

第三章 水稻 (*Oryza sativa* L.) 分泌性蛋白質 Osm34 的基因 選殖及第三型幾丁質酶基因家族的親緣關係分析

Gene cloning of rice (*Oryza sativa* L.) Osm34 secretory protein and phylogenetic analysis of the class III chitinase gene family

第一節 摘要

本研究從水稻細胞的培養液中，分離出一分子量為 34 kDa 的分泌性蛋白質 (Osm34)，經由 N 端胺基酸微定序分析及基因選殖的結果顯示：不包含分泌訊息序列的 *Osm34* cDNA 長度為 1045 bp，可轉譯出含有 282 個胺基酸，等電點為 4.94 的蛋白質。Osm34 的胺基酸序列中，除了具有醣苷水解酵素第 18 家族成員所特有的兩個保守序列，「₁₀₄RVAVSMGG₁₁₁」和「₁₄₆LDGIDIDYE₁₅₄」之外，胺基酸序列一致度的比對結果也顯示，該蛋白質為一個由我們最先鑑定的水稻第 III 型幾丁質酶，我們已將其序列註冊於 GenBank，編號為 AF330230。水稻基因組資料庫中，共登錄有 32 個具保守序列的第 III 型幾丁質酶。我們對這些幾丁質酶進行多序列比對與親緣關係分析，結果顯示這些幾丁質酶可被分類至 III a 和 III b 兩個亞型 (subclasses)。III a 亞型共包含有 29 個蛋白質，其胺基酸序列的一致度介於 34-85% 之間；III b 亞型雖僅含有 3 個蛋白質，但其胺基酸序列的一致度高達 50-83%；不同亞型之間，胺基酸序列的一致度則低於 25%。由前人的研究 (Bokma *et al.*, 2002) 得知，第 III 型幾丁質酶保守序列「DXXDXDXE」中的 D 和 E 為影響酵素活性的兩個關鍵胺基酸，但我們發現在 III a 亞型的 29 個幾丁質酶中，有 20 個成員的這兩個關鍵胺基酸發生變異，可能會導致酵素活性或受質專一性的改變。若將此一因素列入考量，我們建議將 III a 亞型幾丁質酶進一步區分為兩個次亞型 (sub-subclasses)，兩個關鍵胺基酸維持不變的九個成員為 III a-1 次亞型，而兩個關鍵胺基酸從 D 和 E 變異成 F/Y 和 D 的 20 個成員則為 III a-2 次亞型。如此，屬於 III a-1 次亞型的幾丁質酶彼此間胺基酸序列一致度也可提高到 48-69%，而同屬 III a-2 次亞型內的幾丁質酶其胺基酸序列一致度則增加為 43-85%。

Abstract

In this study, we report the identification of a novel class III chitinase (Osm34) secreted by suspension-cultured rice cells. The *Osm34* gene had been cloned and sequenced and its cDNA sequence was submitted to GenBank (accession no. AF330230). Since two amino acid sequences conserved for bacterial and fungal chitinases are also present in Osm34 ($_{104}RVAV\underline{S}M\underline{G}G_{111}$ and $_{146}LD\underline{G}I\underline{D}I\underline{D}Y\underline{E}_{154}$), this plant class III chitinase can be classified as a member of glycosyl hydrolase family 18 as well. Recently, some researchers have suggested that the plant class III chitinases to be further classified into 2 subclasses, IIIa and IIIb. However, this proposal has not been widely accepted. In this study, we are the first group to analyze the phylogeny of 32 putative class III chitinases identified in the rice genome database. Our results suggested that among the 32 examined chitinases, 29 of them, sharing identity from 34% to 85%, can be grouped into subclasses IIIa, while the rest 3, sharing identity of 50-83% are to be placed into subclasses IIIb. Meanwhile, the amino acid sequence identity between the two subclasses is less than 25%. The amino acid residues of aspartic acid (D) and glutamic acid (E) in the conserve region of class III chitinases (DXXDXDXE) are thought to be the most critical amino acids for enzyme activity (Bokma *et al.*, 2002). We discovered that 20 of rice subclasses IIIa chitinases have been mutated in these residues, while 9 of them remain unaltered. According to this variation, we suggest that the rice subclass chitinases might be further divided into two sub-subclasses. Nine members with unchanged conserve region belong to sub-subclass IIIa-1 and the other 20 members with D→F/Y and E→D mutation are classified into sub-subclass IIIa-2. By this way, the amino acid sequence identity within sub-subclass IIIa-1 and IIIa-2 would be raised to 48-69% and 43-85%, respectively.

第二節 緒言

幾丁質酶 (chitinases) 爲一廣泛存在於各種生物體內，包括真菌、植物、昆蟲、節肢動物和細菌的酵素。其主要受質爲由乙醯葡萄糖胺 GlcNAc 以 β -1,4 方式鍵結形成的幾丁質 (Collinge *et al.*, 1993; Patil *et al.*, 2000)。植物本身並不產生幾丁質，因此，一般認爲植物幾丁質酶的主要功能爲參與植物體的防禦作用，可直接水解病原菌細胞壁的幾丁質成分，或是以水解幾丁質後產生的乙醯葡萄糖胺寡糖，來間接誘發植物細胞產生殺菌素 (phytoalexins) 或表現 PR 蛋白質 (pathogenesis-related proteins) 等，以進一步阻止病原菌的擴張 (Collinge *et al.*, 1993; Patil *et al.*, 2000; Kasprzewska, 2003)。但是也有報導指出，某些植物的幾丁質酶可藉由水解自體細胞的醣蛋白或醣脂質等內生受質，而產生發育訊息分子，來調控植物的生長與發育 (de Jong *et al.*, 1992; Kasprzewska, 2003)。另外也有研究發現，某些具有幾丁質酶結構特徵的蛋白質，本身並不具有水解幾丁質的酵素活性，而常在組織發育的初期大量表現，然後在組織成熟的過程中，被代謝轉生成其他類型的蛋白質，因此這些類幾丁質酶可能是扮演儲存性蛋白質的角色 (Clendennen *et al.*, 1998; Peumans *et al.*, 2002)。

植物的幾丁質酶可被區分爲五型 (Meins *et al.*, 1994; Melchers *et al.*, 1994; Neuhaus *et al.*, 1996; Patil *et al.*, 2000; Kasprzewska, 2003)，其分類標準主要是依據胺基酸序列的相似度及其結構的特性。第 I 型幾丁質酶的 N 端有一段長約 40 個胺基酸的區域，是含有高比例 cysteine 殘基的幾丁質鍵結位，又稱爲 cysteine-rich domain (Collinge *et al.*, 1993)。第 II、IV 型幾丁質酶與第 I 型幾丁質酶有高度的胺基酸序列相似度，差異處在於第 II 型幾丁質酶不含 cysteine-rich domain；而第 IV 型的幾丁質酶雖保留有幾丁質鍵結區，但其整體分子的序列中有四段胺基酸的缺失。第 III 型幾丁質酶有獨特的胺基酸序列，與第 I、II、IV 型完全不相同，部分序列與細菌和真菌的醣苷水解酵素第十八族的幾丁質酶有相似性。第 V 型幾丁質酶與細菌的幾丁質外切酶和植物第 III 型幾丁質酶有部分序列相似，但不具有外切酶活性，其分子量通常較第 III 型幾丁質酶爲大 (Melchers *et al.*, 1994)。

幾丁質酶的另一個分類系統，是根據酵素水解機制的差異，將植物幾丁質酶歸類至醣苷水解酵素的第 18 或 19 家族 (Henrissat, 1991; Hamel *et al.*, 1997)。

第 I、II 和 IV 型幾丁質酶為醣苷水解酵素第 19 家族的成員；第 III 和第 V 型幾丁質酶則屬於醣苷水解酵素第 18 家族的成員。屬於醣苷水解酵素第 18 家族的幾丁質酶胺基酸序列中，含有兩段與酵素活性有關的保守序列：「SXXG」和「DXXDXDXE」(Watanabe *et al.*, 1993)，有些成員除了可水解幾丁質和其衍生物之外，亦具有溶菌酶 (lysozyme) 的活性。

目前，很多植物的幾丁質酶基因已被鑑定、選殖。在水稻方面，至少有數百個幾丁質酶的 cDNA 或 EST clones 已被發表在 GenBank 資料庫中，但其中卻只有少數幾個幾丁質酶曾被進行生化特性及生理功能的探討 (Xu *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 1998; Nishizawa *et al.*, 1999; Datta *et al.*, 2001)。此外，現今植物幾丁質酶的分類方法仍沿用多年前的系統 (Collinge *et al.*, 1993; Yamasaki *et al.*, 1998)，隨著基因體計畫的完成，植物體內的幾丁質酶數目得以確定，先前使用的分類系統也需被檢驗與修訂。

本研究除了最先鑑定出水稻懸浮培養細胞所分泌的 Osm34 蛋白質為第 III 型幾丁質酶家族的成員之外，也針對水稻第 III 型幾丁質酶基因家族的所有成員進行其親緣關係的探討。

