

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 宮川 拓也

本論文では、イチヨウの種子に主要に存在する抗真菌タンパク質 Ginkbilobin-2 (Gnk2) を同定し、NMR 相互作用解析と X 線結晶構造解析を行い、真菌細胞表層マンナンの糖成分に対する Gnk2 の認識機構について述べている。本論文は、第一章『Ginkbilobin-2 の一次構造分析とクローニング』、第二章『抗真菌活性とその発現機構』、第三章『Ginkbilobin-2 の立体構造と糖認識機構』、第四章『総括』の全 4 章からなる。

第一章では、イチヨウの種子であるギンナンの胚乳組織に主要に存在している Gnk2 の単離精製と遺伝子のクローニングについて述べ、ギンナン中での Gnk2 の存在状態を同定している。すなわち、Gnk2 の全長アミノ酸配列を決定し、Gnk2 は 108 残基からなる細胞外分泌タンパク質で、3 対のジスルフィド結合をもち、成熟過程で糖鎖などの修飾を全く受けないことを明らかにしている。また、Gnk2 のアミノ酸配列を使って相同性比較を行い、ギンナン中で Gnk2 が担っている機能について考察している。Gnk2 とアミノ酸配列の相同性が高いタンパク質は、イチヨウだけでなく裸子植物のトウヒ属にも存在し、被子植物においては、Gnk2 の部分配列をドメインとしてもつ受容体型タンパク質キナーゼが存在することを見出している。そして、こうした相同性タンパク質で調べられている発現解析の結果から、Gnk2 はイチヨウの種子成熟期と発芽期で機能する可能性や病原菌の感染応答性を示す可能性を説明している。本章の序文で、イチヨウは種子植物の中で特異的に進化して発芽力が非常に強いこと、イチヨウの葉の効能やギンナンの肺結核に対する効能などから食品科学のシーズ探索源としてのイチヨウの可能性に着目していることを述べており、Gnk2 はこうした植物生理学や食品科学の研究対象として非常に興味深いことを説明している。

第二章では、Gnk2 の抗真菌活性と真菌細胞表層中の標的物質について述べている。Gnk2 が病原菌の感染防御に機能している可能性に着目し、酵母と糸状菌を含む真菌と真性細菌に対する抗菌活性を検定している。その結果、真菌の中でも植物病原菌の多くを占める糸状菌に対してのみ成長を阻害できることを見出している。また、糸状菌特異的な成長は菌糸細胞の先端成長によって行われているという特徴に着目し、糸状菌の細胞壁を中心とした細胞表層を構成する物質との相互作用を NMR でスクリーニングしている。この実験のために、大腸菌のペリプラズム内ジスルフィド結合形成機構を利用した発現系を用いて Gnk2 のリコンビナント体を大量発現させ、ギンナンから直接精製した Gnk2 と同等の活性をもったリコンビナント体の調製に成功している。標的物質のスクリーニング結果として、Gnk2 が糸状菌の主要な細胞表層構成成分である β グルカンやキチンではなく、マンナンに対して特異的に結合できるレクチンの一種であることを明らかにしている。そして、菌糸の先端成長におけるマンナンの関与についてはわかっていない部分が多いと述べた上で、Gnk2 が真菌のマンナンに対して特異的に結合できたことから、Gnk2 が糸状菌に対して抗

真菌活性を発現する過程で、マンナンへの結合が重要であろうと考察している。

第三章では、Gnk2のX線結晶構造と真菌細胞表層マンナンの各糖鎖成分に対する結合性について述べている。ギンナンから調製したGnk2とセレノメチオニン化したりコンビナントのGnk2を結晶化し、異常分散効果を用いて分解能2.4 Åの構造解析に成功している。また、NMRを使った相互作用解析から、Gnk2が真菌細胞表層マンナンに最も多く含まれている α 1,2結合マンノース鎖とリン酸基の2成分に結合できることを示し、その結合部位を特定することに成功している。Gnk2のマンノース認識については、Asn11, Arg93, Glu104などの限られた残基がその側鎖を使って行っていると分析している。さらにGnk2の糖結合能がこれまで知られている植物レクチンの結合能よりも低いことについて、Ca²⁺の配位部位や多量体形成能をもっていないためであるという構造的な解釈を与え、Gnk2のマンノース結合能が発揮されるためには、高濃度のマンノース環境を必要とすることを考察している。Gnk2のリン酸基認識については、4つのArg残基が形成する局所的な正電荷表面による静電相互作用を使って行っていると分析し、この静電相互作用によるマンナン環境への濃縮効果を考察している。そして、Gnk2はリン酸基との静電相互作用による濃縮効果によってマンナン環境に取り込まれることで、 α 1,2結合マンノース鎖に対する結合能を発揮して結合できるという真菌細胞表層マンナンに対する特異的認識モデルを提唱するに至っている。また、Gnk2が被子植物の受容体型タンパク質キナーゼの受容体ドメインを形成しているDUF26というドメイン構造をもっており、その構造的保存性の高さからGnk2の糖認識能がこの受容体のリガンド認識能に採用されている可能性を考察している。

第四章では、総括を述べ、糸状菌に対する感染防止への応用やDUF26の構造的特徴を使った植物体内での生理機能解明への発展について今後の展望を述べている。

以上のように、本研究で得られた知見は、学術上貢献するところ大であると考えられる。よって、審査委員一同は、本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。