

機関番号：18001

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21710234

研究課題名(和文) 亜熱帯遺伝子資源の多様性を利用した植物キチナーゼの構造と抗真菌活性との相関解明

研究課題名(英文) Studies on relationship between structure and antifungal activity of plant chitinases with aid of diversity of genes from subtropical plants.

研究代表者

平良 東紀 (TAIRA TOKI)

琉球大学・農学部・准教授

研究者番号：60315463

研究成果の概要(和文)：本研究では、琉球列島の多様な亜熱帯植物資源から抗真菌性タンパク質であるキチン分解酵素(キチナーゼ)およびその遺伝子を単離し、その構造と抗真菌活性との相関を調べた。得られた情報をもとに、変異体(タンパク質のアミノ酸配列の一部を変化させたもの)解析を行い、正電荷の多い酵素ほど抗真菌活性が強いことを明らかにした。本研究の応用は、農業および医療に役立つ安全で効果的な抗真菌剤の開発へ寄与することが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined relationship between structures of plant chitinases and their antifungal activities with aid of diversity of genes from subtropical plants. To clear relationship between charge and antifungal activity of chitinases, mutational analyses were done. Mutants having higher positive charge exhibited higher antifungal activity. These findings would contribute to development of safe and effective antifungal agents for agriculture and medicine.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：構造活性相関, タンパク質工学

1. 研究開始当初の背景

島嶼における亜熱帯・熱帯植物は、強い紫外線、高温、塩害、強い風雨など物理的・化学的環境ストレスを受ける一方で、その温度環境および島嶼環境から年間を通じて多様または特殊な植物病原菌や病害虫等による生物ストレスを受けている。近年、生物ストレス(病原菌の感染等)によって誘導される生体防御タンパク質(抗真菌性等を有する)が物理的・化学的環境ストレスによっても誘

導されることが数多く報告されている。島嶼における亜熱帯・熱帯植物においては、その島嶼性と過度の様々なストレスに対する応答するため、多様または特殊な生体防御タンパク質遺伝子を持ち、それらが多量に発現しているものと推察される。

これまでの申請者らの研究において、亜熱帯・熱帯植物から生体防御タンパク質のひとつであるキチン分解酵素(キチナーゼ)およびその遺伝子が単離され、強い抗真菌活性、

高い安定性または特異な構造を有するなどの特徴が明らかにされていた。

2. 研究の目的

21世紀の食料問題を解決するためには、植物病原菌の約8割を占める真菌(カビ)に対する抵抗性タンパク質遺伝子の探索・利用が必須である。また、医療現場においてはAIDS患者や抗ガン剤の服用者に見られる深刻な真菌症に対して、有効で安全な抗真菌剤の開発が急務となっている。

本研究の目的は、島嶼における各種亜熱帯・熱帯植物から多様な抗真菌性タンパク質およびその遺伝子を単離し、その構造と抗真菌活性との相関を明らかにすることである。本研究の応用は、より強いまたは特殊な抗菌作用を示す抗真菌剤の開発へ寄与することが期待される。

3. 研究の方法

(1)野生型キチナーゼによる抗真菌活性評価およびその構造の決定

島嶼亜熱帯・熱帯地域に自生する様々な植物から、キチナーゼを単離する。得られたキチナーゼの各種酵素化学的性質および抗菌特性を評価する。得られたキチナーゼの部分アミノ酸配列を調べ、特異的プライマーを作成し、PCR法によって遺伝子をクローニングし、一次構造を決定する。

(2)変異型キチナーゼの作成とその抗真菌活性評価

単離されたキチナーゼの構造とその特性から、抗真菌活性に関与する構造を類推し、その部分のアミノ酸配列を改変した変異体を作成し、抗真菌活性試験において野生型と変異型、変異型と変異型との比較を行い、構造と抗真菌活性の相関を解明する。より抗真菌活性の高いまたは特殊な抗菌活性を有する変異体の作成を試みる。

