

## 第一章 前言

植物並無如哺乳類動物的免疫系統，其暴露在充斥微生物的環境中，逐漸演化出其獨特的抗病防禦機制，以抵禦病原菌的感染。當植物辨識到病原菌的侵入時，會激發局部性的抗病反應，即所謂的過敏反應 (hypersensitive response, HR)，在受感染的區域中，產生程序性細胞死亡，以避免病徵擴散。此外，在受到病菌感染的組織，產生並釋放一些植物生長調節劑 salicylic acid (SA)，SA 會被轉送到植株上尚未受到感染組織中，以誘發抗病蛋白質或勝肽鏈的產生，並激發系統性的抗病反應 (systemic acquired resistance, SAR) (Durrant and Dong, 2004)。

### 一、抗病蛋白質與植物抗病反應

在 1970s 年代，van Loon 首先發現，當菸草被鑲嵌病毒 (TMV) 感染之後，會產生一些平時不表現的蛋白質，並將這些蛋白質稱為「病原相關蛋白質 (pathogenesis-related (PR) proteins)」(Durrant and Dong, 2004)，這些 PR 蛋白質具有抗菌的特性，PR 蛋白質陸續被鑑定出，依據蛋白質的生物功能、酵素活性及胺基酸序列的相似度，已區分為 17 類 (表一，van Loon and van Strien, 1999)，這些抗病蛋白質包括：PR-1、 $\beta$ -1, 3-醣苷酶 ( $\beta$ -1, 3-glucanases)、幾丁質酶 (chitinases)、幾丁質鍵結蛋白 (chitin-binding proteins)、thaumatin-like proteins (TLPs)、defensins、glycine/histidine-rich proteins、ribosome-inactivating proteins (RIPs)、lipid-transfer proteins (LTPs)、protease inhibitors 和其他蛋白質。

在這些抗病蛋白質之中，有些是參與抑制真菌細胞壁的合成或直接破壞真菌細胞壁的結構 (Selitrennikoff 2001)。例如： $\beta$ -1, 3-醣苷酶 (PR-2)、幾丁質酶 (PR-3、PR-8 和 PR-11) 可直接水解真菌細胞壁上的  $\beta$ -1, 3-醣苷 ( $\beta$ -1, 3-glucans) 和幾丁質成份，且有些幾丁質酶同時具有溶菌酶的酵素活性，可水解細菌細胞壁的勝肽聚醣 (peptidoglycan) 成分；而幾丁質鍵結蛋白 (PR-4) 則是只含有極微量的水解幾丁質活性，其抗菌機制未明，推測可能是其與真菌細胞壁幾丁質成份鍵結後，干擾了細胞的極性，進而抑制菌絲的生長。另有一些抗菌蛋白會破壞真菌細胞膜的功能，例如：thaumatin-like protein (PR-5)，作用在真菌的細胞膜上，產生膜穿孔 (transmembrane pores)，並改變真菌細胞內外的滲透勢，進一步促使真

菌細胞裂解而死亡；然而，仍有些 PR 蛋白質雖已證實具有抗菌功能，但其作用機制仍不明 (Selitrennikoff, 2001)。

## 二、幾丁質酶的分類

在 17 類 PR 蛋白質當中，共有四類為可水解幾丁質的酵素或可與幾丁質結合的蛋白質：PR-3、PR-4、PR-8 和 PR-11，顯然諸多幾丁質酶基因在植物受到病菌感染時會被誘導，並在植物的抗病防禦反應中扮演重要角色 (van Loon and van Strien, 1999)。

幾丁質為由  $\beta$ -1,4-*N*-acetylglucosamine (GlcNAc) 組成的聚合物，是含量僅次於纖維素的天然聚合物。其存在昆蟲、甲殼類、和大部分的真菌細胞壁上；但並不存在植物、脊椎動物或真核生物細胞中。然而，可水解幾丁質的酵素—幾丁質酶，卻廣泛地存在各種生物體內，一般認為植物的幾丁質酶參與抗病防禦反應 (Collinge *et al.*, 1993; Patil *et al.*, 2000)。

