

学位論文審査結果の要旨

学位申請者 氏 名	高 島 智 也
審査委員	主査 琉球大学 教授 平良 東紀
	副査 琉球大学 准教授 橘 信二郎
	副査 佐賀大学 准教授 永野 幸生
	副査 佐賀大学 教授 後藤 正利
	副査 鹿児島大学 准教授 藤田 清貴
審査協力者	
題 目	<p>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</p> <p>(The roles of individual domains of plant multi-domain chitinases in chitin recognition and antifungal activity)</p>
<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、触媒ドメインのみからなるシングルドメインキチナーゼよりも、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。本学位論文では、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</p>	

*Trichoderma viride*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糖と結合することがわかった。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を示唆した。

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*T. viride*に対して抗真菌活性を示した。LysMn-CatはLysMnよりも*T. viride*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させた。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。

マルチドメインキチナーゼ由来のCBM単体およびCatD単体はほとんど抗真菌活性を示さず、CBMとCatDが融合した状態で強い抗真菌活性を発揮した。本融合体においては、CBMの持つ不溶性キチンへの親和性の寄与が大きいのと同時に、キチン分解活性が抗真菌活性には必須であった。このようにマルチドメインキチナーゼにおいては、CBMとCatDが真菌細胞壁中の不溶性キチンに対して協調して作用し強い抗真菌活性を発揮する。一方で、CBM50の多連結体が、キチン加水分解活性無しに抗真菌活性を発揮するという新しい知見を得た。

本学位論文はマルチドメインキチナーゼの抗真菌活性における各ドメインの役割とその協調的作用について、構造および分子間相互作用解析に基づき詳細に記述したものである。これらの構造と機能の理解は、抗真菌性に優れたタンパク質の創出に貢献することが期待される。よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値を十分に満たしていると判断された。