第三節 材料與方法

一、植物材料與培養

請參考第二章、第三節、一 (一)。

二、Osm34 蛋白質的收集與 N 端微定序

請參考第二章、第三節、二。

三、Osm34 cDNA 的 Nested PCR 選殖與序列分析

PCR 反應之模板的製備，是利用 Sambrook *et al.* (1989) 的方法萃取繼代培養後第五天的水稻懸浮培養細胞 cDNA library (λ TriplEx, Clonetch 6162-1) 的 λ DNA，其詳細步驟請參考第二章，第三節，四 (一)。

Nested PCR 的第一次和第二次 PCR 反應的核苷酸引子分別為：P1 和 P3 及 P2 和 P3。P1 引子的序列 (5'-TAAGGATCC ATG GGC TCC GCC AAG-3'，繪底線處是 *Bam* HI 切點，ATG 為轉譯起始密碼) 相當於水稻 BAC clone nbxb0032I20 (AF229187) 之第 60973-60987 個核苷酸位置上的序列；P2 (5'-CTCGGATCC GTA AAC TCC AAC CTC-3'，繪底線處是 *Bam* HI 切點) 為 Osm34 的 N 端微定序的胺基酸序列相對應的核苷酸序列，乃相當於水稻 BAC clone nbxb0032I20 之 position 61048-61062；P3 引子 (5'-GTCGAC TCTAGA TTTTT TTTTT TTTTT-3'，繪底線處是 *Xba* I 切點) 與 mRNA 的 poly (A) tail 的序列互補。PCR 的條件依序為 95°C/5 min, 95°C/45 s、57°C/30 s 和 72°C/70 s 十次循環，及 95°C/45 s、55°C/30 s 和 72°C/70 s 二十次循環，最後再以 72°C 反應 10 分鐘。在以 PCR 選殖獲得 Osm34 的 cDNA 片段後，我們將其轉接至 pBluescript II KS+ 載體，並轉形至大腸桿菌株 XL1-Blue，隨後外送生技公司進行 DNA 定序分析。

四、水稻基因組 DNA 的分離與南方轉漬分析

(一) 基因組 DNA 之純化

1. 取 2 g 水稻細胞以液態氮研磨成粉狀後，加入 5 ml urea extraction buffer [7 M urea, 0.3 M NaCl, 50 mM Tris-Cl, pH 8.0, 20 mM EDTA, 1 % sarkosine] 混合均勻。

2. 加入 5 ml phenol/chloroform/iso-amylalcohol (25:24:1) 混合均勻後，靜置於室溫下 15 分鐘。
3. 在 4 °C 下，以 10,000 g 離心 10 分鐘，吸取上層液至乾淨的離心管中。
4. 加入 5 ml chloroform/iso-amylalcohol (24:1) 混合均勻後，在 4 °C 下，以 10,000 g 離心 10 分鐘，吸取上層液至乾淨的離心管中。
5. 加入 0.5 ml 3 M Na-acetate, pH 5.2 混合均勻，再加入 5 ml 100% (v/v) isopropanol 混合至白色絲狀物出現。
6. 將 DNA 勾入 1 ml 75 % (v/v) 酒精，在 4 °C 下，以 10,000 g 離心 10 分鐘後，倒掉酒精，再以 100 % (v/v) 酒精清洗沈澱物。
7. 於無菌操作台中風乾 DNA。
8. 以 250 µl TE buffer 回溶沈澱物，加入 2 µl Rnase A (10 mg/ml)，於 37 °C 水浴反應 10 分鐘。
9. 以等體積 phenol/chloroform/iso-amylalcohol (25:24:1) 和 chloroform/isoamylalcohol (24:1) 各萃取一次，在 4 °C 下，以 10,000 g 離心 5 分鐘，吸取上層液至乾淨的離心管中。
10. 加入 25 µl 3 M Na-acetate, pH 5.2 及 275 µl 100% (v/v) isopropanol 混合至白色絲狀物出現。
11. 將 DNA 勾出至 1 ml 75 % 酒精中，在 4 °C 下，以 10,000 g 離心 10 分鐘後，倒掉酒精，再以 100 % 絕對酒精清洗沈澱物。
12. 於無菌操作台中風乾 10 分鐘。
13. 加入 200 µl TE buffer 回溶沈澱物。
14. 取 1 µl DNA 加 TE 至 80 µl，以 Pharmacia Gene Quant II 光度計定量後，置於 4 °C 冰箱儲存。

(二) 南方轉漬分析

各取 10 µg genomic DNA 分別以 *Bam* HI、*Hind* III、*Xba* I 和 *Xho* I 進行酵素反應後，以 0.8% (w/v) 的瓊脂膠進行電泳分離，隨後轉漬至尼龍膜上 (Sambrook *et al.*, 1989)，再以 UV cross-linker 將 DNA 固定後，利用 Amersham 公

司的 AlkPhos Direct™ Labeling and Detection Systems 進行 *Osm34* 探針的螢光標定，接著將尼龍膜與製備好的螢光探針。

在 60°C 下，進行雜和反應 12-16 小時，再於相同溫度下，以 1x SSC, 0.1% SDS 和 0.5x SSC, 0.1% SDS 清洗尼龍膜各一次，每次 15 分鐘。隨後按照 Gene Images CDP-star detection modules 產品手冊 (Amersham Biosciences) 上的方法進行呈色反應。其他詳細步驟請參考第二章、第三節、五 (三)。

五、水稻第 III 型幾丁質酶的胺基酸序列之比對分析

利用 BLASTP 程式搜尋 GenBank 中與 *Osm34* 蛋白質的相似基因，並以 ClustalW 程式進行多序列比對 (multiple sequence alignments)。我們也自 GRAMENE 資料庫中 (<http://www.gramene.org/>) 尋找在水稻基因組中的第 III 型幾丁質酶基因，分析各幾丁質酶的胺基酸數目、分子量和等電點等生化特性。隨後以 Dayhoff matrix model 及 Neighbor Joining method，取一個第 I 型幾丁質酶 (Os06g51050) 和一個第 V 型幾丁質酶 (Os04g30770) 當作外群，繪出胺基酸序列的親緣系統樹；再以 Genetics Computer Group (GCG) 分析軟體 GAP 功能，分析這些幾丁質酶的胺基酸序列間之一致度 (identity) 和相似度 (similarity)，並統整於表一。

第四節 結果

一、*Osm34* 蛋白質的收集與 N 端胺基酸微定序

在本研究中，以 80%飽和度的硫酸銨濃縮水稻懸浮細胞培養液中的蛋白質即為「AmS」樣品，另外收集 60-80%飽和度的硫酸銨濃縮的培養液蛋白質，經低鹽緩衝液透析後，再以 Mono S 陽離子交換管柱進行蛋白質的吸附；不吸附而直接流過 Mono S 管柱的蛋白質則視為「Mono S-」樣品。相較於 AmS 樣品，有些蛋白質的含量在 Mono S-的樣品中因被濃縮而增加，例如 34-kDa 蛋白質，有些則是因可吸附管柱而減少 (Li and Wang, 2006)，在 SDS-PAGE 膠片上有一個分子量為 34 kDa 的蛋白質 (*Osm34*)，在不吸附 Mono S 管柱的樣品中被濃縮，因而佔有最大的比例。我們將這個蛋白質，經 SDS-PAGE 電泳分離後，轉漬到 PVDF 膜上，並進行蛋白質的 N 端胺基酸微定序，結果獲得一段 30 個胺基酸的

序列：「VNSNL FRDYI GAIFN GVKFT DVPIN PKVRF」。經與 GenBank 資料庫進行序列比對 (BLASTP) 的結果得知，Osm34 的 N 端胺基酸序列與劍蘭的 III 型幾丁質酶 (GBC) 以及和鬱金香的兩個 III 型幾丁質酶 (TBC1 和 TBC2) 的 N 端胺基酸序列有高度相似性 (圖一 C)，彼此間的一致度分別為 68%、76% 和 69%。Osm34 的 N 端胺基酸序列相對應的核苷酸序列與水稻的一個 BAC clone nbxb0032I20 (AF229187) 中的部份基因片斷的核苷酸序列一致。

二、*Osm34* 基因的選殖與分析

我們利用蛋白質 N 端胺基酸微定序的結果相對應的核苷酸序列，設計成 PCR 之 5'端引子，再利用 Nested PCR 方法，選殖 Osm34 之生成基因。如圖一 A 所示，根據水稻 BAC clone 的序列所設計第一次 PCR 反應的 5'端核苷酸引子 P1 中，包含有 Osm34 的轉譯起始點；第二次 PCR 反應的 5'端核苷酸引子 P2 的序列，則是設計自 Osm34 的 N 端胺基酸微定序的結果；兩次 PCR 反應所使用的 3'端引子，都是利用 poly (T) 引子 P3。PCR 反應所需的模板 DNA 則是萃取自水稻懸浮培養細胞的 cDNA library。進行第二次的 PCR 反應後，結果得到一長度約為 1 kb 大小的 DNA 片段，利用引子序列上的 *Bam* HI 和 *Xba* I 切位 (圖一 A)，將 *Osm34* 的 cDNA 序列植入 pBluescript II KS+ 載體中，並進行定序分析，以確認其核苷酸序列。

