

# ヤマノイモ(Dioscorea japonica Thunb.)酸性キチナーゼのN 末端ドメインの存在とそのアミノ酸配列

誌名	九州東海大学農学部紀要
ISSN	02868180
著者名	船津,二郎 荒木,朋洋 鳥潟,隆雄
発行元	九州東海大学農学部
巻/号	10巻
掲載ページ	p. 89-95
発行年月	1991年3月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター  
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council  
Secretariat



ヤマノイモ (*Dioscorea japonica* Thunb.)  
酸性キチナーゼの N 末端ドメインの存在と  
そのアミノ酸配列

船津二郎・荒木朋洋・鳥潟隆雄

見明史雄\*・古賀大三\*\*・井手明雄\*\*

Existence of N-terminal Domain in Yam (*Dioscorea japonica* Thunb.) Aerial Tuber Acidic Chitinase and Its Amino Acid Sequence

Jiro Funatsu, Tomohiro Araki, Takao Torikata,  
Fumio Miake, Daizo Koga and Akio Ide

(Accepted September 20, 1990)

The amino acid sequence of N-terminal domain from yam aerial tuber acidic chitinase was determined. Peptides obtained by pyroglutamate aminopeptidase treatment, V8 protease and chymotryptic digestions of carboxymethylated chitinase were sequenced by Edman degradation. Fifty-three amino acid residues at N-terminal region were determined. This sequence contained two deletions (position 11-16 and 35) and one insertion (between position 39 and 40) when compared with N-terminal domain of tobacco basic chitinase. N-terminal domain of this enzyme showed the homology ratio of 43.2% for WGA domain and 38 to 40% for N-terminal domains of other chitinases. These results proved that yam aerial tuber acidic chitinase was composed of N-terminal domain and main structure and was classified into class I.

緒 言

植物キチナーゼは N-アセチルグルコサミンのホモポリマーであるキチンを加水分解する酵素である。本酵素は等電点及びイオン交換クロマトグラフィーより、塩基性キチナーゼと酸性キチナーゼとに分類される。塩基性キチナーゼはタバコ (1)、インゲンマメ (2)、ジャガイモ (3)、トマト (4)、大麦 (5) 及び小麦胚芽 (6) から、また、酸性キチナーゼはナガイモ (7)、

タバコ (1) 及びキュウリ (8) からそれぞれ分離されている。

本酵素のアミノ酸配列は数種のキチナーゼにおいて遺伝子の塩基配列から推定されている (9-13)。そのアミノ酸配列から植物キチナーゼは 3つのクラス (クラス I, クラス II, クラス III) に分類されている (14)。すなわち、クラス I キチナーゼは N 末端部分 (N 末端ドメイン) と主構造部分の 2つの部分から構成され、塩基性キチナーゼが含まれる。クラス II キチナーゼは N 末端ドメインが存在せず主構造部分のみから構成され、酸性キチナーゼが含まれる。クラス III キチナーゼはクラス I 及びクラス II キチナーゼと全く相同性のない構造を持つ酸性キチナーゼが含まれる。

畜産学科生物化学研究室

\* 化学及び血清療法研究所

\*\* 山口大学農学部農芸学科生物化学研究室

塩基性キチナーゼに存在するN末端ドメインはそのドメインを欠くクラスIIキチナーゼの発見により、酵素反応には直接必須ではないと推定された。しかし、本ドメインはキチナーゼの基質であるキチンと結合する小麦胚レクチン(WGA)のドメインと高い相同性を示すことから(15)、本酵素の基質結合に何らかの関与をしている可能性も残されている。

我々は先にナガイモ酸性キチナーゼから得られたトリプシンペプチドのアミノ酸配列を決定し、他のキチナーゼのアミノ酸配列と比較した結果、塩基性キチナーゼの主構造部分と約53.3%の相同性を示すことを報告した(16)。ナガイモ酸性キチナーゼはクラスIIキチナーゼよりクラスIキチナーゼに高い相同性を示したこと及び分子量的に主構造以外のアミノ酸配列の存在が予想されたことから、N末端ドメインが存在する可能性が推定された。

