

論文内容の要旨

応用生命化学専攻
平成 16 年度博士課程入学
氏名 宮川 拓也
指導教員名 田之倉 優

論文題目

イチヨウ種子由来抗真菌タンパク質の構造機能解析

植物は動物と異なり免疫システムを持たないため、外敵である菌類の感染を防御する必要がある。特に植物の生活史の中で種子形成時は外界に対して非常に脆弱な時期で、そのため多くの植物の種子に抗菌タンパク質の存在を確認することができる。現在のところ植物由来の抗菌タンパク質は、大きく defensin, cyclophilin, miraculin そして thaumatin 類似タンパク質に代表される感染特異的 (PR) タンパク質群に分類されている。多くの被子植物からは thaumatin 類似タンパク質を含む高分子量の抗菌タンパク質が報告されている。一方、裸子植物ではイチヨウの葉に植物ホルモンの一種の jasmonate で誘導される defensin (9 kDa) や低分子量の抗菌ペプチド (4 kDa) などが報告されている。イチヨウ (*Ginkgo biloba*) は、約 2 億 5000 万年前に発生し現存する種子植物の中で最古の種で、生命力が非常に強い。例えば、東京大空襲の後 焼け野原の中で最初に芽吹いたため、その生命力が評価され東京都のシンボルマークになっている。またイチヨウは一科一属一種という特異的進化を遂げている事から、分子進化的に特異なタンパク質が含まれている可能性がある。これまでイチヨウの葉に含まれるフラボノイド等が主に研究されており、脳の機能不全の軽減などが期待されて欧米ではそのエキスはサプリメントとして広く服用されている。一方、イチヨウの種子であるギンナンは中国では肺結核の特効薬として古来より珍重されてきたが、その生理活性物質に関しての研究はまだ多くなされていない。

本研究では、ギンナンに含まれるタンパク質を分析することから始め、大量に含まれる貯蔵タンパク質の他に 10 kDa 前後の 3 種類のタンパク質が存在する事を明らかにした。そしてその中で抗真菌活性をもち、これまでに報告されているどの抗菌タンパク質ともアミノ酸配列の相同性を有していないタンパク質 Ginkbilobin-2 (Gnk2) を同定した。Gnk2 の抗真菌活性の発現機構を解明するために、構造と機能について解析を行った。

1. アミノ酸配列の決定とクローニング

ギンナンから単離した Gnk2 は、プロテアーゼ消化とアミノ酸配列分析法によって N 末端及び C 末端を含むフラグメントから部分アミノ酸配列を決定し、この配列を元に作成したプライマーを用いて RT-PCR と RACE 法によって全塩基配列 (402 bp) を決定した。これにより Gnk2 は N 末端のシグナル配列 26 残基を含む全長 134 残基のアミノ酸から構成されており、成熟に伴って細胞外に分泌されることがわかった。成熟型 Gnk2 の質量分析結果はアミノ酸配列から予想される分子量よりも 6 mass 低い値を示した。これにより Gnk2 は 6 つの Cys 残基をもっていることから 3 対のジスルフィド結合を形成し、成熟過程で糖鎖などの修飾を全く受けないことがわかった。

Gnk2 のアミノ酸配列は、白エゾマツなど裸子植物の種子の胚に豊富に含まれている機能未知のタンパク質 (EAP) と 80% 近い相同性を持っていることがわかった。被子植物においても同様のタンパク質がニンジンで同定されているが、Gnk2 との相同性は全く見られなかった。この他にも、被子植物のイネやシロイヌナズナの Cys-rich receptor-like protein kinases (CRLK) と約 30% の相同性が確認された。

2. 抗真菌活性とその発現機構

Gnk2 はこれまで報告されている抗菌タンパク質とアミノ酸配列の相同性を見出せなかった。しかしギンナンに存在する主要タンパク質の 1 つであることから、まず抗菌作用を調べてみた。その結果、Gnk2 は *Fusarium oxysporum*, *Trichoderma reesei* などの植物病原性糸状菌と *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans* などのヒト感染病原性糸状菌に対して抗真菌作用を示した。*C. albicans* はその環境によって酵母型と菌糸型の二形性を示す病原性真菌である。Gnk2 は病原性である菌糸型の *C. albicans* の生育を阻害するが、酵母型には抗真菌活性を示さなかった。また、大腸菌に対しては抗菌活性を示さなかったことから、Gnk2 は菌糸の形成阻害のみに関与することが示唆された。

