結合残基および4)PelCのホモログで*E. carotovora* subsp. *carotovora* strain71が生産するPel1との相違アミノ酸残基に、タンパク構造には影響しないが野生型PelCとは異なるアミノ酸残基に置換すべくその置換形態を設計した(第2-1-2図)。

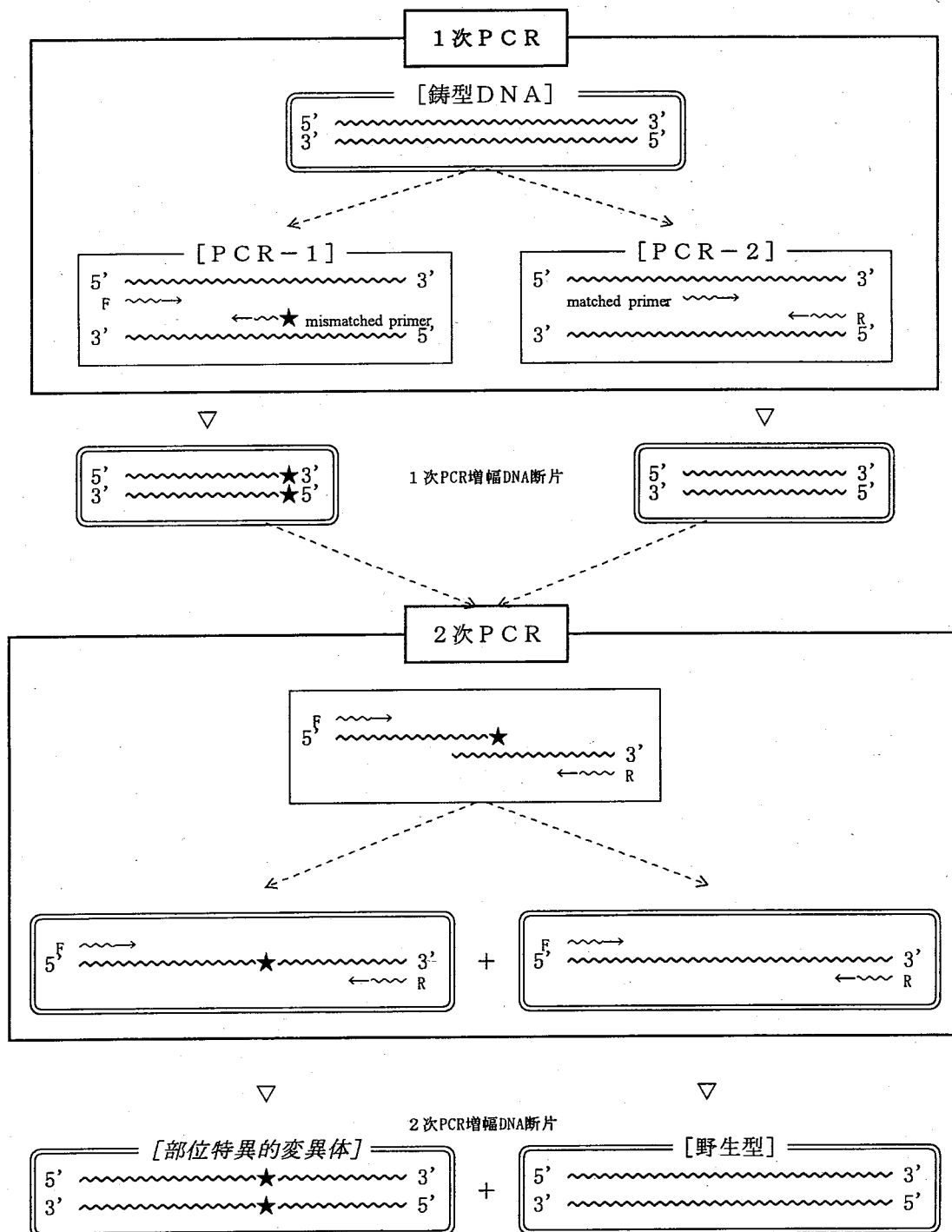
(2) 部位特異的変異の導入

野生型pelCの目的とする部位への特異的変異の導入には、Mikaelianら¹⁰⁷⁾およびYucelら¹⁶³⁾の方法を組み合わせたOLE法を適用した(第2-1-3図)。すなわち、第1ステップとして、野生型pelCの全領域を含むpPEL405(第2-1-1表)を鋳型DNAに、約100bpを共有する2種類のDNA断片を増幅するための1次PCRを行い、連結可能な2つのDNA断片を増幅した。この場合、一方のDNA断片は、目的とする導入変異に合わせて1ないし3塩基をミスマッチさせたプライマー(ミスマッチプライマー)とベクター側のユニバーサルプライマー(Fプライマー)とにより増幅し、もう一方は導入変異を含むDNA断片とおおよそ100塩基オーバーラップする位置に作成したマッチプライマーとベクターのユニバーサルプライマー(Rプライマー)とを用いて増幅した(第2-1-2表)。増幅された1次PCR産物をアガロース電気泳動

で分離し、目的とする増幅DNA断片を常法に従って精製した後、それぞれ50ngづつ取り、FおよびRプライマーを用いて目的とする*pelC*の全翻訳領域を含むDNA断片を増幅するための2次PCRを行った。ミスマッチ塩基はミスマッチプライマーの中央に来るように設計し、Cruachem Inc.(Sterling,VA,USA)に合成委託した。3塩基置換の場合には、ミスプライミングを抑えるため、プライマーのDNA塩基数を最大27merまで延長した。いずれのPCRとも、センスおよびアンチセンスプライ

マーは5pM、dNTPは2.5mM、MgCl₂は100mM濃度とし、3'-エクソヌクレアーゼ活性を有するVent™DNAポリメラーゼ(New England Biolabs社)を0.25ユニットに調製した50μlの反応系で行った。

1次PCRの条件は、94℃、4分間で処理した後、熱変成94℃、30秒、アニーリング55℃、30秒および伸長反応72℃、2分を30サイクル行った。2次PCRでは、アニーリング温度のみを50℃に下げ、それ以外は1次PCRと同じ条件で行った。第2-1-1表にPCRで用いたミスマッ



第2-1-3図 オーバーラップエクステンション法による部位特異的変異の導入手順

第2-1-1表 使用した大腸菌系統およびプラスミド

項目	特 性	出 典
[大腸菌系統]		
DH5 α	F- <i>lacZ</i> M15 <i>endA</i> <i>hsdR17</i> <i>supE44</i> <i>thi-1</i> <i>gyrA</i> <i>relA1</i>	Bethesda Research Lab.
HMS174(DE3)	F- <i>recA</i> <i>r-K12</i> <i>m+K12</i> Rif ^r (T7 lysogen) α	Studier <i>et al.</i> ¹⁴³⁾
[プラスミド]		
pUC119	クローニングベクター (アンピシリン耐性遺伝子を持つ)	Yanish-Perron <i>et al.</i> ¹⁶⁰⁾
pRSET5a	発現ベクター (T7プロモーターおよびアンピシリン耐性遺伝子を持つ)	Schoepfer ¹⁴⁰⁾
pPEL405	<i>pelC</i> クローニングベクター (pUC119コンストラクト)	Tamaki <i>et al.</i> ¹⁴⁴⁾
pRSET405 Δ Pst	<i>pelC</i> 発現ベクター (pRSET5aコンストラクト)。pPEL405 1.4-kbの <i>Xba</i> I- <i>Hind</i> III断片をpRSET5aに挿入し、マルチプル クローニング部位内の <i>Pst</i> I部位を部分消化・再連結により 除去した。	本研究(Kita <i>et al.</i> ¹⁸¹⁾)

**lac*遺伝子、*lacUV5*プロモータ、*lacZ*遺伝子のの上流部分およびT7 RNAポリメラーゼ遺伝子が組み込まれた溶原菌系統

第2-1-2表 部位特異的変異*pelC*の作成に用いたオリゴDNAプライマーの種類とその塩基配列

名 称	方 向	塩 基 配 列*
[ミスマッチプライマー]		
(カルシウムイオン結合部位)		
D 1 2 9 N	antisense	5' - GTCGCCATTTTTTAGCGCCG-3'
D 1 3 1 E	antisense	5' - GCGGATCATTTTCGCCATCTT-3'
D 1 3 1 N	sense	5' - CTAAAGATGGCAACATGATCC-3'
E 1 6 6 D	antisense	5' - ACGGCGGAATCAAAGGTGGTG-3'
E 1 6 6 Q	antisense	5' - ACGGCGGATTGAAAGGTGGTG-3'
D 1 7 0 N	antisense	5' - CCTTGATATTAACGGCGG-3'
K 1 7 2 H	sense	5' - GTTGATATACATGGCGCGTCAAC-3'
K 1 7 2 L	sense	5' - GTTGATATACTGGCGCGTCAAC-3'
K 1 7 2 R	antisense	5' - GACGCGCCACGGATATCAACG-3'
K 1 9 0 A	antisense	5' - CAGACCCACTGCTTTTCACACCGTG-3'
R 2 1 8 A	antisense	5' - CAACGGCAGAGCGGCGTTAACG-3'
R 2 1 8 E	antisense	5' - CAACGGCAGTTTCGGCGTTAACG-3'
R 2 1 8 K	antisense	5' - CAACGGCAGTTTGGCGTTAACGTC-3'
R 2 1 8 L	antisense	5' - CGGCAGAAAGGGCGTTAACG-3'
R 2 2 3 A	sense	5' - CTGCCGTTTGCAAGCTGGTGGT-3'
(wWIDH領域)		
L-10E	antisense	5' - GAGCGCCAGTTCAGTCCAG-3'
Y7D	antisense	5' - GTAGCGGCGTCCGCCACCGGTA-3'
M118N	antisense	5' - CGTATACGATTGTTCTGTACCACC-3'
W142H	antisense	5' - CGTTATGGTCAACCATGGACATTCGGCG-3'
D144N	antisense	5' - CAATTCGTTATGTTAAACCCAGAC-3'
H145Q	antisense	5' - CAATTCGTTTGTGGTCAACCCAG-3'
T206A	antisense	5' - GTTATGGTGATAGGCCAATATTGC-3'
N210S	antisense	5' - CGTTGTAGTAGCTATGGTG-3'
H228Q	antisense	5' - GTTGTAAAGCTTGAACCAGACC-3'
E253D	antisense	5' - GTTCTAAGCATCAACCAGACC-3'
K342E	antisense	5' - GTGGCCAGATTTTTCACCCAC-3'
(ジスルフィド結合)		
C72S	antisense	5' - CACTGGCCGGAGATATTGGCG-3'
C155S	antisense	5' - GTGCCGTCGGACTCATGGTTG-3'
C329S	antisense	5' - TGTCCCTTCACGCTTTGTGC-3'
C352S	antisense	5' - GAGATTATTTACTGGCTGTGC-3'
(Pel1ホモログ)		
I120F	antisense	5' - CAGGTAGCCGAAACGCATGTTC-3'
G280N	antisense	5' - GATGTTGTTGTTTTTTCAGCAC-3'
(その他)		
D28R	antisense	5' - GATATTGACGATACGCTGCATCG-3'
[マッチプライマー]		
F(M13/pUC)	sense	5' - GTAAAACGACGGCCAGT-3'
F200	sense	5' - CTGGCTATGAAATCACTC-3'
F400	sense	5' - CACGTCTGGATGCCAACG-3'
F600	sense	5' - CAACTTCGGCATCTGGAT-3'
F800	sense	5' - GTCGAACACCGTCAACCGT-3'
F1000	sense	5' - ACCAACATCACCGGTTTC-3'
F1200	sense	5' - GACACCAAGCCTTATGTG-3'
R(M13/pUC)	antisense	5' - AACAGCTATGACCATG-3'

*DNA塩基配列の下線部は置換したアミノ酸残基に対応するコドンで、ゴシック体は野生型*pelC*に対してミスマッチさせた塩基を示す。

チプライマーを含むすべてのプライマーの塩基配列を取りまとめた。

得られた2次PCR産物は、1ユニットのプロテアーゼKにより不要タンパクを分解した後³⁶⁾、フェノールクロロフォルム処理により除タンパクした。次に、純化したDNA増幅断片をXba I およびHindIIIで2重消化した後、pUC119の同一制限酵素部位に常法に従って挿入した^{101,160)}。作成した変異*pelC*を含むpUC119コンストラクトは大腸菌DH5aを宿主にし(第2-1-1表)、塩化セシウム密度勾配遠心分離により純化した¹⁰¹⁾。

(3) 塩基配列の確認

今回用いたOLE法では、目的とする部位特異的変異体は理論的に50%の確率で得られることになる(第2-1-3図)。したがって、PCRの過程で発生する突然変異がなく、目的とする変異のみを含むクローンを選抜するため、作成したすべての変異*pelC*の全翻訳領域の塩基配列をdideoxynucleotide termination法により確認した。反応には、T7DNAポリメラーゼと³²PでラベルしたATPを用いたSequenaseキット(United States Biochemical Corp., Cleveland)を用い、野生型*pelC*内に複数作成したマッチプライマーを組み合わせてセンスおよびアンチセンス両方向の塩基配列をカバーした。

3. 結果および考察

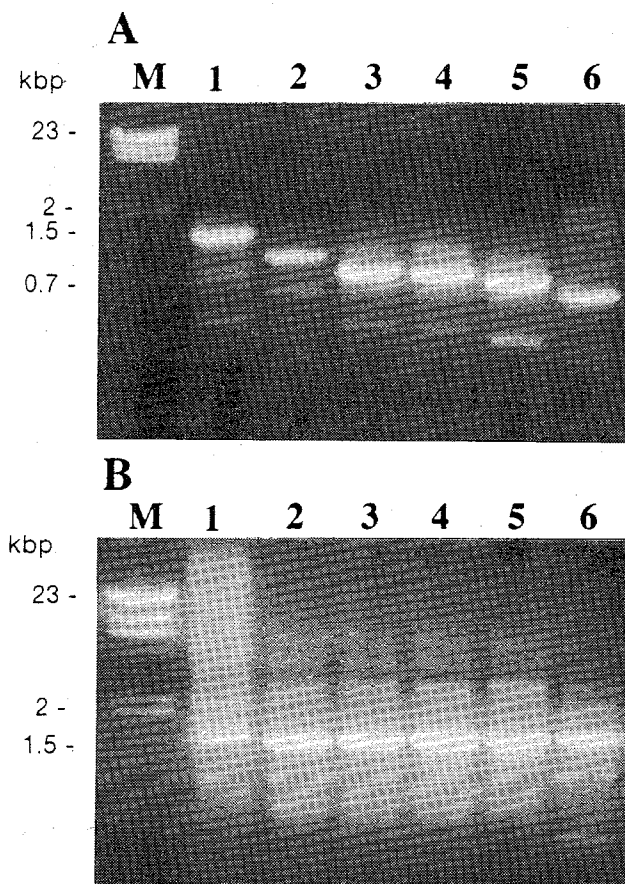
(1) 部位特異的変異導入アミノ酸残基の選抜

*PelC*の活性中心と予測されているCa²⁺結合部位^{161,163)}の周辺からは、化学反応性の高い酸性および塩基性アミノ酸残基をそれぞれ4残基(Asp129, Asp131, Glu166, Asp170およびLys172, Lys190, Arg218, Arg223)の計8残基を選び¹⁶⁶⁾、解析する機能と目的に応じた置換アミノ酸残基を選定した。vWiDH領域からは11残基(Leu10, Tyr7, Met118, Trp142, Asp144, His145, Thr206, Asn210, His228, Glu254, Lys342)を選び、その機能とは異なるアミノ酸残基に置換すべく設計した。また、ジスルフィド結合に関与する4残基(Cys72, Cys155, Cys329, Cys352)については、ジスルフィド結合が生じないように、一方または両方の残基をCysに置換することとした。*E.carotovora* subsp.*carotovora* strain 71の*PelC*ホモログであるPel1との相違残基で、種特異的細胞外分泌⁹⁶⁾に関与すると推定されているIle120およびGly280の2残基については、それぞれPel1型へ、また、その他の部位として選んだ酸性アミノ酸残基のAsp28については塩基性アミノ酸に置換することとした。

これらの部位特異的変異導入の対象とした上記の26のアミノ酸残基の*PelC*分子上の位置については、第2-1-2図に示した。

(2) 部位特異的変異の導入

現在、部位特異的変異の導入には、今回用いたOLE法以外に、Kunkel法⁸⁷⁾やUSE法¹⁵⁹⁾等が利用されているが、OLE法を用いれば、安価で効率よく部位特異的変異体を作成することができる。今回、野生型*PelC*への部位特異的変異の導入に用いたOLE法における1次PCRでは、いずれの変異*pelC*についても、予想される大きさの導入変異を含むDNA断片およびオーバーラップさせるDNA断片が安定して増幅された(第2-1-4図A)。アニーリング温度を5℃下げた2次PCRでは、予想される大きさのDNA断片が特異的に増幅された(第2-1-4



第2-1-4図 オーバーラップエクステンション法による1次PCRにおける*pelC*遺伝子の部分増幅DNA断片(A)および2次PCRにより得られた全長*pelC*を含む増幅DNA断片(B)のアガロース電気泳動像
(A) レーン1: オーバーラップさせる3'側増幅DNA断片、レーン2~6: 部位特異的変異を含む5'側増幅DNA断片(それぞれ、変異*pelC*のR218L, E166D, C155S, D129NおよびC72S)。(B) レーン2~6: 1次PCRで得られた3'側増幅DNA断片(A:レーン1)と5'側増幅DNA断片(A:レーン2~6)を鋳型に、マッチプライマーFおよびRを用いて行った2次PCRで得られた部位特異的変異を含む全長*pelC*(矢印)。レーン1: pPEL405を鋳型にした野生型*pelC*を含む増幅DNA断片。レーンMは、いずれも分子量マーカー(λ /HindIII digests)

図B)。この増幅DNA断片をXba I およびHindIIIで2重消化した後、pUC119にクローニングし、目的の部位特異的変異が正しい位置に導入され、かつその他の部位にはランダム変異が発生していないことを確認した。部位特異的変異体の作成過程で、ランダム変異体が1つ(T275I)得られたので、これも以後の解析対象に加えることとした結果、最終的に次の34種類の部位特異的変異pelCを得ることができた。

1) Ca²⁺結合部位 (15 変異体)

D129N、D131E、D131N、E166D、E166Q、D170N、K172H、K172L、K172R、K190A、R218A、R218E、R218K、R218L、R223A

2) vWIDH領域 (11 変異体)

L-10E、Y7D、M118N、W142H、D144N、H145Q、T206A、N210S、H228Q、E253D、K342E

3) ジスルフィド結合 (4 変異体)

C72S、C72S/C155S、C329S、C329S/C352S

4) PelIホモログ (2 変異体)

I120F、G280N

5) その他 (2 変異体)

D28R、T275I

第2節 大腸菌を用いた大量発現系の開発

1. 緒言

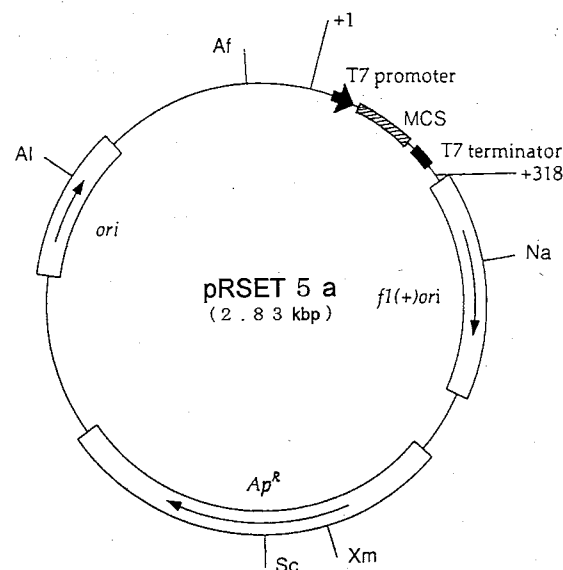
変異タンパクの機能解析には、大腸菌を利用した効率的な遺伝子発現系と発現タンパクの回収・純化系が欠かせない。これまでに、大腸菌を用いたさまざまなタンパク発現システムが開発されてきたが、発現量の多さと発現の特異性を考慮するとT7プロモーターでドライブされたT7発現システムの利用価値は極めて高い¹⁴³⁾。菌体外分泌性タンパクであるPelは、大腸菌を用いて発現させた場合、シグナルペプチドに導かれ、Sec依存分泌システムを通して大腸菌の内膜と外膜の間に存在するペリプラズムに移送され、フォールディングして成熟タンパクになるものと考えられている³⁴⁾。しかし、大腸菌にはタンパクの菌体外分泌装置であるOutシステムがないため、移送された成熟タンパクは、そのままペリプラズムに蓄積し続ける^{31, 53, 54, 71)}。Keenらは⁷²⁾、この特性を利用して大腸菌のペリプラズムにPelタンパクを蓄積させたのち、リゾチーム処理により大腸菌をスフェロプラスト化することによって、Pelタンパクを含むペリプラズム画

分を効率よく回収する系を開発した。しかし、この系で用いた発現ベクターは発現効率が高くないため、20時間以上の培養期間を要していた。そこで、この手法をT7発現システムに適用し、短時間の発現誘導により野生型PelCを発現させるとともに、発現した野生型PelCをより簡易で効率的に回収・純化するための手法開発に取り組んだ。

2. 材料および方法

(1) T7発現システムの構築

第2-1-1表に本章で使用した大腸菌系統およびプラスミドを取りまとめた。野生型PelCを大腸菌で大量発現させるための発現ベクターには、Shoeferら¹⁴³⁾が開発したpRSET5aを用いた(第2-2-1図)。pRSET5aはT7プロモーターを組み込んだ高発現ベクターで、pUC119をフレームとして開発されたものである¹⁴³⁾。このpRSET5aとT7 RNAポリメラーゼ遺伝子がライソジェニックに組み込まれた大腸菌系統HMS174(DE3)とを組み合わせることによって、プラスミドに挿入した外来遺伝子を短時間で大量に発現させることができる¹⁴³⁾。この発現システムは一般にT7発現システムと呼ばれるが、ここではpPEL405に挿入されている野生型pelC遺伝子をpRSET5aにリクローニングすることによって野生型PelCのT7発現ベクターを構築した。すなわち、pPEL405のマルチプルクローニング部位に存在するPst I部位を部分消化・再連結により除去した後、野生型pelCの全翻訳領域を含



第2-2-1図 T7プロモーターでドライブされた発現ベクターpRSET5aの構造¹⁴⁰⁾。
MCS: マルチプルクローニング部位。

むDNA断片をXba I およびHindIIIの2重消化により切り出した。これをpRSET5aの同じ制限酵素部位に常法にしたがってサブクローニングすることにより野生型PelCのT7発現ベクターとしてpRSET405 Δ Pstを作成した(第2-1-1表)¹⁰⁾。

(2) タンパク発現

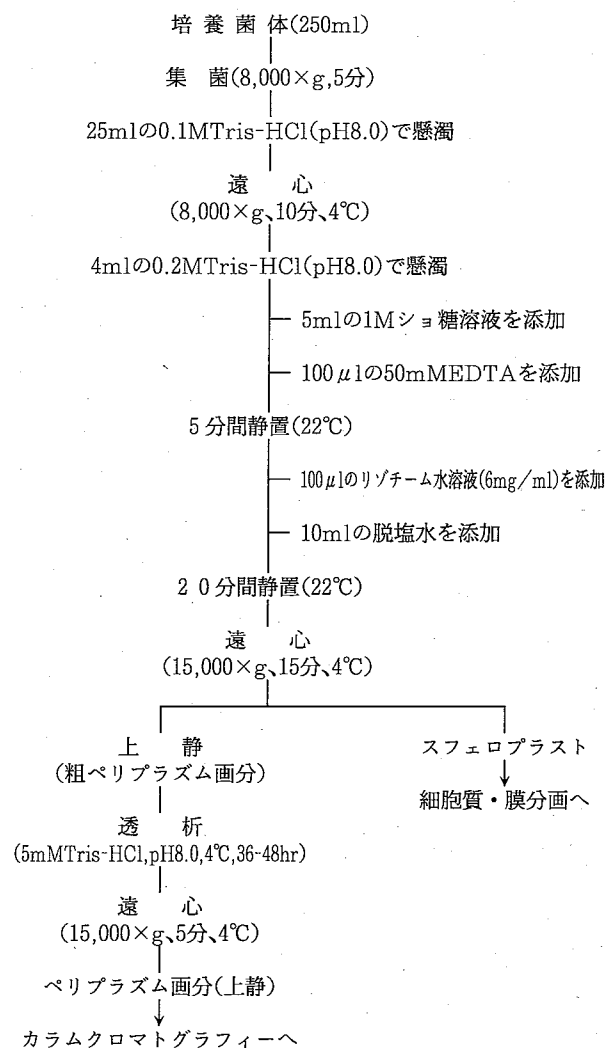
野生型pelCを組み込んだpRSET405 Δ Pstで形質転換した大腸菌(HMS174(DE3))を50 μ g/mlのアンピシリンを含む15mlのLuria液体培地(LB培地)で、28 $^{\circ}$ Cで18時間振前培養し、これと同じ量のアンピシリンを含む250mlのLB培地に添加して28 $^{\circ}$ Cで振とう培養した。約4時間後、600nmにおける吸光度(A₆₀₀)が0.6~0.8になった時点で、isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside(IPTG)を最終濃度が0.6mMになるように添加することにより野生型pelC遺伝子の発現抑制を解除し、さらに28 $^{\circ}$ Cで4時間培養することにより野生型PelCタンパクを大量に発現させた。

(3) 発現タンパクの回収

野生型PelCタンパクを発現させた大腸菌から、Witholtら¹⁸⁾の手法を改変した方法でペリプラズム画分を回収した(第2-2-2図)。すなわち、250mlの発現誘導した培養菌体を、25mlの0.2Mのトリス塩酸緩衝液(pH8.0)で懸濁した後、8,000 \times gの遠心分離により集菌し、菌体を洗浄した。得られた約0.5gの菌体を4mlの0.2Mのトリス塩酸緩衝液(pH8.0)で懸濁し、これに5mlの0.2Mのトリス塩酸緩衝液(pH8.0)に溶解した1Mのショ糖および100 μ lの50mMのEDTA(pH8.0)を加えて5分間静置し、原形質分離を誘導した。次に、この菌液に100 μ lの新鮮なリゾチーム溶液(6mg/ml)を添加し、十分混和した後、直ちに10mlの脱イオン水を加えることにより浸透圧ショックを与えた。この状態で20分間室温で静置し、細胞壁を溶解させて菌体をスフェロプラスト化した。顕微鏡下でスフェロプラストの生成状態を確認した後、15,000 \times gで15分間遠心分離することにより、上清として粗ペリプラズム画分を、沈殿としてスフェロプラストを分画した。この粗ペリプラズム画分を、さらに5mMのトリス塩酸緩衝液(pH8.0)に対し、4 $^{\circ}$ Cで36~48時間透析した後、15,000 \times gで15分間遠心して夾雑物を除去し、最終的にペリプラズム画分として調製した。

(4) イオン交換カラムクロマトグラフィー

得られたペリプラズム画分を1Mのトリス塩酸緩衝液(pH8.0)でpHを8.0に調整した後、カルボキシメチルセルロースを用いた陽イオン交換カラムクロマトグラフィーにかけることによってPelCタンパクを純化した⁷⁾。すな



第2-2-2図 大腸菌で発現させたPelCタンパクの分画手順

わち、弱い陽イオン交換置換体であるCM Bio-Gel A (Bio-Rad社)を1.4 \times 15cmのオープンカラムに充填し、室温で5mMのトリス塩酸緩衝液(pH8.0)で樹脂を平衡化した。このカラムに、pHを8.0に調整したペリプラズム画分を通すことによって、プラスに荷電したPelCタンパクをCM Bio-Gel A樹脂に吸着させた。次に、5mMのトリス塩酸緩衝液(pH8.0)で、A₂₈₀値が0.01以下になるまで樹脂を洗浄した後、0.25Mの塩化ナトリウムを含むトリス塩酸緩衝液(pH8.0)でCM Bio-Gel A樹脂に吸着したPelCタンパクを溶出した。溶出された各フラクションについて、そのA₂₈₀値をモニターするとともにそのPel活性(第3章第2節参照)を測定し、Pel活性を示す溶出ピークフラクションをプールした。これを5mMのトリス塩酸緩衝液(pH8.0)に対して24時間透析した後、Centricon 10 (Amicon Inc., Beverly, MA, USA)を用いてA₂₈₀値で15ないし20まで濃縮し、純化PelCサンプル

として-20°Cで保存した。

(5) SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動およびウエスタンブロット

タンパクの発現状況を確認するため、大腸菌菌体の全発現タンパクおよび各分画それぞれについてSDS-ポリアクリルアミド電気泳動(SDS-PAGE)およびウエスタンブロット解析を行った。大腸菌菌体の全発現タンパクについては、発現誘導した菌体培養液を1ml取り、8,000×gの遠心で集菌した後、100 μlの脱イオン水で懸濁した。これに等量の2.5倍濃度のLaemilliのSDSサンプル緩衝液を加え、100°Cで5分間加熱することによりSDS-PAGE用サンプルを調製した⁷³⁾。

また、ペリプラズム画分については、Centricon 10を用いてA₂₈₀値で1.0まで濃縮した後、その一部をSDS-PAGE用サンプルとして調製した。SDS-PAGEは、Bio-Rad社のミニゲルシステムを用い、濃度12%、0.75mm厚のゲルにより、200Vの定電圧で1時間泳動した。分離したタンパクは0.5%のクマシーブリリアントブルーR250(CBB-R250)で染色した。

ウエスタンブロットは、1/10濃度に希釈した各分画あるいはフラクションのサンプルを用いて、まず、SDS-PAGEにより分離し、次に、Bio-Rad社のミニトランスブロットシステムを用いてPVDF膜に転写した。これを1/5,000濃度のウサギ抗PelCポリクローナル血清と反応させた後、Bio-Rad社のプロトコルに従ってアルカリスフターゼ標識したヤギ抗ウサギ抗体によりPelCを検出した。