本研究では、ナガイモと同属であるヤマノイモ酸性キチナーゼからN末端ドメインの分離を試み、そのアミノ酸配列を決定した結果、タイプIキチナーゼのN末端ドメインと相同なドメインの存在を証明したので報告する。

## 材料及び方法

### 1. 材料

試料は阿蘇に自生するヤマノイモ(*Dioscorea japonica* Thunb.)の球芽(一般に"ムカゴ"と呼ばれる)を採取して用いた。

### 2. キチナーゼの精製

ヤマノイモ酸性キチナーゼの精製はムカゴから粗抽出、臭化セチルトリメチルアンモニウム処理、硫酸分画、DEAE-トヨパールカラムクロマトグラフィー、セファデックスG-75ゲルろ過の過程で行った。精製標品はSDS及びディスク電気泳動的に均一であった。

### 3. キチナーゼの還元カルボキシメチル化

還元カルボキシメチル化はCrestfield *et al.*の方法にしたがって行った(17)。すなわち、20 mgのキチナーゼを1 mlの1.4 M トリス塩酸緩衝液(pH8.6)に溶解した後100  $\mu$ lの5%エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム(EDTA)溶液、1.2 gの尿素及び33  $\mu$ lの $\beta$ -メルカプトエタノールを加え蒸留水で2.5 mlにした。反応溶液はN<sub>2</sub>ガス存在下で37°C、1時間還元後、200  $\mu$ lの1 N水酸化ナトリウムにとかした89 mgのモノヨード酢酸を加えN<sub>2</sub>ガス存在下、暗所、室温で1時間カルボキシメチル化した。還元カルボキシメチル化キチナーゼ(Cm-キチナーゼ)は0.2 Nアンモニア水溶液中でセファデックスG-50カラム(1.7×46 cm)を用いて試

薬を除去した後、凍結乾燥した。

### 4. 酵素消化

#### 1) V8プロテアーゼ消化

Cm-キチナーゼ(8 mg)は2 mlの5 mM重炭酸アンモニウム中に懸濁した後、1/100 (w/w)のV8プロテアーゼ(エンドプロティナーゼGlu-C, ベーリンガー・マンハイム製)を加え、37°Cで3時間消化した。その後、反応溶液は1/100 (w/w)の同プロテアーゼを加えさらに3時間消化を続行した。

#### 2) キモトリプシン消化

ペプチド(1 mg)は300  $\mu$ lの0.2 Mリン酸緩衝液(pH8.0)に溶解した後、1/25 (w/w)の $\alpha$ -キモトリプシン(Type1-S, シグマ製)を加え、37°Cで2時間消化した。

#### 3) ピログルタミン酸アミノペプチダーゼ処理

Cm-キチナーゼ(4 mg)及びペプチド(2 mg)は5 mMジチオスレイトール、10 mM EDTA及び5%グリセロールを含む0.1 Mリン酸緩衝液(pH8.0)1 mlに溶解した後、1/20 (w/w)のピログルタミン酸アミノペプチダーゼ(ベーリンガー・マンハイム製)を加え、N<sub>2</sub>ガス存在下、4°Cで9時間消化した。さらに、反応溶液は1/20 (w/w)の同酵素を加え、N<sub>2</sub>ガス存在下、室温で14時間消化を続行した。消化物は0.2 Nアンモニア水溶液中でセファデックスG-50カラムを用いて試薬を除去した後、凍結乾燥した。

### 5. N末端フラグメントのゲルろ過高速液体クロマトグラフィーによる分離

V8プロテアーゼ消化物はAsahipak GS-320カラム(7.6×500 mm, 旭化成製)を付した高速液体クロマトグラフィー(HPLC)(JASCO 800シリーズ高速液体クロマトグラフ, 日本分光製)に供し、50 mM重炭酸アンモニウムと蒸留水との直線の濃度勾配により溶出した。

### 6. キモトリプシンペプチドの分離

キモトリプシン消化物は逆相HPLC, すなわち、ODS 120A S-5カラム(C18, 4.0×250 mm, 山村化学製)を付したHPLCに供し、0.1%トリフルオロ酢酸(TFA)と60%アセトニトリルを含む同溶液の直線の濃度勾配により溶出した。