4. 研究成果

2009年度は、数種の亜熱帯・熱帯植物よりキチナーゼおよびその遺伝子を単離し、大腸菌による発現系を構築し、その構造・酵素特性および抗真菌活性について調べた。ソテツ由来糖質加水分解酵素ファミリー18に属する酸性キチナーゼおよびその遺伝子を単離して、その構造および酵素特性について明らかにした。本酵素は全く抗真菌活性を示さなかった(図1, III-5)。同ファミリーに属するタバコ由来の塩基性キチナーゼが抗真菌活性を示すことから、等電点が抗真菌活性に関与することが推定された。本結果を受けて、これまでに得られている等電点の異なる各種キチナーゼの抗真菌活性を調べたところ、

等電点が高いキチナーゼほど、活性が強いことが分かった(図1)。また、その活性比較から糖質加水分解酵素ファミリー19の方がファミリー18よりも抗真菌活性が強いことが分かった。これらの成果の一部は学術雑誌に投稿され受理された(雑誌論文4)。また一部は国際学会および国内のシンポジウムで発表し、高い評価を受けた(学会発表5および6)。

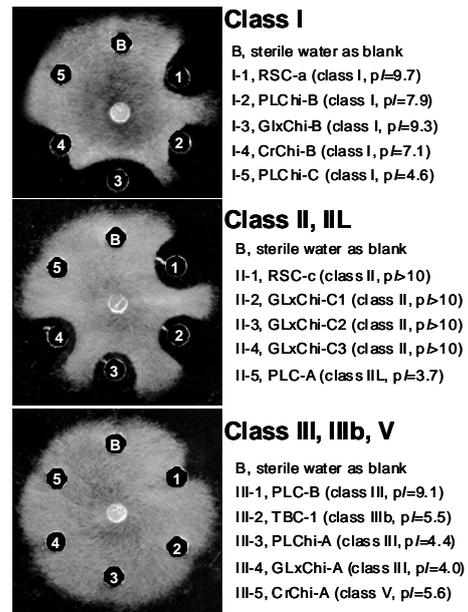


図1. Antifungal activities of various plant chitinases having various pI.

2010年度は、新たにナガハリガネゴケ(*Bryum cronatum*)由来キチナーゼ-A (BcChi-A)の遺伝子クローニングおよび発現系構築を行い、その構造と抗真菌活性を調べた。BcChi-Aは酸性の糖質加水分解酵素ファミリー19の触媒ドメインのみからなり、他の同ファミリーと比較して多くのループ領域が欠損していることが分かった。本キチナ

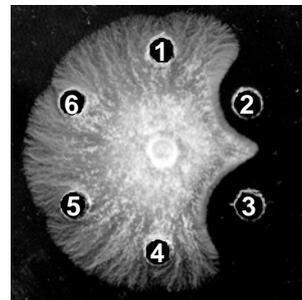


図2. Antifungal activity of BcChi-A and RSC-c against *Trichoderma viride*.

Samples to be tested were placed in wells in 10 μ l distilled water. 1, blank (distilled water); 2, 20 pmol of RSC-c; 3, 100 pmol of RSC-c; 4, 100 pmol of BcChi-A; 5, 200 pmol of BcChi-A; 6, 1000 pmol of BcChi-A.

一ゼは全く抗真菌活性を示さなかった(図2)。等電点およびループ領域が抗真菌活性に影響していることが推察された。

ループ領域の欠損していないファミリー19の触媒ドメインとキチン結合ドメインを持つパイナップル緑葉由来キチナーゼ-C (PLChi-C) は同様の構造を有する他のキチナーゼと比較して極めて抗真菌活性が低いことが分かった。抗真菌活性の強いキチナーゼとの構造比較から、PLChi-Cの分子表面のアミノ酸残基を段階的に置換した変異体を作成し(表1)、その等電点、加水分解活性、および抗真菌活性について調べた。その結果、

表 1. PLChi-C mutants and mutational positions in them

Mutants	Mutations
M5	E75R, D111S, E192R, E214K, V245R
M8	M5 + A70R, H88K, V152R
M13	M8 + L149K, E150Q, D232A, D236G, D294N

表 2. Chitinolytic activities and pI of PLChi-C mutants

Chitinases	pI	S.A.(%)
PLChi-C WT	4.5	100
M5	5.0	20
M8	5.4	18
M13	8.1	60
RSC-a	9.7	50

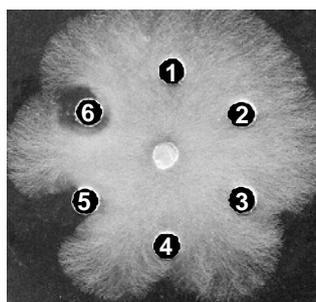


図 3. The antifungal activities of PLChi-C and its mutants

The wells contained 10 μ l of the following solutions: 1, sterile water (blank); 2, 100 pmol of wild type of PLChi-C; 3, 100 pmol of M5; 4, 100 pmol of M8; 5, 100 pmol of M13; 6, 100 pmol of RSC-a.