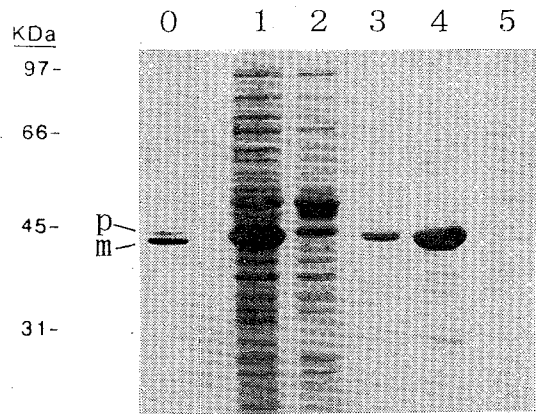
3. 結果および考察

(1) 野生型pelCの大量発現

野生型pelCを組み込んだpRSET405 Δ Pstで形質転換した大腸菌HMS174(DE3)は、IPTGを添加することにより転写抑制が解除され、添加4時間後には大量の野生型PelCが生産された(第2-2-3図、レーン1)。また、ウサギ抗PelCポリクローナル血清を用いた全大腸菌タンパクに対するウエスタンブロットでは、PelCの前駆体および成熟タンパクがそれぞれ明確なバンドとして検出された(第2-2-3図、レーン0)。

(2) 発現した野生型PelCの回収・純化

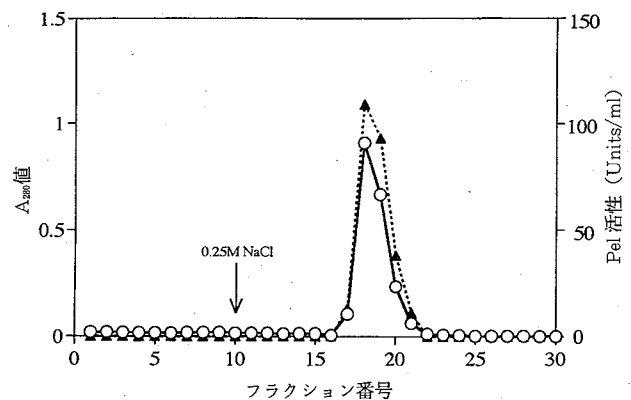
Pelは菌体外分泌性タンパクであるため、まずN末端にシグナルペプチドを持つ前駆体タンパクとして翻訳される¹²⁾。E. chrysanthemiでは、この前駆体タンパクがSec依存分泌系により内膜を通過する過程でシグナルペ



第2-2-3図 野生型pelCを含むpRSET405 Δ Pstで形質転換した大腸菌における野生型PelCの発現状況。レーン1および4：それぞれpRSET405 Δ Pstを含む形質転換体の全タンパクおよびペリプラズム画分、レーン2および5：それぞれpRSET5aのみの全タンパクおよびペリプラズム画分、レーン3：純化PelCのSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動像。レーン0はレーン1をPelCのウサギ抗血清でウエスタンブロットしたもので、pは前駆体を、mは成熟体PelCを示す。

プチドが切り離され、いったんペリプラズムに移行し、ここでフォールディングしたのち、Outシステムを介して菌体外に分泌されるというタイプII型の分泌システムをとっている^{34, 53, 54, 96)}。しかし、大腸菌はこのOutシステムを持たないため、大腸菌を用いてpel遺伝子を発現させると、翻訳されたPelタンパクは大腸菌のペリプラズムに蓄積する^{53, 72)}。

そこで、T7発現システムで野生型PelCを発現させた大腸菌の細胞壁をリゾチームにより酵素的に溶解し、ペリプラズム画分を分離・回収したところ、予想どおり発現した野生型PelCが大量に蓄積していることが確認された(第2-3図、レーン4)。そこで、このペリプラズム画分をCM Bio-Gel Aを充填したカラムに通して樹脂に



第2-2-4図 野生型PelCを含む大腸菌のペリプラズム画分の陽イオンカラムクロマトグラフィーにおける溶出パターン(○—○:A₂₈₀値)とPel活性(▲—▲:Units/ml)

*矢印は、0.25M NaClによる溶出開始点を示す。

野生型PelCを含むプラスに荷電したタンパク類を吸着させた後、0.25Mの塩化ナトリウムを含むトリス塩酸緩衝液(pH8.0)で溶出したところ、単一のピークが溶出され、これがPel活性と一致した(第2-2-4図)。さらに、この溶出ピークに含まれるタンパクをSDS-PAGEにより解析したところ、この溶出ピークには、野生型PelCがほぼ純粋な状態で含まれていることが確認された(第2-2-3図、レーン3)。以上の結果から、本手法を用いることにより、ワンステップで野生型PelCを純化できることが明らかになった。この一連の操作により、酵素活性の測定に耐える高い純度の野生型PelCを、IPTGの添加後、28°C、4時間の培養で、1lの培養菌体から6mg得ることができた。

第三章 ペクチン酸リアーゼC変異体の特性変化

野生型PelCタンパクは、大腸菌を用いて容易に発現させることができる^{31,72,144}。しかし、これに部位特異的変異を導入した場合には、必ずしも野生型と同様な発現が得られるとは限らない。

そこで、本章では、作成したすべての変異*pelC*について、まず、大腸菌における発現解析を行い、変異タンパクの発現状況と発現タンパクの大腸菌体内における局在部位について検討した。次に、可溶性の成熟体タンパクとして発現した変異PelCについて、それらのPel活性、Ca²⁺結合強度、等電点、植物組織分解能あるいはエリクター活性等の特性変化を調べ、PelCの活性中心を推定するとともに、PelCが有する植物組織分解能やエリクター活性等の生物機能との関係について解析した。

第1節 大腸菌における発現特性

1. 緒言

大腸菌に外来遺伝子を発現させた場合、正常にフォールディングせず、細胞質内に不溶性の封入体を形成してしまうケースが多く認められる¹⁰²。また、野生型タンパクでは可溶性であっても、変異を導入した場合には封入体または不溶性タンパクになってしまうことも多い¹⁴⁵。したがって、部位特異的変異を導入した変異*pelC*を、野生型*pelC*で開発したT7発現システムを用いて大量発現させた場合、必ずしも発現タンパクが野生型同様に可溶性の成熟型タンパクとして発現するとは限らない。そこで、部位特異的変異を導入した変異*pelC*が発現する

かどうか、および発現した場合には発現タンパクは大腸菌菌体内のどこに局在するのかについて明らかにしておく必要がある。特に、大腸菌体内における発現タンパクの局在部位は、タンパクのフォールディングと密接な関係があることから^{102,145}、ここでは第2章2節で開発した野生型PelCのT7発現システムを変異*pelC*に適用し、野生型と同じ条件で大腸菌に変異PelCタンパクを発現させた時の発現解析を行った。

2. 材料および方法

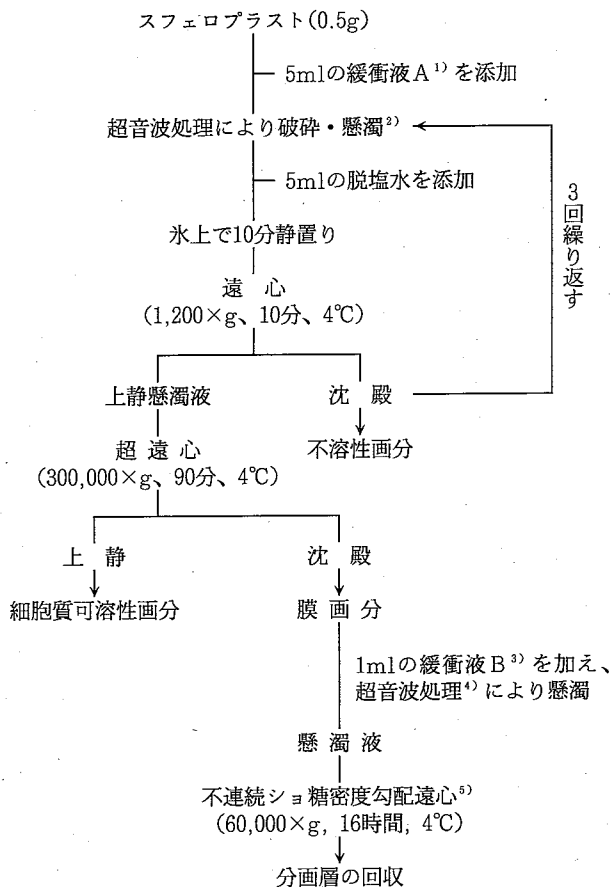
(1) 発現タンパクの分画

変異*pelC*で形質転換した大腸菌(HMS174(*DE3*))をIPTGにより発現誘導し、その大腸菌体を野生型PelCの時と同様にライソザイムを用いてスフェロプラスト化することによりペリプラズム分画を回収した。このペリプラズム分画に変異PelCが可溶性タンパクとして含まれていた場合には、野生型PelC同様にカルボキシメチルセルロース樹脂であるCM Bio-Gel Aを用いた陽イオン交換クロマトグラフィーにより純化した。

一方、ペリプラズム分画の調製過程で得られたスフェロプラストについては、Osbornら¹¹¹、Miuraら¹⁰⁸およびSchnaitman¹³⁰の方法を改変して、宿主大腸菌の細胞質および膜成分を分画した(第3-1-1図)。すなわち、0.5gのスフェロプラストの沈殿に、5mlの緩衝液A(5mM MgCl₂および1mM DTTを含む0.1Mトリス塩酸緩衝液、pH8.0)を加え、ソニケータ(トミー社)を用いて、氷冷下、400MHz、0.5秒間隔で60秒の超音波処理することによりスフェロプラストを破碎した。これに5mlの脱イオン水を加え、氷上で10分間静置することにより膜断片のミセル化を促した。これを1,200×gで10分間、4°Cで遠心分離し、膜断片を含む上静懸濁液と不溶性画分としての沈殿に分けた。沈殿については、この操作をさらに2回繰り返してスフェロプラストを完全に破壊した後、1mlの5mMトリス塩酸緩衝液で懸濁し不溶性画分として調製した。一方、上静懸濁液は全体をプールし、4°C下で、300,000×g、90分間の超遠心分離を行い、上静として細胞質可溶性画分を、また、沈殿として膜画分を分画した。各画分のSDS-PAGEウェスタンブロットについては、第2章第2節で示した方法にしたが行った。

(2) 膜画分の不連続シヨ糖密度勾配遠心分離による分画

得られた膜画分を不連続シヨ糖密度勾配遠心分離によりさらに分画するため、沈殿として得られた膜画分に



第3-1-1図 大腸菌におけるT7発現システムを用いた変異*pelC*発現解析のための分画手順

¹⁾ 5mM MgCl₂および1mM DTTを含む0.1M Tris-HCl (pH8.0)、
²⁾ 氷冷下、400MHz、0.5秒間隔で60秒処理、³⁾ 0.25M ショ糖および1mM EDTAを含む5mM Tris-HCl (pH8.0)、⁴⁾ 氷冷下、200MHz、0.5秒間隔で20秒処理、⁵⁾ 1mlの2.0M、1.8M、1.6M、1.44Mおよび0.5mlの0.77Mのショ糖溶液 (1mM EDTAを含む5mM Tris-HCl (pH8.0)) を重層した不連続密度勾配溶液の最上層に0.5mlの膜画分を乗せて遠心した。

1mlの緩衝液B (0.25M ショ糖および1mM EDTAを含む5mM トリス塩酸緩衝液、pH8.0) を加え、氷冷下で200 MHz、0.5秒間隔、20秒間の超音波処理により懸濁した。次に、この懸濁液0.5mlを、下層から各1mlの2.0M、1.8M、1.6M、1.44Mおよび0.5mlの0.77Mのショ糖溶液 (1mM EDTAを含む5mM トリス塩酸緩衝液に溶解したもの) を重層した不連続ショ糖密度勾配溶液の最上層に乗せ、スイングローターを用い、4°Cで、60,000×g、16時間の遠心分離を行った。各分画のSDS-PAGEおよびウェスタンブロットについては、第2章第2節で示した方法で行った。

(3) コハク酸脱水素酵素活性の測定

スフェロプラストから調製した大腸菌の不溶性画分および密度勾配画分における内膜の存在と量を知るため、グラム陰性菌の内膜 (細胞質膜) の標識酵素であるコハク酸脱水素酵素の活性を Osborn ら¹³⁾ および

Schnaitman¹³⁾ の手法に準じて測定した。すなわち、1mlの25mMコハク酸ナトリウムおよび10mMシアン化ナトリウムを含む60mMリン酸緩衝液 (pH7.5) に30μgのチアゾールブルー (MTT: 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl] 2,5-diphenyltetrazolium bromide) および10μgのフェナジンメチル硫酸ナトリウム (PMS: sodium N-methylidibenzopyrazine methyl sulfate) を加えて酵素反応液を調製した。この酵素反応液に、5~20mlの各分画サンプルを添加し、すみやかに混合した後、23°CでA₅₅₀における吸光度の変化を3分間測定した。単位酵素活性は、A₅₅₀における吸光度を1分間に1.0上昇させる量とし¹³⁾、分画サンプル1ml当たりの酵素活性 (U/ml) で表した。

(4) トリプシン消化処理

大腸菌で発現させた野生型および変異*pelC*のトリプシンに対する感受性を調べるため、可溶性の成熟体および不溶性の発現タンパクを含む大腸菌の膜画分をトリプシンで処理した。いずれのサンプルとも、0.1Mの炭酸アンモニウム緩衝液 (pH8.0) でタンパク濃度がおよそ1.5 mg/mlとなるようA₂₈₀値を2.0に調整した。この溶液1mlに1ユニットのトリプシンを添加し、速やかに混和後、37°Cでインキュベートした。トリプシン分解産物の生成状況を経時的に調べるため、一定時間ごとにサンプル溶液を20μlずつ採取し、これに等量の2.5倍Laemilli SDS サンプル緩衝液を加えて反応を止め、100°Cで5分間加熱することによりSDS-PAGEサンプル化した。

4. 結果

(1) 変異*pelC*の発現

T7発現システムによる変異*pelC*タンパクの発現状況を第3-1-1表に取りまとめた。その結果、I群の*pelC*タンパクファミリー (第1-1表) で保存されているジスルフィド結合を破壊したC329S/C352S以外のすべての変異*pelC*で、野生型と同レベルの変異タンパクが発現していることが確認された。そこで、大腸菌のペリプラズムを分画したところ、Ca²⁺部位周辺に作成したすべての変異体 (15変異体)、*Pel1*ホモログ置換変異体 (I120F、G280N) およびその他の部位の変異体 (D28R、T275I) では、いずれも可溶性の成熟型タンパクが得られた。また、*Pel*ファミリーの高度保存領域であるvWiDH領域に作成した11変異体のうちの4変異体 (W142H、D144N、T206A、K342E) およびジスルフィド結合を破壊した4変異体のうちの2変異体 (C72S、S72S/C155S) でも可

溶性の成熟型タンパクがペリプラズム画分から分離・純化された。なお、D28R、C72S、D144NおよびK342Eの4変異体では、可溶性の成熟型タンパクは得られたものの、ペリプラズムには野生型の1/3程度の変異タンパクしか蓄積せず、変異タンパク収量も少なかった。これに対し、

第3-1-1表 T7発現システムを用いたときの大腸菌における野生型および変異PelCの発現状況とその局在部位

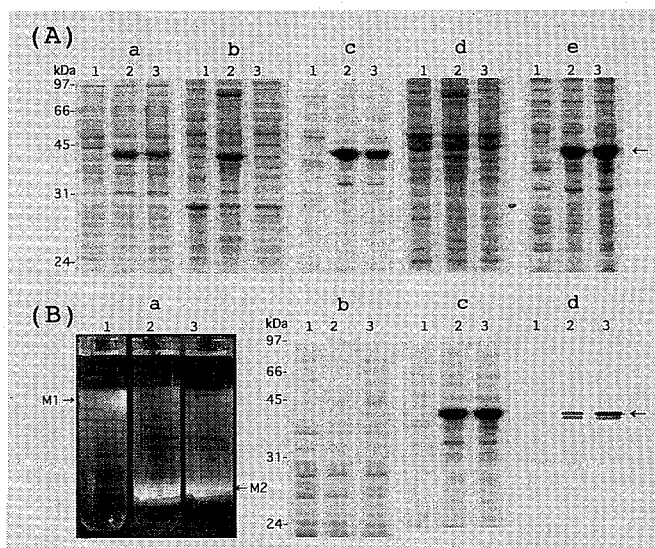
発現させたタンパク	発現状況 ¹⁾		ペリプラズムへの分泌 ²⁾		内膜残存 ³⁾	
	前駆体	成熟体	前駆体	成熟体	前駆体	成熟体
野生型PelC	++	+++	-	++	++	+
[Ca ²⁺ 結合部位周辺]						
D129N	++	+++	-	++	++	+
D131E	++	+++	-	++	++	+
D131E	++	+++	-	++	++	+
E166D	++	+++	-	++	++	+
E166Q	++	+++	-	++	++	+
D170N	++	+++	-	++	++	+
K172H	++	+++	-	++	++	+
K172L	++	+++	-	++	++	+
K172R	++	+++	-	++	++	+
K190A	++	+++	-	++	++	+
R218A	++	+++	-	++	++	+
R218E	++	+++	-	++	++	+
R218K	++	+++	-	++	++	+
R218L	++	+++	-	++	++	+
R223A	++	+++	-	++	++	+
[vWiDH領域]						
L-10E	++	+++	-	±	+++	++
Y7D	++	+++	-	±	+++	+
M118N	++	+++	-	-	+++	+
W142H	++	+++	-	++	++	+
D144N	++	+++	-	+	+++	+
H145Q	++	+++	-	-	+++	+
T206A	++	+++	-	++	++	+
N210S	++	+++	-	-	+++	+
H228Q	++	+++	-	-	+++	+
E253D	++	+++	-	-	+++	+
K342E	++	+++	-	+	+++	+
[ジスルフィド結合]						
C72S	++	+++	-	+	+++	+
C72S/C155S	++	+++	-	++	++	+
C329S	++	+++	-	-	+++	+
C329S/C352S	±	±	-	-	±	±
[Pel1ホモログ]						
I120F	++	+++	-	++	++	+
G280N	++	+++	-	++	++	+
[その他]						
D28R	++	+++	-	+	++	++
T275I	++	+++	-	++	++	+

¹⁾ 野生型および変異PelCの相対的な発現量、²⁾ 発現したタンパクのペリプラズムへの相対的な分泌量、³⁾ 発現したタンパクのうち、大腸菌内膜に残存したものの相対量。いずれも-、±、+、++、+++はタンパクの相対的な発現量を示し、それぞれ、発現なし、トレースレベル、少、中、多を示す。

vWiDH領域における残りの7変異体(L-10E、Y7D、M118N、H145Q、N210S、H228Q、E253D)およびジスルフィド結合変異体のC329Sでは、いずれも野生型と同レベルで変異タンパクが発現していたにもかかわらず、ペリプラズム画分にはその発現タンパクは全く認められなかった。

(2) 発現タンパクの局在部位

不溶性の変異タンパクしか発現しなかった変異PelCでは、その特性上、発現タンパクは大腸菌の細胞質内に封入体として存在しているか^{102,143)}、ペリプラズムに移行できずに内膜に結合したまま残存しているか¹²¹⁾、あるいはその両方か、のいずれかの可能性が考えられる。そこで、これらの不溶性変異PelCの大腸菌体内における局在部位を明らかにするため、vWiDH領域の変異体であるH145Qを用い、pRSET5aおよび野生型*pelC*を対照にして発現タンパクの局在部位について検討した。第3-1-2図にその結果を示したが、発現した変異タンパクは、超音波破碎したスフェロプラストの不溶性細胞質画分および膜画分の双方に、前駆体および成熟体が混在する形で認められた(第3-1-2図A-c,e)。同様の結果が野生型についても認められたが、残存している発現タンパクの



第3-1-2図 大腸菌における発現ベクター、野生型および変異*pelC*の発現状況と不連続シヨ糖密度勾配遠心分離による膜成分の分画 (A)大腸菌HMS174(DE3)で発現ベクターpRSET5aのみ(レーン1)、野生型(レーン2)および変異*pelC*(H145Q;レーン3)を発現させたときの全菌体発現タンパク(a)、ペリプラズム画分(b)、不溶性画分(c)、細胞質可溶性画分(d)および膜画分(e)のSDS-ポリアクリルアミドゲル(SDS-PAGE)電気泳動像。(B)不連続シヨ糖密度勾配遠心分離による膜成分の分画(a)とそのM1画分(b)およびM2画分(c)のSDS-PAGE像および(c)のウサギ抗PelC血清を用いたウエスタンブロット像(d)。矢印は、いずれも目的とする発現タンパクの位置を示す。

ほとんどは前駆体であった(第3-1-2図A-c,e)。一方、細胞質可溶性画分には、野生型およびH145Qいずれにおいても、その発現タンパクは認められなかった(第3-1-2図A-d)。なお、上記の不溶性のPelタンパクを含む膜画分のPel活性を調べたところ、野生型およびH145Qいずれの膜画分にも全くPel活性は認められなかった。

次に、上記の膜画分を、不連続ショ糖密度勾配遠心分離によりさらに分画した。その結果、対照の発現ベクター、pRSET5aのみを含む大腸菌の膜画分は、そのほとんどが1.44M層(M1層)に分画されたのに対し、野生型およびH145Q変異ではより密度の高い1.8M層(M2層)に分画された(第3-1-2図B-a)。そこで、このM1およびM2層からそれぞれ0.5mlずつ回収し、SDS-PAGEおよびウェスタンブロットを行ったところ、発現した野生型およびH145Qはいずれも1.8M層にのみ存在することが明確に示された(第3-1-2図B-b,c,d)。この場合、認められた発現タンパクは、膜画分と同様、野生型ではほとんどが前駆体であったのに対し、H145Qでは前駆体および成熟体の両方が混在する形で存在していた(第3-1-2図B-d)。

(3) 菌体分画成分のコハク酸脱水素酵素活性

不溶性画分および不連続ショ糖密度勾配分画された2層について、グラム陰性細菌の内膜標識酵素であるコハク酸脱水素酵素(SDH)の活性の有無を測定し、その結果を第3-1-2表に取りまとめた。

対照のpRSET5aのみを発現させた不溶性画分には、0.1U/mlとほとんどSDH活性は認められなかったが、野生型PelCおよびその変異体のH145Qを発現させた場合には、それぞれ2.9および1.6U/mlと低いながらSDH活性が認められた。一方、対照のpRSET5aの膜画分には、48.8U/mlの高いSDH活性が認められたのに対し、野生型PelCおよびH145Qの膜画分には、それぞれ18.9および17.9U/mlと有意に低いSDH活性しか認められなかった。また、対照のpRSET5aの膜画分をさらに分画して得られたM1層には、11.3U/mlのSDH活性が認められたのに対し、M2層には0.4U/mlと極めて低いSDH活性しか認められなかった。したがって、対照のpRSET5aのM1層は、Osbornら¹¹¹⁾およびSchnaitmann¹⁵⁵⁾らが分画した内膜画分に相当することが示された。

これに対し、野生型PelCおよびH145Qでは、その膜画分のほとんどがM2層に分画されるとともに(第3-1-2図B-a)、それぞれ2.6および2.1U/mlとやや低いものの、明らかなSDH活性が認められた。また、微量の膜断片が分画されたM1層にも、共に1.4U/mlと低いながらSD

第3-1-2表 T7発現システムを用いて大腸菌で野生型および変異PelC(H145Q)を発現させた時の不溶性画分、膜画分および膜画分の不連続ショ糖密度勾配遠心分画層におけるコハク酸脱水素酵素活性¹⁾

発現タンパク	不溶性画分	膜画分	不連続ショ糖密度勾配遠心分画層	
			M1(上層)	M2(下層)
野生型PelC	2.9±2.54	18.9±4.05	1.4±0.45	2.6±0.57
変異PelC(H145Q)	1.6±1.23	17.9±15.71	1.4±0.75	2.1±0.58
pRSET5a ²⁾	0.1±1.42	48.8±27.88	11.3±5.70	0.4±0.05

¹⁾ いずれも1mlあたりの酵素活性(U/ml)とし、3反復3回測定した値の平均値およびその標準偏差を示す。

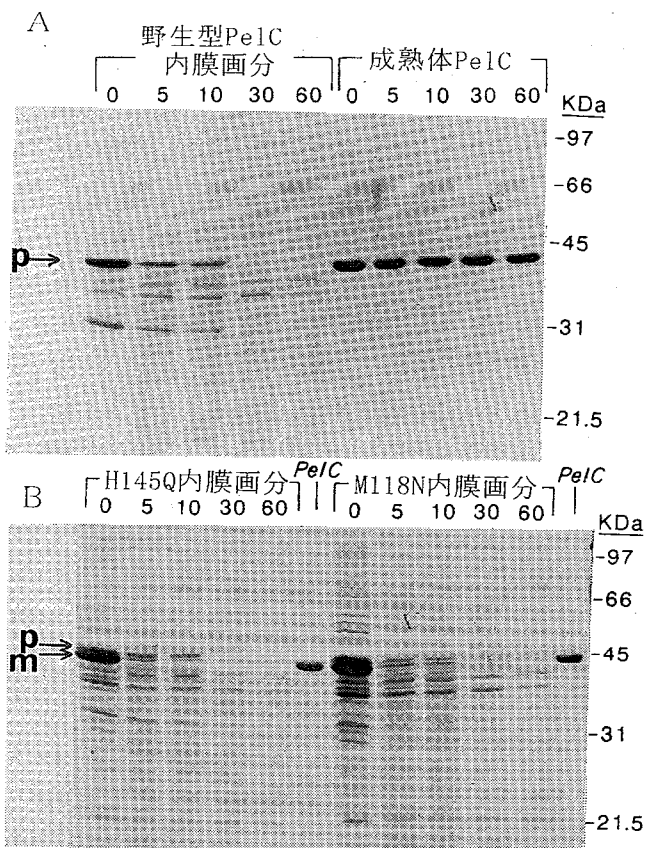
²⁾ T7発現ベクターのみで発現させた対照。

※各分画層の名称については、第3-1-2図を参照。

H活性が認められるとともに、発現レベルを落とすとこのM1層に分画される膜画分の量が増大した。したがって、野生型PelCの前駆体およびH145Qの前駆体と成熟体タンパクは、大腸菌の内膜断片に残存したまま、密度のより高いM2層に分画されたことが明らかになった。なお、野生型および変異PelCを発現させた大腸菌から調製した膜画分のSDH活性が対照に比べて低かったのは、極めて効率の高いT7発現システムを用いたため、SDHを含む大腸菌のハウスキーピングタンパクの発現が抑制された結果であろうと考えられる。

(4) トリプシン感受性

大腸菌で発現した変異PelCが内膜に残存する場合、発現タンパクがフォールディングしていない可能性が考えられた。そこで、発現した変異PelCタンパクのトリプシン感受性について検討した。第3-1-3図に野生型PelCの可溶性成熟体タンパクおよびその前駆体を残存させた大腸菌の内膜画分(A)および不溶性の成熟体と前駆体変異タンパクの両方を発現させたvWidH領域の変異PelC、M118NおよびH145Qの内膜画分(B)をそれぞれトリプシン処理し、SDS-PAGEによりその分解状況を解析した結果を示した。SDS-PAGE像からも明らかなように、可溶性で成熟型の野生型PelCは、1時間のトリプシン処理によっても分解されなかったが、内膜に残存している野生型PelCの前駆体、H145QとM118Nの前駆体およびそれらの成熟体は、いずれもトリプシン処理により速やかに分解され、処理30分後には完全に消失した。その他の変異PelCにおいても同様の結果が認められ、すべての可溶性の成熟体タンパクは、いずれもトリプシンに対して野生型同様の耐性を、また、不溶性タンパクはその形態に関わらずトリプシン感受性を示したことから、これらの発現タンパクは正しくフォールディングしていない可能性が示唆された。



第3-1-3図 野生型(A)およびvWiDH領域の変異pelC (B)をT7発現システムで大腸菌HMS173(*DE3*)に発現させた時に膜画分に残存する発現タンパクと野生型の成熟体PelCのトリプシンに対する感受性

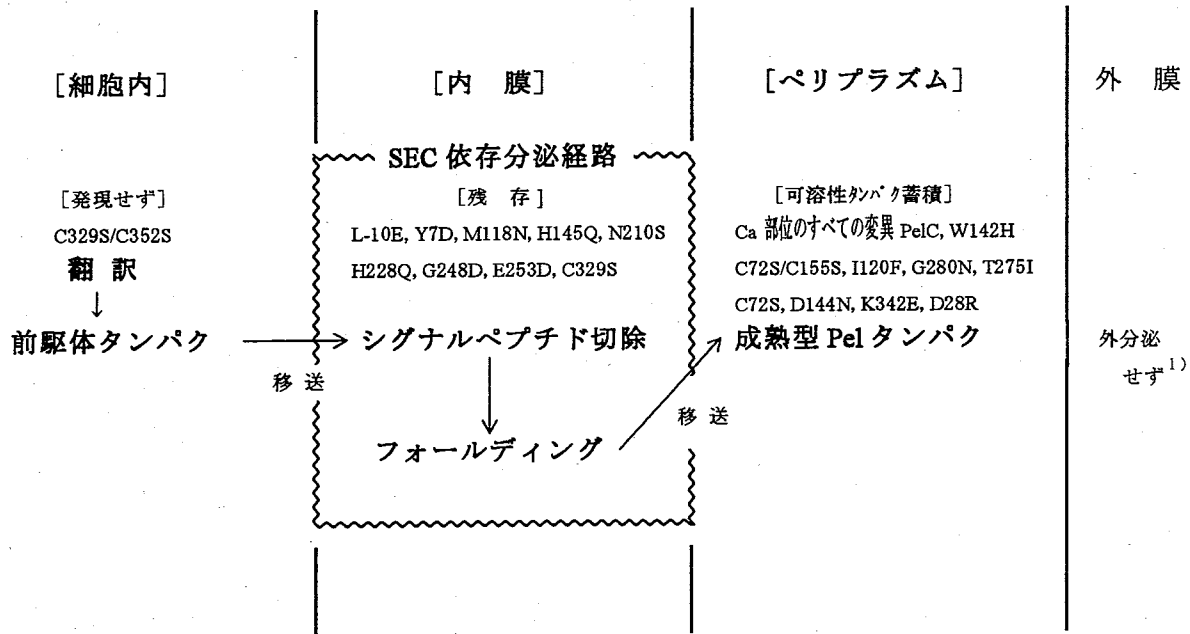
野生型pelCを発現させた膜画分と純化した成熟型PelC (A) およびvWiDH領域に作成した変異PelCのH145QおよびM118Nの膜画分 (B) を吸光度 A_{280} で2.0に調整し、これに1ユニットのトリプシンを添加して37°Cで反応させた。処理0、5、10、30および60分後に20 μ lづつサンプリングし、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により膜画分に残存する前駆体(p)および成熟体(m)タンパクおよび可溶性の野生型成熟PelCの分解状況を調べた。