### 7. アミノ酸分析及びアミノ酸配列分析

#### 1) アミノ酸分析

ペプチドは小試験管内に乾固させた後、0.05% $\beta$ -メルカプトエタノール(v/v)を含む定沸点塩酸500  $\mu$ lを加え減圧下で封管し、110°Cで20時間加水分解した。加水分解物は減圧乾固した後、400  $\mu$ lの0.02 N塩酸に溶解し、835型高速アミノ酸分析計(日立製作所製)を用いて分析した。

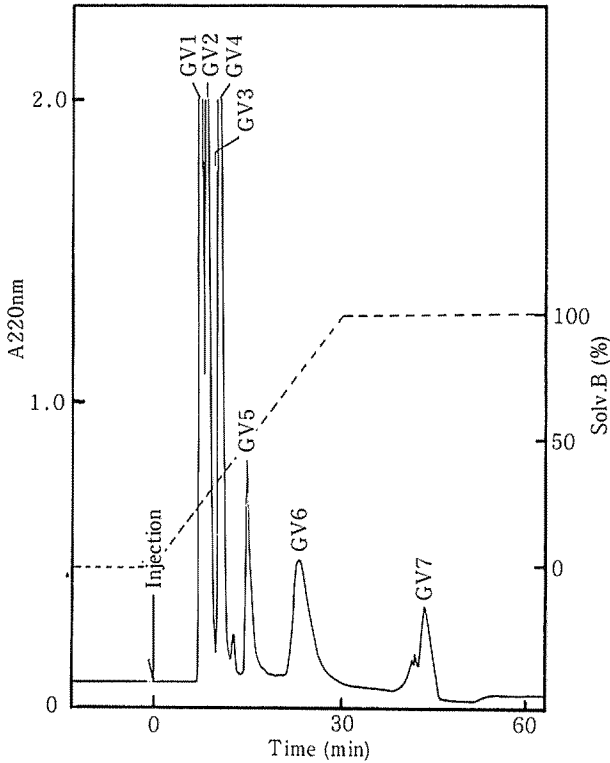


Fig. 1. Gel filtration HPLC of V8 protease peptides from Cm-chitinase on Asahipak GS-320 column. The peptides were eluted with a gradient system of 50 mM ammonium bicarbonate (solvent A) and distilled water (solvent B).

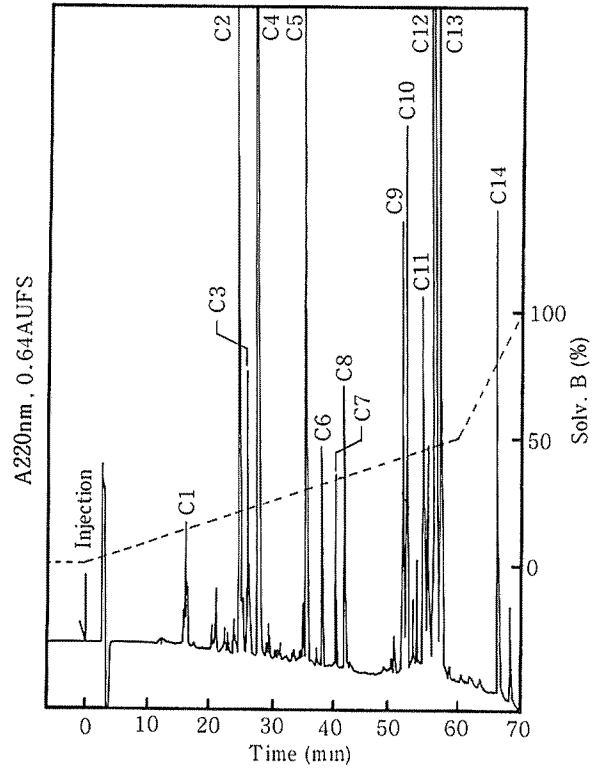


Fig. 2. Reversed-phase HPLC of chymotryptic peptides from GV2 on ODS 120A S-5 column. The peptides were eluted with a gradient system of 0.1% TFA (solvent A) and 60% acetonitrile in solvent A (solvent B).