抗真菌タンパク質である RP タンパク質の多くは β -glucanase, chitinase, chitin-binding protein や同等の活性をもつタンパク質で、真菌細胞壁を構成している β -glucan や chitin を基質もしくはリガンドとしている。そこで細胞壁構成成分について核磁気共鳴 (NMR) 法を用いて Gnk2 との相互作用をスクリーニングした。真菌の細胞壁は β -glucan 層を chitin が裏打ちすることで細胞の形態維持に働いており、その表層にはタンパク質の Asn 残基との結合を介して固定されたマンナン層がある。Gnk2 に酵母由来マンナンを加えることで、NMR シグナルの化学シフト変化が観測され、またシグナル強度の極端な減少を引き起こした。NMR シグナルの化学シフト変化から少なくとも 20 残基以上がマンナンの認識に関与することが明らかとなった。また一般的に NMR シグナルの強度は分子量依存的であることから、シグナル強度の極端な減少は 1 分子のマンナンに対して Gnk2 が複数分子結合したことを示した。糸状菌細胞壁表層のマンナン

層は細胞接着に重要であると考えられており、Gnk2 は糸状菌のマンナン層に結合することで菌糸の伸張を阻害し、抗真菌作用を示すと予想される。

3. 糖認識機構

Gnk2 の糖認識機構を調べるために、NMR による糖との相互作用の解析と Gnk2 の X 線結晶構造解析を行った。NMR では糖を認識する残基を特定するために、 ^{15}N HSQC スペクトル上に観測される Gnk2 由来の主鎖アミドプロトン (Pro 残基はもたない) を全て帰属した。また、X 線結晶構造では、リコンビナント Gnk2 の Se-Met 置換体で Se 原子の多波長異常分散 (MAD) 法を用いて位相を求め、分解能 2.4 Å で野生型 Gnk2 の結晶構造を決定した。

NMR による相互作用解析では、マンナン構成成分である単糖の D-mannose, α -D-mannose-1-phosphate, D-mannose-6-phosphate 及び二糖の α -1,2-mannobiose, α -1,3-mannobiose, α -1,6-mannobiose について調べた。その結果、マンノース類によって化学シフト変化を生じる残基はリン酸化の有無によって違っており、リン酸基の位置や α -グリコシド結合の様式によっては変わらなかった。決定した結晶構造に NMR の相互作用データを当てはめたところ、リン酸基をもたないマンノースは Gnk2 の β 1- α 1 ループ、 α 2- β 4 ループ及び β 4 ストランド、そして C 末端ループで構成されるサイトで認識されていた (図 1)。一方、リン酸化マンノースはこの結合サイトでは認識されないことがわかった。糖を認識するタンパク質 (レクチン) は一般的に多価であり、多くのレクチンは多量体を形成することによって複数の糖を認識する多価性を獲得している。こうした多価性は、例えば植物の根粒形成に関わる根粒菌を濃縮するために重要である。Gnk2 は単量体であることが動的光散乱などの実験で確認されており、糖に対する特異的な結合サイトを 1 つしかもたないことから、Gnk2 単体では多価性を示さないと考えられる。