PCR 選殖結果的 cDNA 片段共包含 1,045 個核苷酸 (圖一 B，核苷酸 76-1120 bp)，可轉譯出 282 個胺基酸，且其 N 端起始的 30 個胺基酸序列 (圖一 B，畫框處) 與 Osm34 的 N 端微定序的胺基酸序列完全一致。

三、*Osm34* 與其他植物幾丁質酶之胺基酸序列比對

將水稻 Osm34 蛋白質的胺基酸序列，送入資料庫進行序列比對分析 (BLASTP)，結果只搜尋到 4 個與 Osm34 有 50% 以上的胺基酸序列一致度的蛋白質，這些蛋白質分別屬於水稻的 OsChib1 (AF296279)、劍蘭的 GBC (JW0077)，及鬱金香的 TBC1 (JE0183) 和 TBC2 (JE0184)；Osm34 與 OsChib1、GBC、TBC1 和 TBC2 之間的胺基酸序列一致度/相似度 (identity/similarity) 依序為：50.2%/59.1%、57.6%/67.9%、50.5%/57.5% 和 56.8%/62.3%。另外，多序列比對分

析的結果則顯示這些蛋白質都含有第 18 族糖苷水解酵素的兩段保守序列：₁₀₄RVAVSMGG₁₁₁和₁₄₆LDGIDIDYE₁₅₄ (圖一C)，特別是與植物第III型幾丁質酶活性密切相關的aspartic acid (D152) 和glutamic acid (E154) 也存在Osm34的序列中。

四、水稻基因組中 *Osm34* 相似基因的數目

利用南方轉漬分析法檢測水稻基因組中 *Osm34* 的基因或相似基因的數量。從 *Osm34* cDNA 的核苷酸序列與水稻 BAC clone nbxb0032120 的核苷酸序列比對結果得知，*Osm34* 基因內不含有 intron，因此，我們選擇 *Osm34* 的 cDNA 序列內沒有切位的酵素：*Bam* HI、*Hind* III、*Xho* I 和 *Xba* I，來進行水稻基因組 DNA 的切割，並用 *Osm34* cDNA 的部分片段 (730 bp，微定序相對應序列至 *Pst* I 切點，圖一 A) 為探針，進行南方轉漬分析。在 *Osm34* cDNA 探針雜和反應後，以 *Hind* III 切割的水稻基因組 DNA 顯示出兩個呈色較深的片段，分別約為 9 kb 和 1.8 kb，及一個顏色較淡的片段，約 4 kb。依據水稻 BAC clone nbxb0032120 之序列，可推測 *Osm34* 的基因組 DNA 上無 intron 且在 CDS (coding sequence) 上無 *Hind* III 切位，離 *Osm34* CDS 最近的 *Hind* III 切位在 BAC clone 的 57475 和 69104 的位置上，切下後長為 11,630 bps，雖然與圖二呈現的 9 kb 大小有些差距，可能是使用的電泳條件之解析力的限制，使其無法明顯區分兩者，或是水稻品系 (Tainan 5 和 Nipponbare) 之間的差異所造成；另一個 1.8 kb 大小的片段及其他訊號微弱的片段 (4 kb) 可能是其他相似基因的呈現。在其他限制酵素反應的實驗組中，亦呈現 2-3 個色帶 (圖二)，顯示水稻基因組上可能含有 2-3 個 *Osm34* 的相似基因。

五、水稻第 III 型幾丁質酶基因家族的系統分析

我們自 GRAMENE 水稻基因組資料庫中，將含有第 18 族糖苷水解酵素的活性保守區域，且資料中描述是屬於第 III 型幾丁質酶的基因挑選出來，並以一個水稻第 V 型幾丁質酶 (Os04g30770) 當作對照組，剔除同是屬於第 18 族糖苷水解酵素的第 V 型幾丁質酶，結果一共得到 32 個第 III 型幾丁質酶。在這 32 個第 III 型幾丁質酶的基因之中，已有 cDNA 或 EST clone 被發表在資料庫中的共

有 30 個；我們將這些水稻第 III 型幾丁質酶的物化特性分析的結果彙整於表一，大部分的水稻第 III 型幾丁質酶含有 280-315 個胺基酸，分子量介於 30-36 kDa 之間，其中 Os01g19750 蛋白質的 N 端及 Os01g49630 和 Os08g40680 蛋白質的 C 端多出一段胺基酸序列，導致分子量較大。這些水稻第 III 型幾丁質酶的等電點則是介於 pI 4.31-9.75 之間。在這 32 個第 III 型幾丁質酶中，Osm34、OsChib1 和 OsChib2 的分子內僅含 1-2 個 cysteine，其他的第 III 型幾丁質酶則含有 4-14 個 cysteine。

另外，我們也利用 GCG 的 GAP 程式和 ClustalW 程式，對這 32 個第 III 型幾丁質酶進行胺基酸相似度分析 (表二) 和多序列比對，隨後以 MEGA 軟體以 Neighbor Joining method 建構系統樹，各取一個第 I 型幾丁質酶 (Os05g33150) 和一個第 V 型幾丁質酶 (Os04g30770) 當作外群，繪出的親緣關係系統樹中，可將這 32 個第 III 型幾丁質酶分為 III a 和 III b 兩個亞型。其中 III a 亞型包含有 29 個成員，而 III b 亞型包含有 3 個成員 (圖三)，包括 Osm34、OsChib1 (Os10g28080) 和 OsChib2 (Os10g28120)。在 III a 亞型內，各成員的胺基酸序列一致度 (identity) 為 34-85%，相似度為 41-88%；在 III b 亞型內，各成員的一致度則有 50-83%，相似度有 59-84%。而在 III a 和 III b 兩個亞型之間胺基酸的一致度則下降到 25%，相似度也只有 37% (表二)。

在這 32 個 III 型幾丁質酶中，有 12 個成員其酵素活性保守序列上的關鍵胺基酸與「DXXDXDXE」完全符合，這 12 個成員包括 9 個 III a 亞型的成員和 3 個 III b 亞型的成員。其他 20 個 III a 亞型成員的酵素活性保守區域「DXXDXDXE」上的兩個關鍵胺基酸 aspartic acid (D) 和 glutamic acid (E) 分別被 phenylalanine (F)/tyrosine (Y) 和 aspartic acid (D) 所取代 (圖四A)。

第五節 討論

我們先前的研究已發現，有一些與植物防禦有關的蛋白質，例如：*thaumatin-like protein* 和第 I 型幾丁質酶等，在水稻細胞的懸浮培養期間，會被分泌並累積至培養液中。我們嘗試將這些水稻細胞所分泌的蛋白質進行其功能鑑定，以期望發現一些具有應用性的蛋白質或啟動子，在這過程中，我們發現了 *Osm34* 蛋白質。

水稻細胞分泌的 *Osm34* 蛋白質，在經過 N 端胺基酸微定序、基因選殖與序列分析後，已確定是一個位於水稻第十對染色體上 (*Os10g28050*)，且不含有 intron 的基因。完整的 *Osm34* cDNA 可轉譯出含 307 個胺基酸的蛋白質，與 *Osm34* 蛋白質的微定序的結果比對，得知微定序的 N 端序列之前，包含有一段 25 個胺基酸的分泌訊息序列：「MGS AK LI AV V LL PAL L AF QA PM ATA」。而分泌至水稻細胞外的 *Osm34* 成熟蛋白質序列含有 282 個胺基酸 (不包含分泌訊號)，以 ExPASy proteomics server (<http://ca.expasy.org/>) 上的軟體可估算出 *Osm34* 成熟蛋白質的分子量和等電點分別為 31.2 kDa 和 pI 4.94。然而，SDS-PAGE 電泳分析結果顯示，*Osm34* 的實際分子量為 34 kDa 與估計值有些差距，於是我們利用 ExPASy 網站上的軟體分析 *Osm34* 的胺基酸序列，找到兩個 N-醣化位 (N-glycosylation site)，分別在₁₂₂NITS₁₂₅ 和₃₀₂NATI₃₀₅ 位置上 (圖一B)，顯示可能是經由轉譯後的醣化作用，使得成熟的 *Osm34* 蛋白質的分子量比預估值較大。