## 2) アミノ酸配列分析

N 末端アミノ酸分析は微量手動エドマン分解法 (4 - NN - dimethylaminoazobenzene 4' - isothiocyanate : DABITC / phenylisothiocyanate : PITC double coupling method) を用いて行い、得られた 4 - NN - dimethyl - aminoazobenzene 4' - thiohydantoin (DABTH) アミノ酸を、ポリアミドレイヤーシート (シュライヒャー & シュエル製) を用いて同定した (18)。または N 末端アミノ酸分析は 477A 型自動シークエンサー (アプライドバイオシステムズ製) を用いて行い、得られた phenylthiohydantoin (PTH) アミノ酸を、120型 PTH アナライザー (アプライドバイオシステムズ製) を用いて同定した。

## 結果及び考察

ナガイモ酸性キチナーゼの amino 酸配列は先にトリプシンペプチドについて分析した結果を報告した (16)。トリプシンペプチドは 102 残基が決定され、主構造部分の約 41% に相当した。この部分はタバコ塩基性キチナーゼ (クラス I) とタバコ酸性キチナーゼ (クラス II) の主構造部分とそれぞれ約 53.3% と 46.1% の相同性を示した。すなわち、ナガイモのキチナーゼは酸性キチナーゼであるにもかかわらずクラス II よりもクラス I に近い相同性を示した。

一方、ナガイモと同属であるヤマノイモの酸性キチナーゼの分子量はナガイモ酸性キチナーゼと同じく約 33K ダルトンであり、クラス II の約 28K ダルトンよりもクラス I の約 32K ダルトンに近い値を示した。以上の点から、ヤマノイモ酸性キチナーゼの構造に N 末端ドメインの存

Table 1. Amino acid compositions of chymotryptic peptides from GV2

	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12	C13
Asp	1.00(1)	1.00(1)	1.16(1)			1.00(1)	2.07(2)	2.12(2)	2.60(3)	2.00(2)	2.50(3)	3.00(3)	3.56(4)
Thr	0.96(1)				1.71(2)	1.88(2)	2.02(2)	1.94(2)			1.41(1)	1.01(1)	1.00(1)
Ser	1.00(1)	0.94(1)	1.64(2)	0.86(1)		0.92(1)				0.55(1)			0.53(1)
Glu		0.57(1)	1.16(1)	1.02(1)		2.04(2)	1.17(1)	2.31(2)	1.96(2)	1.72(2)	1.84(2)	2.12(2)	2.17(2)
Pro									2.25(2)	2.27(2)	2.41(2)	3.06(3)	3.02(3)
Gly		1.05(1)	2.25(2)	1.03(1)					3.53(4)	2.77(3)	4.26(4)	5.06(5)	5.72(6)
Ala									1.00(1)	1.06(1)	1.00(1)	1.05(1)	1.00(1)
CmCys <sup>a)</sup>		0.91(1)	1.80(2)	1.76(2)			1.76(2)	1.80(2)	3.04(3)	2.91(3)	2.87(3)	3.67(4)	4.17(4)
Val	1.02(1)					1.57(2)							
Met													
Ile					0.96(1)	0.69(1)	0.96(1)	1.00(1)					
Leu											1.00(1)	1.10(1)	1.10(1)
Tyr		1.00(1)	2.00(2)	1.00(1)	1.00(1)		1.00(1)	1.00(1)	0.85(1)	0.87(1)	0.63(1)	1.04(1)	1.65(2)
Phe													
Lys													
His			0.96(1)	0.97(1)									
Arg													
Trp <sup>b)</sup>									0.98(1)	0.97(1)	1.13(1)	1.19(1)	1.10(1)
Total	4	6	11	7	4	9	9	10	17	16	19	22	26
Yield (n mol)	102.6	137.7	11.6	81.8	74.7	46.4	14.4	17.7	9.6	6.5	11.7	117.2	17.9

a) Cys residues were determined as CmCys.

b) Trp residues were measured by the external standard obtained under the same conditions of hydrolysis (19).

