

第五章 綜合討論

水稻細胞會表現多種幾丁質酶

我們利用各種電泳系統，進行膠體上幾丁質酶活性染色 (zymogram)。利用 Native-IEF 和 Native PAGE，分析水稻細胞所分泌的蛋白質的結果，鑑定出 3 個具有水解 glycol chitin 活性的酵素，分別為 30-kDa 的 Osm30、34-kDa 的 OsmChi1-34 和一個分子量為 15-kDa 的蛋白質。以含 glycol chitin 的 SDS-PAGE 鑑定出一個 21 kDa protein 具有幾丁質酶活性。將這些具幾丁質酶活性的蛋白質，進行 N 端胺基酸微定序後，確定 Osm30 屬於第 IIIa 型幾丁質酶，OsmChi1-34 為第 I 型幾丁質酶 (附錄八)，而 15-kDa protein 和 21 kDa protein 則因含量及純度不足，以致無法獲得正確序列，依其分子量特徵，推測其可能為屬於 PR-4 的 hevein-like protein 或第 IV 型幾丁質酶。

利用陽離子交換管柱分離水稻所分泌的蛋白質後，我們觀察到在不與 MonoS 管柱結合的蛋白質樣品 (MonoS-) 中，分子量為 34 kDa 的蛋白質的相對含量增加 (第二章圖一，A)，然而，此 34 kDa 蛋白質的幾丁質酶活性並未增加 (第二章圖一，B)，顯然此 34 kDa 蛋白質，並非硫酸銨濃縮的總蛋白質樣品『AmS』中的 OsmChi1-34。因此，我們利用 SDS-PAGE 收集『MonoS-』樣品中的 34 kDa 蛋白質，進行其 N 端胺基酸的定序結果顯示，其為屬於第 IIIb 型的幾丁質酶，即 Osm34。

水稻細胞分泌至培養液的 Osm34 和 OsmChi1-34 成熟蛋白質的等電點分別為 4.94 和 6.44 (表一)，在 Mono S 陽離子交換管柱的分離過程中，溶液的酸鹼值為 pH 5.2，因此，在此環境下，兩個同為 34 kDa 的蛋白質，會攜帶不同的淨電荷，因而被分別分離到『MonoS-』和『MonoS+』樣品中。我們將『MonoS-』樣品進行 Native gel 的電泳分離後，再進行 2-D gel 的分析，結果顯示，只有少部分的 Osm34 蛋白質泳入 Native gel 內 (data not shown)，因此，並非 Osm34 無活性，而是此 Native gel 電泳系統不適用於 Osm34 的分離。此外，在我們鑑定出 Osm34 基因之後 (GenBank AF330320)，Park *et al.* (2001) 純化出與水稻 Osm34 相同的第 IIIb 型幾丁質酶 RCB4 (GenBank AF350426)，並鑑定其可水解 (GlcNAc)₆，但是以

glycol chitin爲受質時，只有極低的酵素活性。亦可能由於此受質專一性的因素，導致我們使用的含glycol chitin的Native gel，無法有效地鑑定出Osm34的活性。

在水稻基因組資料庫中，有 32 個基因屬於第 III 型幾丁質酶的成員，其他類型的幾丁質酶也有 20 餘個。水稻細胞會表現如此多樣的幾丁質酶，顯示其於平時，未受到任何生物或非生物性逆境處理的狀況下，即會表現各種不同型態的幾丁質酶，且這些幾丁質酶可能具有不同的受質專一性，在遭遇不同的病原菌感染後，可以互相彌補不足之處，以達到保護水稻細胞的目的。