幾丁質酶 (EC 3.2.1.14) 有兩種不同的水解機制，分屬於 85 個糖苷水解酵素家族 (glycosyl hydrolase families) 中的第 18 和 19 家族 (Henrissat, 1991; Theis and Stahl, 2004)。病毒、原核生物和真核生物都有第 18 族幾丁質酶；然而，第 19 族幾丁質酶目前只在植物和少數 *Streptomyces* 中發現。不同家族的幾丁質酶之間，具有不同的演化親緣關係、蛋白質三度空間結構不同，且催化水解機制也不相同 (表二)。X 光繞射分析的結果顯示，屬於第 18 家族的幾丁質酶是由 8 個  $\alpha$ -helices 和 8 個  $\beta$ -sheets 組成筒狀的結構，第 19 家族的幾丁質酶則是由 10 個  $\alpha$ -helices 和 3 個  $\beta$ -sheets 構成雙葉形。且由於酵素立體結構的差異，導致水解機制不同，酵素活性位上含羧基的胺基酸 glutamic acid (E) 為酵素催化反應之質子供應者，第 18 家族的幾丁質酶活性位上含有一個 E，而第 19 家族的幾丁質酶酵素活性位上含有兩個 E。水解機制的差異，也造成兩者含有不同的中間產物及酵素活性抑制劑。最終產物的還原端結構也不同，前者產生具有  $\beta$ -anomer 結構的產物，而後者產生具有  $\alpha$ -anomer 結構的產物 (Kasprzewska, 2003)。

## 三、植物幾丁質酶的種類

植物可產生許多種幾丁質酶異構物，依其胺基酸序列的相似度、是否含有 N 端幾丁質鍵結位 (cystein-rich chitin-binding domain)、酵素座落的胞器位置、

蛋白質等電點及蛋白質分泌訊息序列的有無等特徵，可將其區分為第 I-V 共五型。其中植物第 I、II 和 IV 型幾丁質酶是屬於糖苷水解酵素第 19 家族，第 III 和 V 型幾丁質酶則是屬於第 18 家族 (Henrissat, 1991; Hamel *et al.*, 1997; Patil *et al.*, 2000; Kasprzewska, 2003)。

第 I 型幾丁質酶的分子量約 30-36 kDa，其 N 端含有富含 leucine 或 valine 胺基酸殘基的分泌訊息序列 (secretory signal peptide)，並含有一段長約 40 個胺基酸且 cysteine-rich 的幾丁質鍵結位，又稱為 hevein domain，此區段與幾丁質酶的催化能力無關，但與幾丁質鍵結能力、受質親和性及抗菌能力有關；有些第 I 型幾丁質酶的 C 端含有 vacuolar localization signal peptide。此外，依其等電點高低，可將其再區分為 Ia 和 Ib 兩個亞型，第 Ia 亞型幾丁質酶具有高等電點，為鹼性幾丁質酶，存在液泡中；第 Ib 亞型幾丁質酶為酸性幾丁質酶，會被分泌至胞外 (apoplast)。

第 II 型幾丁質酶的 N 端缺少幾丁質鍵結位，分子量約 27-28 kDa，其胺基酸序列與第 I 型幾丁質酶有 60-65% 的一致度 (identity)，同型成員之間的胺基酸序列一致度高於 70%。

第 IV 型幾丁質酶則是含有 N 端幾丁質鍵結位，胺基酸序列與第 I 型幾丁質酶有 35-50% 的一致度，同型成員之間的胺基酸一致度高於 60%，但其中有四段胺基酸序列的缺失 (deletions)，導致其分子量較第 I 型幾丁質酶為小。

