

博士論文要旨

ほ乳類，鳥類の酸性キチナーゼの酵素機能 と食性に関する研究

工学研究科 化学応用学専攻 博士後期課程

生命工学研究室

学籍番号 BD18004

氏名 田畑 絵理

指導教員 小山 文隆 教授

目次

第 1 章 序論

第 2 章 ほ乳類, 鳥類における Chia の遺伝子発現と酵素機能の解析

第 3 章 不活性化酵素の活性化による食性に伴う Chia の分子進化の解明

第 4 章 Chia の精製法の確立とキトオリゴ糖の作製

第 5 章 結論

第1章 序論

キチンは、*N*-アセチル-*D*-グルコサミン (GlcNAc) の重合体で、昆虫、甲殻類、真菌類などの構成成分である。このため、キチンは、セルロースに次いで、地球上に豊富に存在するバイオマスである。持続的な食糧生産のため、栄養価に富む昆虫の飼料化が世界的に注目されている。しかし、昆虫の積極的な家畜飼料利用は控えられ、未だ実現していない。この理由の一つは、キチンが、動物の消化器系では分解されない食物繊維であると考えられてきたことである。最近、当研究室では、酸性キチナーゼ (acidic chitinase, Chia) が、マウスの胃で過剰に発現し、消化器系条件下でキチンを分解することを明らかにした。この結果は、キチンが、動物の消化器系で分解される可能性を強く示唆した。しかし、Chia がすべての動物の胃で、消化酵素として機能しているかどうかは不明であった。

私は、家畜を含めたほ乳類、鳥類の体内で、昆虫のキチンが分解されるのかを検証し、昆虫の家畜飼料化を推進する根拠としたいと考えた。そして、Chia の酵素機能が動物の食性によって異なる結果が得られたことから、Chia の酵素機能に関わるアミノ酸置換を明らかにし、食性の変化に伴う Chia の分子進化の解明に取り組んだ。さらに、天然型 Chia 酵素の精製法を確立し、キトサンに Chia を作用し、生物医学的な利用で注目を集めているキトオリゴ糖が生成するかどうかを検討した。

第2章 ほ乳類、鳥類における Chia の遺伝子発現と機能解析

本章では、Chia mRNA の定量、その翻訳産物の精製、そして Chia の酵素機能について解析を行った。

まずニワトリについて解析を進めた。Chia mRNA の胃での発現レベルを解析するため、 H^+/K^+ -ATPase, pepsinogen A (胃粘膜特異的遺伝子) と GAPDH (ハウスキーピング遺伝子) の mRNA を定量した。Chia mRNA の発現レベルは、 H^+/K^+ -ATPase, GAPDH よりも顕著に高かった。従って、Chia は、ニワトリの胃で過剰発現していることが分かった。次に、ニワトリの胃の抽出液から、キチンカラム、8 M 尿素により Chia をアフィニティー精製した。Chia のキチナーゼ活性の至適は pH 2.0 であり、その条件下で pepsin に対し耐性があった。そして、Chia は、胃の条件下、ミールワーム幼虫の殻のキチン質を分解し、GlcNAc 二量体 [(GlcNAc)₂] を生成した。以上の結果は、ニワトリ Chia が、胃でキチン分解酵素として機能することを示した。

次に、主要な家畜のブタ Chia について検討した。Chia mRNA は、ブタの胃でも多量に発現し、胃の条件下で、昆虫のキチン質を分解することが分かった。

コモンマーモセットは、非ヒト霊長類で、小型で、繁殖効率が高く、疾患モデル動物として期待されている。そこで、マーモセット Chia について解析した。マーモセット Chia は、胃で高いレベルで発現し、胃の条件下でキチンを分解した。

以上の結果から、Chia は、ニワトリ、ブタ、マーモセットの胃でキチン分解酵素として機能することが分かった。

次に、代表的な家畜であるウシとペットのイヌの胃における Chia mRNA レベルを定量し、ブタ、ニワトリ、マウスと比較した。胃での Chia mRNA レベルは、ウシ（草食性）とイヌ（肉食性）では、ブタ、ニワトリ、マウス（雑食性）と比べて、非常に低かった。これら 5 種の Chia を組換えタンパク質として大腸菌で発現し、キチナーゼ活性を測定した。その結果、ウシとイヌ Chia の活性は、雑食性動物よりも低かった。

以上の研究結果から、Chia が、雑食・食虫性動物の胃で、キチン分解酵素として機能するが、草食性と肉食性動物の Chia は、キチン分解能が低いことが分かった。

第 3 章 不活性化酵素の活性化による Chia の分子進化の解明

太古のほ乳類祖先は、小型で食虫性であったが、恐竜の絶滅後、ほ乳類の食性は多様化したと考えられている。私は、「草食・肉食性動物は、昆虫を食べなくなったため、進化の過程で Chia の機能的制約が緩和し、特定のアミノ酸が置換し、不活性化した」との仮説を立て、この検証を行った。

マウスとイヌの Chia の一次構造は、同一性が 79% であり、良く似ている。しかし、イヌ Chia のキチナーゼ活性は、マウスの数分の 1 であり、不活性化していた。そこで、活性の高いマウスと低いイヌの Chia 間でキメラタンパク質を作製し、キチナーゼ活性を測定した。その結果、イヌ Chia の不活性化の原因が exon 7 がコードする領域に存在することが分かった。不活性化を引き起こすアミノ酸を同定するため、変異体の作製、解析を行った。マウスで保存されるアミノ酸、Phe214Leu および Ala216Gly の置換により、イヌ Chia はマウス並みに活性化した。以上の結果から、214 番目の Phe と 216 番目の Ala が、イヌ Chia の不活性化の原因であることを明らかにした。