野生型よりも等電点が塩基性側にシフトした変異体はいずれも、加水分解活性が低下したが、抗真菌活性は上昇した(表2および図3)。これらの結果から、等電点の高いキチナーゼが抗真菌活性が高いことが明らかとなった。本研究成果により、抗真菌タンパク質であるキチナーゼの構造と抗真菌活性との相関の一端が明らかとなった。

これらの成果の一部は学術雑誌に投稿され原著論文1報(雑誌論文2)、総説2報(雑誌論文1および3)が受理された。また一部の成果は学会(学会発表1)で発表し、現在そのデータを基に投稿準備中である。本研究の応用は、より強いまたは特殊な抗菌作用を示す抗真菌剤の開発へ寄与することが期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

1. Arakane Y., Taira T., Ohnuma T., and Fukamizo T. Chitin-related enzymes in agro-biosciences. *Curr Drug Targets, in press* (2011)

2. Taira T., Mahoe Y, Kawamoto N, Onaga S, Iwasaki H, Ohnuma T, Fukamizo T., Cloning and characterization of a small family 19 chitinase from moss (*Bryum coronatum*). *Glycobiology.*, 21:644-654 (2011)

3. Taira T. Structures and antifungal activity of plant chitinases., *J. Appl. Glycosci.*, 57:167-176 (2010)

4. Taira T., Hayashi H, Tajiri Y, Onaga S, Uechi G, Iwasaki H, Ohnuma T, Fukamizo T., A plant class V chitinase from a cycad (*Cycas revoluta*): biochemical characterization, cDNA isolation, and posttranslational modification., *Glycobiology* 19, 1452-1461 (2009)

[学会発表] (計8件)

1. 平良東紀, 秋元理沙. パイナップル緑葉由来キチナーゼ-Cのキチン結合活性および抗真菌活性に関わる構造. 日本農芸化学会2011年度大会. 2011年3月27日. 京都

2. 平良東紀, 翁長彰子, 伊藤進. 植物由来新規キチナーゼおよび植物キチナーゼのクラス分類について. 第24回キチン・キトサンシンポジウム. 2010年7月14日. 東京

3. 水原麻美子, 桐山真, 澤井章人, 大沼貴之, 平良東紀, 深溝慶. 植物クラスVキチナーゼの構造と機能. 日本農芸化学会2010年度大会. 2010年3月29日. 東京

4. 福田達也, 大沼貴之, 平良東紀, 深溝慶. 植物由来 FamilyGH-19キチナーゼのキチンオリゴ分解様式. 日本農芸化学会西日本支部・中四国支部・関西支部、日本栄養食糧学

会九州・沖縄支部、及び日本食品科学工学会西日本支部合同大会. 2009年10月31日. 沖縄

5. 平良東紀, 植物キチナーゼの構造と抗真菌活性との相関. 日本農芸化学会西日本支部・中四国支部・関西支部、日本栄養食糧学会九州・沖縄支部、及び日本食品科学工学会西日本支部合同大会 シンポジウム. 2009年10月30日. 沖縄

6. Taira T, Akimoto R, Yamagami T. Antifungal activity of plant GH family 19 chitinases. The 11th International Conference on Chitin and Chitosan. 2009年9月7日. Taipei, Taiwan

7. 久場由真仁, 平良東紀, 伊藤進. ミドリカタヒバ (*Selaginella doederleinii*) 由来新規キチナーゼの性質および一次構造. 第23回キチン・キトサン・シンポジウム. 2009年8月21日. 佐賀

8. 大沼貴之, 水原麻美子, 平良東紀, Karen Skriver, 深溝慶. 植物由来クラス V キチナーゼの酵素学的性質. 第23回キチン・キトサン・シンポジウム. 2009年8月21日. 佐賀

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平良 東紀 (TAIRA TOKI)

琉球大学・農学部・准教授

研究者番号: 60315463