第 III 型幾丁質酶的分子量約 25-35 kDa，與第 I、II 和 IV 型幾丁質酶的胺基酸序列完全不同，其序列中含有糖苷水解酵素第 18 家族成員的兩段保守序列特徵：『SXXG』和『DXXDXDXE』 (Watanabe *et al.*, 1993)，其中的 E 即為酵素活化位上的 glutamic acid (表二)。

第 V 型幾丁質酶與細菌的幾丁質外切酶有序列相似性，但不具有外切酶活性，亦屬於糖苷水解酵素第 18 家族，含有上述的兩段保守區序列。然而，其與植物第 III 型幾丁質酶的胺基酸序列相似度低於 20%，分子量較第 III 型幾丁質酶為大，約 41-43 kDa (Melchers *et al.*, 1994; Brunner *et al.*, 1998)。

#### 四、植物幾丁質酶的受質

幾丁質酶除了可以水解幾丁質及其衍生物 chitosan (deacetylated chitin) 為受質之外，亦可水解由固氮菌產生的含有 GlcNAc 成分的

lipochitooligosaccharides (Nod factors)；另有些植物幾丁質酶具有似溶菌酶的酵素功能，可水解細菌細胞壁上的由 GlcNAc 和 *N*-acetylmuramic acid 組成的肽聚糖；雖然目前仍未確定找到植物幾丁質酶的內生受質，然而，有相關報導指出植物幾丁質酶可水解植物的 arabinogalactan proteins (AGPs) 及細胞壁上含 GlcNAc 的糖蛋白，這些成分可能即為植物幾丁質酶的內生受質 (Kasprzewska, 2003)。

## 五、幾丁質酶的功能

不同生物體內，具有多種幾丁質酶，主要受質為幾丁質，但是不同物種的幾丁質酶仍有其酵素受質專一性及其他特徵的差異，使其具有多種不同的生物功能。

在細菌細胞中，幾丁質酶參與營養的利用 (nutrition) 與寄生 (parasitism) 的功能；在真菌、原生動物及無脊椎動物，幾丁質酶參與營養利用、生長發育與型態發生 (morphogenesis)；然而，由於植物及脊椎動物體內並不含有幾丁質，其幾丁質酶最主要的角色為參與抗病防禦反應 (Patil *et al.*, 2000)。

在病原菌感染植物的早期，植物胞外幾丁質酶 (apoplastic chitinases) 水解病菌細胞壁後，會釋放出誘引劑 (elicitors)，將病菌入侵的訊息，從菌絲附近傳遞至植物的細胞間隙，隨後，植物細胞膜上的接受器接收到病原訊息之後，產生一系列的訊息傳導，進一步活化植物的防禦機制，包括合成更多的抗病蛋白 (Henrissat, 1991; Brunner *et al.*, 1998)。當菌絲深入並摧毀植物細胞後，液泡內的幾丁質酶 (vacuolar chitinases) 則扮演重要的防禦角色，其可水解菌絲新生成的幾丁質，並進一步抑制真菌生長 (Kasprzewska, 2003)。 *In vitro* 試驗證實，純化的植物幾丁質酶或利用細菌生產的重組幾丁質酶可抑制菌絲的生長 (Kim *et al.*, 1998)；而 *In vivo* 試驗，將植物幾丁質酶基因轉殖至作物，也已證實的確可增進轉殖株對真菌性病原的抗性 (Datta *et al.*, 2001)。

植物幾丁質酶除了參與抗病反應之外，也可能水解擬內生受質，並釋放出訊息分子，以調控植物的生長與發育 (Kasprzewska, 2003)。例如，胡蘿蔔 (*Daucus carota*) 的第 IV 型幾丁質酶可水解擬內生受質，釋放出訊息分子，調控體胚的發生 (embryogenesis) (De Jong *et al.*, 1992; Collinge *et al.*, 1993; Zhong *et al.*, 2002)。