4. 考察

今回作成した変異pelC遺伝子のうち、C329S/C352Sを除いたすべてにおいて、T7発現システムでその変異PelCタンパクが発現した。しかし、発現した変異PelCのうち可溶性タンパクとして得られたのは、Ca²⁺部位周辺に作成したすべての変異体、vWiDH領域の4変異体、ジスルフィド結合の2変異体(15変異体)、Pel1のホモログ置換変異体およびその他の部位のそれぞれ2変異体の計25変異体であった。一方、変異PelCは発現したが、それが可溶性タンパクとして得られなかった8変異体では、その発現タンパクの局在部位について極めて興味深い結果が得られた。すなわち、発現した不溶性の変異PelCは、大腸菌体の不溶性画分と内膜画分の双方に、前駆体および成熟体が混在する形で存在すると

ともに、いずれの画分とも低いながら明らかなSDH活性を示した。また、野生型PelCを発現させた場合にも、その前駆体は内膜画分に残存していた。このように、本来、密度が低いはずの内膜画分がより密度の高い層に分画されたのは、短時間に大量発現したPelCタンパクが、内膜のSec依存分泌経路を通過できず、内膜に結合したまま、いわば詰まった状態になっていることを示唆している¹²⁾。さらに、可溶性の成熟型タンパクは、野生型および変異PelCいずれもトリプシン耐性であるのに対し、不溶性の変異PelCおよび野生型PelCの前駆体タンパクは、いずれもトリプシンに感受性であったことから、これらの不溶性タンパクは、いずれも正しくフォールディングしていないことが明らかになった。

本節で得られた結果は、シグナルペプチドを有する分泌性タンパクの発現過程におけるシグナルペプチドの切り離し時期と成熟型タンパクのフォールディング場所を間接的に示唆する現象であると考えられる。Pugsley¹²⁾は、発現タンパクの分泌とフォールディングの過程について3通りの可能性を提案している。これを今回のケースに当てはめると第3-1-4図に示すようなプロセスが想定される。すなわち、翻訳された前駆体タンパクが、大腸菌の内膜に存在するSec依存分泌経路に入り、シグナルペプチダーゼによりそのシグナルペプチドが切り離された後、Sec依存分泌経路を抜ける過程でフォールディングし、ペリプラズム空間に移行する、というスキームである。このスキームに従うと、可溶性の成熟体タンパクが得られない変異PelCでは、翻訳された前駆体が大腸菌の内膜を通過する過程で、シグナルペプチドは切り離されるものの正しくフォールディングできず、結果としてSEC依存分泌経路も通過できなくなってしまい、内膜に残存しているものと想定される。今回作成した変異PelCのうち、正しいタンパク構造を維持するために不可欠なジスルフィド結合残基およびPelスーパーファミリーにおける高度保存領域のvWiDH領域に作成した変異体の多くは、共通して不溶性タンパクしか発現しなかった。したがって、Pelスーパーファミリーで高度に保存されているvWiDH領域は、ジスルフィド結合の生成を含むPelCタンパクの正しいフォールディングに極めて重要な機能を果たしているか、または翻訳された前駆体タンパクの内膜通過プロセスに何らかの形で関与している可能性が考えられる⁸⁾。しかし、一方で、この現象は単に極めて効率の高いT7発現システムを用いた人為的な結果である可能性も否定できないことから、この発現



第3-1-4図 T7発現システムを用いて大腸菌で野生型PelCを発現させた時の成熟型PelCタンパクの推定生成機構とそれに基づいた変異PelCの発現状況

¹⁾ outシステムを持たないため

タンパクの内膜残存現象については今後さらに詳細な解析が求められるところである。

第2節 ペクチン酸リアーゼ活性の変化

1. 緒言

植物細胞壁マトリクス成分であるペクチン質をβ-トランスエリミネーション機構により分解する主要な酵素には、ポリガラクトuron酸(PGA)を基質とするペクチン酸リアーゼ(Pel)とPGAのカルボキシル基がメチル化されたペクチンを基質とするペクチンリアーゼ(Pnl)の二つがある^{32,128)}。いずれも基質のグルコシド結合をβ-トランスエリミネーション分解し、一方のガラクトuron酸分子(GalpA)を還元末端化し、もう一方のGalpAのC₄およびC₅炭素間に二重結合を生成させる(第1-1図)^{32,128)}。ウロン酸ポリマーのβ-トランスエリミネーション分解機構については、アルギン酸とその分解酵素を中心に研究が進められ、分子レベルでの詳細な分解メカニズムが推定されている^{49,77)}。

すでに述べたように、*E. chrysanthemi*が生産する複数のPelアイソザイムは、病原性因子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。しかし、実際の感染場面でPelがどのようにPGAを分解しているか、その活性中心はどこにあるのか等については明らかにされていない。そこで、本節では、第II章で作成したPel

Cの部位特異的変異体のうち、本章第1節の発現解析で可溶性タンパクが得られた変異PelCについて、その*in vitro*におけるPel活性の変化を解析することにより、Pelの活性中心を同定するとともに、PGAのβ-トランスエリミネーション分解に関するアミノ酸残基の特定を試みた。

2. 材料および方法

(1) Pel活性の測定

Pel活性は、PGAを基質に、カルシウムイオン(Ca²⁺)の存在下で、可溶性タンパクとして得られた変異PelCタンパクを加えて反応させ、遊離してくる不飽和ガラクトuron酸の量をその特異吸光波長である232nmにおける吸光度の変化を測定することによって算出した。この場合、共同因子であるCa²⁺濃度は0.5mMとし、pHは野生型PelCの至適値であるpH9.5に設定した。いずれの場合も、反応は1mlのキューベットに1%のポリガラクトuron酸ナトリウム塩(Sigma)を125μl、0.5mMの塩化カルシウムを含む50mMのBis-Tris-Propane(BTP)緩衝液を870μl加えて良く混合して基質反応液を調製した。これに5μlの変異PelC溶液を添加し、速やかに再混合した後、直ちに232nmにおける吸光度の変化を測定した。この反応系の場合、232nmにおける吸光度の上昇率が1分間に1.73を示したときの不飽和ガラクトuron酸の遊離量が1μMに相当することから⁷¹⁾、これを用いて変異

PelCタンパク1mgあたり、1分間に遊離してくる不飽和ガラクトロン酸の量(mM)として変異PelCの比活性(U/mg of protein)を算出した。

(2) pHプロファイルの測定

主要な変異PelCのpHプロファイルは、pH5から7まではMES(2-[N-morpholino]ethanesulfonic acid)緩衝液、pH7から8.5まではTris塩酸緩衝液、pH9から9.5まではBTP緩衝液およびpH10から10.5まではAMP(2-Amino-2-methyl-1-propanol)緩衝液を、いずれも50 mM濃度で用いて測定した。

(3) タンパク濃度の測定

変異PelCの濃度は、Bradfordら¹⁹⁾の方法およびモル吸光係数を併用して定量した。PelCのモル吸光係数で濃度を算出する場合には、以下の計算式によった。

$$\text{PelC(mg/ml)} = A_{280} \times 37676 \text{ (MW)} / 53389$$

3. 結果および考察

(1) カルシウムイオン結合部位周辺の変異PelCにおけるPel活性の変化

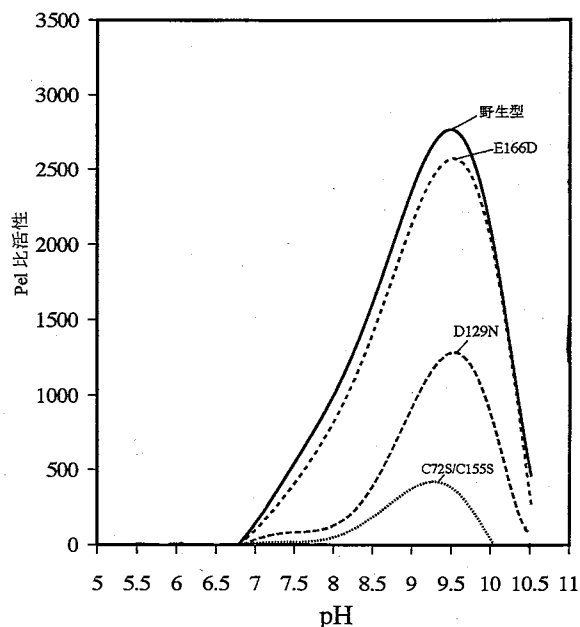
カルシウムイオン(Ca^{2+})結合部位は、PelC分子表面に存在する細長いクレフトの中央部に位置しており(第1-3および1-5図)、これまでの3次元立体構造解析の結果からこの部分にPelCの活性中心が存在するものと推定されている^{161,163)}。そこで、まず、この Ca^{2+} 結合部位周辺に位置する酸性および塩基性のアミノ酸残基の変異体におけるPel活性の変化について検討した(第3-2表)。

Pelスーパーファミリーの不変なアミノ酸残基で、 Ca^{2+} に最も近接して位置するAsp131および水1分子を介して Ca^{2+} と結合するものと推定されるArg218では^{56,58)}、置換したアミノ酸残基の種類にかかわらず、すべての変異体でそのPel活性が消失した。すなわち、酸性のアスパラギン酸残基であるAsp131については、これを極性アミノ酸であるAspに置換したD131Nのみならず分子構造上メチル基が一つ多いだけのGluに置換したD131EでもPel活性は消失した。同様に、塩基性残基であるArg218においては、非極性アミノ酸であるAlaあるいはLeuに置換したR218AおよびR218Lのみならず、同じ塩基性アミノ酸であるLysに置換したR218Kおよび酸性アミノ酸のGluに置換したR218EでもそのPel活性は失われた。

同様に、 Ca^{2+} 結合部位に近接して位置し、Pelファミリー内で高度に保存されている酸性アミノ酸残基である

Glu166およびAsp170^{56,58)}をそれぞれ極性アミノ酸のGlnあるいはAsnに置換したD166QおよびD170Nでも、その酵素活性はいずれも消失した。また、 Ca^{2+} イオンと水2分子を介してイオン結合するものと推定されるPelスーパーファミリーの保存塩基性残基、Lys172、Lys190およびArg223^{56,58)}をそれぞれ非極性アミノ酸であるLeuまたはAlaに置換したK172L、K190A、R223AおよびLys172のHisへの保存的な変異体であるK172HのPel活性は著しく低下(K172L、K172H)または消失(K190A、R223A)した。しかし、Glu166およびLys172を保存的にAspまたはArgに置換したE166DおよびK172Rでは、野生型と同程度(E166D)および約50%(K172R)のPel比活性が維持された。また、 Ca^{2+} 結合部位からやや離れて位置するAsp129の非極性変異体であるD129Nでも野生型の14%のPel比活性が認められた。

Pel活性が維持された変異体のうち、E166DおよびD129NのPel比活性pHプロファイルを第3-2図に示した。図からも明らかのように、Pel活性ピークは顕著に低下したものの、いずれの変異体とも野生型PelC同様、pH9.5で最も高いPel活性を示した。



第3-2図 野生型および主要な変異PelCのペクチン酸リアラーゼ活性におけるpHプロファイル

(2) vWiDH領域に位置する変異PelCにおけるPel活性の変化

Pelスーパーファミリー内で高度に保存されているvWiDH領域は、pelC遺伝子の開始コドンから約600bp下流、翻訳領域全体の5'側1/3付近に位置している。一方、PelC分子上では、このvWiDH領域は Ca^{2+} 結合部位の180°反対側に位置し、NおよびC末端を包み込む形

第3-2表 野生型および変異PelCにおける等電点(pI)、Pel比活性、植物組織分解能、エリシター活性およびカルシウムイオン (Ca²⁺) 結合強度

酵素タンパク	pI	Pel比活性 ¹⁾	植物組織分解能 ²⁾	エリシター活性 ³⁾	Ca ²⁺ 結合強度 ⁴⁾
野生型PelC	9.00	2 9 0 0	4 2 0	0. 9 7 8	1 0 0 ^a
[Ca ²⁺ 結合部位周辺]					
D 1 2 9 N	9.00	1 4 0 0	2 1 0	0. 4 9 7	4 8 ^a
D 1 3 1 E	9.05	<2	<3	0. 2 0 1	1 4 ^b
D 1 3 1 N	9.30	<3	<4	0. 1 0 8	7 6 ^a
E 1 6 6 D	9.10	2 7 0 0	4 1 0	0. 7 7 9	3 9 ^a
E 1 6 6 Q	9.30	<1	<3	0. 1 3 6	1 1 3 ^a
D 1 7 0 N	9.30	<8	<7	0. 1 9 4	4 4 ^a
K 1 7 2 H	9.20	8 0	8 0	0. 9 7 2	6 4 ^a
K 1 7 2 L	9.15	1 2 0	6 0	0. 9 8 8	1 5 ^b
K 1 7 2 R	9.00	1 3 0 0	2 9 0	0. 8 9 6	4 0 ^a
K 1 9 0 A	8.75	<1	<3	0. 0 8 9	1 2 ^b
R 2 1 8 A	8.10	<1	<2	0. 2 9 1	ND
R 2 1 8 E	8.95	<2	<7	0. 3 2 2	ND
R 2 1 8 K	9.00	<1 5	<8	0. 1 1 2	1 1 ^b
R 2 1 8 L	8.05	<5	<5	0. 1 2 9	7 ^b
R 2 2 3 A	8.70	<1 8	<2 0	0. 3 9 1	ND
[vWiDH領域]					
L-1 0 E	-	-	membrane-bound ⁵⁾	-	-
Y 7 D	-	-	membrane-bound	-	-
M 1 1 8 N	-	-	membrane-bound	-	-
W 1 4 2 H	9.00	2 8 0 0	3 7 0	0. 8 5 4	6 5 ^a
D 1 4 4 N	9.40	1 8 0 0	2 8 0	0. 8 2 6	1 0 ^b
H 1 4 5 Q	-	-	membrane-bound	-	-
T 2 0 6 A	9.05	2 4 0 0	3 4 0	0. 7 4 4	ND
N 2 1 0 S	-	-	membrane-bound	-	-
H 2 2 8 Q	-	-	membrane-bound	-	-
E 2 5 3 D	-	-	membrane-bound	-	-
K 3 4 2 E	9.00	2 1 0 0	3 0 0	0. 5 1 8	ND
[ジスルフィド結合]					
C 7 2 S	ND	1 8 0	2 5	0. 3 5 1	ND
C72S/C155S	9.10	4 0 0	1 6 0	0. 4 1 6	ND
C 3 2 9 S	-	-	membrane-bound	-	-
C329S/C352S	-	-	membrane-bound	-	-
[Pel1ホモログ ⁶⁾]					
I 1 2 0 F	9.10	2 3 0 0	3 5 0	1. 1 8 6	ND
G 2 8 0 N	9.00	2 6 0 0	3 9 0	0. 7 3 3	ND
[その他]					
D 2 8 R	9.70	2 2 0 0	3 3 0	0. 5 1 1	ND
T 2 7 5 I ⁷⁾	9.00	2 3 0 0	3 5 0	0. 7 9 7	ND

¹⁾ pH9.5における値(U/mg of protein)、²⁾ 1 μ g/mlの酵素溶液(pH7.0)でキュウリ皮層組織を37°C、1時間処理したときの損失重量(mg)/500mg、³⁾ ダイズ子葉検定法でのA₂₈₅、⁴⁾ 野生型PelCのトリプトファン蛍光測光において、蛍光強度を半減させるのに要した塩化カルシウム濃度に対する百分比。片字の異なるアルファベット間にはダンカンの多重検定により有意差があることを示す。NDは、測定せず。⁵⁾ T7発現システムを用いて大腸菌(HMS174(DE3))で発現させた場合、翻訳されたタンパクがペリプラズムに移送されず大腸菌の内膜に結合したままである状態、⁶⁾ *E. carotovora* subsp. *carotovora* strain71が生産し、PelCと71%の相同性を有するPel1²⁸⁾と同じアミノ酸残基に置換したPelC変異体、⁷⁾ overlap extensionの過程で得られたpelCの突然変異体

で存在している(第1-5図)^{67, 82)}。このvWiDH領域に11の変異pelCを作成したが、本章第1節で示したように、正しくフォールディングし、可溶性の成熟型タンパクが得られたのはW142H、D144N、T206AおよびK342Eの4変異体のみであった。そこで、ここではこの4変異体をvWiDH領域を代表する変異PelCとして*in vitro*におけるPel活性を調べた(第3-2表)。

その結果、W142H、D144NおよびT206Aは、いずれも野生型の62~97%の高いPel比活性を、また、C末端に位置

するK342Eも野生型の72%のPel比活性を示したことから、少なくともvWiDH領域に位置するアミノ酸残基は、Pel活性に直接関与していないことが明らかになった。

(3) ジスルフィド結合、Pel1ホモログおよびその他の部位に作成した変異PelCにおけるPel活性の変化

PelC分子内に存在する2つのジスルフィド結合に関与する4つのアミノ酸残基のうち、PelBCサブファミリーにのみ存在するCys72-Cys155の一方または双方を同時にSerに置換したC72SおよびC72S/C155SのPel比活性は、

それぞれ野生型の6%および14%まで低下したもののPel活性は明らかに維持されていた。また、C72S/C155SのpHプロファイル調べたところ、野生型およびその他のPel活性が維持された変異PelCと同様に、pH9.5を至適pHとした(第3-2図)。前節で示したように、I群のPelファミリーで保存されているジスルフィド結合を消失させた変異体では、変異タンパクが発現しないか、正しくフォールディングしていない不溶性タンパクしか発現しないことを考慮すると、PelBCサブファミリーにのみ存在するジスルフィド結合は、PelCの基本的な機能と分子構造には大きく影響せず、PelBCファミリー固有のループ構造の形成にのみ関与しているものと考えられた。

一方、Ile120およびGly280を、*E.carotovora* subsp. *carotovora* strain71が生産するPelCホモログのPel1²⁸⁰の相同アミノ酸残基であるIle120およびGly280を、それぞれPheおよびAsnに置換したI120FおよびG280Nは、いずれも野生型の79および90%のPel比活性を維持していた。また、その他の部位の変異体であるD28RおよびT275Iは、いずれも野生型PelCの76および79%のPel比活性を示した。したがって、これらのアミノ酸残基についてもPel活性には直接関与していないことが示された。

以上の結果から、PelCの活性中心はCa²⁺結合部位に存在することおよびその周辺に位置するAsp131、Glu166、Asp170、Lys172、Lys190、Arg218およびArg223の7つのアミノ酸残基がPel活性に重要な役割を果たしていることが明らかになった。特にAsp131とArg218の変異体は、その置換形態にかかわらずPel活性が消失したこと、およびPelスーパーファミリーで高度に保存されているアミノ酸残基であることなどから^{56,58)}、Asp131とArg218はPGAのβ-トランスエリミネーション分解において中心的な役割を果たしていることが示唆された。

第3節 カルシウムイオン結合強度および等電点の変化

1. 緒言

Pelは、共同因子としてカルシウムイオン(Ca²⁺)を必要とする³²⁾。しかし、Ca²⁺がどのような形でPelタンパクと結合するのか、基質のPGAの分解過程でどういった役割を果たしているのか等については不明な点が多い^{49,100)}。Sieberら¹³⁶⁾は、PelCのCDスペクトラム解析を行い、Ca²⁺を与えることによりPelCのCDスペクトラムが大き

く変化することを認めた。Pickersgillら¹¹⁷⁾は、*B.subtilis*が生産するペクチン酸リアーゼ(BsPel)が、PelCと同じ並行型βヘリックス構造を有することおよびBsPelがCa²⁺を取り込んで結晶化することを明らかにした。これらの結果から、Pel活性に不可欠なCa²⁺は、少なくともPelC分子に直接結合しているものと考えられる。

そこで、本節では、PelCのCa²⁺結合に関与するアミノ酸残基を推定するとともに、これらの残基がPel活性を発揮する上でどのような役割を果たしているのかを明らかにするため、主にCa²⁺結合部位周辺に作成した変異PelCについて、そのCa²⁺結合強度および分子全体の荷電状態の指標となる等電点について検討した。

2. 材料および方法

(1) カルシウムイオン結合強度の測定

Ca²⁺とPelC分子との結合強度を定量的に把握するため、PelC分子内に存在する7つのトリプトファン残基に注目し、まず、これらの残基が紫外線により励起されて発する蛍光強度を蛍光測光により測定した⁶⁷⁾。蛍光測光には、SPEX Fluorolog Spectrofluorimeterを用い、5mMのBis-Tris-Propane緩衝液(pH9.5)で0.88mMに調製した野生型および変異PelC溶液に、150Wのキセノン・アークランプを光源とする284nmの紫外線を照射した時に励起されてくる300~400nmの範囲の蛍光エミッション強度を連続して計測し、その積分値をもって内部トリプトファン蛍光強度とした。また、Ca²⁺濃度が内部トリプトファン蛍光強度に及ぼす影響を調べるため、0.88mMの野生型あるいは変異PelC溶液を、1Mの塩化カルシウム溶液を用いて、0.001から4.3mM濃度までの間を10濃度段階で滴定し、各滴定値におけるトリプトファン蛍光強度の変化を測定した。

(2) 等電点の測定

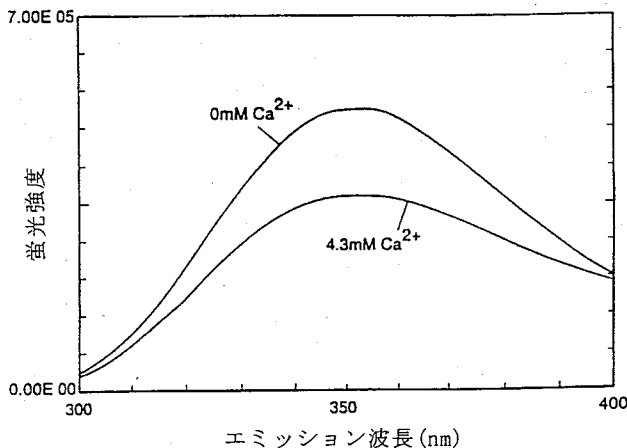
純化した変異PelCを脱イオン水に対して24時間透析し、セントリコン10(アミコン社)を用いて、A₂₈₀で1.5まで濃縮した。等電点電気泳動は、Multiphor II(ファルマシア社)システムで、レディゲル“Ampholine PAG plate”(pH3.0-9.5)を用いて行った。ゲル中央部にろ紙片(5×5mm)を乗せ、これに濃縮サンプルを5μl吸収させた後、陽極には1Mリン酸溶液を、また、陰極には1Mの水酸化ナトリウム溶液を浸したウィックを置き、1,500V、50mA、30Wで75分間泳動した。野生型PelCは、pI9.0と塩基性が強いいため、泳動装置の蓋を密

閉するとともに、二酸化炭素を吸収させる目的で予備バッファー槽に1Mの水酸化ナトリウム溶液を満たした。泳動後、クマシーブリリアントブルーR250で染色し、各変異PelCの泳動位置を検出した。各変異PelCの等電点は、等電点マーカー（アマシャム・ファルマシア・バイテク社）の移動位置から算出した。

3. 結果および考察

(1) カルシウムイオン結合強度の変化

野生型PelCの蛍光エミッションスペクトルに及ぼす Ca^{2+} の影響について検討した。その結果、4.3mMレベルで Ca^{2+} を添加したところ、蛍光エミッションの波長スペクトルはシフトしなかったが、その蛍光強度は顕著に低下し（第3-3-1図）、また、EDTAを添加することによって回復した。この蛍光強度の低下は、PelC分子内の Ca^{2+} 結合部位近傍に位置するTrp256の側鎖の向きが、 Ca^{2+} がPelC分子に結合することによって変化するために引き起こされたものと考えられた。そこで、この蛍光強度の変化を利用してPelCと Ca^{2+} との結合強度の定量化を試みた。

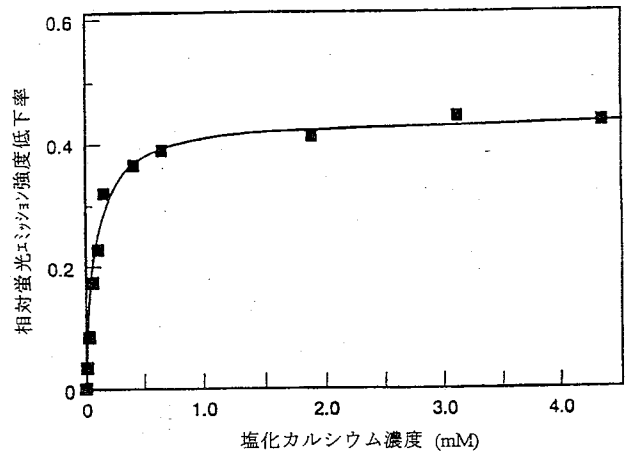


第3-3-1図 284nmの紫外線で励起される野生型PelCの蛍光エミッション強度に及ぼすカルシウムイオンの影響

5mM Bis-Tris-Propane緩衝液(pH9.5)のみおよび4.3mMの塩化カルシウムを含む同緩衝液で0.88mMに調製したPelC溶液を、284nmの紫外線で励起したときに発生する300~400nm間の蛍光エミッション強度の変化を示す。

まず、野生型PelCを1Mの塩化カルシウム溶液で滴定したときの、各 Ca^{2+} 濃度における蛍光強度を測定し、 Ca^{2+} を含まない時の蛍光強度に対する相対的な蛍光強度の低下量を算出し、プロットした。その結果、第3-3-2図に示すように、塩化カルシウム濃度が増加するにしたがって急激に蛍光強度が低下し、1mMに達した時点

で飽和した。このときの K_d 値、すなわち相対蛍光強度低下量を1/2とする Ca^{2+} 濃度は 1.1×10^{-4} Mと算出された。これらの結果から、変異PelCを塩化カルシウムで滴定したときの相対蛍光強度低下量の K_d 値によって、各変異PelCの Ca^{2+} 結合強度を定量的に評価できることが明らかになった。



第3-3-2図 塩化カルシウム溶液の滴定による野生型PelCの相対蛍光エミッション強度低下率(RFR)¹⁾の変化

¹⁾ RFRは、カルシウムイオンを含まない時の300~400nm間における蛍光エミッション強度(FEI)の積分値(E_0)と各滴定値の同積分値(E_i)との差をFEIの低下量とし、この低下量の E_0 に対する比で示した ($RFR = (E_0 - E_i) / E_0$)。

そこで、PelCの Ca^{2+} 結合部位に位置する12の変異体およびvWiDH領域の2つの変異体を選び、その Ca^{2+} 結合強度に関する K_d 値を測定した。第3-3表にこれらの変異体の蛍光測定における K_d 値とその標準偏差および野生型PelCの K_d 値に対する相対値(%)をそのPel比活性と併せて示した。 Ca^{2+} 部位周辺の変異PelCのうち、Pel活性を消失したD131E、K172L、K190A、R218KおよびR218Lでは、野生型に比べ Ca^{2+} 結合強度が著しく低下していた。これに対し、D131N、D170N、E166QおよびK172Lは、いずれもPel活性が消失しているにもかかわらず、野生型に近い Ca^{2+} 結合強度を有していた。また、保存的な変異を導入し、野生型PelCの50%以上のPel比活性を示したD129N、W142H、E166DおよびK172Rは、いずれも野生型と同レベルの Ca^{2+} 結合強度を示した。

一方、vWiDH領域に位置するW142HおよびD144Nは、いずれも野生型と同じまたは60%程度のPel比活性を示したが、 Ca^{2+} 結合強度ではD144Nのみ有意に低い値を示した。このD144Nで認められた Ca^{2+} 結合強度の顕著な低下は、Asp144と1残基おいて隣接するTrp142の芳香環の向きがAsp144をAsnに置換することにより変化し、結果的にPelC分子内のトリプトファン残基全体のエミッション蛍光強度が低下したためと考えられ、

第3-3表 野生型および変異PelCにおけるトリプトファン蛍光測光において相対蛍光エミッション強度を半減させるのに要したCa²⁺濃度とPel比活性

酵素タンパク	Ca ²⁺ 濃度(μM) ¹⁾	Pel比活性 ²⁾
野生型PelC	1 9 5 ^a (100)	2 9 0 0 (100)
[Ca ²⁺ 結合部位周辺]		
D 1 2 9 N	2 8 4 ^a (69)	1 4 0 0 (48)
D 1 3 1 E	1 3 9 6 ^b (14)	<2 (<0.1)
D 1 3 1 N	2 5 5 ^a (76)	<3 (<0.1)
E 1 6 6 D	5 0 2 ^a (39)	2 7 0 0 (93)
E 1 6 6 Q	1 7 2 ^a (113)	<1 (<0.1)
D 1 7 0 N	4 4 6 ^a (44)	<8 (<0.3)
K 1 7 2 H	3 0 3 ^a (64)	8 0 (3)
K 1 7 2 L	1 3 3 0 ^b (15)	1 2 0 (4)
K 1 7 2 R	4 8 5 ^a (40)	1 3 0 0 (45)
K 1 9 0 A	1 6 6 3 ^b (12)	<1 (<0.1)
R 2 1 8 K	1 7 9 6 ^b (11)	<1 5 (<0.5)
R 2 1 8 L	2 6 4 0 ^b (7)	<5 (<0.2)
[vWiDH領域]		
W 1 4 2 H	3 0 1 ^a (65)	2 8 0 0 (97)
D 1 4 4 N	1 8 9 6 ^b (10)	1 8 0 0 (62)

¹⁾ PelC変異体のトリプトファン蛍光測光において、相対蛍光エミッション強度を半減させるのに要した塩化カルシウム濃度(μM)を示し、値が大きいほどCa²⁺結合強度が低いことを意味する。片字の異なるアルファベット間にはダンカンの多重検定により有意差があることを示す。²⁾ pH 9.5における値(U/mg of protein)。括弧内の数値は、いずれも野生型PelCに対する百分比を示す。