根據 *Osm34* 的胺基酸序列中，含有兩段保守區：「₁₀₄RVAVSMGG₁₁₁」和「₁₄₆LDGIDIDYE₁₅₄」(圖一B) 的特性，可將其歸類至第十八族醣苷水解酵素 (Watanabe *et al.*, 1993; Gal *et al.*, 1998)。然而目前已知，植物第 III 和第 V 型幾丁質酶都屬於第十八族醣苷水解酵素，這兩型酵素之間最大的差別，為兩型之間除了保守序列有相似度之外，其他區域無法比對，第 III 型幾丁質酶與真菌幾丁質酶的胺基酸序列較相似，而第 V 型幾丁質酶與原核生物的幾丁質外切酶 (exochitinase) 的胺基酸序列較相似；且兩者之間的平均分子量範圍不同，第 III 型幾丁質酶分子量介於 25-35 kDa 之間，而第 V 型幾丁質酶分子量較大約 41-43 kDa (Melchers *et al.*, 1994)。而 *Osm34* 在相似基因的搜尋結果發現，只與在單子葉植物發現的第 III 型幾丁質酶 (水稻 *OsChib1*、劍蘭 *GBC* 和鬱金香 *TBC1* 和 *TBC2*) 有較高度的胺基酸序列相似性，因此，*Osm34* 可被歸類為第 III 型幾丁質酶。

在西元 1998 年 Yamagami *et al.* 首次將植物的第 III 型幾丁質酶進一步區分為 III a 和 III b 兩個亞型。他們在劍蘭 (*Gladiolus gandavensis*) 球莖中鑑定出 GBC 分子具有第 III 型幾丁質酶的保守特徵，但其胺基酸序列卻與其他多個第 III 型幾丁質酶的胺基酸序列只有不到 20% 的一致度；且根據 X 光繞射分析的結果 (Beintema, 1994)，當時已知的植物第 III 型幾丁質酶的分子中多含有 6 個 cysteine，蛋白質結構內常含有 3 個分子內雙硫鍵，然而，在 GBC 胺基酸序列中，只有一個 cysteine，並無法生成雙硫鍵，顯然其蛋白質的結構差異很大；此外，他們也發現 GBC 並不具溶菌酶的活性，因此，提出建議將 GBC 歸類為 III b 亞型，其他則稱為 III a 亞型。後來，同一組學者又陸續在鬱金香的球莖分離 TBC1 和 TBC2 兩個具有 III b 亞型特徵的幾丁質酶， (Yamagami *et al.*, 2000)。

在水稻方面，Park *et al.* 在 2004 年發現水稻 OsChib1 和 OsChib2 幾丁質酶的分子內，也只有一個 cysteine 殘基，且與 GBC1 的胺基酸序列有 50% 左右的一致度，故將 OsChib1 和 OsChib2 分類為第 III b 型幾丁質酶。

目前 III a 和 III b 亞型幾丁質酶的分類似乎只適用在單子葉植物中。當我們將 Osm34 的胺基酸序列送入雙子葉植物阿拉伯芥的基因組資料庫 (TAIR) 進行序列比對時，發現僅有三個屬於第 V 型幾丁質酶的蛋白質 (At4g19730、At4g19800 和 At4g19810) 與 Osm34 有部分的胺基酸相似度，並且還只侷限在兩段保守區前後約 60-85 個胺基酸長度的區域內 (有 21% 的一致度)，其他區域的胺基酸序列相似度則均低於 20%，顯示第 III b 亞型幾丁質酶可能是單子葉植物與雙子葉植物在已分離演化後才產生的。

目前有關植物幾丁質酶分類方面的報導，常都只針對少數幾個酵素在進行比對分析，尤其是有關 III b 亞型幾丁質酶的研究很少，從 1998 年至今，僅有 5-6 個酵素被鑑定並歸類為 III b 亞型 (Yamagami *et al.*, 1998; Yamagami *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2004)，因此，III a 和 III b 亞型的分類方式是否妥當，仍需更多資料來佐證。由於水稻基因體計劃已完成，我們於是從基因體資料庫中，共找到 32 個具有第 III 型幾丁質酶保守序列特徵的蛋白質，並進行胺基酸序列的多序列比對與親緣分析，以期檢驗水稻第 III 型幾丁質酶的亞型分類是否適當。

我們以 Neighbor Joining method 分析這 32 個酵素並繪出親緣系統樹 (圖三)，結果確實可將第 III 型幾丁質酶分為 III a 和 III b 兩個亞型，分別包含有 29 和 3 個成員。III b 亞型中除了 Park *et al.* (2004) 已鑑定的 OsChib1 和 OsChib2 之

外，更多了本研究新鑑定的 Osm34，且同屬 III b 亞型的成員間胺基酸的序列一致度高達 50-83%，而不同亞型之間的酵素胺基酸序列差異很大，胺基酸序列一致度只有 25% 以下；且當我們以高嚴苛度 (high stringency) 的條件下進行的南方轉漬分析試驗，檢測到的三個基因片段應該就是屬於 III b 亞型的 Osm34、OsChib1 和 OsChib2。從親緣系統樹與南方轉漬分析的結果相符，顯示將水稻第 III 型幾丁質酶分為 III a 和 III b 兩個亞型的方式是可被接受的。

然而，在 III a 亞型中，同亞型成員間的胺基酸序列一致度 34-85%，範圍很大，因此，我們也進一步觀察這些酵素的胺基酸序列特徵。在針對這 32 個第 III 型幾丁質酶進行多序列比對後發現，在部分 III a 亞型成員的酵素活性保守區上，有一些關鍵胺基酸殘基產生了變異。目前已知植物的第 III 型幾丁質酶的胺基酸序列中，至少有 6 個胺基酸殘基與酵素活性及與受質的結合力有關，其相對位置相當於 Osm34 的 D150、D152、E154、Q214、Y216 和 W280 (圖四)，而這些胺基酸在第 III 型幾丁質酶的三度空間結構上，裸露在與受質作用的區域上，且若產生變異時，對幾丁質酶的酵素活性都有某種程度上的影響 (Watanabe *et al.*, 1993; Brameld *et al.*, 1998; Bokma *et al.*, 2002; Suzukawa *et al.*, 2003)。尤其是相對於 Osm34 胺基酸序列上的 D152 和 E154 兩個關鍵胺基酸殘基，對幾丁質酶酵素活性的影響最大；利用點突變分析，探討其他第 18 族幾丁質酶的這些胺基酸殘基的功能時，發現 D 和 E 被其他胺基酸取代後，活性會降低達數十至數千倍，甚至低至無法偵測活性 (Watanabe *et al.*, 1993; Patil *et al.*, 2000; Suzukawa *et al.*, 2003)。

而我們觀察水稻第 III 型幾丁質酶的胺基酸序列，發現包含 Osm30 的 9 個 III a 亞型成員 (圖三，IIIa 下半部的九個成員) 與 3 個 III b 亞型成員的胺基酸序列上，都保有這六個重要的胺基酸殘基，且我們先前也已利用幾丁質酶的活性膠體染色證實 Osm30 的確具有酵素活性 (Li and Wang, 2006)。然而，另外 20 個 III a 亞型成員的胺基酸序列中，相對於 Osm34 的 D152 位置全都被 F 或 Y 取代；與活性關聯性最大的 E154，在這 20 個酵素中，就有 18 個是被 D 所取代；其中更有一個成員缺乏「DXXDXDXE」保守區；此外，這 20 個成員的 Q214 位置，則全被 lysine (K) 或 arginine (R) 取代；有 9 個成員 Y216 的位置已被 F 所取代；而與受質結合有關的 W280 位置，則有兩個酵素被 Y 取代。總之，這 20 個幾丁質酶分子上，與活性最有關的 6 個胺基酸殘基中，就有 3-5 個產生變異。然而，

