

## 11. 溶菌微生物 *Flexibacter* sp. FL824A のキチン分解酵素遺伝子の解析

[ 要約 ] *Flexibacter* sp. FL824A の染色体 DNA から、2つの活性ドメインを持つ特異な構造のキチナーゼの遺伝子と、エンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼの遺伝子の2つのキチン分解酵素遺伝子をクローニングし、全塩基配列を決定した。

国際農林水産業研究センター・畜産草地部				連絡先	0298 (38) 6308		
部会名	国際農業	専門	作物病害	対象	牧草	分類	研究

### [ 背景・ねらい ]

牧草病害において生物機能を利用した病害防除技術の開発研究はほとんど進んでいないことから、牧草での微生物間の相互作用を解明し、それを利用した病害の防除技術の開発が世界的に望まれている。これまでに、作物地上部から植物病原糸状菌を強く溶菌する細菌 *Flexibacter* sp. FL824A を分離している。しかし、その溶菌機構については不明のままである。そこで、溶菌機構の中で重要な役割を担っていると考えられるキチン分解酵素の遺伝子を明らかにし、その成果を溶菌生物を利用した病害防除技術の開発に資することを目的とする。

### [ 成果の内容・特徴 ]

1. *Flexibacter* sp. FL824A の染色体 DNA から pUC19 と大腸菌を用い、4MU-(GlcNAc)<sub>2</sub> と 4MU-(GlcNAc)<sub>3</sub> を基質として粗タンパク抽出液の分解活性を測定することにより、4株の陽性クローンを得た。それらは、基質特異性により2つのグループに分類できた(表1)。活性の大きさ、基質特異性、インサートの大きさおよび制限酵素による切断パターンからクローン CHF1149 と CHF1351 を選び出し、各々の挿入断片の制限酵素地図を作成して、少なくとも異なる2種類のキチン分解遺伝子がクローニングされたと結論した。
2. クローン CHF1149 の挿入断片の全長 8.7kb の全塩基配列を決定し、1412 アミノ酸からなるタンパクを推定した。本タンパクは、N末端側に *Bacillus circulans* WL-12 のキチナーゼ A1 の活性ドメインと、C末端側に同菌のキチナーゼ D のそれと同一性を有する2つの活性ドメインを持つ特異な構造のキチナーゼであることがわかった(図1)。
3. クローン CHF1351 については、サブクローニング後、全長 5.0kb の DNA 断片の全塩基配列を決定し、654 アミノ酸からなるタンパク質を推定した。これは、*Clostridium perfringens* のエンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼと同一性(25%、アミノ酸レベル)があった。

### [ 成果の活用面・留意点 ]

*Flexibacter* sp. FL824A の強い溶菌能力は、一つとして2つの活性ドメインをもつキチナーゼによると考えられるが、本キチナーゼの分解特性は不明のままであるので、その特性を明らかにする必要がある。

### [ 具体的データ ]

表1 4-MU-N-Acetylchitooligosid を基質とした陽性クローンの酵素活性

クローン	酵素活性 (μ Unit/ml) <sup>1)</sup>		活性比 (dimer/trimer)
	dimer <sup>2)</sup>	trimer	
グループ A			
CHF2778	7.63	10.36	0.74
CHF2601	15.81	26.16	0.60
CHF1149	232.19	446.39	0.52
グループ B			
CHF1351	768.50	40.33	19.06

- 1) 1Unit は 37℃ で 1 分間に基質から 1 μ mol の 4-MU を生成する酵素量
- 2) dimer, 4-MU-(GlcNAc)<sub>2</sub>; trimer, 4-MU-(GlcNAc)<sub>3</sub>

*Flexibacter* sp. FL824A キチナーゼ



*Bacillus circulans* WL-12 キチナーゼ A1



*Bacillus circulans* WL-12 キチナーゼ D



*Aeromonas* sp.10S-24 キチナーゼ II



図1 *Flexibacter* sp. FL824 キチナーゼと他のキチナーゼのドメイン構造の比較

- ▨, ▩, ≡, 活性ドメイン; ≡≡, キチン吸着ドメイン;
- ▬▶, フィブロネクチン・タイプ III 様ドメイン;
- , □, 機能不明のドメイン

### [ その他 ]

研究課題名: 植物病害菌に対する溶菌微生物の拮抗機構の解明と利用技術の開発

予算区分: 大型別枠(生態秩序)

研究期間: 平成8~10年

研究担当者: 安藤康雄

発表論文等: 取りまとめ中。