我們的研究結果則顯示，平時只有基礎表現量的第 III 型幾丁質酶 Osm30 和 Osm34，在水稻細胞受傷、感受到環境滲透壓變化及病原菌感染的狀況下，其基因皆會被誘導而增加表現量，以進一步參與抗病反應。然而，此兩個幾丁質酶基因表現的調控情形並不完全相同，*Osm30* 的啓動子上含有 PR 基因啓動子序列上常見的 GCC-box，*Osm34* 卻不含有此序列，顯示水稻細胞在接收病原入侵的訊息後，可能經由不同類型的轉錄因子，來參與調控不同的幾丁質酶基因之表現。此外，*Osm30* 和 *Osm34* 啓動子序列上，皆含有 ABRE 及其他與 ABA 反應有關的轉錄調節位，這兩個基因的表現應都會受到逆境激素 ABA 的調控，而我們的研究結果顯示，水稻細胞中 *Osm30* 會受到 ABA 的正調控，但是 *Osm34* 卻是受到 ABA 的負調節，可能是分別經由不同型態的 ABA-相關的轉錄因子，來參與調控 *Osm30* 和 *Osm34* 基因的表現情形。植物在經過長期的演化之後，同源基因逐漸演變成具有不同的調控機制，以確保植株在不同的逆境下，有不同的 PR 蛋白質參與防禦機制。

幾丁質酶的應用

幾丁質酶基因在抗病育種方面的應用性

目前有多種 PR 基因，例如： β -1,3-糖苷酶和 proteinase inhibitors 等，已被應用在以分子遺傳技術進行作物的抗病育種上。水稻的第 I 型幾丁質酶 (RC7) 也已被證實，轉殖入作物體內後，大量表現幾丁質酶，可增加作物對於水稻病原真菌 *R. solani* 的抗病性 (Datta *et al.*, 2001)。然而，目前並無轉殖植物第 III 型幾丁質酶，以進行抗病育種的相關報導。已知有些第 III 型幾丁質酶具有雙重酵素的機能，除了可水解真菌的細胞壁幾丁質成分之外，亦具有可水解細菌細胞壁的溶菌酶活性。我們所鑑定的 Osm30 和 Osm34 分別被歸類至第 IIIa 和 IIIb 亞型幾丁

質酶，在進行重組蛋白質的生合成時，我們觀察到轉形 *Osm30* 的大腸桿菌株之生長會受到抑制。然而，轉形 *Osm34* 和 GFP 的對照組，並不會抑制細菌的生長。以上結果顯示，*Osm30* 可能具有溶菌酶的活性，未來可將此基因轉殖於作物，以期除了提高作物對真菌性病原菌抗病性之外，亦可以增加對細菌性病原的抗性。

幾丁質酶啓動子的應用潛能

Osm30 和 *Osm34* 的啓動子可能亦為具有應用的潛能。於平時，水稻植株內 *Osm30* 和 *Osm34* 蛋白質的只維持基本表現量。而我們以懸浮培養的水稻細胞為試驗模式系統時，鑑定出其基因的表現會受到植物生長調節劑 MeJA 的正向調控，且另有一些內生的抑制因子會調控其表現。未來若能對其啓動子的調控機制有更進一步的瞭解，其啓動子與其序列上的各種正向或負向的轉錄調節位，將可以應用於作物的基因轉殖方面。

第五章之圖、表

表一、水稻懸浮培養細胞所分泌的幾丁質酶之生化特性

Table 1. Biochemical properties of the chitinases secreted by suspension-cultured rice cells.

Chitinases secreted by rice cells	Osm30	Osm34	OsmChiI
Loc_	Os01g47070	Os10g28050	Os06g51060
Full length (aa)	301	307	323
Predect M.W. (kDa)	31	33.7	33.8
Predect pI	4.31	5.08	7.5
Secretory signal peptide (aa)	26	25	20
Mature protein (aa)	275	282	303
Predect M.W. (kDa)	28.3	31.2	31.5
Predect pI	4.08	4.94	6.44
M. W. in SDS-PAGE (kDa)	30	34	34
Cys #	6	2	17
Classification	IIIa	IIIb	I
Chitinase activity (Native gel with glycol chitin)	+	*	+
Anti-bacterial property	+	—	—

註：

1. “UD”：代表未進行試驗。
2. “*”：Osm34 無法進入 Native gel 中，故無法偵測活性。