Ca²⁺結合強度の低下によるものではないと推定された。

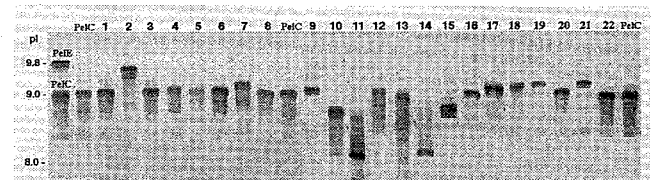
以上の結果から、Ca²⁺結合には、少なくともAsp131、Lys172、Lys190およびArg218の4つのアミノ酸残基が直接あるいは間接的に関与していること、およびCa²⁺結合強度の低下は一部の変異PelCにおけるPel活性の主要な活性消失の要因の一つであることが明らかになった。しかし、Ca²⁺と結合できる可能性のある酸性アミノ酸残基でPel活性を消失しているにもかかわらず、野生型と同レベルのCa²⁺結合強度を有する変異PelCも存在したことから、Ca²⁺結合にはさらに別の要因が関与するとともに、Ca²⁺結合とは異なる活性消失要因が存在することが示唆された。

(2) 等電点の変化

Ca²⁺結合強度に影響する別の要因として、分子全体の電荷の変化も想定されたので、主要な変異PelCを等電点(pI)を測定し、第3-3-3図に等電点電気泳動像を示すとともに、各変異PelCのpI値を第3-2表に取りまとめた。

その結果、野生型PelCは、これまで報告されているようにpI9.0と高い塩基性を示した。これに対し、Pel活性を消失したCa²⁺結合部位の12の変異体のうち、7つの

変異体のpI値は、顕著に低下(pI8.05~8.75: K190A、R218A、R218L、R223A)または上昇(pI9.3: D131N、E166Q、D170N)した。一方、D131E、K172H、K172L、R218EおよびR218Kの5変異体およびPel活性が維持された3変異体(D129N、E166D、K172R)は、野生型と同レベルのpI値を示した。また、vWiDH領域を含むその他の部位における変異体のうち、野生型の60~75%のPel比活性を有していたI120F、D144NおよびD28Rの3変異体および低いながらPel活性が維持されたC72S/C155Sは、それぞれpI9.10、9.40、9.70および9.10と野生型に比べ高いpI値を示した。これに対して、W142H、T206A、G280NおよびK342Eは、いずれも野生型の70~90%のPel比活性を有していた変異体であるが、いずれも野生型と同レベルのpI値を示した。



第3-3-3図 変異PelCのポリアクリルアミド等電点電気泳動像

マルチフォアIIシステム(アマシャム・ファルマシア・バイオテク社)でAmpholine PAG plate (pI3.5-9.5)を用いて濃縮・脱塩処理した各変異PelCを泳動した。pIマーカータンパク以外に、すでにpI値が明らかにされている野生型PelCおよびPelEも同時に泳動した。各レーンの変異PelCは次のとおり。1: T275I, 2: D28R, 3: G280N, 4: I120F, 5: K342E, 6: T206A, 7: D144N, 8: W142H, 9: C72S/C155S, 10: R223A, 11: R218L, 12: R218K, 13: 218E, 14: 218A, 15: K190A, 16: K172R, 17: K172L, 18: K172H, 19: E166Q, 20: E166D, 21: D131N, 22: D131E

以上のように、同じpI値を示す変異体の中にも、高いPel活性を維持している変異体と著しくPel活性が低下したか消失した変異体が混在し、また、必ずしもPel活性あるいはCa²⁺結合強度とも一致しないなど、一定の傾向は認められなかった。しかし、少なくともpI値が顕著な低下または上昇した変異体のPel活性は失われていることから、PelC分子全体の電荷の変化は、Pel活性の消失・低下の要因の一つとなっていることは明らかである。また、pI値が著しく低下したK190AおよびR218LではCa²⁺結合強度も低下したことから、PelC分子全体としての電荷の変化もCa²⁺結合強度に関与していることが示唆された。

第4節 植物組織分解能の変化

1. 緒言

植物のペクチン質を構成するポリガラクトロン酸(PGA)は、単位ウロン酸分子のカルボキシル基同士がカルシウムイオン(Ca^{2+})を介して結合することにより植物組織を堅固なものにしている^{105,128)}。Pelは、このPGAを β -トランスエリミネーション機構により、最終的に不飽和ガラクトロン酸を含む1ないし3量体まで分解する¹²⁰⁾。

*E. chrysanthemi*は、植物体への感染に伴ってこのPelを中心としたペクチン酸分解酵素群を爆発的に生産して植物組織を軟化・分解し、得られた分解産物を炭素源に増殖し、結果として組織の腐敗を引き起こす^{6,10,115)}。このペクチン分解酵素群による植物組織の軟化・分解を、Batemanは“maceration”と呼んだ⁹⁾。Pelが病原性因子の一つとして植物組織の軟化・分解に果たしている機能については、これまでに多くの生化学あるいは分子生物学的研究によって間接的に明らかにされてきたが^{8,32,84)}、実際の感染場面においてPelが植物組織をどのように軟化・分解しているのかについては未だ不明な点が数多く残されている。

そこで、本節では、可溶性タンパクが得られた変異PelCについて、キュウリの皮層組織を用いて植物組織分解能を定量的に評価するとともに、*in vitro*におけるPel活性と植物組織分解能との関係を相互に比較検討した。

2. 材料および方法

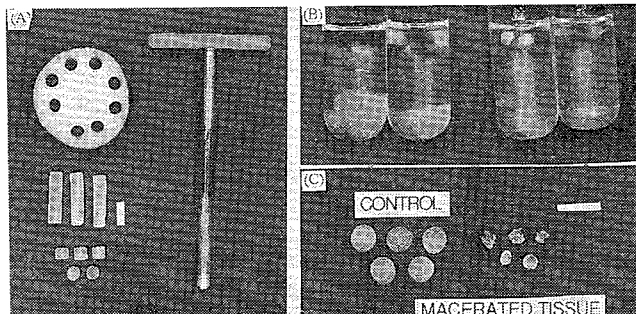
(1) キュウリ皮層組織の調製

キュウリ(西洋型)の皮層組織を径0.5mmのコルクボーラーで打ち抜き、1片が約100mgとなるよう5mmの長さでスライスした後、直ちに脱イオン水に浸せきした。1時間後、5片の皮層組織を取り、ろ紙で余分な水分を取り除いた後、その重量(mg)を測定し、5片で500~600mgになるよう調製した(第3-4-1図A)。

(2) 植物組織分解能の測定

まず、各変異PelC溶液を、0.5mMの塩化カルシウム(CaCl_2)を含み、植物組織分解能のpHプロフィール検定(後述)で最大値を示したpH7.5(第3-3-2図)に調整した50mMのBis-Tris-Propane(BTP)緩衝液を用い

て調製した。この場合、変異PelCの濃度はPel活性の程度に合わせて1~10 $\mu\text{g/ml}$ とした。この変異PelC酵素液5mlに、重量をあらかじめ測定しておいた上記5片のキュウリの皮層組織片を浸せきし、37°Cで1時間、80rpmで振とうした(第3-4-1図B)。処理後、20秒間ボルテックスし、0.8mmメッシュを通して軟化・遊離した組織を洗い流し、ろ紙を用いて残った組織片に付着した余分な水分を取り除いた後、その全重量を測定した(第3-4-1図C)。植物組織分解能の測定はそれぞれ3処理3反復行い、各測定値から算出される損失重量(mg)を酵素処理前の重量と無処理区における物理的損失重量を用いて組織500mg当たりの値に補正し、1 $\mu\text{g/ml}$ 濃度の酵素溶液に対する値として植物組織分解能を算出した。なお、BTP緩衝液の影響を調べる場合には、脱イオン水を用いて酵素溶液を調製した。また、植物組織分解能におけるpHプロフィールの測定には、*in vitro*におけるPel活性のpHプロフィールと同様に、pH5から7まではMES緩衝液、pH7から9.5まではBTP緩衝液およびpH10から10.5まではAMP緩衝液を用い、濃度はいずれも50mMとした。



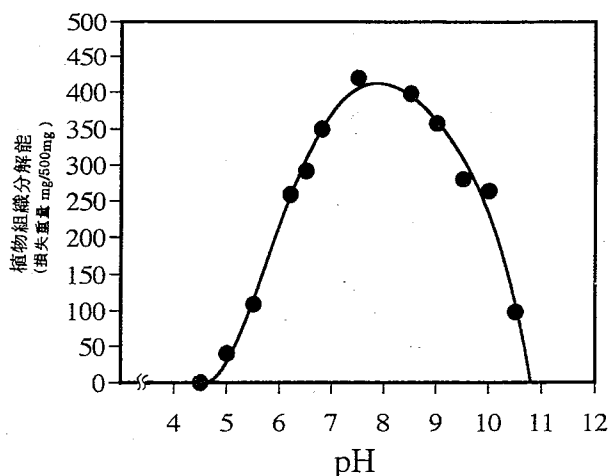
第3-4-1図 野生型PelCによるキュウリ皮層組織の軟化分解(maceration)

キュウリ皮層組織を内径5mmのコルクボーラーで打ち抜き、これを一片が100mgになるよう細断した(A)。次にその5片を1 $\mu\text{g/ml}$ の野生型PelCを含む50M Bis-Tris-Propane緩衝液(pH7.5)に浸せきし、37°Cで1時間振とう処理した(B)。ボルテックスにより未分解組織のみとした後(C)、その重量を測定することにより組織500mg当たりの損失重量を算出した。対象は緩衝液のみとした。

3. 結果および考察

(1) 植物組織分解能に及ぼすpHとカルシウムイオンの影響

緩衝液のpHが、野生型PelCの植物組織分解能に及ぼす影響について明らかにするため、緩衝液のpHをpH5.5から10.5まで変えて処理したところ、pH7.5で組織が最も効率良く軟化・分解された(第3-4-2図)。



第3-4-2図 緩衝液のpHが野生型PelCの植物組織分解能に及ぼす影響

0.5mMの塩化カルシウムを含むpH5.5から10.5の緩衝液を用いて野生型PelCを1 μ g/mlに調整し、それぞれ500mgのキュウリ皮層組織を第3-3-1図に示した方法で処理したときの損失重量を測定した。

しかし、この至適pH7.5という値は、*in vitro*のPel活性の至適pHの9.5（前節参照）より2.0も低い。キュウリの皮層組織の汁液のpHを実測するとpH5.8とさらに低い値であることから、緩衝液とCa²⁺の影響について検討した（第3-4表）。その結果、Ca²⁺を含まない脱イオン水のみで野生型PelCを処理した時の植物組織分解能は130mgで、pH7.5の50mM BTP緩衝液とともに処理した時の420mgと比べると35%程度の低い値しか示さなかった。一方、Ca²⁺を添加しなかった場合には、緩衝液および脱イオン水いずれにおいてもCa²⁺を添加した場合の87~88%程度の植物組織分解能を示した。

第3-4表 緩衝液とカルシウムイオン濃度が野生型PelCの植物組織分解能に及ぼす影響

溶 媒	Ca ²⁺ (mM)	植物組織分解能 ¹⁾
50m MBis-Tris-Propane (pH7.0)	0	370±40
	0.5	420±35
脱イオン水	0	130±15
	0.5	150±15

¹⁾ 1 μ g/mlの酵素溶液 (pH7.0) でキュウリ皮層組織を37°C、1時間処理したときの組織500mgあたりの損失重量 (mg) およびその標準偏差を示す。

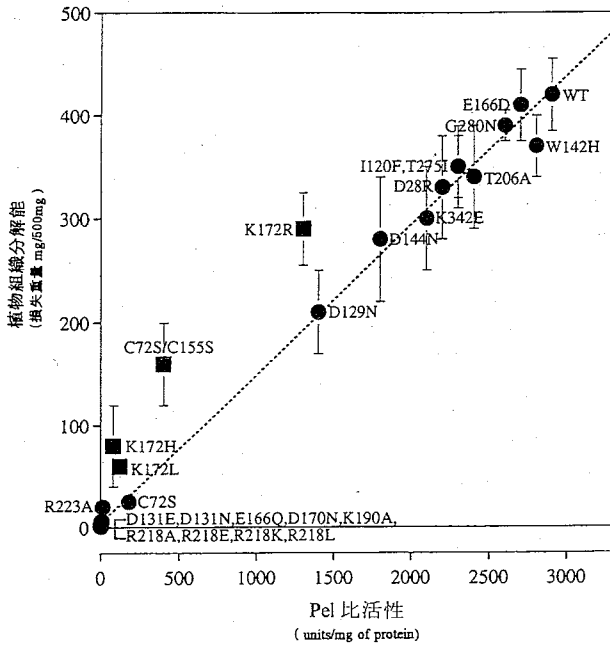
Pelの酵素機能に不可欠なCa²⁺は、細胞壁マトリクスに1mM以上の濃度で存在している¹⁰⁹⁾。したがって、生体内においては、外部からCa²⁺が与えられなくてもPel活性は十分発揮されるはずであり、実際にCa²⁺を添加しなくてもキュウリの皮層組織はPelCにより分解された。これに対して、pH5.8という低い生体内pH環境に

において、pH9.5という高い至適pHを有するPelがどのように植物細胞壁成分であるPGAと結合し、組織を分解しているのかは明らかではない。ただ、植物細胞壁マトリクスに存在するCa²⁺はPGAを相互に結合する機能を果たしていることから、これが同時に周辺のpHを局所的に高めている可能性も考えられる^{104,148)}。このことは、逆に、Pelの高い至適pHが、実際の感染場面の微細環境に適応した結果とも考えられることから、実際の感染場面でのpHとPel活性との関係についてはさらに詳細な検討を行う必要がある。

(2) 植物組織分解能の変化

野生型および変異PelCの植物組織分解能をキュウリの皮層組織を用いて定量的に検討した（第3-2表）。その結果、Ca²⁺結合部位周辺に位置する変異PelCのうち、Pel活性を失ったD131E、D131N、E166Q、D170N、K190A、R218A、R218E、R218K、R218LおよびR223Aはすべて植物組織分解能を失っていた。また、Pel活性がわずかに認められたK172Hおよび極めて低い値を示したC72S、C72S/C155SおよびK172Lの植物組織分解能も、野生型PelCに比べ顕著に低い値を示した。これに対して、野生型PelCと同レベルのPel活性が認められたD28R、I120F、D129N、W142H、D144N、E166D、K172R、T206A、K342E、G280NおよびT275Iでは、PelC分子上の位置にかかわらず各変異体のPel活性のレベルに対応した植物組織分解能を示した。

そこで、Pel比活性と植物組織分解能に直線回帰分析を適用した。その結果、K172H、K172L、K172Rおよびジスルフィド結合を消失させたC72S/C155Sを除く22の変異体については、そのPel比活性と植物組織分解能との間に、回帰係数0.995の極めて高い正の相関関係が認められた（第3-4-3図）。これは、植物組織分解能がPel比活性の程度、すなわち変異PelCの β -トランスエリミネーション分解能の程度と一致することを意味する。このことから、*E.chrysanthemi*の感染によって引き起こされる植物組織の軟化・分解は、Pelが細胞壁構成成分であるPGAを β -トランスエリミネーション分解することによって引き起こされることが明確に示された。しかし、作成した変異PelCの中に、直線回帰の期待値より有意に高い植物組織分解能を示す変異体が存在することから、PelCの植物組織分解能にはPel活性以外の要因として基質結合強度あるいはPelC分子の立体構造の違い等も関与している可能性が示唆された。



第3-4-3図 野生型および変異PelCにおけるPel比活性と植物組織分解能との間に認められる相関関係
K172H、K172L、K172RおよびC72S/C155Sを除いた直線回帰で、回帰係数 $r^2=0.995$ ($n=22, <0.01$ で有意) が得られた。

第5節 エリクター活性の変化

1. 緒言

エリクターとは、植物が持つ病害抵抗反応を誘導する物質で、一般に病原微生物の感染等に伴って植物にファイトアレキシンの生産を誘導する物質のことを総称する⁶⁸⁾。これまでにさまざまな生物学的および非生物学的エリクターが同定されているが^{69,70)}、Pelについてもダイズを含む各種植物に対してエリクター活性を示すことが明らかにされている^{39,40)}。エリクター活性は、そのファイトアレキシン生産誘導活性の高さによって評価されるが、ここではダイズのファイトアレキシンであるファゼオリンの生成誘導を指標とするダイズ子葉検定法により変異PelCのエリクター活性を評価した。

2. 材料および方法

エリクター活性を評価するためのダイズの子葉検定法は、Ayersら^{3,4)}およびKeenら^{69,70)}の方法をもとにして、より正確に定量化できる手法を開発した。すなわち、ダイズ品種'Harosoy 63'の種子をポットにまき、25°Cで8~10日間育成した。本葉第1葉が展開し始めた段階で子葉を摘み取り、脱イオン水で洗浄し、余分な水分を取り除

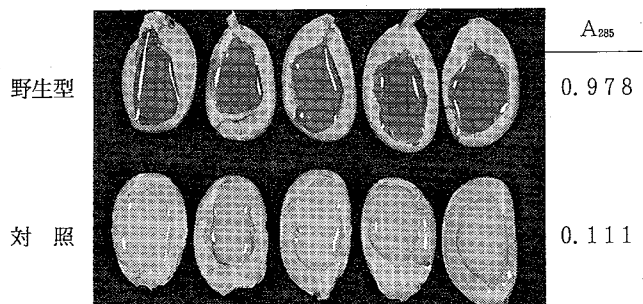
いた後、大きさのそろった子葉8片を選び、その裏面組織をカミソリを用いて厚さ2~3mm削ぎ取った。この表層組織が削ぎ取られた部分に変異PelCの水溶液を1片の子葉あたり200 μ l置くことによりエリクター処理を行った。変異PelC溶液には、インキュベート中の微生物の増殖を防ぐため、硫酸ストレプトマイシンおよびリファンピシンをそれぞれ300および10 μ g/mlとなるよう添加した。室温で、3,000luxの連続蛍光灯証明下、24時間インキュベートした後、代表的な反応を示している子葉5片を選び、それぞれから処理した変異PelC溶液を50 μ lずつ回収した。これにそれぞれ4mlの脱イオン水を加えて良く混和した後、ファゼオリンの特異吸収波長である285nmにおける吸光度を測定した⁴⁾。なお、対照には変異PelCを含まない水溶液を用いるとともに、各変異PelCについて、少なくとも3処理3反復行うことにより、使用する子葉の反応と処理誤差を排除した。

3. 結果および考察

(1) 変異PelC濃度とエリクター活性

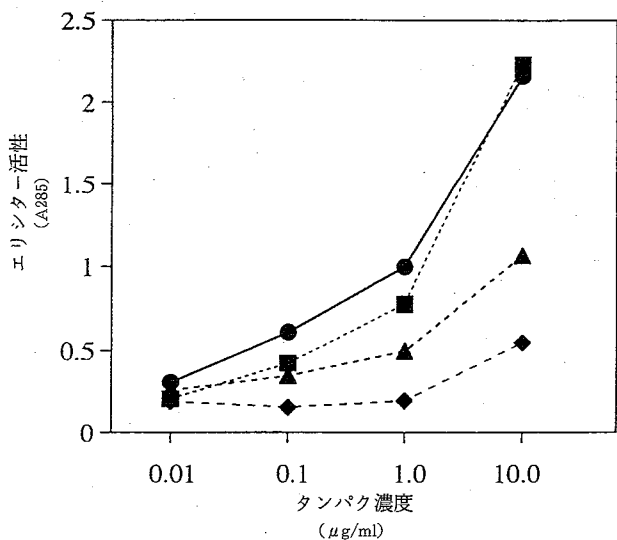
裏面組織を切除したダイズ子葉にPelC溶液を処理すると、第3-4-1図に示すように、処理したPelC溶液が赤褐色に変化した。この処理液の吸光スペクトラムを測定したところ、 A_{285} に吸収のピークが認められ、ダイズのファイトアレキシンであるファゼオリンが生成していることが確認された^{3,4)}。

次に、今回作成したすべての変異PelCのエリクター活性を定量的に評価するため、野生型およびPel活性のレベルが異なる3つの変異PelC、D129N、E166DおよびD170Nを選び、そのエリクター活性を濃度別に測定し



第3-5-1図 ダイズ子葉検定で野生型PelCが示すエリクター活性

播種後10日のダイズ子葉の裏面組織を削ぎ取った表面に、1 μ g/mlに調整した野生型PelC水溶液(上段)または脱塩水(下段)を処理した後、3000luxの蛍光灯照射下、24時間、室温でインキュベートした。エリクター活性の数量評価は、各子葉から処理液を50 μ lずつ回収し、これを4mlの脱塩水で希釈した溶液の285nm(ダイズのファイトアレキシンであるグリセオリンの特異吸収波長)における吸光度で示した。



第3-5-2図 野生型および主要な変異PelCの処理濃度がエリシター活性に及ぼす影響

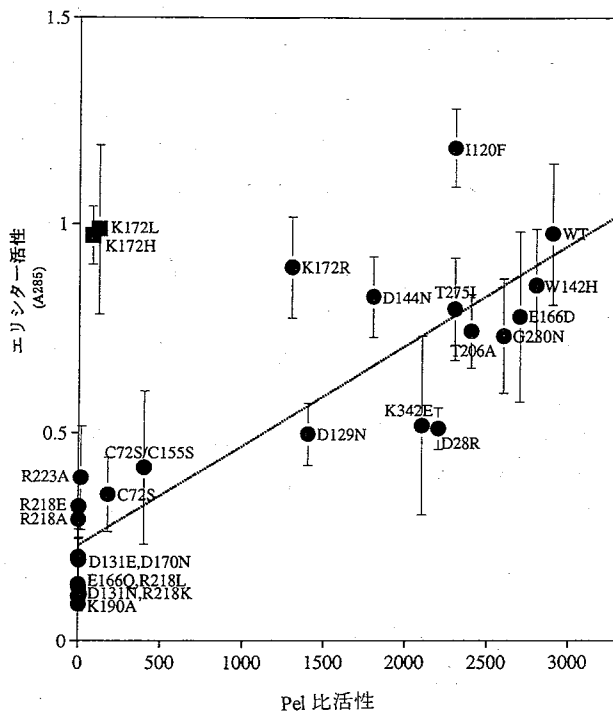
●—● 野生型 ●····· E166D, ▲····· D129N, ◆-·-·- D170N

た。その結果、エリシター活性は各変異PelCが有するPel活性の強さに比例し、1 µg/mlの濃度で処理した時に、各変異体の中で最も顕著な活性の差が認められた(第3-4-2図)。そこで、以後、各変異PelCのエリシター活性を評価するための処理濃度を1 µg/mlに設定して実験を進めた。

(2) 変異PelCにおけるエリシター活性の変化

作成したすべての変異PelCについて、1 µg/mlの濃度でのエリシター活性を測定した結果、変異PelCのエリシター活性は、植物組織分解能と同様、全体としてPel活性の高い変異体ほど高く、低い変異体ほど低いという傾向を示した(第3-2表)。すなわち、D131E、R218A等のPel活性を失った変異PelCは、いずれもA₂₈₅値で0.3以下と低いエリシター活性しか示さなかったのに対して、Pel活性が維持されたE166D、D129NおよびC72S/C155S等ではいずれもPel活性の高さに相応したエリシター活性を示した。このことから、変異PelCのβ-トランスエリミネーション分解作用によって遊離してくるPGAの分解産物の量が、エリシター活性に強く影響していることが示唆された。

しかし、一方で例外も多く存在し、特にK172HおよびK172Lは、いずれも野生型PelCに比べ3%以下のPel活性しか有していないにもかかわらず、共に野生型と同じレベルのエリシター活性を示した。この例外的な特性を示すK172HおよびK172Lを除いた24の変異PelCについてそのPel比活性とエリシター活性との間に直線回帰分析を適用したところ、全体にやや分散してはいるものの、回帰係数0.758の正の相関関係(1%有意)が認めら



第3-5-3図 野生型および変異PelCにおけるPel比活性とエリシター活性との間に認められる相関関係 K172HとK172Lを除いた直線回帰で、回帰係数 $r^2=0.758$ ($n=24, <0.01$ で有意) が得られた。

れた(第3-4-3図)。しかし、I120F、D144N、K172RおよびR223Aの4変異体は、算出された直線回帰から推定される値より有意に高いエリシター活性を、また、D28Rは逆に有意に低いエリシター活性を示すなど例外も多く認められた(第3-4-3図)。

Pelが示すエリシター活性については、これまでにPelによってPGAが分解されて生じる9~12merのオリゴガラクトロン酸がエリシターとして直接植物に作用することが明らかにされている⁴⁰⁾。しかし、本節で明らかにしたように、いくつかの変異PelCでは、Pel活性とエリシター活性が必ずしも一致しないことから、Pelが示すエリシター活性にはPGAの分解能力以外に、植物に認識されるタンパク構造等もPelが示すエリシター活性に関与している可能性が示唆された。

第四章 *E.chrysanthemi* EC16が生産するペクチン酸リアーゼアイソザイムの機能解析

1. 緒言

*E.chrysanthemi*は感染に伴って複数のペクチン酸リアーゼアイソザイム(Pelアイソザイム)を生産・分泌する^{6, 32, 152)}。このうち、病原性に最も重要な役割を果たす

PelA、B、C、DおよびEは、その塩基配列の相同性および基質分解特性からPelADEおよびPelBCの二つのサブファミリーに類別される^{5,6,133,153} (第1-1表, 第4-1図)。Tardyら¹⁴⁷は、*E. chrysanthemi* 3937が生産する上記5つのPelアイソザイムの生化学的特性を検討し、基本的な酵素化学的特性には大きな差がないことを明らかにした。一方、Androら¹¹およびBeaulieuら¹⁶⁰は、これら個々のPelアイソザイムが病原性に果たしている相対的な貢献度を明らかにするため、各pelアイソザイム遺伝子の欠損株を作成し、変異株の病原性を調べた結果、病原性の程

度は欠損させたPelの植物組織分解能とは必ずしも一致しないことを認めた。このように、複数存在するPelアイソザイムが実際の感染場面でのどのように機能分担しているかについては未だ不明な点が多く、また、遺伝子レベルでの十分な検討も行われていない。

そこで、本章では、*E. chrysanthemi* EC16が生産するPelA、B、CおよびEが病原性を発揮する上でそれぞれどのように機能分担しているのかを明らかにするため、*in vitro*におけるPel活性の比較に加えて、植物組織分解能およびエリクター活性の二つのバイオアッセイ系を

Isozymes					Res. #	
PelC:	ATDT-----	-----G	GYAA----TA	GGNVTGAV--	---SKTATSM	26
PelB:	-ADT-----	-----G	GYTK----TD	GGDVSGAV--	---KKTASSM	25
PelA:	-----AELVSD	KALES-APTV	GWASQNGFTT	GGAA-----AT	SDNIYIVTNI	41
PelE:	-----	-AVETDAATT	GWATQNGGTT	GGAK-----	AAKAVEVKN I	33
					*	
PelC:	QDIVNIIDAA	RLDANGKKVK	GGA---YPL	VITYTGNEDS	LINAAAANIC	72
PelB:	QDIVNIEAA	KVDANGKKVK	GGA---YPL	VITYTGNEDS	LINAAAANIC	71
PelA:	SEFTSALS--	-----	---AGAEAK	IIQIKGT---	-----	62
PelE:	SDFKKALN--	-----	---GTDSSAK	IIKVTGP---	-----	65
					*	
PelC:	GQWSKDPRG-	-----	-----V	EIKEFTK--G	ITIIGANGS-	99
PelB:	GQWSKDARG-	-----	-----V	EIKDFTK--G	ITIIGANGS-	98
PelA:	-----I	DISGGTPYTD	FADQKARSQI	NI-----PAN	TTVIGLGTDA	98
PelE:	-----I	DISGGKAYTS	FDDQKARSQI	SI-----PSN	TTIIGVGSNG	91
					★	
PelC:	SAN-FGIWI-	--KKSSDVVV	QNMRIQY-LP	GGAK-----	-----DGD	131
PelB:	SAN-FGIWI-	--VNSSDIVV	RNMRIQY-LP	GGAQ-----	-----DGD	130
PelA:	KFINGSLIID	GTDGTNNVII	RNVYIQ-TPI	D---VEPHYE	KGDGWNAEWD	144
PelE:	KFTNGSLVI-	--KGVKNVIL	RNLYIE-TPV	D---VAPHYE	SGDGWNAEWD	134
					*	
PelC:	MIRVDDSP-N	VWVDHNELEFA	ANHECDGTPD	NDT-----	-----	163
PelB:	MFRIDNSP-N	VWLDHNELEFA	ANHECDGTKD	GDT-----	-----	162
PelA:	ANNITNGAHH	VWIDHVTISD	-----	---GNFTDDM	YTTKDGETYV	181
PelE:	AAVIDNST-N	VWVDHVTISD	-----	---GSFTDDK	YTTKDGEEKYV	170
					*	
PelC:	TFESAVIDIKG	ASNTVTVSYN	YIHGVKKVGL	DGSSSSDTG-	-----RN	204
PelB:	TFESAIDIKK	GATYVTISYN	YIHGVKKVGL	SGFSSSDTAE	-----RN	204
PelA:	QHDGALDIKR	GSDYVTISNS	LIDQHDKTML	IGHNDT----	NSAQDKGKLG	227
PelE:	QHDGALDIKK	GSDYVTISYS	RFELHDKTIL	IGHSDS----	NGSQDSGKLR	216
					*	
PelC:	ITYHHNYND	VNARLPLQRG	GLVHAYNNLY	TNI-----	-TGSGLNVRQ	246
PelB:	ITYHHNIYSD	VNARLPLQRG	GNVHAYNNLY	TGI-----	-TSSGLNVRQ	246
PelA:	VTLFNNVFN	VTERAPRVRY	GSIHFSNNVF	KG-DAKDPVY	RYQYSFGIGT	276
PelE:	VTFHNNVFD	VTERAPRVRF	GSIHAYNNVY	LG-DVKHSVY	PYLYSFGGLGT	265
					*	
PelC:	NGQALIENNW	FEKAI-----	-----	---NPVTSRY	DGKNFG---T	275
PelB:	NGKALIENNW	FENAV-----	-----	---SPVTSRY	DGSNFG---T	275
PelA:	SGSVLSEGN	FTI--ANL--	-----SAS	KACKVVKKF-	-----NGSI	308
PelE:	SGSILSESNS	FTL--SNLKS	IDGKNPE---	---CSIVKQF-	-----NSKV	301
					*	
PelC:	WVLKGNNTK	PADFSTYSIT	WTADTKPYVN	ADSWTS----	-----T	312
PelB:	WVLKGNNTK	PADFATYNIT	WTPDTKEYRN	ADTWTS----	-----T	312
PelA:	FSDNGSVL--	-----	-----	-----NGSA	-VDLSGCGFS	329
PelE:	FSDKGS LV--	-----	-----	-----NGST	TTKLDTCGLT	323
					*	
PelC:	GTF-PTVAYN	YSPVSAQCV-	--KDKLPGYA	GVGKNLATLT	STACK	353
PelB:	GTY-PTVPYS	YSPVSAQCV-	--KDKLANYA	GVGKNLATLA	SSACK	353
PelA:	AY-TSKIPYI	YDVQPMT--T	ELAQSITDNA	GSGKL-----	-----	361
PelE:	AY-KPTLPYK	YSAQTMT--S	SLATSINNNA	GYGKL-----	-----	355