イヌを含めた食肉目動物 41 種の Chia 遺伝子の塩基配列を解析した結果、これらのアミノ酸置換は、イヌ科に特有であった。さらに、このグループの大多数の動物において、Chia は翻訳領域 (Open reading frame, ORF) に終止コドンを持つ偽遺伝子 (pseudogene) だった。他方、食肉目に属し、昆虫を食餌とするスカンクとミーアキャットは、完全長 Chia と保存された数の Cys を有し、高いキチン分解活性を保持していた。以上のことから、食肉目動物が非昆

虫性の食餌に適応した結果，Chia 遺伝子の構造と機能に大きな変化をもたらしたことを明らかにした。

第4章 Chia の精製法の確立とキトオリゴ糖の作製

第2章で，ウシやイヌのような草食性や肉食性動物は，雑食性動物と比べて，体内におけるキチンの分解性が低いことを明らかにした。さらに，ヒトの肺において，Chia の発現レベルの低下，またはキチナーゼ活性の低下が認められ，喘息や肺線維症が発症することが知られている。私は，Chia を補充的に用いれば，草食性，肉食性動物におけるキチン含有の食餌に対する消化機能の向上，ヒトにおいてはキチナーゼ活性の低下によって起こる疾患の治療に有効であると考えた。

第2章では，キチンカラムと 8 M 尿素を用いて，ニワトリおよびブタの胃組織から Chia が精製できることを示した。先行研究において，キチンカラムからのキチナーゼの溶出に，8 M 尿素の代わりにより穏やかな酢酸によって溶出されることが報告されていた。しかし，その詳細なメカニズムについて解明されていなかった。酢酸は弱酸であるため，一般的なキチナーゼでは酸変性が起こり得る。しかし，第2章で示したように，ニワトリおよびブタ Chia は，顕著な酸耐性を有する。本章では，Chia-キチン複合体が，0.1 M 酢酸によって競合的に解離することを示した。キチンカラムと酢酸を用いた穏やかで効果的な Chia の精製法は，ニワトリやブタ Chia の取得に利用でき，農学や医学において，Chia の補充や疾患の治療目的で，高い可能性をもつ。

キトサンは，キチンの部分的脱アセチル化体で，D-glucosamine (GlcN) と GlcNAc のヘテロポリマーである。キトサンの分解産物であるキトオリゴ糖は，GlcN と GlcNAc を含むホモまたはヘテロ体のポリマーであり，抗菌性，抗炎症性，抗腫瘍性などの生物医学的な幅広い効能を持つことから注目されている。キトオリゴ糖は，キトサンを酸加水分解あるいは酵素分解することで調製されてきた。これまで，市販のブタ pepsin 標品がキトサン分解活性を持つことから，キトオリゴ糖の調製に用いられてきた。このことは，ブタの pepsin が，プロテアーゼ活性とキトサン分解活性を有することを示唆していた。私は，ブタ pepsin 標品中のキトサン分解活性の本体が，微量に残存したブタ Chia の分解産物であることを明らかにした。そして，ブタ Chia が，効率的なキトオリゴ糖の生産に有効であることを示した。

第5章 結論

本研究では，ニワトリ，ブタ，コモンマーモセットなどの雑食・食虫性動物の胃で，Chia mRNA が多量に発現し，その翻訳産物である Chia が，昆虫のキ

チンを分解できることを示した。他方、ウシやイヌの草食性、肉食性動物では、Chia mRNA の発現量およびキチン分解活性が、上記動物と比べて低いことを明らかにした。このように、キチンの分解性は、動物の食性と Chia の発現量・活性と相関することを見出した。以上のほ乳類、鳥類の Chia の解析から、昆虫を飼料として積極的に与えるべき動物、控えるべき動物を提案した。

次に、肉食性動物での Chia の不活性化メカニズムの解明に取り組んだ。イヌ Chia は、マウス Chia に保存される 2 アミノ酸の置換により、マウスと同等のレベルに活性化したことから、イヌ Chia の不活性化の原因は、Phe214Leu および Ala216Gly が原因であった。そして、このアミノ酸置換は、イヌ科に特有であった。さらに、イヌ科を除く多くの食肉目動物の Chia が偽遺伝子化していた。他方、昆虫を食餌とするスカンクとミーアキャットでは高いキチン分解活性を示した。これらのことから、肉食性動物がキチンを含まない食餌に適応したことで、Chia の構造と酵素活性に大きな変化が生じたことを明らかにした。

最後に、Chia の応用利用を試みた。キチンカラムと酢酸を用いた穏やかで効率的な Chia の精製法を確立した。本研究で確立した Chia の精製法により、活性型 Chia を飼料に添加あるいは補充的に用いることで、キチンの消化性の向上、疾患の治療への応用が期待できる。さらに、Chia が、生物医学的な利用で注目を集めるキトオリゴ糖の生産に利用できることを示した。

以上の研究成果は、「動物の食性が、Chia の構造と酵素機能に影響する」と結論できる。さらに、本研究成果は昆虫の飼料化促進、Chia の応用利用にとっての重要な基礎的データとなる。