幾丁質酶亦參與植物與真菌的共生作用 (Kasprzewska, 2003)。例如：非豆科植物的幾丁質酶可水解根瘤菌的 Nod factors，釋放出誘引劑，活化植物的防禦機制，並抑制根瘤的形成；植物與菌根菌 (mycorrhizal fungi) 的共生亦須由植物幾丁質酶的參與，若菌根菌與植物相容，其 chitooligosaccharides 會被植物幾丁質酶分解，植物防禦機制則不啟動，使菌絲能與植物的根部相容，達到互利共生的狀況；若非共生菌，幾丁質酶則不會水解這些誘引劑，誘引劑與細胞膜上的受質結合後，會激發 HR 反應 (Kasprzewska, 2003)。

此外，有一些類幾丁質酶的蛋白質 (chitinase-like) 雖與幾丁質酶的胺基酸序列相似，但卻不具有酵素活性，而是扮演儲存性蛋白質的角色。例如：香蕉 (*Musa spp.*) 果實發育早期，會產生並累積大量的擬第 III 型幾丁質酶 (chitinase-III homolog)，在果實發育後期，這些蛋白質被分解，並當作胺基酸來源，轉變成其他蛋白質 (Peumans *et al.*, 2002)。

## 六、植物幾丁質酶的基因表現與調節

在健康的植物，有些幾丁質酶於平時即呈現持續性表現的情形，且表現量隨著植物的年齡的增加而增加。另有一些幾丁質酶只在病原菌入侵、誘引劑和植物生長調節劑，例如乙烯 (ethylene)、水楊酸 (salicylic acid, SA) 和 茉莉酸 (jasmonic acid, JA)，等生物性因子，或受傷、乾旱、寒冷、重金屬和臭氧等非生物性因子的誘導後才表現 (Kasprzewska, 2003)。

當植物受到病原菌感染時，主要由兩個訊息路徑在調控抗病訊息，一是 SA-dependent pathway 是以 SA 為系統性的訊息分子 (systemic signal)，參與 SAR 反應；另一路徑為 JA/ethylene pathway，又稱為 SA-independent pathway，是以 JA 和乙烯為訊息分子，JA 則主要參與 necrotrophic 病原菌感染後產生的 HR 反應，且 JA 亦為植物受傷等逆境的訊息分子之一 (Thomma *et al.*, 1998; Kunkel and Brooks, 2002)。此兩訊息路徑常呈現拮抗反應。HR 和 SAR 防禦反應都有 PR 蛋白質參與其中，例如：阿拉伯芥的 PR-1 只受到 SA 誘導，defensin PDF1.2 則是受到 JA 的調控 (Kunkel and Brooks, 2002)。此外，有些植物幾丁質酶可受到 JA/ethylene 的誘導，有些則是受到 SA 的調控，更有些則是可由兩者共同調節 (Kunkel and Brooks, 2002)。

在不同的植物組織部位、不同的生長時期，或各種環境逆境下，植物會產生各種植物生長調節劑，調控植物幾丁質酶或其他 PR 基因的表現 (Farmer and Ryan, 1990; Pieterse and van Loon, 1999; Yen *et al.*, 2001; Denekamp and Smeekens, 2003)，這些基因的啓動子上常含有 W-box (WRKY binding sites)、ERE (ethylene response element, GCC-box)、EIRE (elicitor response element)、ABRE (ABA-response element) 或 G-box 等 *cis*-acting elements。其中，真菌感染後產生的誘引劑，會調控含 EIRE 序列的基因表現；病菌感染或受傷時產生的 JA 訊息分子，會調控含有 W-box 和 G-box 的基因；乙烯會調控啓動子上含有 ERE 的基因；逆境激素 ABA 則會調節啓動子上含 ABRE 序列的基因。這些訊息分子和相關的轉錄因子，形成複雜的訊息網絡，有些是互相促進，而有些是呈現拮抗反應 (Kasprzewska, 2003)。