第4-1図 *E. chrysanthemi* EC16が生産する4種のペクチン酸リアーゼアイソザイム(PelA, B, C, E)の3次元立

体構造に基づいたアミノ酸配列アライメント^{56, 58)}
 ★および☆はそれぞれPelタンパクファミリーで不変および保存されているアミノ酸残基、*はジスルフィド結合Cys残基、ゴシック体はPelスーパーファミリーで高度に保存されているVWIDH領域のアミノ酸残基およびアンダーラインはPelAとPelEとで3次元立

構造上顕著に異なるアミノ酸配列をそれぞれ示す。

用いて各Pelアイソザイムの機能評価を行った。また、PelCとは異なるサブグループに属するPelEに、PelC同様の部位特異的変異を導入するとともに、各pelアイソザイム遺伝子を相互に連結したキメラpel遺伝子を作成し、得られた変異PelEおよびキメラPelタンパクの機能解析についても併せて行った。

2. 材料および方法

(1) Pelアイソザイムの大腸菌による大量発現

個々のPelアイソザイムを効率よく大量に得るため、野生型PelCで用いたT7発現ベクター、pRSET5aに各Pelアイソザイム遺伝子を組み込んだ¹⁴⁰⁾。第4-1表に用いた大腸菌の系統およびプラスミドについて取りまとめた。pelBおよびpelEは、それぞれpPEL344およびpPEL741からXba I-HindIII断片を直接サブクローニングした。pelAについては、pPEL812をSac Iで、pRSET5aをHindIIIでそれぞれ切断した後、T4DNAリガーゼにより平滑末端化した。次に、目的のpelAを含む挿入断片がベクターのT7プロモーターに関して正方向に連結するよ

う平滑末端化した断片をそれぞれXba Iにより切断し、これら二つのDNA断片を連結することによりpRSET812を構築した。

(2) pelEの部位特異的変異体の作成

pelEへの部位特異的変異の導入は、変異pelCの場合と同様にオーバーラップエクステンション(OLE)法により行った(第II章第1節)。変異は、PelEにおけるPelスーパーファミリーの不変アミノ酸残基であるAsp134とArg230および保存アミノ酸残基であるAsp173の3残基を対象に(第4-1図、第1-2表)⁵⁸⁾、それぞれ保存的(D134EおよびR230K)および非保存的(D173NおよびR230L)に置換した。変異導入に使用したオリゴDNAプライマーについては第4-2表に取りまとめた。2次PCRで得られた増幅DNA断片はXba IおよびHindIIIにより切断後、pRSET5aの同じ部位に挿入した。得られた変異pelE内に導入した部位特異的変異および翻訳全領域の塩基配列については、Taq Dye Deoxy Terminator法によるサイクルシーケンス(使用機種:ABI373S、パーキンエルマー社)で確認した。

第4-1表 使用した大腸菌系統およびプラスミド

項目	特 性	出 典
[大腸菌系統]		
HMS174 (DE3)	F- <i>recA r-K12 m+K12 Rif^r</i> (T7 lysogen) ¹⁾	Studier <i>et al.</i> 1990 ¹⁴³⁾
[プラスミド]		
pPEL812	<i>pelA</i> を含むpINK1コンストラクト	Tamaki <i>et al.</i> 1988 ¹⁴⁴⁾
pPEL344	<i>pelB</i> を含むpINK1コンストラクト	Keen <i>et al.</i> 1986 ⁷²⁾
pPEL410	<i>pelC</i> を含むpINK1コンストラクト	Tamaki <i>et al.</i> 1988 ¹⁴⁴⁾
pPEL748	<i>pelE</i> を含むpINK1コンストラクト	Keen <i>et al.</i> 1986 ⁷²⁾
pPEL781	キメラ遺伝子pel EA (pINK1コンストラクト)	Tamaki <i>et al.</i> 1988 ¹⁴⁴⁾
pRSET5a	発現ベクター (T7 RNAポリメラーゼプロモーターおよびアンピシリン耐性遺伝子を持つ)	Schoepfer 1993 ¹⁴⁰⁾
pRSET812	<i>pelA</i> 発現ベクター。pPEL812から切り出した <i>pelA</i> を含む1.4-kbpのDNA断片をpRSET5aに組み込んだもの。	本研究
pRSET344	<i>pelB</i> 発現ベクター。pPEL344から切り出した <i>pelB</i> を含む1.4-kbpのDNA断片をpRSET5aに組み込んだもの。	本研究
pRSET405ΔPst	<i>pelC</i> 発現ベクター。pPEL405から切り出した <i>pelC</i> を含む1.4-kbpのDNA断片をpRSET5aに組み込んだもの。	Kita <i>et al.</i> 1996 ⁸¹⁾
pRSET748	<i>pelE</i> 発現ベクター。pPEL748から切り出した <i>pelE</i> を含む1.2-kbpのDNA断片をpRSET5aに組み込んだもの。	本研究
pRSET-BC	<i>pelB</i> と <i>pelC</i> をvWiDH領域で結合したキメラ遺伝子 <i>pelBC</i> をpRSET5aに組み込んだ <i>pelBC</i> 発現ベクター	本研究
pRSET-CE	<i>pelC</i> と <i>pelE</i> をvWiDH領域で結合したキメラ遺伝子 <i>pelCE</i> をpRSET5aに組み込んだ <i>pelCE</i> 発現ベクター	本研究
pRSET-EA	<i>pelEA</i> 発現ベクター。pPEL781から切り出した <i>pelEA</i> を含む1.4-kbpのDNA断片をpRSET5aに組み込んだもの。	本研究
pRSET-EB	<i>pelE</i> と <i>pelB</i> をvWiDH領域で結合したキメラ遺伝子 <i>pelEB</i> をpRSET5aに組み込んだ <i>pelEB</i> 発現ベクター	本研究
pRSET-EC	<i>pelE</i> と <i>pelC</i> をvWiDH領域で結合したキメラ遺伝子 <i>pelEC</i> をpRSET5aに組み込んだ <i>pelEC</i> 発現ベクター	本研究

¹⁾ *lacI*遺伝子、*lacUV5*プロモータ、*lacZ*遺伝子の上流部分およびT7RNAポリメラーゼ遺伝子が組み込まれた溶原菌系統

第4-2表 使用したオリゴDNAプライマー

項目	塩基配列	出典
マッチプライマー		
T7F	sense 5' -AATACGACTCACTATAG-3'	本研究
T7R	antisense 5' -GTTATGCTAGTTATTGCTC-3'	本研究
FB600	sense 5' -CTGGATCGTCAACTCTTC-3'	本研究
FC600	sense 5' -CAACTTCGGCATCTGGAT-3'	Kita et al.1996 ⁸¹⁾
FE400	sense 5' -ACGTTATCCTGCGTAACCTG-3'	本研究
ミスマッチプライマー		
D134E	antisense 5' -TAACGGCTGCTTCCCACTCG-3'	本研究
D173N	antisense 5' -AGTGCGCCGTTGTGCTGAAC-3'	本研究
R230K	antisense 5' -ACGCGCGGGGCCTTTTCAGTCAC-3'	本研究
R230L	antisense 5' -ACGCGCGGGGCAAGTTTCAGTCAC-3'	本研究
キメラPel作成用プライマー		
OLCF	sense 5' -GTCTGGGTTGACCATAAC-3'	本研究
OLCR	antisense 5' -TGGTCAACCCAGACATTCGG-3'	本研究
OLEF	sense 5' -GTCTGGGTTGACCACGTCACC-3'	本研究
OLER	antisense 5' -TGGTCAACCCAGACGTTG-3'	本研究

※DNA塩基配列の下線部は、置換したアミノ酸残基に対応するコドンで、ゴシック体は野生型*pelE*に対してミスマッチさせた塩基を示す。

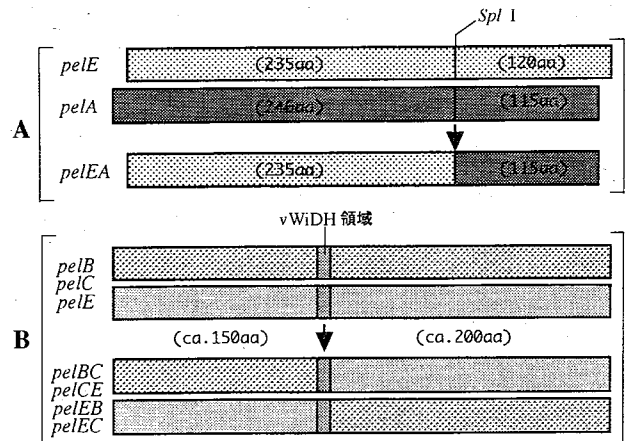
(3) キメラ*pel*遺伝子の作成

キメラ*pel*遺伝子は共通する制限酵素部位の利用(*pelEA*)およびOLE法(*pelBC*、*pelCE*、*pelEB*および*pelEC*)によって作成した。用いた材料の入手先および主要特性等については第4-2表に取りまとめた。

*pelEA*では、共通する制限酵素部位として*pelA*および*pelE*の終止コドン上流約500bpに共通して存在する*Spl*I部位を選び、*pelA*を含むpPEL812の*Xba*I-*Spl*I断片を*pelE*を含むpPEL748のそれと置換することにより*pelEA*を作成し(第4-2図)、*pelEA*コンストラクトとしてpPEL781を構築した。このpPEL781から*Xba*I-*Hind*III断片を切り出し、pRSET5aの同じ部位にリクロニングすることにより、*pelEA*のT7発現コンストラクトであるpRSET-EAを作成した。

pelBC、*pelCE*、*pelEB*および*pelEC*の作成には、*pelC*と*pelE*に共通するvWiDH領域に、それぞれ対応したセンス(OLCF、OLEF)およびアンチセンス(OLCR、OLER)の22merのオリゴDNAプライマーを作成した(第4-2表)。

1次PCRでこれらのプライマーとユニバーサルプライマーを組み合わせ、pRSET344、pRSET405 Δ*Pst*およびpRSET748を鋳型にvWiDH領域の上流および下流DNA断片をそれぞれ増幅した。得られた1次PCR産物をアガロース電気泳動で分離し、増幅DNA断片を切り出した後、目的とするキメラ*pel*遺伝子の組み合わせに応じて上流および下流DNA断片をそれぞれ50ngづつ混合し、



第4-2図 ペクチン酸リアーゼアイソザイム間で作成したキメラ遺伝子の構造

A: *pelA*と*pelE*に共通する制限酵素部位(*Spl*I)を利用して作成した*pelEA*、B: オーバーラップエクステンション法により*pelB*、*pelC*および*pelE*をPelスーパーファミリーで高度に保存されているvWiDH領域で連結して作成した*pelBC*、*pelCE*、*pelEB*および*pelEC*

センスおよびアンチセンスのユニバーサルプライマーを用いて2次PCRを行い、キメラ*pel*遺伝子の全領域を含むDNA断片を増幅した。得られた2次PCR産物を再びアガロース電気泳動で分離し、目的とする増幅DNA断片を切り出し、*Xba*I-*Hind*IIIで2重消化した後、pRSET5aの同じ部位に組み込んだ。なお、1次および2次PCRいずれについても、変性96°C/30秒、アニーリング45°C/30秒、伸長72°C/4分で30サイクル反応させた。得られたすべてのキメラ*pel*遺伝子の全領域の塩基配列は、Taq Dye Deoxy Terminator法によるサイクルシーケ

ンス（使用機種：ABI373S、パーキンエルマー社）で確認した。

(4) Pelアイソザイム、変異*pelE*およびキメラ*pel*遺伝子の発現解析、純化および機能評価

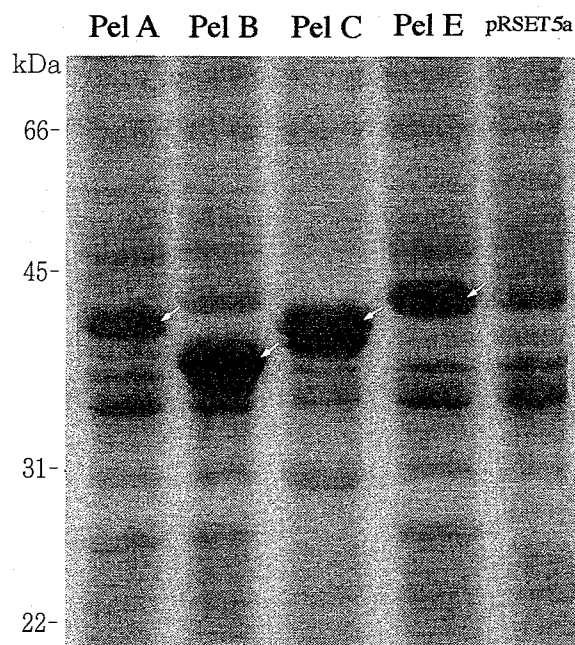
Pelアイソザイム、変異*pelE*およびキメラ*pel*遺伝子は、いずれも変異PelCタンパクの機能解析で用いた溶原大腸菌系統HMS174(*DE3*)を用いて大量発現させた。発現したタンパクのうち、PelA以外については、第II章第2節の方法にしたがって大腸菌のペリプラズムから回収し、CMセルロースカラムクロマトグラフィーにより純化した。一方、酸性タンパクのPelAについては、透析したペリプラズム画分をセントリコン10（アミコン社）を用いて1.7Mの硫酸アンモニウム溶媒に置換し、吸光度 A_{280} で1.0まで濃縮した。この濃縮サンプルを、疎水性フェニルスーパーロースを充填したミニカラム「PC1.6/5」を装着したスマートシステム（アマシャム・ファルマシア社）を用いて、20分間で1.7から0Mまでの硫酸アンモニウムグラジエント溶出により分画した。得られた主要ピークフラクションのPel活性を調べるとともにSDS-PAGEによりPelAの存在と純度を確認した。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)、Pel活性、植物組織分解能、エリクター活性および等電点電気泳動(IEF)については、それぞれ第III章第1、2、3、4および5節の方法に従って行った。メチル化度の異なるPGAに対するPel活性の測定には、基質として28、64、93および98%メチル化したPGA（シグマ社）を用いた。

3. 結果

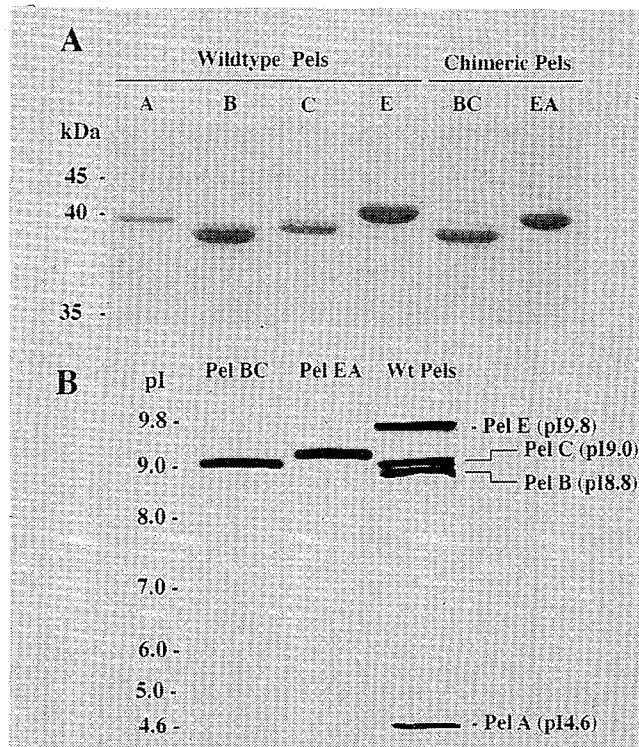
(1) Pelアイソザイムの特性と機能

Pelアイソザイム遺伝子をT7発現ベクターであるpRSET5aに組み込み、大腸菌で発現させたところ、いずれのPelアイソザイムとも目的とする大きさのタンパクが発現した（第4-3図）。これら的大腸菌で多量発現させたPelアイソザイムは、いずれもペリプラズムから回収され、PelB、CおよびEについてはCMセルロースカラムクロマトグラフィーによって、また、PelAについては疎水カラムクロマトグラフィーによって純化することができた（第4-4図A）。純化したこれらのPelアイソザイムのpIを測定したところ、これまで報告されているとおり、酸性タンパクのPelAはpI4.6を、また、塩基性タンパクであるPelB、PelCおよびPelEは、それぞれ8.8、9.0および9.8を示した（第4-3表、第4-4図B）⁵⁾。

純化したPelアイソザイムについて、変異PelCと同じ



第4-3図 T7発現システムによりPelA、B、CおよびEを大量発現させた大腸菌HMS174(*DE3*)の全発現タンパクのSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動像
矢印は、それぞれ発現したPelA、B、CおよびEタンパクを示す。レーン右端は、発現ベクターとして用いたpRSET5aのみで発現を誘導したもの。



第4-4図 大腸菌で発現させ、回収・純化した野生型Pelアイソザイムおよびそのキメラ酵素タンパクのSDSポリアクリルアミドゲル (A) および等電点 (B) 電気泳動像

A：A、B、C、Eは、それぞれPelA、PelB、PelCおよびPelEを、また、BCおよびEAはそれぞれPelBCおよびPelEAを示す。

B：レーン左からPelBC、PelEAおよび野生型Pelアイソザイムの泳動像を示す。括弧内に各野生型PelアイソザイムのpI値を示した⁵⁾。

手法により機能解析を行った結果を第4-3表に示した。各PelアイソザイムのPel活性について検討したところ、pI値にかかわらず、いずれのPelアイソザイムともpH9.0を中心とするpH8.5~9.5の塩基性域を至適pHとし、各至適pHを頂点とするシャープなpHプロフィールを示した(第4-5図)。次に、Pelアイソザイム間で共通するpH9.0におけるPel比活性について調べた。その結果、PelAは1,200U/mgと他のPelアイソザイムに比べやや低いものの、PelB、PelCおよびPelEは、それぞれ1,500、1,800および1,700U/mgといずれも同レベルのPel比活性を示した。これに対し、エリクター活性については、Pelアイソザイム間で全く差は認められず、いずれのPelアイソザイムとも吸光度 A_{285} で0.876~0.980を示した。

キュウリ皮層組織を用いた植物組織分解能では、Pelアイソザイム間に著しい差が認められた。すなわち、PelAは1 μ g/mlの濃度で500mgのキュウリ皮層組織を1時間、37°Cで処理したときに40mgの組織しか軟化・分解できなかったのに対し、同じ濃度のPelBおよびPelCはいずれもその10倍の410、および420mgの組織を軟化・分解した。さらにPelEは、0.1 μ g/mlの濃度で430mgの組織を軟化・分解したことから植物組織分解能の相対値は4,300mgとなり、PelBおよびPelCの10倍、PelAの実に100倍の値を示した(第4-3表)。

第4-3表 *E. chrysanthemi* EC16が生産するPelアイソザイムの特性比較

酵素タンパク	アミノ酸残基数 ¹⁾	分子量(Da)	pI	Pel比活性		植物組織分解能 ³⁾	エリクター活性 ⁴⁾
				至適pH	活性 ²⁾		
[アイソザイム]							
PelA	361	38,758	4.6	9.0	1200	40	0.914
PelB	353	37,942	8.8	9.0	1500	410	0.977
PelC	353	37,676	9.0	9.5	1800	420	0.978
PelE	355	38,037	9.8	9.0	1700	4300	0.876
[キメラ酵素]							
PelBC	352	37,718	9.05	9.0	1400	420	0.980
PelEA	350	37,415	9.3	8.5	1500	180	0.944

¹⁾成熟タンパクのアミノ酸総数、²⁾pH9.0の50mM Bis-Tris-Propane 緩衝液を用いた時の値(U/mg of protein)、³⁾1 μ g/ml濃度の酵素溶液(pH7.0)にキュウリ皮層組織500mgを37°C、1時間浸漬処理したときの損失量(mg)を示す。PelAおよびPelEについては、酵素溶液をそれぞれ0.1および10 μ g/mlの濃度で処理し、これを1 μ g/ml濃度あたりの数値に換算して示した。⁴⁾ダイズ子葉検定での A_{285} 値

植物組織分解能に認められたPelアイソザイム間での大きな差を明らかにするため、単位ガラクトロン酸のカルボキシル基のメチル化度が異なるポリガラクトロン酸

(PGA)に対するPel活性をpH9.0で測定した。第4-4表にその結果を取りまとめたが、いずれのPelアイソザイムとも28%メチル化したPGAに対して最も高いPel活性を示し、64%メチル化したPGAに対してもメチル化度0%のPGAと同レベルのPel活性を示した。93%メチル化したPGAに対しても0%の時の20~30%のPel活性を示したものの、98%以上メチル化されているlink pectinに対しては、トレース程度のPel活性しか認められなかった。これらの結果から、Pelアイソザイムは少なくともPGAが50%以上メチル化していても基質として利用できることが明らかになった。

Pel活性が最も高くなった28%メチル化PGAに対するPel比活性をPelアイソザイム間で比較したところ、PelEが3,400U/mgと最も高く、PelCが3,000U/mgでこれに次いだ。一方、PelBのPel比活性は2,100U/mgとPelEおよびPelCよりやや低く、また、PelAのPel比活性は1,700U/mgでPelEの1/2程度となった。PelAのPel比活性は全体に低いものの、メチル化度が0から63%まで間では、30%程度の差しか認められず、他のPelアイソザイムに比べ、基質のメチル化度の影響を受けにくいことが明らかになった。このことから、PelAは他のPelアイソザイムに比べ基質特異性が低いものと考えられた。

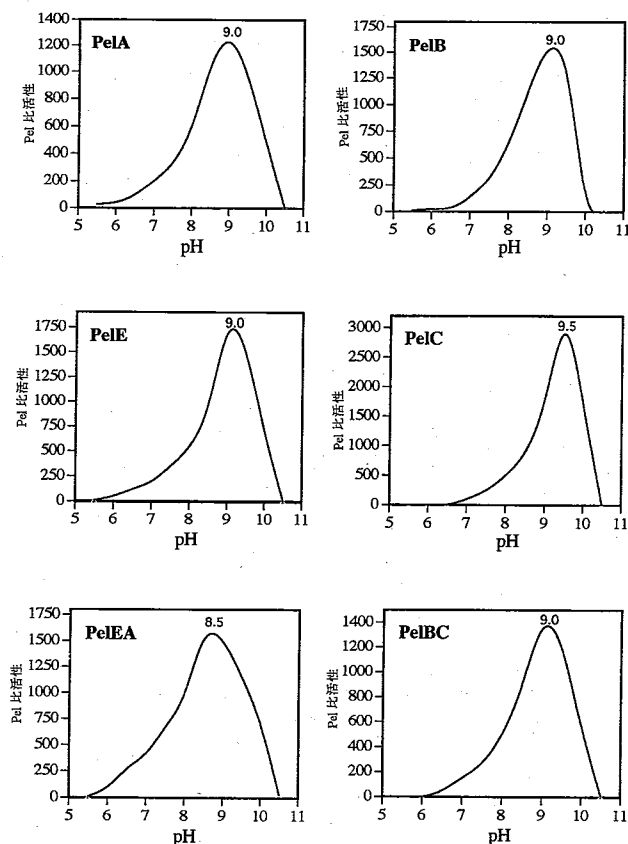
第4-4表 ポリガラクトロン酸(PGA)のメチル化度が *E. chrysanthemi* EC16が生産するPelアイソザイムおよびそのキメラ酵素のPel活性に及ぼす影響

酵素タンパク	PGAのメチル化度別のPel比活性 ¹⁾				
	0%	28%	64%	93%	98%
[アイソザイム]					
PelA	1200	1700	1300	400	<4
PelB	1500	2100	1500	300	<3
PelC	1800	3000	1800	200	<5
PelE	1700	3400	1400	200	<3
[キメラ酵素]					
PelBC	1400	1800	400	50	<3
PelEA	1500	2100	3700	500	<3

¹⁾pH9.0の50mM Bis-Tris-Propane 緩衝液を用いたときの値(U/mg of protein)

(2) 部位特異的変異PelEの機能解析

前項で、PelADE群に属するPelEは他のPelアイソザイムと比較して特徴的に高い植物組織分解能を有していることが明らかになった。Pelアイソザイム間でメチル化度の異なるPGAに対するPel活性には有意な差が認められないことから、PelEにはPel活性の中心が3次元立体構造解析により予想されたCa²⁺結合部位以外にも存在するのではないかという可能性が考えられた。そこで、PelEのCa²⁺結合部位に位置し、Pelファミリー内で不変



第4-5図 *E.chrysanthemi* EC16が生産する4種のPelアイソザイム(PelA,B,C,E)およびそのキメラ酵素(PelBC,PelEA)のPel活性におけるpHプロフィールグラフ内の数字は、至適pHを示す。比活性の単位は、U/mg of protein。

な(Asp134, Arg230)あるいは高度に保存されている(Asp173) アミノ酸残基に注目し⁵⁸⁾、D134E、D173N、R230KおよびR230Lの4つの変異*pelE*を作成した。これらの変異*pelE*は、変異*pelC*と同様にpRSET5aに組み込み、T7発現システムにより大腸菌を用いて変異PelEタンパクを大量発現させたところ、可溶性タンパクとして回収・純化することができた。

純化した変異PelEの特性を各変異体に対応する変異PelCホモログと比較させて第4-5表に取りまとめた。pI値については、R230Lが変異PelCのR218Lと同様、野生型の9.8よりやや低い9.5を示したが、それ以外の変異PelEは野生型と同じpI値を示した。これに対し、Pel活性は、いずれの変異PelEとも変異PelCホモログと同様に完全に消失した。また、キュウリ皮層組織を用いた植物組織分解能は、いずれの変異PelEとも野生型PelEの4,300mgに比べると4%以下の著しく低い値しか有していなかった。このことから、PelEの活性中心は、3次元立体構造解析で予測されたCa²⁺結合部位に1カ所のみ存在することが示された(第4-5表)。

第4-5表 PelCおよびPelEのCa²⁺結合部位周辺に位置する相同アミノ酸残基における部位特異的変異体の特性比較

酵素タンパク	Pel比活性 ¹⁾	植物組織分解能 ²⁾	エリクター活性 ³⁾
PelC/野生型	1 8 0 0 (100)	4 2 0 (100)	0. 9 7 8 (100)
PelE/野生型	1 7 0 0 (100)	4 3 0 0 (100)	0. 8 7 6 (100)
PelC/D 1 3 1 E	< 2 (0.1)	< 3 (0.7)	0. 2 0 1 (21)
PelE/D 1 3 4 E	< 1 0 (0.6)	1 7 0 (4.0)	0. 9 2 9 (106)
PelC/E 1 6 6 Q	< 1 (<0.1)	< 3 (0.7)	0. 1 3 6 (14)
PelE/D 1 7 3 N	< 3 (0.2)	8 0 (2.0)	0. 5 9 1 (67)
PelC/R 2 1 8 K	< 1 5 (1)	< 8 (2.0)	0. 1 1 2 (11)
PelE/R 2 3 0 K	< 1 (<0.1)	8 0 (2.0)	0. 5 6 5 (64)
PelC/R 2 1 8 L	< 5 (0.3)	< 5 (1.2)	0. 1 2 9 (13)
PelE/R 2 3 0 L	< 1 (<0.1)	4 0 (1.0)	0. 2 8 3 (32)

¹⁾ pH9.0における値(U/mg of protein)、²⁾ 1 μg/mlの酵素溶液(pH7.0)でキュウリ皮層組織を37°Cで1時間浸漬処理したときの損失重量(mg/500mg)、³⁾ ダイズ子葉検定法でのA₂₈₅値。()は、各野生型に対する百分比を示す。

一方、植物組織分解能の実数値について注目してみると、変異PelEと同じタイプの変異PelCホモログでは、Pel活性の消失に伴って植物組織分解能も完全に失われたのに対し、変異PelEでは、D134Eで170mg、D173NおよびR230Kで80mgおよびR230Lでも40mgを示すなど、実数値としては明らかに植物組織分解能が維持されていた。これらの変異PelEが示す植物組織分解能を野生型PelAの40mgと比較してみると、それと同等(R230L)かその2倍(D173N、R230K)ないし3倍(D134E)も高い植物組織分解能を有していることになる。変異PelEにおいて植物組織分解能が維持されたことは、ダイズ子葉を用いたエリクター活性にも影響した。すなわち、いずれの変異PelEとも変異PelCホモログと比較して顕著に高いエリクター活性を示した。このエリクター活性の程度は、変異PelCと同様、植物組織分解能が高い変異PelEほど高くなったが、特に、植物組織分解能170mgを示したD134Eは、野生型と同レベルのエリクター活性(A₂₈₅=0.929)を示した。

以上のように、変異PelEでは変異PelCとは異なり、Pel活性は失われているが植物組織分解能およびエリクター活性はある程度維持されていることが明らかになった。

(3) キメラPelの機能解析

*pelBC*と同じ*vi*領域で異なるPelサブグループに属する*pelB*と*pelE*および*pelC*と*pelE*を相互に連結した

pelBE、*pelCE*および*pelEC*では、いずれもキメラPelタンパクは発現しなかった。同じPelサブグループに属するPelAとPelEとでは、アミノ酸レベルで62%、PelBとPelCとでは84%の相同性があるのに対し、異なるPelサブグループに属するPelCとPelEおよびPelBとPelEとでは、それぞれ22%および21%の低い相同性しかない(第4-1図)。したがって、発現が認められなかったキメラ*pel*遺伝子については、翻訳されたとしても宿主大腸菌に不完全な異質タンパクとして認識され、発現過程ですみやかに分解されてしまったものと考えられた。