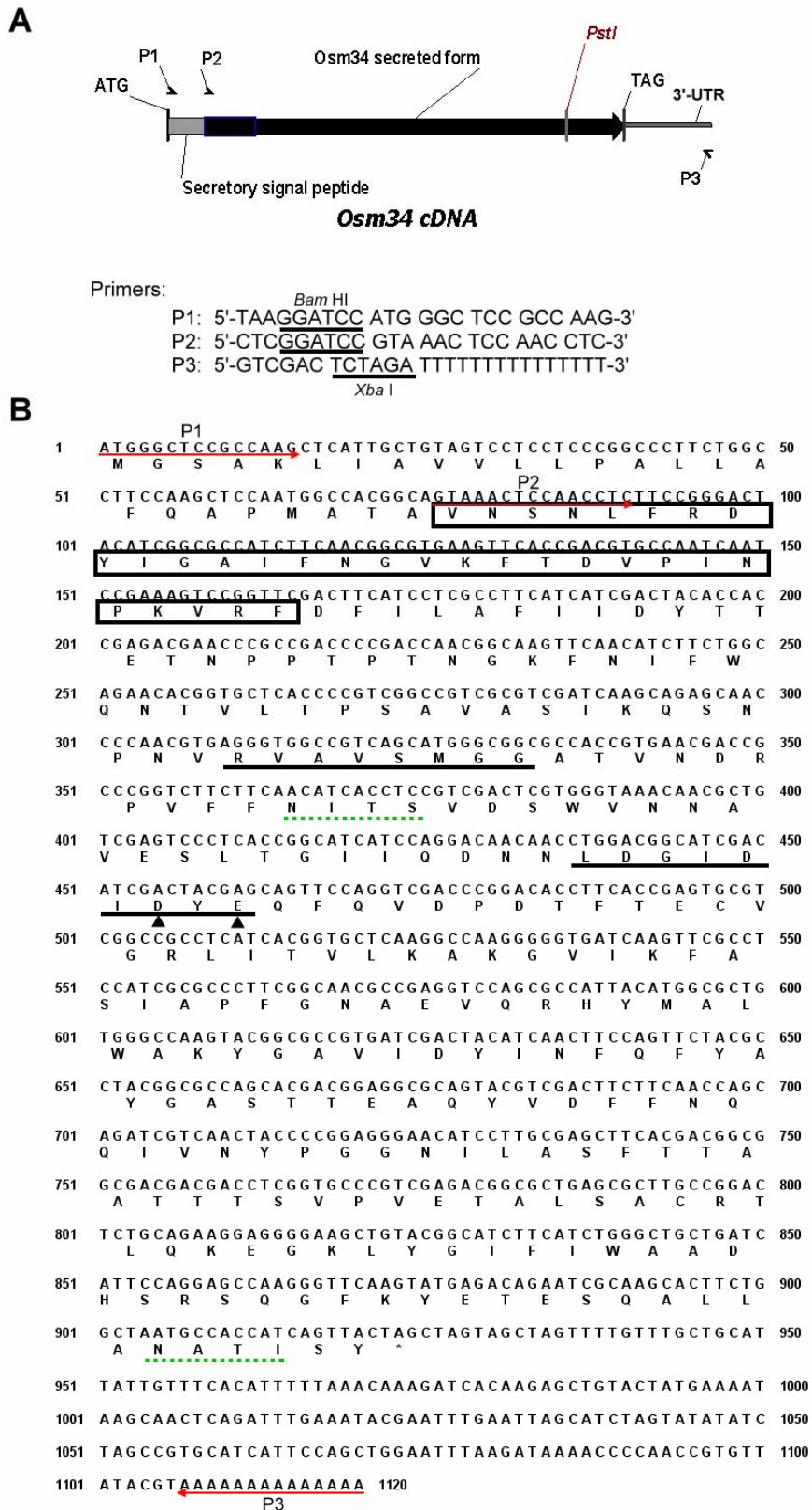
這些變異是否真的會導致酵素活性喪失，或使植物幾丁質酶改變對受質的專一性，使其能在植物細胞內扮演多種不同的生理功能，則仍需進一步探討。

總之，若將關鍵胺基酸的變異與否列入分類的考量時，可將 III a 亞型幾丁質酶再區分為兩個次亞型時，III a-1 次亞型中包含 Osm30 等 9 個成員，另外 20 個產生活性位胺基酸變異的成員則歸類為 IIIa-2。如此，同次亞型內的幾丁質酶胺基酸序列相似度全部高達 50% 以上，不同次亞型之間的胺基酸序列一致度則是分別為 34-50%。其中 III a-1 次亞型成員之間的胺基酸序列一致度和相似度可提高為 48-69%，III a-2 次亞型成員之間的胺基酸序列一致度和相似度則增加至 43-85%。

綜合以上結果，我們除了新鑑定一水稻細胞分泌的 Osm34 為第 III b 型幾丁質酶之外；也以 Osm34 的序列與阿拉伯芥的基因組資料庫進行比對，發現第 III b 亞型的幾丁質酶可能是單子葉植物特有的一群幾丁質酶；此外，我們也首次針對水稻基因組資料庫中所有的第 III 型幾丁質酶，進行多序列比對與親緣分析，確定可將其區分為 III a 和 III b 兩個亞型；並建議可考慮依活性位上關鍵胺基酸的變異與否，將第 III a 型幾丁質酶區再分為 III a-1 和 III a-2 兩個次亞型，如此，同次亞型內成員胺基酸序列的一致度可從原來的 34% 以上，提高至將近 50% 以上。

第三章之圖、表

圖一、 Osm34 的 cDNA 與胺基酸序列暨其與其他植物第 III 型幾丁質酶的胺基酸序列比對結果



C

<i>Osm34</i>	1	-----VNSN	LFRDYIGAI	F	14
<i>AF229187</i>	1	MG.SAKLIAVLLPALLAFQAPMATA		39
<i>OsChib1</i>	1	M.....GYE.....Q	15
<i>GBC</i>	1VE.....SQ	11
<i>TBC1</i>	1L.....V.....E.....SQ	11
<i>TBC2</i>	1	A.....E.....Q	11
<i>Osm34</i>	15	NGVKFTDVPINPKV-RFD	FILAFI	IDYTTETNP--PTPTN	51
<i>AF229187</i>	40	76
<i>OsChib1</i>	16	T.R.S.....V.GL.S.HA.....	FMA.QSSK.A.A	54
<i>GBC</i>	12	T.I.....RITD	Q.V.S.A	VS.P...H	48
<i>TBC1</i>	12	.D.S.....D.D.HA.....	SGSS...H	47
<i>TBC2</i>	12	.D.S.....M.D.HA.....	SGSS...H	47
<i>Osm34</i>	52	GKFNIFWQNTVLTPSAVASIKQSNPNV	RVAVSMGGATVN	-	90
<i>AF229187</i>	77	115
<i>OsChib1</i>	55	V.APY.DTAN.S.A	AA.AAH.LS	ILAL.D.QN	94
<i>GBC</i>	49	...V.DSSN.G.Q	DA.S.HN	...L...G	87
<i>TBC1</i>	48	N.KP.DTNN.S.Q	AV.RTHS.K	SL.L.DS.G	86
<i>TBC2</i>	48	N.P.DTNN.S.Q	A.RTYN.K	S.L.NS.G	86
<i>Osm34</i>	90	-DRPVFFNI-TSVD	SWHNAVESL	TGIQDNNLDGIDIDY	128
<i>AF229187</i>	115	153
<i>OsChib1</i>	95	TGVNAT.APTS	..A.R.AD	VS.L.DAYG.V.V	134
<i>GBC</i>	87	.GKS.Q.QP.S.IS.....Q	..RY	125
<i>TBC1</i>	86	.GKN.SP.S.SE.....R	..KQYH	124
<i>TBC2</i>	86	.GER.P.S.SD.....S.....K	..KQYH	124
<i>Osm34</i>	129	EQFQV-DPDTFTECV	GRLITVLKAKGVI	KFASIAPIFGNAE	167
<i>AF229187</i>	154	192
<i>OsChib1</i>	135	H.AA.GV.....V.IL.E.....	RHPNIAT.EHPV	173
<i>GBC</i>	126	N.NT.....A.IT.RNR	..N...-PD	163
<i>TBC1</i>	125	H.KG.....N.A.I	Q.V.R.KNE	VS.V.DD.Q	163
<i>TBC2</i>	125	H.KG.....N.A.I	Q.V.R.KN	VS.V.DD.Q	163
<i>Osm34</i>	168	VQRHYMALWAKYGA	VIDYINQFYAY	GASTTEAQYVDFFN	207
<i>AF229187</i>	193	232
<i>OsChib1</i>	174	..Y.QP..RR.AGV.....G	..N.DV.T.M.YD	213
<i>GBC</i>	164	.EY.L.NR.KN.NH	DS...VR.FLKYYD	203
<i>TBC1</i>	164	.S.Q.....E.HQV.....	S.R.SVE.FLKY.E	203
<i>TBC2</i>	164	.S.Q.....E.HQV.....	SSRMSVE.FLKY.E	203
<i>Osm34</i>	208	QQIVNYPGGNILAS	FTTA-ATTSVP	VETALSACRTLQKE	246
<i>AF229187</i>	233	271
<i>OsChib1</i>	214	E.AA...SKL...K	G.NV.GLLSP	QGIAGAKE..RQ	252
<i>GBC</i>	204	TAVSK.R...V.I	S.ERDAGGLT	VDRGFFD.ASI.K.Q	243
<i>TBC1</i>	204	E.SS.H.KV.V.S	D.SSGGLK	DNGFFR.SI.K.Q	242
<i>TBC2</i>	204	M.RS...KV.V.S	D.NSGGLK	RNGFFD.SI.K.Q	242
<i>Osm34</i>	247	GKLYGIFIWAADHS	RSQGFKYETES	QALLANATISY	282
<i>AF229187</i>	272	307
<i>OsChib1</i>	253	..P.L..S.S	MVSSY.F.Y.TK	QEIV.NH	286
<i>GBC</i>	244	..H.AV.S.T	K.N.R.DE.A	SF.VS	274
<i>TBC1</i>	243	..H.V.S.D	LMSNVFRY.M	QSML.S	275
<i>TBC2</i>	243	..H.V.S.D	LMSNDVFKY.M	QSLL.S	275