## 七、抗病基因的應用

水稻是世界上最重要四種糧食作物之一，全世界有超過一半的人口以水稻為主食。然而，水稻的病原菌 (*Pyricularia oryzae*) 所引起之稻熱病 (rice blast) 常導致水稻產量損失達 20% (Grover and Gowthaman, 2003)。因此，近代育種學家除了傳統育種方法之外，亦開始嘗試利用分子生物學與遺傳工程的方式來改良作物，以期增進作物的抗病性，來提高糧食作物的產量和品質。利用分子遺傳技術來提升作物抗病性的策略，主要有兩個方向：首先是直接將抗菌分子，例如抗菌蛋白或毒素，轉殖於作物；其次是轉殖 R 基因或其他參與 SAR 反應的基因，使作物在病原菌感染時，可引起 HR 反應或 SAR 反應，以提升作物的抗病性 (Grover and Gowthaman, 2003)。

目前隨著水稻基因體計畫的完成，充分的基因資訊的支持下，使後續蛋白質的功能性分析更加順利。我們利用水稻懸浮培養系統，分離並鑑定水稻細胞所分泌的各種蛋白質，以期鑑定具有應用潛能的蛋白質或啓動子。研究過程中，鑑定出數種 PR 蛋白質，包括 thaumatin-like protein 和數種幾丁質酶。本論文針對這些幾丁質酶，以期對其物化特性、基因表現調節的情形及其生理功能有更深入的瞭解，並探討其是否具有應用的潛能。

## 第一章之圖、表

表一、病原菌相關蛋白質的分類

**Table 1. Classification of Pathogenesis-Related Proteins (PRs)**

<b>Family</b>	<b>Type member</b>	<b>Properties</b>
PR-1	tobacco PR-1a	antifungal, 14-17 kD
PR-2	tobacco PR-2	class I, II, and III endo-beta-1,3-glucanases, 25-35 kD
PR-3	tobacco P, Q	class I, II, IV endochitinases, 26-43 kD
PR-4	tobacco R	antifungal, win-like proteins, endochitinase activity, similar to prohevein C-terminal domain, 13-19 kD
PR-5	tobacco S	antifungal, thaumatin-like proteins, osmotins, zeamatins, permeatins, similar to alpha-amylase/trypsin inhibitors
PR-6	tomato inhibitor I	protease inhibitors, 6-13 kD
PR-7	tomato P69	endoproteases
PR-8	cucumber chitinase	class III chitinases, chitinase/lysozyme
PR-9	lignin-forming peroxidase	peroxidases, peroxidase-like proteins
PR-10	parsley PR-1	ribonucleases, Bet v 1-related proteins
PR-11	tobacco class V chitinase	endochitinase activity
PR-12	radish Ps-AFP3	plant defensins
PR-13	Arabidopsis THI2.1	thionins
PR-14	barley LTP4	nonspecific lipid transfer proteins (ns-LTPs)
PR-15	barley OxOa (germin)	oxalate oxidase
PR-16	barley OxOLP	oxalate-oxidase-like proteins
PR-17	tobacco PRp27	unknown

表二、醣苷水解酵素第 18 和 19 家族幾丁質酶的差異

**Table 2. Comparison of glycosyl hydrolase family 18 and 19.**

(Kasprzewska 2003)

<b>Family</b>	<b>18</b>	<b>19</b>
Class of plant chitinase	III, V	I, II, IV
3-D structure	( $\alpha/\beta$ ) <sub>8</sub> -barrel (8 $\alpha$ -helices and 8 $\beta$ -sheets)	bilobal (10 $\alpha$ -helices and 3 $\beta$ -sheets)
Catalytic mechanism	Retaining mechanism (substrate-assisted mechanism)	Inverting mechanism (double displacement mechanism)
Intermediate	Oxazoline ring	Oxocarboxonium ion
Catalytic residue	1 Glu (E)	2 Glu
Anomer conformation of hydrolytic products	$\beta$ -anomer	$\alpha$ -anomer
Inhibitors	Allosamidin, Hg <sup>+</sup> , Ag <sup>+</sup>	Amidines, amidrazones