一方、塩基性タンパクのPelEのC末端1/3の120アミノ酸残基(aa)を、対応する酸性タンパクのPelAの116aaと置換して作成した*pelEA*およびN末端よりの1/3付近に位置するvWIDH領域で*pelB*と*pelC*を連結した*pelBC*では、予測される大きさのキメラ酵素タンパクが発現し、いずれも大腸菌のペリプラズムから野生型同様に分離・純化された(第4-4図A)。pI値は、PelBCではPelCよりわずかに高い9.05を、PelEAはPelEのpI9.8に近いpI9.3を示した(第4-4図B、第4-3表)。Pel活性におけるpHプロフィールは、PelBCがPelBと同じpH9.0を至適pH値を頂点とするシャープなpHプロフィールを示したのに対し、PelEAはpH8.5から9.0の間を至適域とするやや幅の広いpHプロフィールを示した(第4-5図)。pH9.0におけるPelBCおよびPelEAのPel比活性は、それぞれ1,400および1,500U/mgと、いずれもキメラ親の野生型Pelアイソザイムと同レベルであったことから、作成したキメラPelアイソザイム分子内のPel活性中心は機能的に保存されていることが明らかになった。また、PelBCとPelEAのダイズ子葉を用いたエリクター活性は、 A_{285} 値でそれぞれ0.980および0.944と差はなく、いずれもそのキメラ親と同レベルの値を示した。メチル化度の異なるPGAに対するPel活性でも、いずれもその野生型のキメラ親と同様にメチル化度28%のPGAに対し最も高いPel活性(1,800U/mg)を示した(第4-4表)。

これに対し、植物組織分解能においては、PelBCとPelEAとでその特性が大きく異なり、PelBCはキメラ親のPelBおよびPelCと同レベルの430mgの植物組織分解能を示したが、PelEAは180mgとPelAの40mgに比べるとその4.5倍にまで高まったものの、PelEの4,300mgに比べると1/20以下までに低下していた(第4-3表)。

4. 考察

*Erwinia*属の植物病原性細菌は宿主範囲が極めて広く、

特に*E. chrysanthemi*は実に23属、50種以上の植物に対して病原性を示す^{42,43}。*E. chrysanthemi*は、感染に伴って複数のペクチン分解酵素、タンパク分解酵素およびセルロース分解酵素等を分泌し、結果として植物組織を軟化させるとともにその分解産物を栄養源に増殖し、植物組織を腐敗させる^{6,32,115}。このうち、エンド型のPelアイソザイム群は、植物組織の軟化・分解の主要因として機能していることが明らかにされており^{6,32,34}、これまでに9種類以上の存在が確認されている^{132,147}。これらは、感染場面において複数の制御機構によりの確に生産・分泌がコントロールされていることから、幅広い宿主に対して病原性を発揮する上で相互に機能分担しているものと推測されている^{6,7,17,18,132}。本章では、*E. chrysanthemi* EC16が生産するPelA、PelB、PelCおよびPelEの4種類のpelアイソザイム遺伝子、部位特異的変異*pelE*およびpelアイソザイム遺伝子の組み合わせにより作成したキメラ*pel*遺伝子をT7発現システムを用いて大腸菌で大量発現させ、得られた酵素タンパクについてその機能解析を行った。

その結果、*E. chrysanthemi* EC16が生産する4種のPelアイソザイムのpI値は、PelAが酸性の4.6、PelB、PelCおよびPelEがそれぞれ8.8、9.0および9.8と塩基性を示したものの、至適pH、Pel活性およびエリクター活性には大きな差は認められなかった。しかし、植物組織分解能については、PelEはPelBおよびPelCの10倍の、また、PelAの100倍もの値を示した。この植物組織分解能における著しい差は、立体構造解析から推定されているPelEの活性中心が正しくないか、または異なる基質特異性を有しているかの二つの可能性が考えられた。

そこで、3次元立体構造が明らかにされているPelEについて、PelC同様にその活性中心と予測されているCa²⁺結合部位の不変(Asp134、Arg230)あるいは保存アミノ酸残基(Asp173)に変異を導入したところ、いずれの変異PelE(D134E、D173N、R230KおよびR230L)ともそのPel活性を失った。このことから、PelEの活性中心は、当初の予測どおりCa²⁺結合部位1カ所のみであること^{94,95}が確認された。そこで、PelAおよびPelBについても、その活性中心はカルシウム結合部位1カ所であることおよびPel活性に直接関与する活性アミノ酸残基とその機能は同じであるものと考えられた。

以上のように、*in vitro*におけるPel活性については、Pelアイソザイム間に微妙な差が認められたのみであったが、植物組織分解能においては極めて興味深い結果が得られた。すなわち、Ca²⁺結合部位に作成した4つの

変異PelEの植物組織分解能は、いずれも野生型PelEに比べ、その2%以下と著しく低下していたものの、実数値ではPelAと同等かそれ以上の植物組織分解能を維持していた。これらの変異PelEのエリクター活性は全体に高く、特にD134Eは野生型と同等のエリクター活性を示した。また、PelCの部位特異的変異体の機能解析では、Pel比活性の高さと植物組織分解能とが極めて良く一致したが、PelアイソザイムおよびそれらのキメラPel酵素間で比較すると、Pel比活性と植物組織分解能とは必ずしも一致しなかった。これらの結果は、Pelアイソザイム間で最適な基質が相互に異なる可能性を強く示唆している。そこで、3次元立体構造が明らかにされているPelCとPelEのスペースフィリングモデルを比較してみると、PelCでは荷電した側鎖を有する酸性および塩基性アミノ酸がCa²⁺結合部位を含むクレフト部に集中しているのに対して、PelEではそれが分子表面全体にランダムに分散していることがわかる(第1-3図)。このことは、PelEはPelCに比べて構造的に変異の幅の広い基質に対しても結合できる可能性を示唆している。実際に、Prestonら¹²⁰⁾は、PelアイソザイムのPGA分解産物分析で、PelBおよびPelCは不飽和ガラクトン酸1分子を含む3量体の、また、PelAおよびPelEは同2量体のオリゴガラクトン酸を最終分解産物とすること、およびPelAによる分解産物には比較的長いオリゴガラクトン酸が多く含まれることなど、分解産物レベルでも基質特異性に差があることを認めている。

実際の感染場面で*E. chrysanthemi*が遭遇する植物細胞壁成分の構造は、植物種のみならず同一の植物種でもその組織、細胞単位で異なっている⁹⁷⁾。特にペクチン質を構成する単位ウロン酸分子のカルボキシル基は様々な程度でメチル化されていることが知られている^{97,105)}。Linerら⁹⁷⁾は、PelEのモノクローナル抗体を用いて、PelEが植物組織内で細胞壁を構成するペクチン質のエステル化程度の違いに応じて分布していることを示した。本章では、単位ウロン酸分子のカルボキシル基のメチル化度が異なるPGAを基質にしたときの各PelアイソザイムのPel活性について検討し、いずれのPelアイソザイムとも28%メチル化したPGAに対して最も高いPel活性を示すことを明らかにした。Tardyら¹⁴⁷⁾およびLojowskaら⁹⁹⁾も、Pelアイソザイムの特性解析において同様の結果を得ているが、本節で得られた結果をより詳しく分析してみると、Pelアイソザイムはそれぞれ微妙に異なる特性を示すことが明らかになった。Pel比活性値そのものについて見てみると、PelEはPelAの2倍

の、また、PelBの1.5倍のPel比活性を示した。一方、PelAは基質のメチル化度の影響を受けにくく、63%までのメチル化PGAに対しては安定したPel活性を示すなど、各Pelアイソザイムのメチル化PGAに対する基質特異性は個別に異なった。

PelEAは、Pelアイソザイム間の植物組織分解能の大きな差が何によるのかを示唆する極めて興味深い特性を示した。すなわち、PelEAはそのN末端から2/3のアミノ酸配列がPelE由来で(第4-2図)、pIも9.3とPelEに極めて近い値を示したにもかかわらず、その植物組織分解能はPelEの約1/20の低い値しか示さなかった(第4-3表)。このことから、PelEのC末端1/3が、PelEの高い植物組織分解能に関与している可能性が示唆された。そこで、PelEとPelAのアミノ酸配列を比較したところ、PelEのC末端から1/3の部分に、PelAには存在しないアミノ酸配列が付加されていることが明らかになった(第4-1図)。この配列は、Lys282からジスルフィド結合残基のCys290までの9つのアミノ酸残基で、PelEの3次元立体構造上では平行型βヘリックスの最上部のジスルフィド結合直前のβストランドから外側に向かうループを形成している(第1-3図)。このループは、PelCでは基質の還元末端が結合する部位に隣接していることから(第V章参照)、この部分における立体構造の差がPelAとPelEの間に認められる大きな植物組織分解能の差に関与している可能性が示唆された。

本章で作成したキメラpel遺伝子のうち、PelADEとPelBCサブファミリー間で組み合わせたpelBE、pelCEおよびpelECではキメラタンパクが生産されなかった。これに対し、各サブファミリー内のPelアイソザイム同士で連結したpelEAおよびpelBCでは、いずれも親の野生型Pelアイソザイムと同じレベルのPel比活性を有するキメラPelタンパクが生産された。このように、同じサブファミリー内ではその遺伝子構造と機能が極めて類似していることから、同一サブファミリーに属する複数のPelアイソザイムはそれぞれ同一遺伝子の重複により分化してきたものと推定された。

異なるサブグループに属するPelCとPelEの3次元立体構造を重ね合わせ、分散値が3.0Å以上異なる構造領域を抽出すると、Pelの活性中心であるCa²⁺結合部位から突出したループを含む領域が抽出される^{94,95)}。Pickersgillら¹¹⁷⁾は、彼らが分子構造を明らかにしたBsPelとPelCとを比較し、活性中心のCa²⁺結合部位が両者間で最も変化に富んでいることを明らかにした。一般に、類似した機能を有する酵素タンパクの活性中心の

構造は最も保存されているのが普通であるが^{50, 103, 106}、Pelではその活性中心およびその周辺に位置するアミノ酸残基がPelアイソザイム間で最も変化に富んでいることから、Pelにおいてはこの活性中心周辺に生じた変異によって複数のアイソザイムが分化してきたものと考えられる。

本章で得られた結果を総合すると、*E. chrysanthemi* は複数の機能が微妙に異なるPelアイソザイムを生産することによって、幅広い植物種をその宿主としていることが示唆された。

第V章 総合考察

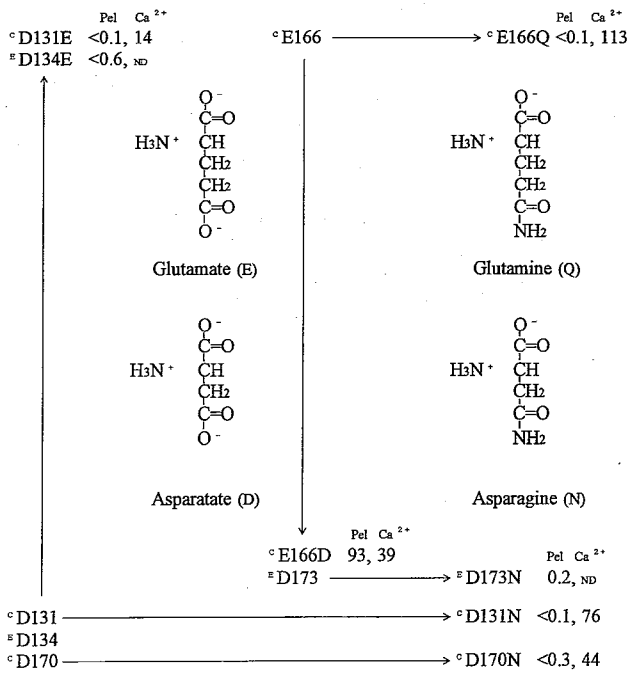
植物病原微生物と宿主植物の間には極めて多様な相互作用が存在する。親和性の組み合わせでは、病原微生物が宿主細胞あるいは組織中に侵入した後、栄養源を得て増殖し、宿主を発病へと導く。一方、非親和性の組み合わせでは、過敏反応に代表される宿主の細胞レベルでの防御反応によって病原微生物の増殖は抑えられる^{41, 78, 79}。親和性になるか非親和性になるかは、Flor⁴⁹が提唱した遺伝子対遺伝子説で説明され、一般に宿主が持つ抵抗性遺伝子と病原微生物に存在する非病原性遺伝子の相互作用によって決まる。近年では、抵抗性遺伝子と非病原性遺伝子がそれぞれ単離され、Florの遺伝子対遺伝子説が分子レベルでも正しいことが証明されている^{84, 115, 138}。このように、宿主と病原微生物間の相互認識に関するメカニズムについては分子レベルでも徐々に明らかにされてきた。しかし、実際の被害を引き起こすのは親和性の組み合わせにおける病原微生物の侵害力であり、感染に伴う被害はその侵害力の程度が大きく関与する^{84, 115}。この侵害力に関わる因子は広義の病原性因子と呼ばれ、宿主特異性は低いものの病原性を発揮する上では極めて重要な機能を果たしている。本研究で取り上げたペクチン酸リアーゼ(Pel)は、その代表的な病原性因子の一つとして位置づけられている^{6, 11, 39}。広い宿主範囲を有する*Erwinia*属の軟腐性植物病原細菌は、Pelを感染場面で的確に、かつ、爆発的に生産することによって宿主細胞壁成分であるポリガラクトロン酸(PGA)を短時間に分解し、結果として軟腐症状を引き起こす^{6, 10, 32, 84, 115, 130}。これに対し、かいよう症状を引き起こす*P. syringae*群の植物病原性細菌は、感染に際し*hrp*遺伝子産物を中心とする宿主特異性の高い病原性因子を生産・分泌することによって宿主に感染するが、感染後の病徴発現のスピードは遅く、侵害力という点では*Erwinia*属

細菌に及ばない^{11, 34}。

本研究では、*E. chrysanthemi*の侵害力を支える最も重要な病原性因子であるPelと植物との相互関係について、その酵素タンパクの3次元立体構造と機能という視点から検討を加え、Pelの活性中心を特定するとともに、植物組織分解能あるいはエリクター活性等の生物機能の特性を明らかにした。すなわち、Pelの活性中心は共同因子であるカルシウムイオン(Ca^{2+})結合部位にあること、本菌による感染組織の軟腐症状は、植物細胞壁の主要構成成分であるPGAが、Pelによって β -トランスエリミネーション分解されて引き起こされること、およびPelが有するエリクター活性には、PelによるPGAの分解産物以外にPelのタンパク構造自体も関与している可能性があることなどが明確に示された。また、Pelスーパーファミリーで高度に保存されているvWIDH領域については、Pel活性には関与していないものの、タンパクのフォールディングあるいは分泌機構に関与している可能性が示唆された。

また、*E. chrysanthemi* EC16が生産する4つのPelアイソザイムの機能解析では、Pelアイソザイム間でPel活性およびエリクター活性にほとんど差がないにもかかわらず、植物組織分解能では10から100倍もの差が存在することを見出した。これらの結果は、*E. chrysanthemi*が基質特異性が微妙に異なる複数のPelアイソザイムを進化の過程で獲得し、異なる細胞壁成分を有する幅広い宿主植物の組織を効率よく軟化・分解することによりそのニッチを維持・拡大してきたことを示唆している⁷。一方、これに対して植物は、Pelを単にその組織を軟化腐敗させる酵素として認識するだけではなく、ファイトアレキシン生産等の抵抗反応を引き起こす生物学的なシグナルとしても認識することにより、*E. chrysanthemi*の強い侵害力に対処してきたのであろう⁴¹。

Pelの基本的な機能解析にあたっては、*in vitro*におけるPel活性や Ca^{2+} 結合強度あるいは等電点といった生化学的な特性のほか、立体構造解析が進んでいるPelCの部位特異的変異体を活用し、これを補完する形でPelEの部位特異的変異体およびPelアイソザイム間のキメラPelを作成して用いた。部位特異的変異の導入には、PCRを利用したオーバーラップエクステンション法^{60, 61, 104, 107}を用い、作成した変異pel遺伝子をT7発現システム⁴³を利用して大腸菌で効率よく発現させた。また、発現タンパクは、カルボキシメチルセルロース樹脂を用いた陽イオン交換カラムクロマトグラフィーによりワンステップで回収・純化できるようにした。この系を



第5-1図 *E.chrysanthemi* EC16が生産するPelCおよびPelEの部位特異的変異体における酸性アミノ酸残基の置換形態とPel活性¹⁾およびCa²⁺結合強度¹⁾の関係

¹⁾ いずれも野生型に対する百分比(%)で、前肩字のCおよびEは、それぞれPelCおよびPelEの部位特異的変異体を示す。NDは測定せず。

用いることにより、4時間の発現誘導で11の培養菌体からおよそ6mgの純化タンパクを得ることができた。ここで開発した変異pel遺伝子の大量発現系と発現タンパクの回収・純化システムは、同じ植物軟腐性病原細菌の*E.carotovora* subsp.*carotovora*が生産するポリガラクトクトナーゼ(Peh)¹¹⁸⁾や、*Aspergillus niger*が生産するペクチンリアーゼ(Pnl)^{103,154)}等の大量発現系にも応用され、Pelと同じβロールモチーフを持つこれらのタンパクの3次元立体構造の解明のための原動力となった。

すでに述べたように、Pelは植物細胞壁の主要構成成分であるPGAをβ-トランスエリミネーション機能により分解する^{32,88,89)}。このPGAのβ-トランスエリミネーション分解は、Ca²⁺の存在下でPel分子と基質であるPGAとが結合した後、単位PGA分子のC₅炭素のプロトンが、Pel分子の活性中心付近に存在する複数のアミノ酸残基と相互作用しながらグリコシド結合部位へ移送され、C₄とC₅炭素間に二重結合を形成させて完結するものと考えられている⁶⁷⁾。この二重結合の生成に関わるプロトン移送系はプロトン移送ネットワーク (proton transfer network)と呼ばれ、触媒機能の中心を担う反応系を構成している^{47,49)}。このように、PelによるPGAのβ-トランスエリミネーション分解には、1)Ca²⁺結

合、2)基質結合および3)プロトン移送ネットワークという3つのステップが関与していることがわかる。

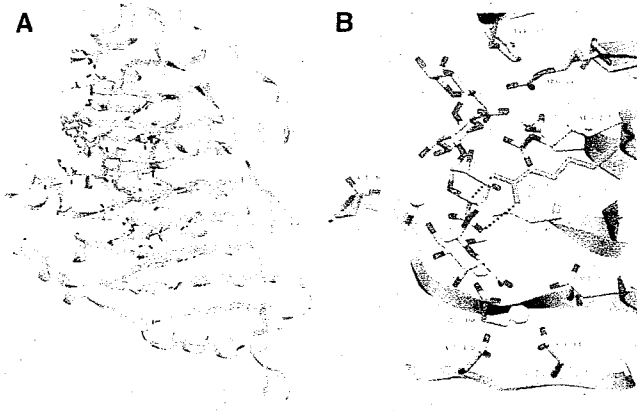
最近、Scavettaと筆者らは、Pel活性を失った変異PelCのR218Kと5分子のガラクトロン酸(GalpA)からなるガラクトロペンタオース(pentaGalpA)との酵素-基質複合体結晶を作成し、X線回折によりその3次元立体構造解析を行った¹³¹⁾。この複合体は、植物細胞壁成分を立体分子像として捉えた最初の事例であり、その複合体の構造解析から活性中心に位置する酸性および塩基性アミノ酸残基の機能が極めて明確に示された。

そこで、以下において本研究により得られた結果およびR218K-pentaGalpA複合体の立体構造解析結果をもとに、PelによるPGAのβ-トランスエリミネーション分解において中心的な役割を果たしている酸性および塩基性アミノ酸残基が、上記の3つのステップにどのように関与しているかについての構造機能相関解析を試みた。また、その解析結果からPelによるPGAのβ-トランスエリミネーション分解メカニズムを推定した。

酸性アミノ酸残基の機能

PelCおよびPelEに作成した部位特異的変異体における残基の置換形態とそのPel活性との関係を第5-1図に取りまとめた。PelCのAsp131(°D131)はPelファミリーにおける不変残基で、PelEのAsp134(°D134)がそのホモログに当たる。この残基については、電荷を消失させた°D131Nだけでなく、電荷はそのまま側鎖のメチル基を一つ多くしただけの°D131Eおよび°D134EもPel活性を失っていた。なお、°D131EはCa²⁺結合強度が野生型に比べ顕著に低下していた。一方、PelCのGlu166(°E166)およびAsp170は、Pelスーパーファミリー内ではAspまたはGluのいずれかの形で存在する保存残基で、PelEではAsp173(°D173)がそのホモログとなる^{56,58)}。これらの残基に作成した変異体のうち、側鎖のメチル基を一つ少なくした°E166Dでは野生型と同レベルのPel活性が維持されたが、電荷を消失させた°E166Q、°D170Nおよび°D173NではいずれもPel活性が消失した。また、Ca²⁺結合強度は、°E166Dおよび°E166Qいずれも野生型と同レベルで維持されていた。

R218K-pentaGalpA複合体の結晶構造解析では、R218KがCa²⁺結合部位を含むクレフトにpentaGalpAの還元末端分子を含む4分子と4つのCa²⁺を取り込んで複合体を形成していることが明らかになった(第5-2図A)。この4つのCa²⁺のうち、野生型PelCの3次元立体



第5-2図 PelCの部位特異的変異体、R218K、とガラクトフルクトロペンタオース (pentaGalpA) との複合体結晶構造 (A) および基質結合部位におけるpentaGalpA、 Ca^{2+} およびR218Kのアミノ酸残基の立体配置 (B) (Scavettaら、1999¹⁶¹)

A: R218Kの α 炭素骨格は緑のリボンで、 Ca^{2+} は黄色球で、また、結合するtetraGalpA (淡青) およびこれらと相互作用するアミノ酸残基はロッドで表示し、炭素原子は灰色、酸素原子は赤、窒素原子は青とし、ジスルフィド結合を黄色で示した。

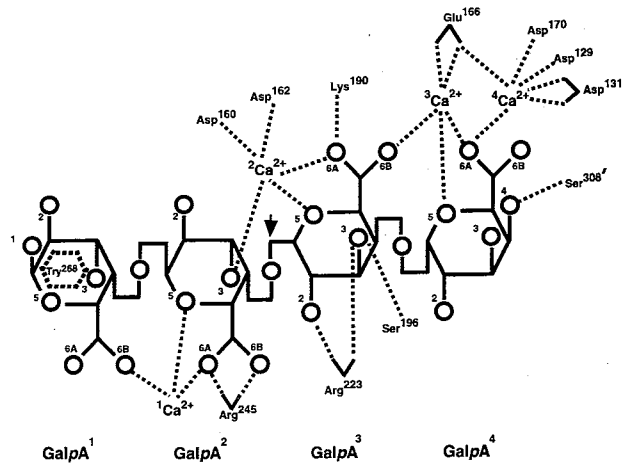
B: R218Kと結合したtetraGalpAはロッド表示で、炭素原子は灰色、酸素原子は赤とした。それ以外はAと同じ。

構造解析で予測された Ca^{2+} 結合部位には4番目の Ca^{2+} が位置するとともに、還元末端から4番目のGalpA分子とも配位結合していることが明らかになった (第5-2図B、第5-3図)。Asp129、Asp131およびAsp170は、予想どおり直接この4番目の Ca^{2+} と配位結合し、また、Glu166はこの4番目の Ca^{2+} のみならず、隣接する3番目の Ca^{2+} とも直接配位結合していた (第5-3図)。

以上の結果を総合すると、活性中心付近に位置するこれらの酸性残基は、共同因子である Ca^{2+} を捕捉するとともに、 Ca^{2+} 結合を介して基質-酵素タンパク複合体を安定化しているものと考えられた。しかし、これらの酸性残基の部位特異的変異体に認められたPel活性の消失には、 Ca^{2+} 結合強度の低下に側鎖の長さの違いも関与していることから、そのマイナス荷電が触媒に関わるプロトン移送ネットワークを形成する上で不可欠な機能を果たしていることが示唆された。

塩基性アミノ酸残基の機能

R218K-pentaGalpA複合体の構造解析から¹⁶¹⁾、活性中心に位置する塩基性アミノ酸残基、Lys190、Arg223およびArg245は、基質のpentaGalpAのカルボキシル基または水酸基と直接水素結合する基質結合残基として機能していることが明らかになった (第5-2および3図)。一方、PelCのK172H、K172LとArg218に作成したすべての



第5-3図 基質結合部における変異PelC (R218K) のアミノ酸残基と Ca^{2+} およびtetraGalpA分子との相互作用の模式図

GalpA¹は還元末端分子、○は酸素原子および矢印はtetraGalpA分子に認められる歪みの位置を示す。⁴ Ca^{2+} は、野生型PelC分子が単独で取り込む Ca^{2+} に当たる。(Scavettaら、1999¹⁶¹)

変異体およびPelEのArg230 (PelCのArg218ホモログ) に作成したR230KおよびR230Lでは、Pel活性が著しく低下または完全に消失した。PelCのK172L、K190A、R218KおよびR218Lの4変異体では、 Ca^{2+} 結合強度の著しい低下を伴ってPel活性が消失し、R218K以外ではpI値も野生型に比べ顕著に低下していた。PelCの立体構造解析では、これらの塩基性アミノ酸残基が水分子を介して間接的に Ca^{2+} と配位結合している可能性が指摘されたが^{161,163)}、R218KとpentaGalpAとの複合体の3次元立体構造解析では、Arg218を含むどの塩基性残基も Ca^{2+} とは配位結合していないことが明らかになった (第5-3図)。しかし、R218Kでは、1番目の Ca^{2+} の空間占有率が50%しかなかったことから、これがR218K、K190AおよびR218Lで認められた Ca^{2+} 結合強度低下の原因の一つになっている可能性は否定できない。

Pelスーパーファミリーに共通する不変アミノ酸残基であるArg218の機能については不明な点が多い。Pelと同じ並行型 β ヘリックス構造を有するペクチンリアーゼ (Pnl)は、カルボキシル基がメチル化され、電気的に中性なペクチンをPelと同じ β -トランスエリミネーション機構により分解する^{77,88,89)}。この β -トランスエリミネーション分解は、PelおよびPnlいずれの場合も基質のガラクトuron酸分子 (GalpA) の C_5 炭素からのプロトン抽出により開始する^{67,77)}。R218KとpentaGalpA複合体では、どのGalpAユニットについても C_5 炭素またはグリコシド結合酸素から3~4Åの距離内に存在する水分子あるいは Ca^{2+} は見つからなかった。しかし、野生

型とR218Kの結晶構造を重ね合わせたところ、Arg218のグアニジン窒素が還元末端から3番目のGalpAのC₅炭素と2.6Åの距離に、もう一つの窒素が2.7Åの距離に位置することが明らかとなり、Arg218がC₅炭素原子と相互作用している可能性が示唆された。Arg218がPelスーパーファミリーの不変アミノ酸残基であること、Pel活性の至適pHが9.5と極めて高いことおよびPelCのR218KのみならずPelEのホモログであるR230KもPel活性を失っていること等の事実を総合すると、Arg218がβ-トランスエリミネーション分解を開始する際のプロトン抽出に参与している可能性が強く示唆された。

Pelによるポリガラクトン酸の分解メカニズム

変異PelCのR218KとpentaGalpAとの複合体結晶の構造解析では¹³⁰⁾、R218Kに結合したpentaGalpAは、還元末端から2つ目と3つ目のGalpA分子間でその右巻きのヘリックス構造が大きく変形していた(第5-2図B)。これが野生型に当てはまるとすれば、野生型PelCは実際の感染場面でも植物細胞壁成分のポリガラクトン酸(PGA)分子を同様な形で変形させているものと推測される。そこで、2から7分子よりなるオリゴGalpAまたは還元末端にガラクトン酸1分子をつないだオリゴGalpAと野生型PelCとをそれぞれ反応させ、その最終分解産物を解析した。その結果、PelCが分解できる最小のオリゴGalpAは3量体であること、および還元末端に付加したガラクトン酸はPelC分子とは結合できないことが明らかになった(第5-1表)。また、5量体以上のオリゴGalpAでは、還元末端から数えて3番目と4番目の間で切断されたオリゴGalpAが高頻度で生成した。このことから、pentaGalpAは、PelCと結合した時に生じる大きな歪み部分、すなわち、還元末端から数えて2番目から4番目のGalpAの間で主に切断されることが生化学的にも証明された。

そこで、これまでのPelCとPelEを中心とした構造機能相関解析をもとに、PelCをモデルにPelによるPGAの分解モデルを考察し、それを第5-4図に示した。このモデルでは、PelCによるPGAのβ-トランスエリミネーション分解には少なくとも3つのグループが必要となる。一つ目のグループは塩基性アミノ酸残基で、基質のウロン酸の酸性環境に基づく負の電荷を中和する機能を持つ。二つ目のグループも塩基性アミノ酸残基で、基質を構成するGalpA分子のC₅炭素からプロトンを引き離す機能を有している。そして、三つ目のグループは酸性アミノ

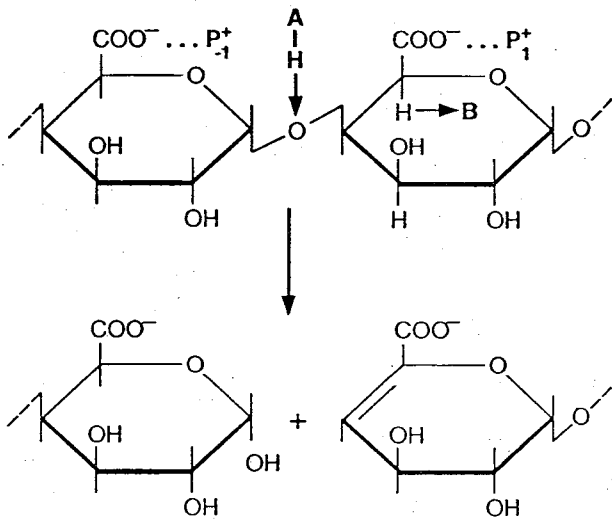
酸残基で、切断されるグリコシド結合酸素原子へプロトンを供給するプロトン移送ネットワークを形成する。この三つのグループが果たしている機能を、PGAのβ-トランスエリミネーション分解にメカニズムに当てはめると以下ようになる。

まず、Pel活性に不可欠な4分子のCa²⁺が4分子のGalpAのマイナス電荷を介してPelC分子とtetraGalpAとで共有される。同時に、PelCのLys190およびAg223が、第3と第4GalpAのウロン酸グループの負電荷を中和する。続いてArg218がプロトンを抽出し、抽出されたプロトンは酸性アミノ酸残基Asp131、Asp129、Asp170そしてGlu166により形成されるプロトン移送ネットワークを介してグリコシド結合しているC₄炭素に移送され、C₄-C₅炭素間に2重結合を生成させて分解が終了する。なお、Arg218がC₅炭素からプロトンを抽出する際には、少なくともAsp131のカルボキシル基の一つがCa²⁺の配位結合域から遊離し、酸素原子をフリー化している可能性が高い。なぜなら、Ca²⁺を必要としないPnlの場合には、PelCのCa²⁺結合部位に位置する酸性ア