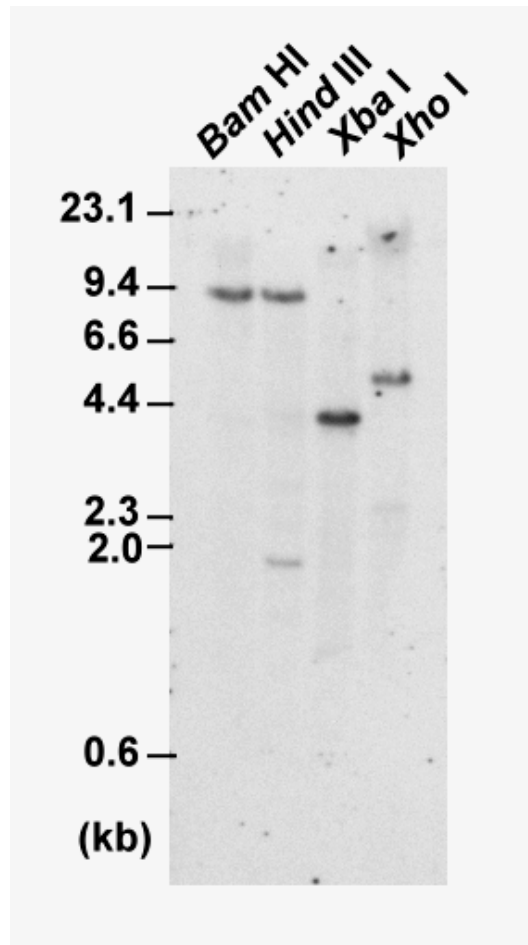
*

圖一、 *Osm34* 的 cDNA 與胺基酸序列暨其與其他植物第 III 型幾丁質酶的胺基酸序列比對結果

(A) *Osm34* 的 cDNA 圖譜與 PCR 引子序列。P1 和 P2 之 5'端繪底線處為 *Bam*HI 酵素切位，P3 之 5'端繪底線處為 *Xba*I 酵素切位。(B) *Osm34* 的 cDNA 與胺基酸序列，蛋白質 N 端 25 個胺基酸為分泌訊息序列，第 26-55 個胺基酸 (方框) 與圖一(B)的 N 端微定序結果一致。星號『*』為轉譯終止密碼，繪實線處指出第十八家族糖苷水解酵素的兩段保守區域，三角形『▲』指出酵素活性位，虛線為可能的 N-醮化位。(C) *Osm34* 胺基酸序列與其他植物第 III 型幾丁質酶進行多序列比對結果。AF229187 為一水稻的 BAC clone nbxb0032I20，*OsChib1* 為水稻的第 III 型幾丁質酶，GBC、TBC1 和 TBC2 為劍蘭和鬱金香的第 III 型幾丁質酶。『-』為 gap，使序列成最佳比對結果，黑底顯示相同胺基酸，灰底為相似胺基酸，繪實線處為第 18 族糖苷水解酵素的兩段保守序列，三角形『▼』指出酵素活性位。

Fig. 2 The nucleotide and deduced amino acid sequences of *Osm34*.

(A) The restriction enzyme map of *Osm34* cDNA and the primers used for nested PCR. (B) The predicated amino acid sequence of *Osm34* is shown below the nucleotide sequence. The box displays the microsequenced amino acid segment of *Osm34* protein. The asterisk indicates the translation termination codon. Underlines show the consensus sequences of glycosyl hydrolase family 18. Putative catalytic residues are denoted by arrowheads. (C) Comparison of cDNA-deduced amino acid sequence of *Osm34* with other plant class III chitinase from a rice (*OsChib1*), a gladiola bulb (*Gladiolus gandavensis*) chitinase GBC, and two tulip bulb chitinase (TBC1 and TBC2). Dashes indicate gaps introduced to give the best alignment. Underlines show the consensus sequences of glycosyl hydrolase family 18. Putative catalytic residues are denoted by arrowheads.

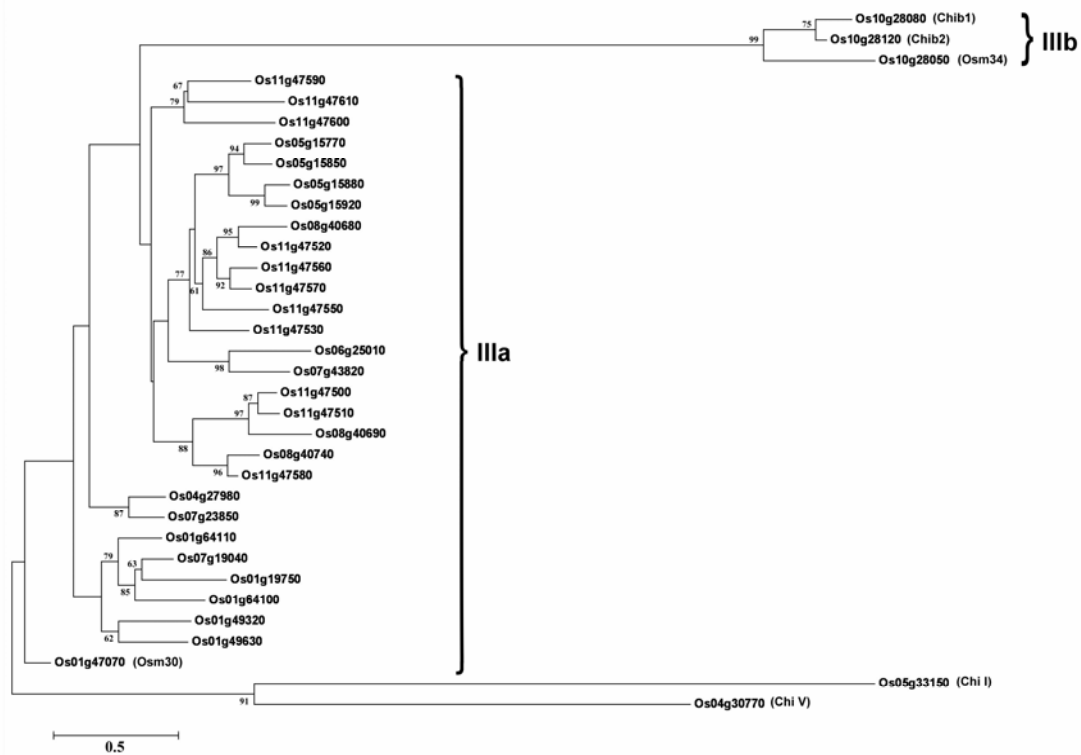


圖二、南方轉漬分析結果

將 10 μg 水稻基因組 DNA 以限制酶 *Bam* HI、*Hind* III、*Xba* I 及 *Xho* I 分別進行反應，以 0.8%瓊脂膠進行電泳分離後，轉漬到尼龍膜上，以螢光標定的 *Osm34* cDNA 片段為探針，圖左側標示為 $\lambda\text{DNA}/\text{Hind III}$ 的 DNA 分子量標準樣品。

Figure 2. Southern blot analysis.

Southern blot carrying 10 μg of rice genomic DNA digested with either *Bam* HI, *Hind* III, *Xba* I or *Xho* I was hybridized with *Osm34* cDNA probe . The size of $\lambda\text{DNA}/\text{Hind III}$ markers are shown in left.



圖三、水稻第 III 型幾丁質酶胺基酸序列的親緣系統樹

利用 Dayhoff matrix model 以 Neighbor Joining method 分析後，建構出此親緣系統樹，III b 相當於表二中含紅色區域內的幾丁質酶，III a 相當於表二藍色區域和綠色區域。其中 Os05g33150 為第 I 型幾丁質酶、Os04g30770 為第 V 型幾丁質酶，分別當做外群。分支上的數值為大於 50% bootstrap 值。

Figure 3. The phylogenetic tree of rice class III chitinases.

The amino acid sequences of rice class III chitinase were analyzed by Dayhoff matrix model and Neighbor Joining method and present in the phylogenetic tree. Os05g33150, a class I chitinase, and Os04g30770, a class V chitinase, were used as outgroups. Numbers at the forks are the result of bootstrap analysis, and represent confidence limits for grouping together the sequences on the right-hand side of that fork. The scale bar denotes 0.5 substitutions per site.

