

最終試験結果の要旨	
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	
実施年月日	令和 2年 1月 16日
試験方法 (該当のものを○で囲むこと。)	
<input checked="" type="radio"/> 口答 <input type="radio"/> 筆答	
<p>主査及び副査は、令和2年1月16日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。具体的には別紙のよう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が博士（農学）の学位を受けるに必要な十分の学力ならびに識見を有すると認めた。</p>	

学位申請者
氏名

高島 智也

[質問1]

LysMドメインはペプチドグリカンを認識することが、これまでに明らかにされている。LysMドメインを有するキチナーゼの基質をペプチドグリカンと想定して、実験を行わないのか？

[回答1]

*Micrococcus luteus*の細胞壁(ペプチドグリカンが主成分)を基質に用いた分解実験を行っている。その実験において、PrChi-Aが細胞壁懸濁液の濁度を低下させることはなかった。この結果から、PrChi-Aはペプチドグリカン分解活性を持たないと考えられる。LysMドメインとペプチドグリカンの結合実験は行っていない。LysMドメインとペプチドグリカンとが結合することは否定できない。

[質問2]

抗真菌活性の測定において、供試菌に*T. viride*だけを用いて実験している。それはなぜか？ほかの真菌を用いて試験しないのか？

[回答2]

*T. viride*の生育速度が速いために実験に使いやすいこと、および*T. viride*がキチナーゼに対して高い感受性を示すこと、現在までのところ、*T. viride*のみで定量的抗真菌活性測定法が確立されていることから、キチナーゼに加えた変異が抗真菌活性に与える影響を明らかにするために、*T. viride*を実験に用いている。他の真菌を用いて実験することは、キチナーゼの抗真菌スペクトルなどを明らかにするうえで重要であるので、今後検討したい。

[質問3]

LysMドメイン多連結体の抗真菌活性を發揮するメカニズムを提唱しているが、それは正しいのか？LysMドメイン多連結体が細胞壁キチンと結合することによって、真菌の生産するキチナーゼの活性を阻害することによって、細胞壁の再構成が阻害された結果、抗真菌活性を示すのではないのか？

[回答3]

LysMドメイン単体は菌糸と結合するにもかかわらず抗真菌活性を示さない。LysMドメイン単体であっても、LysMドメイン多連結体であっても、キチンと結合して真菌のキチナーゼの働きを阻害する可能性がある。しかし、LysMドメイン多連結体が抗真菌活性を示すのに対し、LysMドメインの単体は抗真菌活性を示さない。この結果は、LysMドメインが抗真菌活性を示すためには、1つの分子内に複数のキチン結合部位を有することが必須であることを示している。LysMドメイン多連結体のそれぞれのLysMドメインが異なるキチン鎖と結合・架橋した結果、菌糸先端において細胞壁が固定化される。本来菌糸伸張のため柔軟であるべき菌糸先端部の細胞壁が固定化されることによって、細胞伸張に伴う膨圧に耐えられなくなり溶菌するというメカニズムが妥当であると考えている。

[質問4]

GlxChi-Bのループ欠損変異体をどのようにデザインしたのか？大腸菌で発現させた変異体は封入体を形成しなかったか？GlxChi-Bの変異体を用いた不溶性キチン分解実験を行わないのか？

[回答4]

自然界にはループ構造を欠損したLoopless型キチナーゼが存在している。Loopless型キチナーゼとGlxChi-Bのアミノ酸配列を比較して、変異体をデザインした。それぞれの変異体は、大腸菌の可溶性画分に発現し、CDスペクトルも野生型とほぼ一致した。ループ構造の欠損と抗真菌活性の関係を明らかにする上で、不溶性キチンの分解実験が必要であると考え、現在実験を行っている。

[質問5]

PrChi-A(野生型酵素)はLysMドメインを二つ有している[N末端側から1番目(LysM1)および2番目の(LysM2)]。本研究ではLysM2のみを用いた多連結体とその融合キチナーゼを作製している。野生型(LysM1-LysM2-触媒ドメイン)と、LysM2を2連結させた多連結体融合キチナーゼ(LysM2-LysM2-触媒ドメイン)では、後者の方が強い抗真菌活性を示すのはなぜか？

[回答5]

LysM1とLysM2のアミノ酸配列はわずかに異なる。野生型酵素がもつLysMドメイン2連結体(LysM1-LysM2)と、本研究で作製した、N末端側から2番目のLysMドメインの2連結体(LysM2-LysM2)の抗真菌活性を比較した結果、後者の多連結体の方が前者より、強い抗真菌活性を示した。LysM1とLysM2の構造の差異が抗真菌活性に影響を与えているのは間違い無い。LysM1の多連結体や部位特異的変異体を作成し、その原因(構造)を明らかにする必要があると考えている。

[質問6]

キチンナノファイバーの分解実験の結果と、抗真菌活性の測定の結果とに明確な相関がない。本研究において、キチンナノファイバーを用いるのは適切なのか？実験にキチンナノファイバーよりも、分散性を示さないキチンを用いた方が良いのではないか？

[回答6]

キチンナノファイバーは比較的均質で分散性が高いために、再現性の高い実験データが得られる。また、分解実験だけでなく結合実験など、複数の実験結果をあわせて考察するために、キチンナノファイバーを一貫して実験に用いている。分散性を示さない結晶化度の高い基質はほとんど分解されず、また抗真菌活性との相関は見られない。むしろ、真菌の細胞壁を調整して基質として用いる方が抗真菌活性と相関を示すデータが得られると考え実験を行っている。しかし、これまでの実験結果からは、真菌細胞壁に対する分解活性と抗真菌活性にも明確な相関は得られていない。キチナーゼの構造と抗真菌活性の相関関係を明らかにするために、抗真菌活性と相関のある何らかの生化学的データを得ようとしているが、現在のところは得られていない。

[質問7]

等温滴定型カロリメトリー(ITC)を用いた結合実験によって得られた熱力学的パラメーターの解釈について説明してください。

[回答7]

マルチドメインキチナーゼの全長酵素とマルチドメインキチナーゼの触媒ドメイン単体で、キチンオリゴ糖6糖に対して同程度の親和性を示す(両者とキチンとの結合の K_{assoc} や ΔG の値が近似する)。一方で ΔG に寄与しているエンタルピー変化とエントロピー変化は両者で異なる。全長酵素の場合は、結合に対する有利なエンタルピー変化が大きい一方で、不利なエントロピー変化も大きい。触媒ドメイン単体の場合は、有利なエンタルピー変化が小さく、エントロピー変化はほとんどない。この差異は、触媒ドメインにリンカーを介して連結された糖質結合モジュールに起因している。糖質結合モジュールとキチンの結合で形成される水素結合とファンデルワールス力が、エンタルピー変化に有利に働く。一方で、糖質結合モジュールやリンカーの構造が固定されるなどの要因によってエントロピー変化が結合に不利になると考えている。

[質問8]

活性中心に変異を加えた不活性変異体が、触媒活性を失っていることを、オリゴ糖の分解実験などで証明したほうが良いのではないか？

[回答8]

グリコールキチンを基質に用いた分解実験を行っており、作製した変異体が触媒活性を失っていることを確かめている。そのデータを学位論文に追記する。