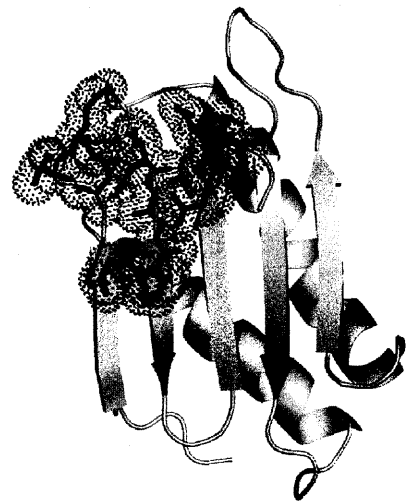


図 1 Gnk2 のマンノース結合サイト

Gnk2 は D-mannose に対する解離定数 (K_D) が約 100 mM であり、レクチンの単糖に対する K_D は一般的に 1 ~ 10 mM の範囲であることを考えると非常に弱い結合である。植物レクチンの中で最も大きなレクチンファミリーであるマメ科レクチンは糖の認識に金属イオン (Ca^{2+} または Mn^{2+}) を必要とすることが知られている。Gnk2 の全体構造はマメ科レクチンのものとは全く異なっていたが、マメ科レクチンの糖結合に関わる酸性残基と Gly 残基が構造上保存されていることなど、糖認識サイトの構造はよく似

ていた。しかしながら、Gnk2 は Ca^{2+} の有無で K_D に差を確認できなかったため、糖の認識に金属イオンを必要としないことがわかった。また、マンノース類の結合能は、 α -1,2-mannobiose > D-mannose > α -1,6-mannobiose > α -1,3-mannobiose であり、マンナンの構成成分含量が最も多い α -1,2-mannobiose に対して比較的高い親和性をもっていたが、一般的なレクチンの単糖に対する結合能に比べても非常に弱かった。そのため、Gnk2 は植物体内で極端に濃縮された糖環境で機能するか、より複雑な糖構造に対してもしくは金属イオン以外の補因子によって本来のレクチン機能が発揮される可能性が考えられる。

4. CRLK に保存されているモチーフ構造

Gnk2 は CRLK と約 30% のアミノ酸配列の相同性が確認された。特に相同性が高い領域は C-X8-C-X2-C というモチーフ (CRLK モチーフ) であり、さらに C 末端側にも保存された Cys 残基がある。CRLK モチーフは Gnk2 の立体構造上で β 3- α 2 ループを形成しており、それに続く α 2 ヘリックスは Gnk2 のもつ 3 対全てのジスルフィド結合によって β シート上に特定の配向で固定されていた (図 2)。このジスルフィド結合で形成された独特の構造は Gnk2 の糖認識以外の分子機能に必要かもしれない。CRLK は、ホルモン応答経路、細胞分化、自家不和合性、そして病原菌の認識に重要な役割を担っていることが報告されており、Gnk2 のもつ独特な構造モチーフが植物体内での作用に関係していると考え、非常に興味深い。

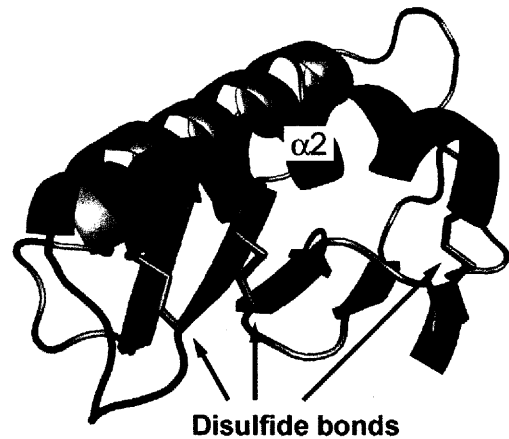


図 2 CRLK モチーフ構造と 3 対のジスルフィド結合で β -シート上に裏打ちされた α 2 ヘリックス

5. まとめ

本研究では、Gnk2 の抗真菌作用が糸状菌細胞表層のマンナンに結合することで発現していることを明らかにした。マンナン層は糸状菌の細胞接着だけでなく糸状菌が感染する際の宿主認識にも重要であるため、Gnk2 は糸状菌の感染防止の目的で応用が可能である。また、Gnk2 はリン酸化の有無を識別できるマンノース結合サイトをもつことを明らかにし、CRLK に保存されている独特なモチーフ構造を明らかにした。Gnk2 が他の抗真菌タンパク質と同様に真菌を積極的に殺すことは考え難く、むしろ Gnk2 独特の糖認識と構造モチーフによって植物体内で未知の機能を担っていると予想される。今後、この新規のレクチンである Gnk2 のさらなる解析によってレクチンが植物体内で担っている生理機能の解明につながると期待される。