

学位論文要旨

氏名	翁長 彰子
題目	糖質加水分解酵素ファミリー18 キチナーゼのキチン結合活性および抗真菌活性における LysM ドメインの役割 (The roles of LysM domain in chitin-binding and antifungal activities of glycoside hydrolase family 18 chitinases)
<p>キチナーゼ(EC3.2.1.14)は <i>N</i>-アセチルグルコサミンが β-1,4 結合したポリマーであるキチンを加水分解する酵素である。植物のキチナーゼは病原性真菌の主な細胞壁構成成分であるキチンを分解することによって、真菌の侵入および生育を抑制する生体防御タンパク質の 1 つであると考えられている。キチナーゼはその触媒ドメインの構造により糖質加水分解酵素ファミリー18(GH18)および19(GH19)に分類される。キチナーゼの抗真菌活性の報告のほとんどは GH19 キチナーゼであり、GH18 キチナーゼが抗真菌活性を示すという明確な報告はなかった。我々はシダ植物より抗真菌活性を有する <i>Pteris ryukyuensis</i> Chitinase-A (PrChi-A)を単離した。遺伝子クローニングの結果、PrChi-A は GH18 に属する植物 class IIIb キチナーゼに 2 つの LysM ドメインが連結した構造であった。LysM ドメインはペプチドグリカン、キチンオリゴ糖、Nod factor に結合することが示唆されているモチーフである。GH18 キチナーゼに LysM ドメインが連結した構造は、植物由来キチナーゼとしては全く新奇のものであった。変異体解析により、PrChi-A の LysM ドメインはそのキチンへの結合力を通して、不溶性キチン分解活性および抗真菌活性に大きく寄与していること、そして、結合には 72 番目のチロシン残基が関与していることを明らかにした。</p> <p>PrChi-A 由来 LysM ドメインの付加は GH18 キチナーゼの抗真菌活性の発揮に大きく貢献することが期待された。そこで、他の植物 GH18 キチナーゼと LysM ドメインとの融合キチナーゼを作成し、そのキチン分解活性、キチン結合活性および抗真菌活性について調べた。植物 class III キチナーゼとしてパイナップル由来キチナーゼ(PLChiA)を、class IIIb キチナーゼとしてチューリップ由来キチナーゼ(TBC-1)をそれぞれ用いて LysM 融合 GH18 キチナーゼを作成した。PLChiA は既に諸性質および部分アミノ酸配列が調べられていたが、遺伝子クローニングは行われていなかった。そこで本研究では PLChiA 遺伝子のクローニングおよび大腸菌による発現系の構築を行った。その結果、PLChiA の推定アミノ酸配列は多くの種子植物由来 class III キチナーゼと高い相同性を示す一方、リコンビナント体は極めて耐熱性が高いなどその諸性質はネイティブと同様であることが分かった。</p> <p>植物 class III および class IIIb キチナーゼへの LysM ドメインの付加は可溶性基質に対する分解活性には影響しなかったが、不溶性基質に対する分解活性およびキチン結合活性を著しく上昇させた。また、PLChiA および TBC-1 は触媒ドメイン単独では抗真菌活性はみられなかったが、LysM ドメインを連結することにより明確な抗真菌活性を示した。PrChi-A の LysM ドメインは、GH18 キチナーゼの真菌細胞壁キチンへの結合および分解活性を上昇させ、抗真菌活性の発揮に大きく寄与することが明らかになった。これらの知見は、新たな抗真菌タンパク質の創出に寄与することが期待される。</p>	