A

圖四、水稻第 III 型幾丁質酶的胺基酸多序列比對結果

Osm34, Osl10g28050 (91)	SA	VASIKSNPNVAVVSMGG	ATVMDRKY	FNITTSVDSVWNNAY	ESLITGIIIDNNMLDGDIDIDYEOF	
Chk1, Osl10g28080 (69)	AA	VAAAKAAHPNLSVLLAIGG	DTVONTQWNAIF	APTSVSDVWNNAA	DSSGGLIDAYGLDGDVDYEHF	
Chk2, Osl10g28120 (69)	AD	VAAAKAAHPNLSVWVGLGG	DVQDITK	VFSPPTSVDSDVWNAV	ASVSGIIDAYGLDGDVDYEHFND	
Osl1g19750(220)	SG	ACANLITADIA	QSMGVVLDLSIGG	GAGGYSLASKQADVSHL	ARYLDFSLGGKPS	APGGRPIGDVLDGDVDIDIEGG
Osl1g64100 (79)	SG	GCTGQSKDIRACQRRGV	VLSTIGG	DDGSYGLSSRQDAQVAA	MYLDMVFLGG	SSSRPIGDVLDGDVDIDIELG
Osl1g64110 (74)	SNG	CTGVGADIKSCOSLGI	KVMSIGG	GVGNVYGLSSRDDAKOVA	AYLDMVYLG	TSPSRPIGDVLDGDVDIDIESSG
Osl7g19040 (79)	NG	GCAQQSSDIKSCQSRGV	MLMSIGG	GAGSYVLSSEDAKNAVA	TYLDMVFLGG	QSSSRPIGDVLDGDVDIDIEGG
Osm30, Osl1g47070 (80)	SG	GCTGQSSDIQTCCSL	GVVLSIGG	GAGSYGLSSTQDA	ADVAAYLDMVFLGG	SSSRPIGDVLDGDVDIDIEFG
Osl1g49320 (83)	AG	TCKLSSEISSCQSGV	VLSTIGG	ERGVYSLSSADANGVA	DYLDVMTFLGG	SSSRPIGDVLDGDVDIDIEKDG
Osl1g49630 (82)	SG	TCASLAADIASCCQAGV	VLSTIGG	GALGYMSSPSDARDLA	AYLDMVFLGG	ATGASRPIGDVLDGDVDIDIESP
Osl4g27380 (85)	VG	PDVKVCCQSRGV	VLSTIGG	GIRVYSLASKADAKAAVA	DHLDMVFLGG	RSKRPIGDVLDGDVDIDIELG
Osl7g23850 (52)	VG	PDVKVCRSKGV	VLSTIGG	GVGRVYSLASQADAKAAVA	DHLDMVFLGG	STMSWPFQDVLDDGDVDIDIELG
Osl06g25010 (85)	IG	DDIKHCQF	IGVPSVLSIGG	FGMGYSLPSNRSAL	ELFDYLDMAVYFGGSR	AGVYRPFQDVLDDGDVDIDIEHG
Osl7g43820 (92)	IG	GDVKHCQRRKGV	VLSTIGG	GAYSLPTMOSAL	DLFELHDMVTYLGGGGKGA	VAAARPFQDVLDDGDVDIDIEG
Osl05g15770 (81)	VG	PDIKHCQSRGL	VLSTIGG	QGGYVSLPTSQA	AVDLEDFYLDMAVFLGGGR	PGVARRPFQDVLDDGDVDIDIEG
Osl05g15850 (88)	VG	GDIKHCQSKGK	TVLSTIGG	QGGYVYVLPSSQA	AVDLDYLDMAVFLGGGR	SGVARRPFQDVLDDGDVDIDIEG
Osl05g15880 (85)	VG	PDIKHCQSKGK	LLAIGG	QGGYVSLPSSQA	AVDLHDHLYSYLGGRR	NGVYRPFQDVLDDGDVDIDIEG
Osl05g15920 (86)	VG	PDIKHCQSKGK	LLAIGG	QGGYVSLPTPQA	AVELNDHLYSYLGGHR	NGVYRPFQDVLDDGDVDIDIEG
Osl1g47530 (84)	VG	ADIKHCQSKY	EPVLSIGG	QGGAYSLPTMAS	ADVADHLDMVFLGG	AGVSRPFQDVLDDGDVDIDIEG
Osl08g40680 (90)	VG	ADIHCC	QRKRWVTLAIGG	QGGYVSLPTSQA	ADVADHLDMVFLGGRR	AGVSRPFQDVLDDGDVDIDIEG
Osl1g47520 (82)	VG	ADIKHCQSRG	TVLSTIGG	QGGAYSLPTMAS	ADVADHLDMVFLGGRR	AGVARRPFQDVLDDGDVDIDIEG
Osl1g47560 (85)	VG	ADIKHCQSKG	CVLSTIGG	QGGYVSLPSSQSA	ADVADHLDMVFLGGRR	RAGVARRPFQDVLDDGDVDIDIEG
Osl1g47570 (80)	VG	ADIKHCQSKG	CVLSTIGG	QGGYVSLPSSQSA	ADVADHLDMVFLGGRR	RAGVARRPFQDVLDDGDVDIDIEG
Osl1g47550 (81)	VG	NDIKHCQ	RKRWVTLAIGG	QGGYVSLPTSQA	ADVADHLDMVFLGGRR	KGLRPFQDVLDDGDVDIDIEG
Osl08g40690 (92)	IG	ADITHC	FKAYVLSIGG	DGDGDKDYSLPSSKSA	ADVADHLDMVFLGGSR	PGVYHPPFQDVLDDGDVDIDIEG
Osl1g47500 (85)	VG	ADIRHCQSKG	VYVLSIGG	DGYVYSLPSSKSA	ADVADHLDMVFLGGDR	PGVYHPPFQDVLDDGDVDIDIEG
Osl1g47510 (93)	VG	ADIRHCQSKG	VYVLSIGG	DGDGYVYSLPSSKSA	ADVADHLDMVFLGGDR	PGVYHPPFQDVLDDGDVDIDIEG
Osl08g40740 (83)	IG	ADNKCQSK	HSYVLSIGG	AGNDYSLPSSQSA	ADVADHLDMVFLGGDR	PGVYHPPFQDVLDDGDVDIDIEG
Osl1g47580 (86)	IG	ADIKHCQSK	YVLSIGG	AGNDYSLPTS	KSADVADHLDMVFLGGDR	PGVYHPPFQDVLDDGDVDIDIEG
Osl1g47590 (87)	VG	ADIKHCQ	HAKNVTVLSTIGG	DGDGYVYSLPTPSA	ADVADHLDMVFLGGGR	HGVYHPPFQDVLDDGDVDIDIEG
Osl1g47610 (86)	VG	ADVKHCQ	AKAVTVLSTIGG	DGDGYVYSLPTPSA	ADVADHLDMVFLGGGR	HGVYHPPFQDVLDDGDVDIDIEG
Osl1g47600 (84)	VG	ADVKHCQSK	YVLSIGG	DGYVYSLPTPSA	ADVADHLDMVFLGGGR	HGVYHPPFQDVLDDGDVDIDIEG
Consensus(228) SA		VASIKSNPNVAVVSMGG	ATVMDRKY	FNITTSVDSVWNNAY	ESLITGIIIDNNMLDGDIDIDYEOF	