第5-1表 野生型PelCによる重合度の異なるオリゴガラクトン酸の分解産物 (Scavettaら, 1999¹³¹⁾)

基質 ¹⁾	分解産物 ²⁾	同左構成比(%)
(GalpA) ₃	GalpA+4-en-thrHexpA-GalpA	100
(GalpA) ₄	GalpA+4-en-thrHexpA-(GalpA) ₂ (GalpA) ₂ +4-en-thrHexpA-GalpA	25 75
(GalpA) ₅	(GalpA) ₂ +4-en-thrHexpA-(GalpA) ₂ (GalpA) ₃ +4-en-thrHexpA-GalpA	71 29
(GalpA) ₆	(GalpA) ₂ +4-en-thrHexpA-(GalpA) ₃ (GalpA) ₃ +4-en-thrHexpA-(GalpA) ₂ (GalpA) ₄ +4-en-thrHexpA-GalpA	9 53 38
(GalpA) ₇	(GalpA) ₂ +4-en-thrHexpA-(GalpA) ₄ (GalpA) ₃ +4-en-thrHexpA-(GalpA) ₃ (GalpA) ₄ +4-en-thrHexpA-(GalpA) ₂ (GalpA) ₅ +4-en-thrHexpA-GalpA	4 9 55 32
L-Gal-onic-(GalpA) ₂	分解されず	0
L-Gal-onic-(GalpA) ₃	GalpA+4-en-thrHexpA-GalpA-L-Gal-onic	100
L-Gal-onic-(GalpA) ₄	(GalpA) ₂ +4-en-thrHexpA-GalpA-L-Gal-onic GalpA+4-en-thrHexpA-(GalpA) ₂ -L-Gal-onic	32 68
L-Gal-onic-(GalpA) ₅	(GalpA) ₄ +4-en-thrHexpA-L-Gal-onic (GalpA) ₃ +4-en-thrHexpA-GalpA-L-Gal-onic (GalpA) ₂ +4-en-thrHexpA-(GalpA) ₂ -L-Gal-onic	2 16 82
L-Gal-onic-(GalpA) ₆	(GalpA) ₅ +4-en-thrHexpA-L-Gal-onic (GalpA) ₄ +4-en-thrHexpA-GalpA-L-Gal-onic (GalpA) ₃ +4-en-thrHexpA-(GalpA) ₂ -L-Gal-onic (GalpA) ₂ +4-en-thrHexpA-(GalpA) ₃ -L-Gal-onic	8 21 66 5

¹⁾ GalpAはガラクトン酸、L-Gal-onicはL-ガラクトン酸を、また、括弧の添字は重合分子数を表す。L-Gal-onicは、各オリゴGalpAの還元末端に連結した。²⁾ 4-en-thrHexpAはα-L-eno-threohexosylpyranosyluronic acid (4,5-不飽和ガラクトン酸)を表す。



第5-4図 Pelの β -エリミネーション機構によるPGAの分解モデル

Pelの β -エリミネーション分解機構には、 P^+ （カルボン酸グループの電荷を中和するグループ）、 B^- （プロトンを引き離す作用グループ）およびA（グリコシド結合酸素原子にプロトンを与えることにより、還元末端側のガラクトン酸分子の C_4 と C_5 炭素との間に2重結合を生成させるグループ）の少なくとも3種類の作用グループが関与しているものと想定される。

これをPelCに当てはめてみると、 P^+ グループとしてLys190、Ag223およびArg245が、まずPelC分子に結合したPGAのカルボキシル基のマイナス電荷を Ca^{2+} と共同して中和する。次に、Arg218を中心とするB⁻グループのアミノ酸残基が還元末端側のガラクトン酸分子の C_4 炭素からプロトンを引き離す。引き離されたプロトンはAsp129、Asp131、Glu166およびAsp170等のAグループに属する酸性アミノ酸残基とその間に介在する水分子とによって形成されるプロトントランスファーネットワーク上を動いて、最終的にグリコシド結合酸素原子に受け渡され、結果として還元末端側のガラクトン酸分子の C_4 と C_5 炭素との間に2重結合を生成させて β -エリミネーション分解を終了することになる。

ミノ酸残基がすべて塩基性残基に置換され、Asp131のアナログ残基は常にプロトン抽出可能な状態となっているからである。

以上のように、PelCとPelEの部位特異的変異体およびPelアイソザイムとそのキメラPelの機能解析結果をPelの3次元立体構造と関連づけることにより、PelによるPGAの β -トランスエリミネーション分解メカニズムを推定することができた。ここで提案した分解メカニズムは、あくまでも現時点における情報を基に構築したものである。したがって、この分解モデルを検証するためには、今後さらに詳細なPelタンパクの立体構造解析、的確な変異体の利用および生化学的な酵素機能解析等が求められるところである。

このように、一見極めて物理的な側面を持つPelの3次元立体構造も、Pelそのものが持つ基本的な生物機能と関連させて考えることによって、実用技術の開発へとつなげて行くことができる。たとえば、活性中心に特異

的に結合する効果的なインヒビターの開発^{26,155)} やその農薬としての利用、活性を消失させた変異Pelの抵抗性誘導物質としての利用^{40,156)} あるいはPelに分解されにくい細胞壁を有する抵抗性作物の育成^{84,86,104,156)} 等、効果的な病害虫防除技術としての新たな展開が期待できる。また、分子レベルでのPelとオリゴサッカライド相互作用の詳細が明らかになれば、遺伝子組換え技術を利用して理論的に基質結合部位を改変し、任意のオリゴサッカライドを切断するリコンビナント酵素を作出することも可能となるだろう^{50,76)}。

タンパクの立体構造解析は、もはや基礎研究の対象ではなく、応用研究の対象として位置づけられる時代に入った。植物と病原微生物との相互関係においても、DNAの塩基配列には書かれていないダイナミックな生体内の動きを3次元視点をとらえることにより、これまで平面的であった研究にもボリュームが出てくるはずである。植物感染生理学分野においても、今後タンパクの立体構造に基づいた研究が発展していくものと期待されるところである。

第VI章 摘 要

1. 研究の背景

ペクチン酸リアーゼ(Pel)は、*Erwinia*属等の軟腐性植物病原微生物が植物への感染に伴って生産する主要な病原性因子の一つで、カルシウムイオン(Ca^{2+})の存在下で植物細胞壁の主要成分であるポリガラクトン酸(PGA)を β -トランスエリミネーション機構により切断し、宿主組織を軟化・腐敗させる。これまでに複数のPelアイソザイムが分離・純化されるとともに、その遺伝子もクローニングされ、分子レベルでの解析が進められてきた。最近、*E.chrysanthemi* EC16が生産するPelCおよびPelEの3次元立体構造が明らかにされ、いずれも β ストランドが大きく右巻きになった新規のトポロジーである“平行型 β ヘリックス (parallel β helix) 構造”を有していることが明らかにされた。

そこで、本研究では、*E.chrysanthemi*の病原性に果たしているPelの役割を分子レベルで明らかにするため、1)pelCに部位特異的変異を導入するとともに野生型PelCの大量発現系および効率的な回収・純化手法を開発し、これを用いて、2)変異PelCタンパクの発現解析と得られた変異PelCの特性変化について検討した。また、3)*E.chrysanthemi* EC16が生産する4種のPelアイソザイムについての機能解析を行うとともに、4)本研究

で得られた結果と別途共同研究で行った変異PelCと5量体PGAとの酵素-基質複合体結晶の立体構造解析結果を総合して、Pelの構造機能相関解析を行った。

2. pelC遺伝子への部位特異的変異の導入と大量発現系の開発

(1) 部位特異的変異の導入

導入変異を含むミスマッチオリゴDNAプライマーを用いオーバーラップエクステンション法により、PelC分子の1)Ca²⁺結合部位、2)Pelスーパーファミリーの高度保存領域であるvWiDH領域、3)ジスルフィド結合および4)*E.carotovora* subsp.*carotovora* strain71が生産するPelCホモログであるPel1との相違残基等の計26残基に、タンパク構造には影響しないが、野生型とは異なるアミノ酸残基に置換すべく野生型pelC内に部位特異的変異を導入した。その結果、ランダム変異を含め34種類の部位特異的変異pelCを得た。

(2) 大腸菌を用いた大量発現系の開発

野生型のPelCタンパクを大腸菌で大量発現させることのできるT7発現システムを開発するとともに、発現タンパクを大腸菌のペリプラズムから効率よく回収し、陽イオン交換カラムクロマトグラフィーを用いて、11の培養菌体から6mgの野生型PelCをワンステップで純化できる系を併せて確立した。

3. PelC変異体の特性変化

(1) 大腸菌における発現特性

C329S/C352S以外のすべての変異pelCは、野生型pelC同様に大腸菌体で大量発現した。このうち可溶性タンパクが得られたのはCa²⁺部位周辺に作成したすべての変異体(15)、vWiDH領域に作成した4変異体、ジスルフィド結合の2変異体、Pel1ホモログの2変異体およびその他の2変異体の計25の変異PelCであったが、前駆体タンパクはフォールディングしていない不溶性タンパクとして大腸菌の内膜画分に残存した。一方、vWiDH領域に作成した11の変異体のうちの7変異体およびジスルフィド結合の2変異体では、前駆体および成熟体タンパクいずれもフォールディングしていない不溶性タンパクとして大腸菌の内膜画分に残存したことから、vWiDH領域は、PelCタンパクのフォールディングあるいはペリプラズムへの分泌機構に関与している可能性が示唆された。

(2) Pel活性の変化

可溶性タンパクが得られた25の変異体について、*in vitro*におけるPel活性を調べたところ、Ca²⁺結合部位

周辺に作成した15の変異PelCのうち、12の変異体でPel活性が著しく低下または完全に消失した。一方、他の可溶性変異PelCは、野生型の1/2ないし同等のPel活性が維持されていたことから、PelCの活性中心はCa²⁺結合部位にあることが明らかになった。

(3) Ca²⁺結合強度および等電点の変化

Ca²⁺結合部位に作成した12の変異PelCおよびvWiDH領域の2変異PelCについて、トリプトファン内部蛍光測光によりCa²⁺との結合強度の変化を測定した。その結果、Pel活性を失った5つの変異体で顕著なCa²⁺結合強度の低下するとともに、そのpI値は野生型に比べて顕著に上昇または低下していたことから、Pel活性の消失には、Ca²⁺結合強度およびPelC分子全体の荷電の変化が関与している可能性が示唆された。しかし、Pel活性が失われてもCa²⁺結合強度あるいはpI値が野生型と同レベルの変異体が多数存在することから、Pel活性にはこれら以外の要因が関与していることが示唆された。

(4) 植物組織分解能の変化

可溶性タンパクが得られた25の変異PelCの植物組織分解能をキュウリ皮層組織を用いて調べたところ、一部の例外を除いてPel比活性と高い正の相関関係が認められた。このことから、*E.chrysanthemi*の感染に伴って引き起こされる植物組織の軟化・腐敗は、細胞壁構成成分であるPGAのPelによるβ-トランスエリミネーション分解に起因していることが示された。

(5) エリシター活性の変化

同様に、上記25の変異PelCのエリシター活性を調べたところ、植物組織分解能に比べると相関係数は低いものの、Pel比活性と明らかな正の相関関係が認められたことから、PelCによる植物細胞壁成分であるPGAの分解産物がPelCのエリシター活性に影響していることが示された。しかし、Pel活性の高さとエリシター活性とが一致しない変異PelCも多く認められたことから、Pelが示すエリシター活性にはPGAの分解能力以外にPelCのタンパク構造等、別の要因も関与している可能性が示唆された。

4. *E.chrysanthemi* EC16が生産するPelアイソザイムの機能解析

E.chrysanthemi EC16が生産するPelA、B、CおよびEの4種のPelアイソザイムの至適pH、Pel活性およびPGAのメチル化度に対する反応特性等については差が認められなかった。一方、植物組織分解能では、PelEはPelBおよびPelCの10倍の、さらにPelAの100倍もの高い値を示すなどPelアイソザイム間で大きな差が認め

られたことから、植物組織分解能にはPel活性以外の要因が強く関与していることが示唆された。

PelEのCa²⁺結合部位の変異PelCホモログとなる部位特異的変異体を作成したところ、いずれもPel活性を消失したことから、PelEの活性中心もCa²⁺結合部位に存在することが明らかになった。しかし、変異PelEの植物組織分解能は野生型に比べ著しく低下したものの、PelAと同等かそれ以上の値を維持するとともに高いエリシター活性も示した。

また、Pelアイソザイム間でキメラPelを作成したところ、PelBCおよびPelEAで親タンパクと同レベルのPel活性とエリシター活性を有する酵素タンパクが発現した。特にPelEAは、そのN末端の2/3がPelE由来であるにもかかわらず、植物組織分解能はPelEの1/20まで低下していたことから、PelEが有する高い植物組織分解能にはPelEのC末端の1/3部分が関与している可能性が示唆された。

以上の結果から、*E. chrysanthemi*が、植物組織分解能の異なる複数のPelアイソザイムを有することは、細胞壁成分であるPGAの構成パターンが異なる幅広い宿主に感染する上で機能分化という形で寄与しているものと考えられた。

5. Pelの構造機能相関解析

本研究によって得られた結果とScavettaと筆者らが行った変異PelCと5量体PGAとの酵素-基質複合体結晶の3次元立体構造解析結果を総合して構造機能相関解析を行った結果、PGAのβ-トランスエリミネーション分解には、Ca²⁺結合部位に位置する4つの酸性アミノ酸残基(Asp129、Asp131、Glu166、Asp170)と4つの塩基性アミノ酸残基(Lys190、Arg218、Arg223、Arg245)が極めて重要な役割を果たしていることが明らかになった。また、この解析結果を基にして、PelによるPGAのβ-トランスエリミネーション分解メカニズムを推定した。

6. 結論

本研究で得られた結果から、1) Pelの活性中心は共同因子であるCa²⁺結合部位に存在することを明らかにするとともに、Pel活性およびCa²⁺結合に関与するアミノ酸残基を特定した。また、2) *E. chrysanthemi*の感染に伴って引き起こされる植物組織の軟化・腐敗要因とPelが有するエリシター活性の特性を明確化した。さらに、3) *E. chrysanthemi* EC16が生産する複数のPelア

イソザイムの存在が*E. chrysanthemi*の寄主範囲の維持・拡大に貢献している可能性を示した。このほか、4) Pelスーパーファミリーで高度に保存されているvWIDH領域が、Pelタンパクのペリプラズムへの分泌あるいはフォールディング機構に関与している可能性を指摘した。

以上の結果および別途共同研究で行った変異PelCとガラクトクロペンタオース(pentaGalpA)との酵素-基質複合体結晶の3次元立体構造解析結果を総合してPelの構造機能相関解析を行い、5) PelによるPGAのβ-トランスエリミネーション分解に関与している触媒アミノ酸残基を特定するとともに、その分解機構を推定した。

今回の研究結果から、Pel活性中心に特異的に結合する効果的なインヒビターの開発やその農業としての利用、活性を消失させた変異Pelの抵抗性誘導物質としての利用あるいはPelに分解されにくい細胞壁を有する抵抗性作物の育成等、効果的な病害虫防除技術の開発のみならず、理論的に基質結合部位を改変し、任意のオリゴサッカライドを切断するリコンビナント酵素を作出することも可能となるなど、今後、新たな技術開発が展開できるものと期待される。

SUMMARY

Studies on the Three-Dimensional Structure and Function of Pectate Lyases Produced by *Erwinia chrysanthemi*

1. Background

Pectate lyases (Pels) are the major virulence factors of plant pathogenic *Erwinia* and composed of a battery of the isozymes. Pels depolymerize negatively charged polygalacturonic acid (PGA), a major component of plant cell wall, in the presence of calcium (Ca^{2+}). Pels cleave PGA by β -trans-elimination mechanism, which is essentially initiated by proton abstraction from C₃ of the galacturonosyl residue on the reducing end.

Many of the genes encoding the Pel isozymes have been cloned and characterized. Recently, the three-dimensional structures of PelC and PelE of *E. chrysanthemi* EC16 have been determined and found to have a novel structural motif, the 'parallel β helix', which is generated by coiling β strands into a large, right-handed helix.

The present study reports 1) construction of site-directed *pelC* mutants and use of T7 expression system to overexpress the mutant proteins by using *E. coli* cells, 2) analysis of the expression of PelC mutants in *E. coli* cells and characterization of the expressed proteins and 3) functional analysis of the four Pel isozymes, PelA, PelB, PelC and PelE, produced by *E. chrysanthemi* EC16, to understand the role of Pel isozymes in the pathogenicity of *E. chrysanthemi*. Finally, 4) the structure and function relationships of the Pels are discussed to postulate a possible mechanism of pectinolytic cleavage of PGA.

2. Construction of site-directed *pelC* mutants and use of T7 expression system to overexpress and purify wildtype PelC

(1) Construction of site-directed *pelC* mutants

Oligonucleotide site-directed mutations were introduced into the *pelC* gene of *E. chrysanthemi* EC16 by overlap extension. Specific mutations were directed single or double amino acid changes mainly affecting 1) calcium binding, 2) protein folding, and 3) disulfide linkages, or replacing with 4) homologous residues of PelI of *E. carotovora* subsp. *carotovora*. Finally, 34 *pelC* mutants were obtained.

(2) Development of T7 expression system of wildtype PelC by using *E. coli* cells and the efficient purification

Overexpression system of wildtype *pelC* in *E. coli* was developed by using pRSET5a that contains T7 RNA polymerase promoter in the upstream of the multiple cloning site. Translated proteins were isolated from the periplasmic fraction of *E. coli* and approximately 6 mg of wildtype PelC could be purified from the 1 liter culture through cation-exchange column chromatography.

3. Characterization of PelC mutant proteins

(1) Analysis of the mutant PelC expression in *E. coli* cells

All the PelC mutants except C329S/C352S were overexpressed by T7 expression system in the same way as wildtype PelC, while soluble proteins were obtained from 26 *pelC* mutants including all the mutants around the Ca²⁺ binding site (Ca-site) and PelI homologous. Preproteins of these mutants, however, remained as insoluble proteins in the inner membrane fraction of *E.coli* as is the case of the wildtype. Seven out of nine mutants in the vWiDH region and C329S yielded insoluble pre and mature proteins remaining in the bacterial inner membrane fraction. Trypsin-sensitivity studies suggested that all the preproteins and these mutant proteins remaining in the bacterial inner fractions were defective in membrane release or in protein folding.

(2) Changes in Pel activity

Pel activity of 12 out of 15 PelC mutants around the putative Ca-site lost the Pel activity, while other mutants retained half to the same levels of Pel activity with that of the wildtype. These results, thus, clearly indicate that pectinolytic active site is located around the Ca-site rather than an invariant vWiDH region. Effect of the mode of mutation in each PelC mutants on the pel activity suggested important residues in pectinolytic catalysis.

(3) Changes in Ca²⁺ affinity and isoelectric point (pI)

Significant decrease of the intrinsic tryptophan fluorescence intensity in the presence of Ca²⁺ demonstrated direct coordination of Ca²⁺ to the protein molecule. Quantitative analysis of the fluorescence intensity of PelC mutants around the Ca-site revealed that five inactive mutants showed conspicuously lower affinity for Ca²⁺ than wildtype PelC. Also, significant variation in the pIs was observed in several inactive PelC mutants. These results suggest that loss of Pel activity in these mutants may result from the decrease of affinity for Ca²⁺ and/or the overall changes of the electric charges of the protein molecules. However, other factors are also considered to be involved in the loss of Pel activity in the rest of these mutants.

(4) Changes in plant tissue maceration activity

Most of the PelC mutants generally macerated plant tissue in proportion to their Pel activity, suggesting that maceration of plant tissue by the bacterial infection results from the β -eliminative cleavage of the PGA components of the host cell wall by the Pels.

(5) Changes in elicitor activity

Elicitor activity of these mutants on soybean cotyledons also positively correlated with the Pel activity. Some of these mutants, however, gave greater or lesser elicitor activity than those predicted from the linear regression with Pel activity, suggesting that factors other than Pel activity is involved in the elicitor activity.

4. Functional analysis of four Pel isozymes

Four Pel isozymes, PelA, PelB, PelC and PelE, were characterized by their pectinolytic activity, plant tissue maceration and elicitor activity. All Pel isozymes showed the same levels of Pel activity at around pH 8.5 to 9.5 and cleaved 28% methylated PGA most efficiently in spite of their different pI values. No difference was observed in their elicitor activity as well. On the contrary, PelE macerated plant tissue ten times more efficiently than PelB and PelC, and one hundred times than PelA. These results, therefore,

suggest that factors other than Pel activity such as substrate specificity or protein structure is involved in plant tissue maceration.

Four PelE mutants, which are compatible to those mutants located around the Ca-site in PelC, completely lost their pectinolytic activity, confirming that pectinolytic active site in PelE also around the Ca-site. Unlike the PelC mutants, all these PelE mutants retained plant tissue maceration activity at the same or greater than that of wildtype PelA. The elicitor activity was also correlated with the activity level of the maceration activity.

Among five chimeric pel genes, *pelBC*, *pelCE*, *pelEA*, *pelEB* and *pelEC* constructed, *pelBC* and *pelEA* were successfully expressed by T7 expression system and the functional enzymes were obtained. Both chimeric proteins had the same levels of pectinolytic and elicitor activity with their parental proteins except PelEA that showed the maximum pectinolytic activity with 63% methylated PGA. Moreover, while PelBC showed the same levels of tissue maceration activity with both of their parental proteins, PelEA macerated plant tissue 1/20 times less than PelE though two third of the protein is derived from PelE. These results suggest that substrate specificity in PelEA might be greatly changed and that the external loop at C terminal region in PelE might be responsible for the high levels of plant tissue maceration activity.

These results suggest that multiple forms of Pel isozymes with divergent function and ability in tissue maceration may contribute to a wide host range of *E.chrysanthemi*.

5. Structure and function relationships of the Pels

Scavetta *et al.*¹⁹¹⁾ have recently determined the three-dimensional structure of a complex between a PelC inactive mutant and a galacturopentaose (pentaGalpA) substrate fragment, which provides the first atomic view of a plant cell wall component. The structural analysis revealed that four out of the five saccharide units of the pentaGalpA binds in a cleft, interacting primarily with positively charged groups: either lysine or arginine amino acids on PelC and the four Ca²⁺ in the complex. The results suggest that residues homologous to Asp131 and Arg218 in PelC, which are invariant in the Pel family, are likely to have crucial catalytic roles in the pectinolytic cleavage of PGA. Moreover, the Arg218 is strongly suggested to be the amino acid that initiates proton abstraction during the β -elimination cleavage of PGA. Product analysis of oligogalacturonates with different degrees of polymerization with or without a galactonic acid residue in the reducing end suggest that the glycosidic scissle bond lies between the second and third galacturonic acid units from the reducing end of the pentaGalpA. Finally, a possible mechanism of β -eliminative cleavage of PGA by Pels was postulated.

6. Conclusion

The present study confirmed that calcium binding site in the cleft on one side of the parallel β -helix of the Pels forms the pectinolytic active site and that residues homologous to invariant Asp131 and Arg218 in PelC are likely to have crucial catalytic roles in the pectinolytic cleavage. The vWiDH region, instead, is suggested to be involved in Sec-dependent secretion and/or folding of the Pels. While β -eliminative cleavage of pectate components of the plant cell wall by Pels is shown to be responsible for the "soft rot" damage and the elicitor activity of the Pels, factors other than pectinolytic activity are suggested to be involved in the tissue maceration and elicitor activity. Multiple forms of Pel isozymes may account for the virulence of *E.chrysanthemi* to a wide range of host with diverse cell wall components.

引用文献

1. Andro, T., J.P. Chambost, A. Kotoujansky, J. Cattaneo, Y. Bertheau, F. Barras, F. van Gijsegem and A. Coleno. 1984. Mutants of *Erwinia chrysanthemi* defective in secretion of pectinase and cellulase. *J. Bacteriol.* 160:1199-1203.
2. Ayers, W.A., G.C. Papavizas and A.F. Diem. 1966. Polygalacturonate trans-eliminase and polygalacturonase production by *Rhizoctonia solani*. *Phytopath.* 56:1006-1011.
3. Ayers, A.R., J. Ebel, F. Finelli, N. Berger, and P. Albersheim. 1976. Host-parasite interactions. IX. Quantitative assays of elicitor activity and characterization of the elicitor present in the extracellular medium of cultures of *Phytophthora megasperma* var. *sorjae*. *Plant Physiol.* 57: 751-759.
4. Ayers, A.R., J. Ebel, B. Valent, and P. Albersheim. 1976. Host-parasite interactions. X. Fractionation and biological activity of an elicitor isolated from the mycelial walls of *Phytophthora megasperma* var. *sorjae*. *Plant Physiol.* 57: 760-765.
5. Barras, F., K.K. Thurn and A.K. Chatterjee. 1987. Resolution of four pectate lyase structural genes of *Erwinia chrysanthemi* (EC16) and characterization of the enzymes produced in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 209:319-325.
6. Barras, F., van Gijsegem, and A.K. Chatterjee. 1994. Extracellular enzymes and pathogenesis of soft-rot *erwinia*. *Ann. Rev. Phytopath.* 32:201-234.
7. Bartling, S., C. Wegnen and O. Olsen. 1995. Synergism between *Erwinia* pectate lyase isozymes that depolymerize both pectate and pectin. *Microbiol.* 141:873-881.
8. Basham, H.G. and D.F. Bateman. 1975. Killing of plant cells by pectic enzymes: the lack of direct injurious interaction between pectic enzymes or their soluble reaction products and plant cells. *Phytopath.* 65:141-153.
9. Bateman, D.F. 1963. The "macerating enzyme" of *Rhizoctonia solani*. *Phytopath.* 53:1178-1186.
10. Bateman, D.F. and R.L. Millar. 1966. Pectic enzymes in tissue degradation. *Ann. Rev. Phytopath.* 4:1119-1146.
11. Bauer, D.W., A.J. Bogdanove, S.V. Beer and A. Collmer. 1994. *Erwinia chrysanthemi* *hrp* genes and their involvement in soft rot pathogenesis and elicitation of the hypersensitive response. *MPMI* 7:573-581.
12. Bauer, D.W. and A. Collmer. 1997. Molecular cloning, characterization, and mutagenesis of a *pel* gene from *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* encoding a member of the *Erwinia chrysanthemi* PelADE family of pectate lyases. *MPMI* 10:369-379.
13. Baumann, U., S. Wu, K.M. Flaherty and D.B. McKay. 1993. Three-dimensional structure of the alkaline protease of *Pseudomonas aeruginosa*: a two-domain protein with a calcium binding parallel β motif. *EMBO J.* 12:3357-3364.
14. Beaulieu, C. and F. Van Gijsegem. 1990. Identification of plant-inducible genes in *Erwinia chrysanthemi* 3937. *J. Bacteriol.* 172:1569-1575.

15. Beaulieu, G.V., Minsavage, B.I., Canteros and R.E. Stall. 1991. Biochemical and genetic analysis of a pectate lyase gene from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. MPMI 4:446-451.
16. Beaulieu, C., M. Boccara and F. van Gijsegem. 1993. Pathogenic behavior of pectinase-defective *Erwinia chrysanthemi* mutants on different plants. MPMI 6:197-202.
17. Boccara, M., A. Diolez, M. Rouve and A. Kotoujansky. 1988. The role of individual pectate lyases of *Erwinia chrysanthemi* strain 3937 in pathogenicity on saintpaulia plants. Physiol. Mol. Plant Pathol. 33:95-104.
18. Boccara, M., R. Vedel, D. Lalo, M.-H. Lebrum and J.F. Lafay. 1991. Genetic diversity and host range in strains of *Erwinia chrysanthemi*. MPMI 4:293-299.
19. Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72:248-254.
20. Braun, E.J. and C.A. Rodrigues. 1993. Purification and properties of an endoxylanase from corn stalk rot strain of *Erwinia chrysanthemi*. Phytopath. 83:332-338.
21. Brooks, A.D., S.Y. He, S. Gold, N.T. Keen, A. Collmer, S.W. Hutcheson. 1990. Molecular cloning of the structural gene for exopolysaccharide lyase from *Erwinia chrysanthemi* EC16 and characterization of the enzyme product. J. Bacteriol. 172:6950-6958.
22. Budelier K.A., A.G. Smith and C.S. Gasser. 1990. Regulation of stilar transmitting tissue-specific gene in wild-type and transgenic tomato and tobacco. Mol. Gen. Genet. 224:183-192.
23. Burkholder, W.H., L.A. McFadden and A.W. Dimock. 1953. A bacterial blight of chrysanthemums. Phytopathol. 43:522-526.
24. Caprari, C., B. Mattei, M.L. Basile, G. Salvi, V. Crescenzi, G. De Lorenzo, and F. Cervone. 1996. Mutagenesis of endopolysaccharidase from *Fusarium moniliforme*: histidine residue 234 is critical for enzymatic and macerating activities and not for binding to polysaccharidase inhibiting protein (PGIP). MPMI 9:617-624.
25. Carter, P.; Wells, J.A. 1987. Engineering enzyme specificity by "substrate assisted catalysis." Science 237 : 394-399.
26. Cervone, F., G. De Lorenzo, L. Degra, G. Salvi and M. Bergami. 1987. Purification and characterization of a polysaccharidase-inhibiting protein from *Phaseolus vulgaris* L. Plant Physiol. 85:631-637.
27. Chatterjee, A.K., H. Murata, J.L. McEvoy and A. Collmer. 1991. Molecular genetics of regulation and export of *Erwinia* pectinases. In Biochemistry and molecular biology of plant-pathogen interactions. Ed. C.J. Smith. Clarendon Press. Oxford.
28. Chatterjee, A., Y. Liu, and K. Chatterjee. 1995. Nucleotide sequence of a pectate lyase structural gene, *pell* of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* strain 71 and structural relationship of *pell* with other *pel* genes of *Erwinia* species. MPMI 8:92-95.
29. Cohen, F.E. 1993. The parallel β helix of pectate lyase C : something to sneeze at. Science 260:1444-1445.
30. Collmer, A., C.H. Whalen, S.V. Beer and D.F. Bateman. 1982. An exo-Poly- β -D-galacturonosidase implicated in the regulation of extracellular pectate lyase production in *Erwinia chrysanthemi*. J.