学 位 論 文 要 旨

氏 名	Shoko Onaga
題 目	<p>The roles of LysM domain in chitin-binding and antifungal activities of glycoside hydrolase family 18 chitinases (糖質加水分解酵素ファミリー18 キチナーゼのキチン結合活性および抗真菌活性における LysM ドメインの役割)</p>
<p>Chitinases (EC 3.2.1.14) catalyze the hydrolysis of chitin, which is a β-1,4-linked homopolymer or oligomer of N-acetyl glucosamine. Based on their amino acid sequences, chitinases are divided into glycoside hydrolase family 18 (GH18) and 19 (GH19). One of the physiological roles of these chitinases is to protect plants against fungal pathogens by degrading chitin, a major component of the cell wall of many fungi. GH19 chitinases have been found in many seed plants and some bacteria, and many of them exhibit antifungal activity. However, many GH18 chitinases from plants and many bacteria do not exhibit antifungal activity.</p> <p>Chitinase-A (PrChi-A), molecular mass 42 kDa, was purified from the leaves of a fern (<i>Pteris ryukyuensis</i>) using several column chromatographies. A cDNA encoding PrChi-A was cloned by rapid amplification of cDNA ends and polymerase chain reaction procedures. The deduced amino acid sequence indicated that PrChi-A is composed of two N-terminal LysM domains and a C-terminal catalytic domain, belonging to the group of plant class IIIb chitinases, linked by proline, serine, and threonine-rich regions. This type of chitinase is the first report of plant GH18 chitinase having extra LysM domains. LysM domains are found in a variety of peptidoglycan- and chitin-binding proteins. In the plant kingdom, LysM domains are found in receptors of chitooligosaccharide and related compounds. To clarify the role of LysM domains in PrChi-A, mutational analyses were done. Wild-type PrChi-A had chitin-binding and antifungal activities, but a mutant without LysM domains had lost both activities. These results suggest that the LysM domains contribute significantly to the antifungal activity of PrChi-A through their binding activity to the chitin in the fungal cell wall. Although the canonical three-dimensional LysM domain structure has been solved, the interaction of LysM domain with ligands is not clarified to date. The titration experiments, monitored by 2D-NMR, allowed us to identify several residues the domain, which are critical with chitin binding. Mutagenesis experiments showed that Tyr72 precisely involved in the chitin-binding ability of LysM domain from PrChi-A, through stacking interaction.</p> <p>To examine the contribution of LysM domain to antifungal activity of other GH18 chitinases, the chimeric chitinases were constructed and characterized. The chimeric chitinases possessing LysM domain was made by plant class III chitinase (pineapple leaf chitinase A, PLChiA) and class IIIb chitinase (tulip bulb chitinase-1, TBC-1). A complementary DNA encoding PLChiA was cloned, sequenced, and expressed in <i>Escherichia coli</i> cells. Based on the amino acid sequence homology, PLChiA belongs to the class III chitinases in glycoside hydrolase family 18.</p> <p>By connecting the LysM domain and linker region of PrChi-A to other GH18 chitinases, both the hydrolyzing activity and binding ability toward insoluble chitin were increased. In addition, the chimeric GH18 chitinases acquired antifungal activity against <i>Trichoderma viride</i>.</p>	

学位論文審査結果の要旨	
学位申請者 氏名	翁 長 彰 子
審査委員	主査 琉球 大学 教授 外 山 博 英
	副査 琉球 大学 准教授 平 良 東 紀
	副査 佐賀 大学 教授 渡 邊 啓 一
	副査 鹿児島 大学 教授 菅 沼 俊 彦
	副査 佐賀 大学 教授 光 富 勝
審査協力者	
題 目	糖質加水分解酵素ファミリー18 キチナーゼのキチン結合活性および抗真菌活性における LysM ドメインの役割 (The roles of LysM domain in chitin-binding and antifungal activities of glycoside hydrolase family 18 chitinases)
<p>キチナーゼ(EC3.2.1.14)は <i>N</i>-アセチルグルコサミンが β-1,4 結合したポリマーであるキチンを加水分解する酵素である。植物のキチナーゼは病原性真菌の主な細胞壁構成成分であるキチンを分解することによって、真菌の侵入および生育を抑制する生体防御タンパク質の 1 つであると考えられている。キチナーゼはその触媒ドメインの構造により糖質加水分解酵素ファミリー18(GH18)および 19(GH19)に分類される。キチナーゼの抗真菌活性の報告のほとんどは GH19 キチナーゼであり、GH18 キチナーゼが抗真菌活性を示すという明確な報告は無かった。我々はシダ植物より抗真菌活性を有する <i>Pteris ryukyuensis</i> Chitinase-A (PrChi-A)を単離した。遺伝子クローニングの結果、PrChi-A は GH18 に属する植物 class IIIb キチナーゼに 2 つの LysM ドメインが連結した構造であった。LysM ドメインはペプチドグリカン、キチンオリゴ糖、Nod factor に結合することが示唆されているモチーフである。GH18 キチナーゼに LysM ドメインが連結した構造は、植物由来キチナーゼとしては全く新奇のものであった。変異体解析により、PrChi-A の LysM ドメインはそのキチンへの結合力を通して、不溶性キチン分解活性お</p>	