在が予想された。

N末端配列分析はまず、Cm-キチナーゼに対して行ったが、N末端アミノ酸が検出されなかった。このことからN末端アミノ基はブロックされていると考えられた。ヤマノイモ酸性キチナーゼのN末端アミノ酸は、現在までに明らかにされている植物キチナーゼのN末端にグルタミン酸及びグルタミンが多いことから、ピログルタミン酸である可能性が考えられた。そこで、Cm-キチナーゼはピログルタミン酸アミノペプチダーゼで処理した後、N末端配列分析を行った。その結果、N末端配列はAsn - Cys - Gln - X - Asp - Thr - Thr - Ile - Tyr - X - X - Ser - X - His - Gly - と同定され、N末端アミノ酸はピログルタミン酸であることが明らかになった。この配列によって、ヤマノイモ酸性キチナーゼにN末端ドメインの存在が明らかとなった。植物キチナーゼのN末端ドメインは約40残基で構成され、このドメインはキチナーゼの基質であるNアセチルグルコサ

ミンを結合するWGAドメイン(42-43残基)に相同性が高いことが報告されている(15)。そこで、次にヤマノイモ酸性キチナーゼを酵素消化し、N末端ドメインを含む大きなペプチドを得ることを試みた。すなわち、ヤマノイモ酸性キチナーゼをグルタミン酸のC末端側のペプチド結合を切断する酵素であるV8プロテアーゼで消化した。V8プロテアーゼ消化物はゲルろ過HPLCに供し、Fig. 1にその溶出像を示した。各ピークのN末端配列分析の結果、GV2はN末端がブロックされていることが明らかとなった。さらに、GV2はアミノ酸分析の結果、55残基のペプチドであったため、ヤマノイモ酸性キチナーゼのN末端ドメインを含むペプチドと考えられた。つぎに、GV2はアミノ酸配列を決定するためピログルタミン酸アミノペプチダーゼ処理後、キモトリプシンでさらに断片化を行った。

Fig. 2に示したように、キモトリプシン消化物は逆相HPLCによって14個のペプチドが得られた(C1-C14)。

Table 2. Amino acid sequences of chymotryptic peptides from GV2

—————> indicates the residues which were determined by manual Edman method. ———> indicates the residues which were determined by gas-phase sequencer. -----> indicates the residues which were determined indirectly. Cys residues were determined as CmCys.

Peptide	Sequenece
C 1	<u>Thr-Val-Ser-Asp</u>
C 2	<u>Cys-Gly-Asn-Ser-Tyr</u> <sup>5</sup>
C 3	<u>Cys- X -Glu-His-Gly-</u> <sup>5</sup>
C 4	<u>Cys-Cys-Ser-Gln-His-Gly-Tyr</u>
C 5	<u>Thr-Thr-Ile-Tyr</u>
C 6	<u>Thr-Val-Ser-Asp-Ile-Val-Thr-Gln-Glu</u> <sup>5</sup>
C 7	<u>Asn-Cys-Gln-Cys-Asp-Thr-Thr-Ile-Tyr</u>
C 8	Blocked
C 9	<u>Asp-Tyr-Cys-Gly-Pro- X -Cys-</u> <sup>5</sup>
C 10	<u>Asp-Tyr-Cys-Gly-Pro-Gly- X -Gln- X -Gly-Pro-Cys-</u> <sup>5 10</sup>
C 11	<u>Asp-Tyr-Pro-Gly-Pro-</u> <sup>5</sup>
C 12	<u>Asp-Tyr-Cys-Gly-Pro-Gly-Cys-Gln-Ala-Gly-Pro-Cys-Trp-Asp-Pro-</u> <sup>5 10</sup> <u>Cys-Glu-Gly-Asp-Gly-Thr-Leu</u> <sup>15</sup>
C 13	<u>Cys-Gly-Pro-Gly-</u>

