

学 位 論 文 要 旨	
氏 名	高島智也
題 目	植物由来マルチドメインキチナーゼのキチン認識および抗真菌活性における各ドメインの役割 (The roles of domains of plant multi-domain chitinases in chitin recognition and antifungal activity)
<p>植物キチナーゼは真菌細胞壁に含まれるキチンの β-1,4-グリコシド結合を加水分解することによって、真菌の増殖と感染を防ぐ生体防御タンパク質である。キチナーゼには、キチン結合ドメインと触媒ドメインがリンカーを介して繋がったマルチドメインキチナーゼが存在する。マルチドメインキチナーゼは触媒ドメイン単体よりも不溶性キチンの分解と抗真菌活性に優れていることが報告されている。このことは結合ドメインと触媒ドメインが協調して基質に作用することに起因していると考えられ、タンパク質の分子進化による機能獲得・向上を考える上でも重要であるが、その解析は非常に限られている。本研究では、植物由来マルチドメインキチナーゼのキチン結合・分解活性および抗真菌活性における各ドメインの役割と協調的作用について調べた。</p> <p>スギ花粉由来キチナーゼ (CJP-4) は糖質結合モジュールファミリー (CBM) 18 と糖質加水分解酵素ファミリー (GH) 19 触媒ドメイン (Cat) がリンカーを介して繋がったマルチドメインキチナーゼである。CJP-4 は CJP-4 の触媒ドメイン (CJP-4 Cat) よりも不溶性キチンであるキチンナノファイバー (CNF) に対して強い加水分解活性を示した。また CJP-4 は CJP-4 Cat よりも <i>Trichoderma viride</i> に対して強い抗真菌活性を示した。これらの結果は CJP-4 の CBM18 が不溶性キチンと結合することによって、Cat のキチン分解を促進することを示唆した。CJP-4 の不活性変異体 (CJP-4_E108Q) とキチンとの相互作用を NMR で分析した。CJP-4_E108Q とキチンオリゴ糖 6 糖の相互作用を分析した結果、CJP-4 の CBM18 と Cat は同程度の親和性でキチンオリゴ糖 6 糖と結合するこがわかった。CJP-4_E108Q と CNF の相互作用を分析したところ、CJP-4 の CBM18 に由来するシグナル強度が減少したのに対して、Cat に由来するシグナルに変化はなかった。この結果は CJP-4 の CBM18 が CNF と強く結合することが示唆した。</p> <p>リュウキュウイノモトソウ由来キチナーゼ (PrChi-A) はキチン結合性の CBM である 2 つの LysM ドメインと Cat がリンカーを介して繋がったマルチドメインキチナーゼである。PrChi-A は強い抗真菌活性を示すが、LysM ドメインの欠損、加水分解活性の欠失が抗真菌活性を失わせることが報告されている。本研究では LysM ドメインが複数連なった LysM ドメイン多連結体 (LysMn) と LysMn と触媒ドメインを融合した LysM ドメイン多連結体融合キチナーゼ (LysMn-Cat) を作製し、抗真菌活性をはじめとする機能解析を行った。LysMn と LysMn-Cat はそれぞれ LysM ドメイン単体、触媒ドメイン単体よりも CNF に対して高い親和性を示した。LysMn-Cat は触媒ドメイン単体よりも CNF に対して高い加水分解活性を示した。驚いたことに LysMn はキチン分解活性なしで <i>T. viride</i> に対して抗真菌活性を示した。LysMn-Cat は LysMn よりも <i>T. viride</i> に対して強い抗真菌活性を示した。顕微鏡観察の結果、LysMn が菌糸先端のみを溶菌したのに対して、LysMn-Cat は菌糸の先端だけでなく、菌糸の側壁からも溶菌した。LysMn がキチン結合能によって糸状菌の生長点である菌糸先端に作用するのに対し、LysMn-Cat がキチン結合能とキチン分解活性によって菌糸の先端だけでなく側壁まで作用点を広げ、強い抗真菌活性を発揮すると考えられた。</p>	