および抗真菌活性に大きく寄与していること、そして、結合には72番目のチロシン残基が関与していることを明らかにした。

PrChi-A由来LysMドメインの付加はGH18キチナーゼの抗真菌活性の発揮に大きく貢献することが期待された。そこで、他の植物GH18キチナーゼとLysMドメインとの融合キチナーゼを作成し、そのキチン分解活性、キチン結合活性および抗真菌活性について調べた。植物class IIIキチナーゼとしてパイナップル由来キチナーゼ(PLChiA)を、class IIIbキチナーゼとしてチューリップ由来キチナーゼ(TBC-1)をそれぞれ用いてLysM融合GH18キチナーゼを作成した。PLChiAは既に諸性質および部分アミノ酸配列が調べられていたが、遺伝子クローニングは行われていなかった。そこで本研究ではPLChiA遺伝子のクローニングおよび大腸菌による発現系の構築を行った。その結果、PLChiAの推定アミノ酸配列は多くの種子植物由来class IIIキチナーゼと高い相同性を示す一方、リコンビナント体は極めて耐熱性が高いなどその諸性質はネイティブと同様であることが分かった。

植物class IIIおよびclass IIIbキチナーゼへのLysMドメインの付加は可溶性基質に対する分解活性には影響しなかったが、不溶性基質に対する分解活性およびキチン結合活性を著しく上昇させた。また、PLChiAおよびTBC-1は触媒ドメイン単独では抗真菌活性はみられなかったが、LysMドメインを連結することにより明瞭な抗真菌活性を示した。PrChi-AのLysMドメインは、GH18キチナーゼの真菌細胞壁キチンへの結合および分解活性を上昇させ、抗真菌活性の発揮に大きく寄与することが明らかになった。

以上のように、本論文は、抗真菌活性を有するキチナーゼをシダ植物より単離し、遺伝子クローニングした結果、LysMドメインを2つ連結した新奇なキチナーゼあること、そのLysMドメインが抗真菌活性に必須であること、他の抗真菌活性を示さないキチナーゼにLysMドメインを連結させた融合キチナーゼが新たに抗真菌活性を示すことを明らかにしており、これらの知見は、新たな抗真菌タンパク質の創出に寄与することが期待され、したがって、本論文は学位論文として十分に価値のあるものと判定した。

最終試験結果の要旨	
学位申請者 氏名	翁 長 彰 子
審査委員	主査 琉球 大学 教授 外 山 博 英
	副査 琉球 大学 准教授 平 良 東 紀
	副査 佐賀 大学 教授 渡 邊 啓 一
	副査 鹿児島 大学 教授 菅 沼 俊 彦
	副査 佐賀 大学 教授 光 富 勝
審査協力者	
実施年月日	平成 23年 1月 11日
試験方法 (該当のものを○で囲むこと。) (口答)・筆答	
<p>主査および副査4名は、平成23年1月11日(火)の公開審査会において、学位申請者に対して、学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について試問を行った。具体的には別紙の様な質疑応答がなされ、いずれも満足できる回答を得ることができた。</p> <p>以上の結果から、審査委員会は申請者 翁長彰子 が、博士(農学)の学位を受けるに必要な十分の学力および識見を有すると認めた。</p>	

学位申請者
氏名

翁 長 彰 子

[質問 1] 微生物由来キチナーゼの中にはキチン結合ドメインをもつ GH18 キチナーゼがあり、そのキチナーゼはキチンに結合するが抗真菌活性が無い。微生物由来キチナーゼのキチン結合ドメインと LysM ドメインはどちらもキチンに結合するにもかかわらず、抗真菌活性を発現するものとししないものがあるということは、抗真菌活性にはどういことが重要なのか？

[回答 1] キチン結合ドメインの違いによって、抗真菌活性に違いが出ているのかどうか調べる目的で、現在、微生物由来の GH18 キチナーゼに LysM ドメインを融合させた LysM 融合キチナーゼを作成し、その変異体のキチン結合活性および抗真菌活性に違いが出るのか調べる予定である。また、植物 GH19 キチナーゼのキチン結合ドメイン（ヘベインモチーフ）と LysM ドメインのスイッチングを行い、LysM ドメインが融合した GH19 キチナーゼを作成し、抗真菌活性測定を行った結果、抗真菌活性の増強が見られた。今後、LysM 融合キチナーゼの詳細な解析を行うことにより、抗真菌活性発揮に重要な要因を明らかにしていきたいと考えている。