各ペプチドのアミノ酸組成と、アミノ酸配列はそれぞれ Table 1 と Table 2 に示した。

C 1, C 2, C 4, C 5, C 6, C 7, 及び C 12 は全配列, C 3, C 9-11, 及び C 13 は部分配列を決定した。C 8 は N 末端アミノ酸が検出されずピログルタミン酸アミノペプチダーゼ未消化の N 末端ペプチドと考えられた。C 7 は Cm-キチナーゼの N 末端配列と同一配列を示したため、N 末端ペプチドと考えられた。C 6 は C 末端がグルタミン酸であることから、V 8 プロテアーゼの基質特異性より GV 2 の C 末端に位置するペプチドと考えられた。C 1 は C 6 の 1 から 4, C 5 は C 7 の 6 から

9 番目の配列であった。C 9, C 10, C 11 及び C 13 は C 12 の一部の配列であった。C 14 は回収率が非常に低くアミノ酸配列を決定することができなかった。キモトリプシンペプチドはタバコ塩基性キチナーゼの N 末端配列と比較して最も相同性の高い部分に配列し、Fig. 3 に示した (図中、配列の重複するペプチドは最も長いものを示した)。C 7 と C 4 は Cm-キチナーゼの N 末端から直接決定した配列と比較しオーバーラップが得られた。このことから、ヤマノイモ酸性キチナーゼはタバコ塩基性キチナーゼにおける N 末端より 11 から 16 番目と 35 番目のアミノ酸残基が欠失しており、また 39 番目と 40 番目の間



## 謝 辞

本研究の一部は、財団法人佐川先端化学技術振興財団助成金の補助を受けて行った。

## 引用文献

- 1) Cornelissen, B. J. C., Huijsduijnen, R. A. M. and Bol, J. F., 1986, *Nature* **321**, 531-532.
- 2) Boller, T., Gehri, A., Mauch, F. and Vogeli, U., 1983, *Planta* **157**, 22-31.
- 3) Kombrink, E., Schroder, M. and Hahlbrock, K., 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 782-786.
- 4) Pegg, G. F. and Young, D. H., 1982, *Physiol. Plant Pathol.* **21**, 389-409.
- 5) Leah, R., Mikkelsen, J. D. and Mundy, J., 1987, *Carlsberg Res. Commun.* **52**, 31-37.
- 6) Molano, J., Polacheck, I., Duran, A. and Cabib, E., 1979, *J. Biol. Chem.* **254**, 4901-4907.
- 7) Tsukamoto, T., Koga, D. and Ide, A., 1984, *Agric. Biol. Chem.* **48**, 931-939.
- 8) Metraux, J.P., Streit, L. and Staub, Th., 1988, *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **33**, 1-9.
- 9) Shinshi, H., Mohnen, D. and Meins, Jr., F., 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 89-93.
- 10) Broglie, K. E., Gaynor, J. J. and Broglie, R. M., 1986, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 6820-6824.
- 11) Laflamme, D. and Roxby, R., 1989, *Plant Molecular Biology* **13**, 249-250.
- 12) Payne, G., Ahl, P., Moyer, M., Harper, A., Beck, J., Meins, F. Jr. and Ryals, J., 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 98-102.
- 13) Metraux, J.P., Burkhardt, W., Moyer, M., Dincher, S., Middlesteadt, W., Williams, S., Payne, G., Carnes, M. and Ryals, J., 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 896-900.
- 14) Shinshi, H., Neuhaus, J-M., Ryals, J. and Meins, Jr., F., 1990, *Plant Molecular Biology* **14**, 357-368.
- 15) Lucas, J., Henschen, A., Lottspeich, F., Voegeli, U. and Boller, T., 1985, *FEBS Lett.* **193**, 208-210.
- 16) Araki, T., Koga, D., Ide, A. and Torikata, T., 1989, *Proc. Fac. Agric. Kyushu Tokai Univ.* **8**, 29-35.
- 17) Crestfield, A. M., Stein, W. H. and Moore, S., 1963, *J. Biol. Chem.* **238**, 622-627.
- 18) Chang, J. Y., Brauer, D. and Wittmann-Liebold, B., 1978, *FEBS Lett.* **93**, 205-214.
- 19) Araki, T., Kuramoto, M. and Torikata, T., 1988, *Proc. Fac. Agric. Kyushu Tokai Univ.* **7**, 81-86.