- Bacteriol. 149:626-634.
31. Collmer, A., C. Schoedel, D.L. Roeder, J.L. Ried, and J.F. Rissler. 1985. Molecular cloning in *Escherichia coli* of *Erwinia chrysanthemi* genes encoding multiple forms of pectate lyase. J. Bacteriol. 161:913-920.
32. Collmer, A. and N.T. Keen. 1986. The role of pectic enzymes in plant pathogenesis. Ann. Rev. Phytopath. 24:383-409.
33. Collmer, A. J.L. Ried, G.L. Cleaveland, S.Y. He and A.D. Brooks. 1989. Mutational analysis of the role pectic enzymes in the virulence of *Erwinia chrysanthemi*. In Molecular Biology of Plant-Pathogen Interactions. pp.35-48. Ed. B. Staskawicz, P. Ahlquist and O. Yoder. Alan R. Liss, Inc. New York.
34. Collmer, A. and D.W. Bauer. 1994. *Erwinia chrysanthemi* and *Pseudomonas syringae*: plant pathogens trafficking in extracellular virulence proteins. In Bacterial pathogenesis of plant and animals. Ed. J.L. Dangl, Springer-Verlag, New York
35. Craik, C.S., C. Largman, T. Fletcher, S. Rocznik, R.J. Barr, R. Fletterick and W.J. Rutter. 1985. Redesigning trypsin : alteration of substrate specificity. Science 228:291-297.
36. Crowe, J.S., H.J. Cooper, M.A. Smith, M.J. Sims, D. Parker and D. Gewert. 1991. Improved cloning efficiency of polymerase chain reaction (PCR) products after protease K digestion. Nucleic Acid Res. 19:184.
37. Chothia, C. and A.M. Lesk. 1986. The relation between the divergence of sequence and structure in proteins. EMBO J. 5:823-826.
38. Dahler, G.S., F. Barras and N.T. Keen. 1990. Cloning of genes encoding extracellular metallo-proteases from *Erwinia chrysanthemi* EC16. J. Bacteriol. 172:5803-5815.
39. Davis, K.R., A.G. Darvill, P. Albersheim, and A. Dell. 1986. Host-parasite interactions. XXIX. Oligogalacturonides released from sodium polypectate by endopolygalacturonic acid lyase are elicitors of phytoalexins in soy bean. Plant Physiol. 80:568-577.
40. De Lorenzo, G., F. Cervone, M.G. Hahn, A. Darvill, and P. Albersheim. 1991. Bacterial endopolygalacturonate lyase: evidence that plant cell wall pH prevents tissue maceration and increases the half-life of elicitor-active oligogalacturonides. Physiol. Mol. Plant Pathol. 39:335-344.
41. De Wit, P.J.G.M. 1992. Molecular characterization of gene-for-gene systems in plant-fungus interactions and the application of avirulence genes in control of plant pathogens. Ann. Rev. Phytopath. 30:391-418.
42. Dickey, R.S. 1979. *Erwinia chrysanthemi* : A comparative study of phenotypic properties of strains from several hosts and other *Erwinia* species. Phytopath. 69:324-329.
43. Dickey, R.S. 1981. *Erwinia chrysanthemi* : Reaction of eight plant species to strains from several hosts and to strains of other *Erwinia* species. Phytopath. 71:23-29.
44. Dunning, A.M., P. Talmud and S.E. Humphries. 1988. Errors in the polymerase chain reaction. Nucleic Acid Res. 16:10393.
45. Emsley, P., I.G. Charles, N.F. Fairweather and N.W. Isaacs. 1996. Structure of *Bordetella pertussis* virulence factor P.69 pertactin. Nature 381:90-92.

46. Estell, D.A., Graycer, T.P. and Wells, J.A. 1985. Engineering an enzyme by site-directed mutagenesis to be resistant to chemical oxidation. *J. Biol. Chem.* 260 : 6518-6521.
47. Feingold, D.S. and R. Bentley. 1987. Conformational aspects of the reaction mechanisms of polysaccharides lyases and epimerases. *FEBS Letters* 223:207-211.
48. Flor, H.H. 1956. The complementary genetic systems in flax and flax rust. *Adv. Genet.* 8:29-54.
49. Gacesa, P. 1987. Alginate-modifying enzymes: A proposed unified mechanism of action for the lyases and epimerases. *FEBS Lett.* 212:199-202.
50. Gilkes, N.R., B. Henrissat, D.G. Kilburn, R.C. Miller, JR., and R.A.J. Warren. 1991. Domains in microbial β -1,4-glycanases : Sequence conservation, function, and enzyme families. *Microbial. Rev.* 55:303-315.
51. Gonz lez-Candelas, L. and P.E. Kolattukudy. 1992. Isolation and analysis of a novel inducible pectate lyase gene from the phytopathogenic fungus *Fusarium solani* f.sp. *pisi* (*Nectria haematococca*, mating population VI). *J. Bacteriol.* 174:6343-6349.
52. Gysler, C., J.A.M. Harmsen, H.C.M. Kester, J. Visser and J. Heim. 1990. Isolation and structure of the pectin lyase D-encoding gene from *Aspergillus niger*. *Gene* 89:101-108.
53. He, S.Y., M. Lindeberg, A.K. Chatterjee and A. Collmer. 1991. Cloned *Erwinia chrysanthemi* *out* genes enable *Escherichia coli* to selectively secrete a diverse family of heterologous proteins to its milieu. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:1079-1083.
54. He, S.Y., M. Lindeberg and A. Collmer. 1993. Protein secretion by plant pathogenic bacteria. *In* *Biotechnology in Plant Disease Control*. pp.39-64. Wiley-Liss, Inc. New York.
55. Hedstrom, L., L. Graf, C-B. Stewart, W.J. Rutter and M.A. Phillips. 1991. Modulation of enzyme specificity by site-directed mutagenesis. *Methods Enzymol.* 202:671-687.
56. Heffron, S.E., B. Henrissat, M.D. Yoder, S.E. Lietzke, and F. Journak. 1995. Structure-based multiple alignment of extracellular pectate lyase sequences. *MPMI.* 8:331-334.
57. Henrissat, B., M. Claeysens, P. Tomme, L. Lemesle and J.-P. Mornon. 1989. Cellulase families revealed by hydrophobic cluster analysis. *Gene* 81:83-95.
58. Henrissat, B., S.E. Heffron, M.D. Yoder, S.E. Lietzke, and F. Journak. 1995. Functional implications of structure-based sequence alignment of proteins in the extracellular pectate lyase superfamily. *Plant Physiol.* 107:963-976.
59. Hinton, J.C.D., J.M. Sidebotham, D.R. Gill and G.P.C. Salmond. 1989. Extracellular and periplasmic isoenzymes of pectate lyase from *Erwinia carotovora* subspecies *carotovora* belong to different gene families. *Mol. Microbiol.* 3:1785-1795.
60. Ho, S.N., H.D. Hunt, R.M. Horton, J.K. Pullen and L.R. Pease. 1989. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* 77:51-59.
61. Horton, R.M., S.N. Ho, J.K. Pullen, H.D. Hunt, Z. Cai and L.R. Pease. 1993. Gene splicing by overlap extension. *Methods Enzymol.* 217:270-279.

62. Hotchkiss, A.T. and K.B. Hicks. 1993. Analysis of pectate lyase-generated oligogalacturonic acids by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *Carbohydrate Res.* 247:1-7.
63. Hughes, R.E., P.A. Rice, T.A. Steits and N.D.F. Grindley. 1993. Protein-protein interactions directing resolvase site-specific recombination : a structure-function analysis. *EMBO J.* 12:1447-1458.
64. Hugouvieux-Cotte-Pattat, N. and J. Robert-Baudouy. 1992. Analysis of the regulation of the *pelBC* genes in *Erwinia chrysanthemi* 3937. *Mol. Microbiol.* 6:2363-2376.
65. Jenkins, J., Mayans, O. and R. Pickersgill. 1998. Structure and evolution of parallel β helix proteins. *J. Struct. Biol.* 122:236-246.
66. Journak, F., M.D. Yoder, R. Pickersgill, and J. Jenkins. 1994. Parallel β -domains : a new fold in protein structures. *Current Opinion in Structural Biology* 4:802-806.
67. Journak, F., N. Kita, M.R. Garrett, S.E. Heffron, R. Scavetta, C.M. Boyd and N.T. Keen. 1996. Functional implications of the three-dimensional structures of pectate lyases. *In Pectin and pectinases.* Ed. J. Visser and A.G.J. Voragen. pp.295-308.
68. Keen, N.T. 1975. Specific elicitors of plant phytoalexin production : Determinants of race specificity in pathogens? *Science* 187:74-75.
69. Keen, N.T. and M. Yoshikawa. 1983. β -1,3-endoglucanase from soybean releases elicitor-active carbohydrates from fungal cell walls. *Plant Physiol.* 71:460-465.
70. Keen, N.T., M. Yoshikawa and M.C. Wang. 1983. Phytoalexin elicitor activity of carbohydrates from *Phytophthora megasperma* var. *glycinea* and other sources. *Plant Physiol.* 71:466-471.
71. Keen, N.T., D. Dahlbeck, B. Staskawicz, and W. Belser. 1984. Molecular cloning of pectate lyase genes from *Erwinia chrysanthemi* and their expression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 159:825-831.
72. Keen, N.T. and S.J. Tamaki. 1986. Structure of two pectate lyase genes from *Erwinia chrysanthemi* EC16 and their high-level expression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 168: 595-606.
73. Keen, N.T., D. Ridgway and C. Boyd. 1992. Cloning and characterization of a phospholipase gene from *Erwinia chrysanthemi* EC16. *Mol. Microbiol.* 6:179-187.
74. Keen, N.T. 1992. The molecular biology of disease resistance. *Plant Mol. Biol.* 19:109-122.
75. Keen, N.T., C.M. Boyd and B. Henrissat. 1996. Cloning and characterization of a xylanase gene from corn strains of *Erwinia chrysanthemi*. *MPMI* 9:651-657.
76. Kelemu, S. and A. Collmer. 1993. *Erwinia chrysanthemi* EC16 produces a second set of plant-inducible pectate lyase isozymes. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:1756-1761.
77. Kiss, J. 1974. β -eliminative degradation of carbohydrates containing uronic acid residues. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 29:229-303.
78. Kita, N., H. Toyoda and J. Shishiyama. 1980. Histochemical reactions of papilla and cytoplasmic

- aggregation in epidermal cells of barley leaves infected by *Erysiphe graminis hordei*. Ann. Phytopath.Soc.Japan. 46:263-265.
- 79.Kita,N.,H.Toyoda and J.Shishiyama. 1981. Chronological analysis of cytological responses in powdery-mildewed barley leaves. Can.J.Bot. 59:1761-1768.
- 80.Kita,N., H.Toyoda, K.Shimizu and S.Ouchi. 1987. Selection of high quality strains of callus-derived regenerants and their self-pollinated progenies. Plant Tissue Culture Lett. 4:71-74.
- 81.Kita,N., C.M.Boyd, M.R.Garrett, F.Jurnak and N.T,Keen. 1996. Differential effect of site-directed mutations in *pelC* on pectate lyase activity, plant tissue maceration and elicitor activity. J.Biol.Chem. 271:26529-26535.
- 82.Kita,N. 1997. Functional implications of the three-dimensional structures of pectate lyases in terms of the pectinolytic activity and virulence in *Erwinia chrysanthemi*. In The strategy for plant protection in physiological and molecular plant pathology. Ed. K.Kojima and N.Furuichi. Phytopath.Soc.Japan pp.108-120.
- 83.Kooman-Gersmann,M., R.Vogelsang, E.C.M.Hoogendijk and P.J.G.De Wit. 1997. Assignment of amino acid residues of the AVR9 peptide of *Cladosporium fulvum* that determine elicitor activity. MPMI 10:821-829.
- 84.Kotoujansky, A. 1987. Molecular genetics of pathogenesis by soft-rot *Erwinias*. Ann.Rev. Phytopath. 25:405-430.
- 85.Kraut,J.1988. How do enzyme work? Science 242:533-540.
- 86.Kulikauskas, 1997. Identification of the tobacco and *Arabidopsis* homologues of the pollen-expressed LA59 gene of tomato. Plant Mol. Biol. 34:809-814.
- 87.Kunkel, T.A., J.D.Roberts and R.A.Zakour. 1987. Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. Methods Enzymol. 154:367-382.
- 88.Kuster-Van Someren, M.A., J.A.M.Harmsen, C.H.M.Kester and J.Visser. 1991. Structure of *Aspergillus niger pelA* gene and its expression in *Aspergillus niger* and *Aspergillus nidulans*. Curr.Gent. 20:293-299.
- 89.Kuster-Van Someren, M., M.Flippighi, L. de Graaff, H.Broeck, H.Kester, A.Hinnen and J.Visser. 1992. Characterization of *Aspergillus niger pelB* gene : structure and regulational expression. Mol.Gen.Gent. 234:113-120.-
- 90.Lei,S-P., H-C.Lin, S-S.Wang, J.Callway, and G.Wilcox. 1987. Characterization of the *Erwinia carotovora pelB* gene and its product pectate lyase. J.Bacteriol. 169:4379-4383.
- 91.Lei,S-P., H-C.Lin, S-S.Wang and G.Wilcox. 1988. Characterization of the *Erwinia carotovora pelA* gene and its product pectate lyase A. Gene 62:159-164.
- 92.Liao,C.H., D.E. McCallus and J.M.Wells. 1993. Calcium-dependent pectate lyase production in the soft-rotting bacterium *Pseudomonas fluorescens*. Phytopathol. 83:813-818.
- 93.Liao,C-H., T.D.Gaffney, S.P.Bradley and L-J.C.Wong. 1996. Cloning of a pectate lyase gene from

- Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* and comparison of its sequence relationship with pel genes of soft-rot *Erwinia* and *Pseudomonas*. MPMI 9:14-21.
94. Lietzke, S.E., M.D. Yoder, N.T. Keen and F. Journak. 1994. The three-dimensional structure of pectate lyase E, a plant virulence factor from *Erwinia chrysanthemi*. Plant Physiol. 106: 849-862.
95. Lietzke, S.E., R.D. Scavetta, M.D. Yoder and F. Journak. 1996. The refined three-dimensional structure of pectate lyase E from *Erwinia chrysanthemi*. Plant Physiol. 111:73-92.
96. Lindeberg, M., C.M. Boyd, N.T. Keen and A. Collmer. 1998. External loops at C terminus of *Erwinia chrysanthemi* pectate lyase C are required for species-specific secretion through the Out type II pathway. J. Bacteriol. 180:1431-1437.
97. Liners, F., J.F. Thibault, and P. Van Cutsem. 1992. Influence of the degree of polymerization of oligogalacturonates and of esterification pattern of pectin on their recognition by mono-clonal antibodies. Plant Physiol. 99:1099-1104.
98. Lojkweks, E., C. Dorel, P. Reignault, N. Hugouvieux-Cotte-Pattat and J. Robert-Baudouy. 1993. Expression of *Erwinia chrysanthemi* pectinase gene during infection of potato tuber. In Mechanisms of Plant Defense Responses. pp.72-75. Ed B. Fritig and M. Legrand. Kluwer Academic Publishers. Netherlands.
99. Lojkweks, E., C. Masclauz, M. Boccara, J. Robert-Baudouy and N. Hugouvieux-Cotte-Pattat. 1995. Characterization of the pelL gene encoding a novel pectate lyase of *Erwinia chrysanthemi* 3937. Mol. Microbiol. 16:1183-1195.
100. Makhov, A.M., B.L. Trus, J.F. Conway, M.N. Simon, T.G. Zurabishvili, V.V. Mesyanzhinov and A.C. Steven. 1993. The short tail-fiber of bacteriophage T4 : Molecular structure and a mechanism for its conformational transition. Virology 194:117-127.
101. Maniatis, T., E.F. Fritsch, and J. Sambrook. 1982. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
102. Marston, F.A.O. 1986. The purification of eukaryotic polypeptides synthesized in *Escherichia coli*. Biochem. J. 240:1-12.
103. Mayans, O., M. Scott, I. Connerton, T. Gravesen, J. Benen, J. Visser, R. Pickersgill and J. Jenkins. 1997. Two crystal structures of pectin lyase A from *Aspergillus* reveal a pH driven conformational change and striking divergences in the substrate-binding clefts of pectin and pectate lyases. Structure 5:677-689.
104. McMillan, G.P., D. Hedley, L. Fyffe and M.C.M.P. Sombelton. 1993. Potato resistance to soft-rot erwinias is related to cell wall pectin esterification. Physiol. Mol. Plant Pathol. 42:279-289.
105. McNeil, M., A.G. Darvill, S.C. Fry, and P. Albersheim. 1984. Structure and function of the primary cell walls of plants. Ann. Rev. Biochem. 53:625-663.
106. McPhalen, C.A., N.C.J. Strynadka and M.N.G. James. 1991. Calcium-binding sites in proteins : a structural perspective. Advances in Protein Chemistry 42: 77-144.
107. Mikaekian, I. and A. Sergeant. 1992. A general and fast method to generate multiple site directed mutations. Nucleic Acid Res. 20 : 376

108. Miura, T. and Mizushima, S. 1968. Separation by density gradient centrifugation of two types of membranes from spheroplast membrane of *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta.* 150:159-161.
109. Mussel, H.W. and J. Morre. 1969. A quantitative bioassay specific for polygalacturonases. *Anal. Biochem.* 28:353-360.
110. Nasuno, S. and M.P. Starr. 1967. Polygalacturonic acid *trans*-eliminase of *Xanthomonas campestris*. *Biochem. J.* 104:178-185.
111. Osborn, M.J., Gander, J.E., Parisi, E. and Carson, J. 1972. Mechanism of assembly of the outer membrane of *Salmonella typhimurium*. *J. Biol. Chem.* 247:3962-3972.
112. Palmer, T. 1990. The investigation of active site structure. *In* Understanding enzymes. pp.185-200. Ellis Horwood. New York.
113. Palva, T.K., K. Holmström, P. Heino, and E.T. Palva. 1993. Induction of plant defense response by exoenzymes of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *MPMI.* 6:190-196.
114. Payne, J.H., C. Schoedel, N.T. Keen and A. Collmer. 1987. Multiplication and virulence in plant tissues of *Escherichia coli* clones producing pectate lyase isozymes PLb and PLe at high levels and of an *Erwinia chrysanthemi* mutant deficient in PLe. *Appl. Env. Microbiology* 53: 2315-2320.
115. P. Sombelton, M.C.M. and A. Kelman. 1980. Ecology of the soft-rot *Erwinias*. *Ann. Rev. Phytopath.* 18:361-387.
116. Petersen, T.N., S. Kauppinen and S. Larsen. 1997. The crystal structure of rhamnogalacturonase A from *Aspergillus aculeatus*: a right-handed parallel β helix. *Structure.* 15:533-544.
117. Pickersgill, R., J. Jenkins, G. Harris, W. Nasser, and J. Robert-Baudouy. 1994. The structure of *Bacillus subtilis* pectate lyase in complex with calcium. *Nature Struct. Biol.* 1: 717-723.
118. Pickersgill, R., D. Smith, K. Worboys and J. Jenkins. 1998. Crystal structure of polygalacturonase from *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *J. Bacteriol.* 273:2460-24664.
119. Pissavin, C., J. Robert-Baudouy and N. Hugouvieux-Cotte-Pattat. 1998. Biochemical characterization of the pectate lyases PelZ of *Erwinia chrysanthemi* 3937. *Biochim. Biophys. Acta* 1383:188-196.
120. Preston III, J.F., J.D. Rice, L.O. Ingram, and N.T. Keen. 1992. Differential depolymerization mechanisms of pectate lyases secreted by *Erwinia chrysanthemi* EC16. *J. Bacteriol.* 174: 2039-2042.
121. Pugsley, A.P. 1993. The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. *Microbiol. Rev.* 57:50-108.
122. Qamar, S., K. Marsh and A. Berry. 1996. Identification of arginine 331 as an important active site residue in the class II fructose-1,6-biphosphate aldolase of *Escherichia coli*. *Protein Sci.* 5:154-161.
123. Rafnar, T., I.J. Griffith, M.C. Kuo, J.F. Bond, B.L. Rogers and D.G. Klapper. 1991. Cloning of *Amb a1* (antigen E), the major family of short ragweed pollen. *J. Biol. Chem.* 266:1229-1236.
124. Raetz, C.R.H. and S.L. Roderick. 1995. A left-handed parallel β -helix in the structure of UDP-N-

- acetylglucosamine acyltransferase. Science 270:997-1000.
- 125.Reverchon,S., N.Hugouvieux-Cotte-Pattat and J.Robert-Baudouy. 1985. Cloning of genes encoding pectolytic enzymes from a genomic library of the phytopathogenic bacterium, *Erwinia chrysanthemi*. Gene 35:121-130.
- 126.Reverchon,S. W.Nasser and J.Robert-Baudouy. 1991. Characterization of *kdgR*, a gene of *Erwinia chrysanthemi* that regulates pectin degradation. Mol.Microbiol. 5:2203-2216.
- 127.Rogers,H.J., A.Harvey and D.M.Lonsdale. 1992. Isolation and characterization of a tobacco gene with homology to pectate lyase which is specially expressed during microsporogenesis. Plant Mol.Biol. 20:493-502.
- 128.Sakai,T.,T.Sakamoto,J.Hallaert and E.J.Vandamme. 1993. Pectin, pectinase, and protopectinase: production, properties, and applications. Advances in Applied Microbiology 39:213-294.
- 129.Saitou,T. 1985. Bacterial stunt of carnation caused by *Erwinia chrysanthemi* pv. *dianthicola*. Ann. Phytopath.Soc.Japan 51:145-151.
- 130.Salmond,G.P.C. 1994. Secretion of extracellular virulence factors by plant pathogenic bacteria. Ann.Rev.Phytopathol. 32:181-200.
- 131.Scavetta,R.D, S.R.Herron, A.T.Hotchkiss, N.Kita, N.T.Keen, J.A.E.Benen, H.C. M. Kester, J.Visser and F.Jurnak. 1999. Structure of plant cell wall fragment complexed to PelC. Plant Cell 11:1081-1092
- 132.Shevchik,V., J.Robert-Baudouy and N.Hugouvieux-Cotte-Pattat. 1997. Pectate lyase PelI of *Erwinia chrysanthemi* 3937 belongs to a new family. J.Bacteriol. 179:7321-7330.
- 133.Schoedel, C. and A.Collmer. 1986. Evidence of homology between the pectate lyase-encoding *pelB* and *pelC* genes in *Erwinia chrysanthemi*. J.Bacteriol. 167:117-123.
- 134.Schnaitman, C.A. 1970. Examination of the protein composition of the cell envelope of *Escherichia coli* by polyacrylamide gel electrophoresis. J.Bacteriol. 104:882-889.
- 135.Schnaitman, C.A. 1970. Protein composition of the cell wall and cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. J.Bacteriol. 104:890-901.
- 136.Sieber,V., F.Jurnak and G.R.Moe. 1995. Circular dichroism of the parallel β helical proteins pectate lyase C and E. Proteins:Structure, Function, and Genetics 23:32-37.
- 137.Sprang, S.R. 1993. On a (β)-roll. TIBS 18:313-314.
- 138.Staskawicz,B.J., D.Dahlbeck and N.T.Keen. 1984. Cloned avirulence gene of *Pseudomonas syringae* pv *glycinea* determines race-specific incompatibility on Glycine max (L.) Merr. Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 81:6024-6028.
- 139.Steinbacher, S., R.Seckler, S.Miller, B.Steipe, R.Huber and Reinemer (1994). Crystal structure of P22 tailspike-protein: interdigitated subunits in a thermostable trimer. Science 265:383-386.
- 140.Shoepfer, R. 1993. The pRSET family of T7 promoter expression vectors for *Escherichia coli*. Gene

- 124:83-85.
141. Starr, M.P. and F. Moran. 1962. Eliminative split of pectic substances by Phytopathogenic soft-rot bacteria. *Science* 135:920-921.
142. Straus, D., R. Raines, E. Kawashima, J.R. Knowles and W. Gilbert. 1985. Active site of triosephosphate isomerase: *in vitro* mutagenesis and characterization of an altered enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 82:2272-2276.
143. Studier, F.W., A.H. Rosenberg, J.J. Dunn, and J.W. Dubendorff. 1990. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.* 185:60-89.
144. Tamaki, S.J., S. Gold, M. Robeson, S. Manulis and N.T. Keen. 1988. Structure and organization of the *pel* genes from *Erwinia chrysanthemi* EC16. *J. Bacteriol.* 170:3468-3478.
145. Taniguchi, Y., A. Ono, M. Sawatani, M. Nanba, K. Kohno, M. Usui, M. Kurimoto and T. Matsushashi. 1995. *Cry j I*, a major Japanese cedar pollen, has pectate lyase enzyme activity. *Allergy* 50:90-93.
146. Taraporewala, Z.F. and J.N. Culver. 1996. Identification of an elicitor active site within the three-dimensional structure of the tobacco mosaic tobamovirus coat protein. *Plant Cell* 8:169-178.
147. Tardy, F., W. Nasser, J. Robert-Baudouy and N. Hugouvieux-Cotte-Pattat. 1997. Comparative analysis of the five major *Erwinia chrysanthemi* pectate lyases: enzyme characteristics and potential inhibitors. *J. Bacteriol.* 179:2503-2511.
148. Temsah, M., Y. Bertheau, and B. Vian. 1991. Pectate-lyase fixation and pectate disorganization visualized by immunocytochemistry in *Saintpaulia ionantha* infected by *Erwinia chrysanthemi*. *Cell Biol. International Reports* 15:611-620.
149. Tsuyumu, S. 1977. Inducer of pectic acid lyase in *Erwinia carotovora*. *Nature* 269:237-238
150. Tsuyumu, S. 1979. "Self-catabolite repression" of pectate lyase in *Erwinia carotovora*. *J. Bacteriol.* 137:1035-1036.
151. Turcich, M.P., D.A. Hamilton and J.P. Mascarenhas. 1993. Isolation and characterization of pollen-specific maize genes with sequence homology to ragweed allergens and pectate lyases. *Plant Mol. Biol.* 23:1061-1065.
152. Van Gijsegem, F. 1986. Analysis of the pectin-degrading enzymes secreted by three strains of *Erwinia chrysanthemi*. *J. Gen. Microbiology* 132:617-624.
153. Van Gijsegem, F. 1989. Relationship between the *pel* genes of the *pelADE* cluster in *Erwinia chrysanthemi* strain B374. *Mol. Microbiol.* 3:1415-1424.
154. Vitali, J., B. Schick, H.C.M. Kester, J. Visser and F. Jurnak. 1998. The three-dimensional structure of *Aspergillus niger* pectin lyase B at 1.7-Å resolution. *Plant Physiol.* 116:69-80.
155. Wattad, C., S. Freeman, A. Dinor and D. Prusky. 1994. Purification of pectate lyase produced by *Colletotrichum gloeosporioides* and its inhibition by epicatechin: a possible factor involved in the resistance of unripe avocado fruits to anthracnose. *MPMI* 7:293-297.

156. Wegner, C., S. Bartling, O. Olsen, J. Weber and D. von Wettstein. 1996. Pectate lyase in transgenic potatoes confers pre-activation of defence against *Erwinia carotovora*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 49:359-376.
157. Wing, R.A., J. Yamaguchi, S.K. Larabell, V.M. Ursin, and S. McCormic. 1989. Molecular and genetic characterization of two pollen-expressed genes that have sequence similarity to pectate lyases of the plant pathogen *Erwinia*. *Plant Mol. Biol.* 14:17-28.
158. Witholt, B., M. Boekhout, M. Brock, J. Kingma, H. van Heerikhuizen, and L. de Leij. 1976. An efficient and reproducible procedure for the formation of spheroplasts from variously grown *Escherichia coli*. *Anal. Biochem.* 74:160-170.
159. Wychowski, C., S.U. Emerson, J. Silver and S.M. Feinstone. 1990. Construction of recombinant DNA molecules by the use of a single stranded DNA generated by the polymerase chain reaction: its application to chimeric hepatitis A virus/poliovirus subgenomic cDNA. *Nucleic Acid Res.* 18:913-918.
160. Yanisch-Perron, C., J. Vieira, and J. Messing. 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33:103-119.
161. Yoder, M.D., N.T. Keen, and F. Jurnak. 1993. New domain motif: the structure of pectate lyase C, a secreted plant virulence factor. *Science* 260 :1503-1507.
162. Yoder, M.D., S.E. Lietzke, and F. Jurnak. 1993. Unusual structural features in the parallel β -helix in pectate lyases. *Structure* 1:241-251.
163. Yoder, M.D. and F. Jurnak. 1995. The refined three-dimensional structure of pectate lyase C from *Erwinia chrysanthemi* at 2.2 Ångstrom resolution. *Plant Physiol.* 107:349-364.
164. Yucel, I and N.T. Keen. 1994. Amino acid residues required for the activity of avrD alleles. *MPMI* 7:140-147.
165. Zhao, L.-J., Q.X. Zhang and R. Padmanabhan. 1993. Polymerase chain reaction-based point mutagenesis protocol. *Methods Enzymol.* 217:218-227.
166. Zvelebil, M.J.J.M., and M.J.E. Sternberg. 1988. Analysis and prediction of the location of catalytic residues in enzymes. *Protein Engineering* 2:127-138.

平成11年 8 月 20 日 発行
神奈川県農業総合研究所
研究報告
第 140 号

神奈川県農業総合研究所
〒259-1204 神奈川県平塚市上吉沢1617
TEL (0463) 58-0333
FAX (0463) 58-4254

Kanagawa Prefectural Agricultural Research Institute
1617 Kamikisawa
Hiratsuka, Kanagawa 259-1204
Japan

印刷所 株式会社興版印刷
神奈川県平塚市新町7-15
TEL 0463-32-1899

BULLETIN
OF THE
KANAGAWA PREFECTURAL
AGRICULTURAL RESEARCH INSTITUTE

No. 140

Aug. 1999

Contents

Studies on the Three-Dimensional Structure and Function of Pectate Lyases
Produced by *Erwinia chrysanthemi*

.....N.Kita



神奈川県

農業総合研究所

平塚市上吉沢1617 〒259-1204 電話 (0463) 58-0333 (代表)



この本は 再生紙を使用しています