	367	380	390	400	450	460	474
Osm34, Osl0g28050 (204)	YGAVLDYINFQFYAAGASTTEA	QYV	---	VDFPNOQIVNYPG	GN	---	TLQ-KEGKLYGIFIAADHSRSGF
Chkb1, Osl0g28080 (185)	YACVLDYVNFQFYGAVLTDV	ALTY	---	VWFYDECAANYPG	SK	---	ELQ-FQGLPGLFISADSSMVS
Chkb2, Osl0g28120 (187)	YACVLDLVNFQFYGAVLTDV	PTTY	---	VWYFVDECAANYPG	GK	---	ELQ-FQGLPGLFISADSSMVS
Osl01g19750 (346)	DITGLFDYVWVQFYVNNPCC	QYAAAGSGG	---	GAAVLLDAURQUTSG	V	---	ALK-ASSKTYGIMLWSRYDDQ
Osl01g64100 (197)	STGLFDVAWVQFYVNNPCC	QFSAAGR	---	GAFMDAURKME	SVP	---	LIR-GSPKTYGIMLWSKYTDQ
Osl01g64110 (194)	STGLFDYVWVQFYVNNPCC	QYSSSMG	---	VGNLSAAWKQWTS	IP	---	VVK-KSPKTYGIMLWSRYDGL
Osl07g19040 (196)	NTGLFDYVWVQFYVNNPCC	QYSSGS	---	TSNLADAWKQWTS	V	---	VTK-SSGKTYGIMLWSKYDDO
Osm30, Osl01g47070 (199)	QTGLFDVWVQFYVNNPCC	QYANGD	---	ASNLVSAUNTW	TGGV	---	AVQ-GNPKTYGIMVUNRFYVQ
Osl01g49330 (197)	KTYVFSHVWVQFYVNNRCC	QYASGD	---	ASALQAAWAQUTSG	V	---	AVEGAAANYGIMLUNRURDVA
Osl01g49630 (207)	ATGLFDVWVQFYVNNPCC	QYAAPG	---	DSALRSAAWAQUTG	L	---	VVE-GAANYGIMLWSRYDSS
Osl04g27980 (199)	RTGLFDVWVQFYVNNPCC	QYRASN	---	AAAFAAAWRKASSL		---	IWC-RSRNTYGIMLWSRYWDR
Osl07g23850 (167)	RTGLFDVWVQFYVNNPCC	QYRASN	---	VAAFTSAUNKWAA	SL	---	IWC-KSKNTYGIMLWSRNUDK
Osl06g25010 (203)	ATGLFERIHVRIYDDNCE	AYVHL	---	AUDKWT	VWR	---	ELQ-KAANYGIMLDRYSDKQ
Osl07g43820 (209)	ATGATERVHVRFYGGG	GGDNCT	---	VYMEDA	URWTLAA	---	FIN-KLPNYGIMVUNRYWDR
Osl05g15770 (197)	STGLFSRIHVKVF	GDGRCASRRE	---	LEKIM	AAV	---	FIN-KLPNYGIMVUNRYWDR
Osl05g15850 (199)	ATGLFSRIHVKLF	ENDGRCWGRRE	---	SLKX	AAV	---	FIN-KLPNYGIMVUNRYWDR
Osl05g15880 (201)	ATGLFHRIVHKMF	SDGRCPAWSRR	---	CSFEK	AKTY	---	FIN-KOPNFGIMVUNDRFY
Osl05g15920 (202)	ATGLFHRIVHKMF	SDGRCPASSWIC	---	SFO	AKMY	---	YVFSKLPNFGIMVUNDRFY
Osl1g47530 (195)	ATGLFHRIVHVF	GGGDDAGCTTR	---	HRASU	ERWAAV	---	IVE-KPNTYGIMLDRYD
Osl08g40680 (202)	ATKYVDRIHVRF	GAETIERCVIS	---	S	RYSUEKAAV	---	FVT-KLPNTYGIMVUNDRY
Osl1g47520 (199)	ATVFARIHVRF	GDEQCTMSPRY	---	SUEK	AAV	---	FVR-SLPNTYGIMVUNDRY
Osl1g47560 (193)	ATVFARIHVRF	GDOCTMFPKD	---	AWEK	AAV	---	DKE--PNYGGIMLDRYD
Osl1g47570 (188)	ATGLIGRIHVRI	IFGDMCQMLPLD	---	AWEK	AAV	---	ILN--KPNYGGIMLDRYD
Osl1g47550 (195)	ATVFARIHVRF	GDDVNCIAPR	---	ESUEK	AAV	---	YLR-DRLNYGIMLDRYD
Osl08g40690 (212)	ETVFAARIHVRF	YDDPRCSYNHAG	---	LAGVMA	QUNRSASV	---	AVQ-KTDYGGIMLWNSY
Osl1g47500 (202)	DTKLFRRIVHVF	YDDPRCSYNHAG	---	LAGVMA	QUNRSATY	---	AVQ-NTDYGIMLWNSY
Osl1g47510 (210)	DTKLFQIHVRF	YDDPRCSYNHAG	---	LAGVMA	QUNRSARY	---	AVQ-KTESYAGIMLWNSY
Osl08g40740 (181)	DTKLFERIVHVF	YDDPRCSYNHAG	---	LAGVMA	QUNRSARY	---	NVQ-KAKNYGIMLDRF
Osl1g47580 (202)	DTKLFERIVHVF	YDDPRCSYNHAG	---	LAGVMA	QUNRSARY	---	NVQ-KAKNYGIMLDRFY
Osl1g47590 (198)	ATGLIGRIHVRF	YDDPRCSYDSSER	---	PPFYGA	MLGWTARY	---	LVR-GTPNYGIMLUNRH
Osl1g47610 (202)	TLSEFRLHVRF	WNSCDYNYFETR	---	PF	WGAURTWTSRF	---	SVQ-DDANYGIMLDRYD
Osl1g47600 (195)	GTSVVRHIVHVF	YDLAGIMTKTDG	GRSLFDWEDUD	ATS	RF	---	RAQ-TASNYGIMLDRGAD
Consensus (367)	YGAVLDYINFQFYAAGASTTEA	QYV	---	VDFPNOQIVNYPG	GN	---	TLQ-KEGKLYGIFIAADHSRSGF

圖四、水稻第 III 型幾丁質酶的胺基酸多序列比對結果

(A) 相對應於 Osm34 第 91-174 個胺基酸序列比對結果，「▲」指出 D150、D152 和 E154。繪黑色底線處為第 18 家族糖苷水解酵素的兩段保守區域。(B) 相對應於 Osm34 第 204-290 個胺基酸序列比對結果，「▲」指出 Q214、Y216 和 W280。「-」為 gap，使序列成最佳比對結果，各種顏色區塊內的幾丁質酶與表一相對應。

Figure 5. Multiple sequence alignment of rice class III chitinases.

(A) Multiple sequence alignment from the 91th to 174th amino acid residues of Osm34. (B) Multiple sequence alignment from the 204th to 290th amino acid residues of Osm34. Dashes “-” indicate gaps introduced to give the best alignment. Two consensus sequences similar to glycosyl hydrolase family 18 are underlined. The green, blue and red areas are relative to the rice class III chitinases in table 1. The triangle “▲” indicate the active sites of plant class III chitinase.

表一、水稻第 III 型幾丁質酶的生化特性

「Loc_」為在染色體的位置，「Length」為胺基酸數目，「M.W.」為預測的蛋白質分子量，「pI」，為預測的蛋白質等電點，「Cys#」為胺基酸序列中半胱胺酸 (Cysteine) 的數目，「cDNA/EST」為資料庫中是否含 cDNA 或 EST clones。

Table 1. Biochemical properties of rice class III chitinases.

“Loc_”, “Length”, “M.W”, “pI”, “Cys#” and “cDNA/EST” indicate the chromosomal location, number of amino acids, molecular weight, isoelectric point, number of cysteine and cDNA/EST presenting in database, respectively. “Y”, Yes; “N”, No.

Loc_	Gene	Length	M.W.	pI	Cys#	cDNA/EST
Os10g28050	<i>Osm34</i>	307	33.7	5.08	2	Y
Os10g28080	<i>Chib1</i>	286	31.1	5.17	1	Y
Os10g28120	<i>Chib2</i>	288	31.2	4.48	1	Y
Os01g19750		451	46.8	9.30	11	Y
Os01g64100		297	31.5	6.36	7	N
Os01g64110		296	31.2	8.16	6	Y
Os07g19040		297	31.6	4.80	7	N
Os01g47070	<i>Osm30</i>	301	31.0	4.31	6	Y
Os01g49320		302	31.3	4.60	10	Y
Os01g49630		686	74.3	8.09	14	Y
Os04g27980		301	32.2	9.88	5	Y
Os07g23850		269	28.7	9.29	5	Y
Os06g25010		248	27.3	6.37	4	Y
Os07g43820		316	34.2	8.50	5	Y
Os05g15770		297	32.5	6.09	4	Y
Os05g15850		293	31.8	6.65	6	Y
Os05g15880		293	32.4	8.76	4	Y
Os05g15920		297	33.0	9.00	4	Y
Os11g47530		292	31.5	6.47	4	Y
Os08g40680		416	45.8	5.50	9	Y
Os11g47520		290	31.7	6.14	4	Y
Os11g47560		284	31.2	5.88	5	Y
Os11g47570		280	30.7	6.65	5	Y
Os11g47550		289	32.2	9.28	5	Y
Os08g40690		315	35.3	8.25	4	Y
Os11g47500		304	33.7	6.47	4	Y
Os11g47510		312	35.0	9.21	4	Y
Os08g40740		283	31.9	9.75	4	N
Os11g47580		304	33.9	9.33	5	Y
Os11g47590		300	32.5	7.33	4	Y
Os11g47610		302	33.5	8.26	5	Y
Os11g47600		301	33.0	7.21	6	Y
Os04g30770	<i>ChiV</i>	479	50.3	9.53	2	Y

表二、水稻第 III 型幾丁質酶的胺基酸序列相似度分析結果

右上半側為胺基酸序列相似度 (Similarity)，左下半側為胺基酸序列一致度。胺基酸序列的一致度超過 50% 以上者分別紅色、藍色、綠色或黃色標示出。紅色區有 Os10g28050 (Osm34)、Os10g28080 (OsChib1) and Os10g28120 (OsChib2) 三個幾丁質酶。藍色區有 Os01g47070 (Osm30) 等九個幾丁質酶，綠色區有二十個幾丁質酶。Os05g33150 為第 I 型幾丁質酶、Os04g30770 為第 V 型幾丁質酶，分別當做對照組。

Table 2. Comparison of amino acid sequence of rice class III chitinases.

Results of GCG GAP program. Identity is listed in the bottom left corner, similarity is listed in the top right corner. The identity over 50% had been marked with red, blue and yellow color, respectively. There are three chitinases, Os10g28050 (Osm34), Os10g28080 (OsChib1) and Os10g28120 (OsChib2), in the red area, nine in the blue area, including Os01g47070 (Osm30), and twenty in the green area. Os05g33150, a class I chitinase, and Os04g30770, a class V chitinase, are controls.