[質問 2] LysM ドメインを持つ GH18 キチナーゼがシダ植物特有であり、シダ植物が他の植物と異なる分化をしたと考えているようだが、他にもシダ植物に特有な酵素等の事例があるのか？

[回答 2] 現在、ゲノムプロジェクトによってさまざまな植物種の全ゲノム配列が明らかにされている。しかし、シダ植物はゲノムサイズが大きすぎるためにゲノム解析は手をつけられていない状態である。さらに、その他の研究もほとんどなされていないのが現状であるため、LysM ドメインを持つキチナーゼ以外にもシダ植物特有の酵素があるのかどうかは明らかにされていない。

[質問 3] 今回はシダ植物の葉からキチナーゼを精製したということだが、細胞内の局在性などを調べたことはあるのか？また、活性染色などにより、何種類のキチナーゼが存在しているのか調べたことはあるのか？

[回答 3] 局在性は調べたことはないが、今後やってみたいと思う。また、リュウキュウイノモトソウの葉っぱの活性染色の結果、最低でも 3 種類のバンドが確認できた。

[質問 4] LysM ドメインをひとつだけ付加させた場合、TBC1 は抗真菌活性があり、PLChiA には活性が無いということだが、その違いは何なのか？

[回答 4] LysM ドメインをひとつ付加した PLChiA の変異体は TBC1 の変異体より強くキチンに結合するにもかかわらず、抗真菌活性を発揮しなかった。抗真菌活性にはキチ

ンへの結合だけではなく、他の要因も関わっていることが考えられた。しかし、その原因説明には至っていないため、さらなる詳細な解析を行う予定である。

[質問 5] PLChiA は非常に熱安定性の高いキチナーゼであると言っていたが、その LysM ドメイン融合タンパク質の熱安定はどうなっているのか？

[回答 5] PLChiA は非常に熱安定性の高いキチナーゼであり、LysM ドメイン自身も熱変性温度が 95℃ と非常に耐熱性のタンパク質である。現在のところ、また熱安定性の測定は行っていないが、融合変異体は野生型の PLChiA と同等もしくはそれ以上の非常に高い熱安定性を持つことが推測される。

[質問 6] さまざまなキチナーゼのキチン結合活性を調べているが、その pH やイオン強度などは全部同じ条件で行っているのか？ 酵素によってそれぞれ強いキチン結合能を発揮する条件が異なるのではないのか？

[回答 6] キチンへの結合に最適な pH やイオン強度が各キチナーゼにおいて異なっている可能性は考えられる。しかし、各タンパク質で pH やイオン強度の違いによるキチン結合活性への影響は調べていないのでわからない。今回の実験系は抗真菌活性とキチン結合活性の関係を調べるために行っているため、その pH やイオン強度は抗真菌活性測定に用いる培地の条件に合わせてキチン結合活性を行っている。

[質問 7] LysM ドメインのキチンへの結合には PrChi-A の 72 番目のチロシンが重要であるということだったが、LysM ドメインのアライメントの結果、チロシンに対応するアミノ酸残基は W、F、Y のほかに、S や A を持つ LysM ドメインの出現頻度が高いということだった。S や A を持つ LysM ドメインがキチンに結合しないとすると、どのような役割をしているのか？ また LysM ドメインのアライメントにおいて、全部の LysM ドメインで保存されているアミノ酸残基はないのか？

[回答 7] ほとんどのレセプタータイプの LysM ドメインには W、F、Y は保存されておらず、S や A、D の出現頻度が高くなっている。このことより、本アミノ酸残基はリガンド特異性に関わる可能性がある。また、LysM ドメインのアライメントでよく保存されているアミノ酸残基はいくつか存在する。よく保存されているアミノ酸のうち、NMR 滴定実験でキチン結合への関与が示唆されたアミノ酸残基であるアスパラギン酸残基 (D69) の変異体解析を試みた結果、本変異体は正常な立体構造を保っていなかった。本アスパラギン酸残基は LysM ドメインの立体構造の安定性に関わっていると考えられた。