

# 博士学位論文要旨

カニクイザル酸性キチナーゼの酵素特性に  
関する研究：キトオリゴ糖生産への応用

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      bd19001

氏名            上原 麻衣子

指導教員      小山 文隆 教授

## 目次

第1章 序論

第2章 カニクイザルにおけるキチナーゼの遺伝子発現解析

第3章 カニクイザル酸性キチナーゼの酵素化学的性質の解析

第4章 カニクイザル酸性キチナーゼによるキチンおよびキトサンの分解

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) の重合体である。自然界においてセルロースに次いで二番目に豊富に存在する多糖であり、甲殻類や昆虫の外骨格、真菌類の細胞壁などの構成成分である。

キチナーゼはキチンを加水分解する酵素である。ほ乳類は体内でキチンを合成しない。しかし、多くのほ乳類は、活性が確認されている酵素、酸性キチナーゼ (acidic chitinase, CHIA) とキトトリオシダーゼ (chitotriosidase, CHIT1) を発現している。CHIT1 は最初にクローニング、精製されたほ乳類キチナーゼである。CHIA は、CHIT1 の補償的酵素として発見され、等電点が酸性であることから命名された。両キチナーゼは、炎症を伴う疾患や生理現象に関連することが報告されている。CHIA は、喘息モデルマウスにおける気道のアレルギー応答の際に過剰発現される。また、マウスなどの雑食性動物の胃で大量に発現し、消化酵素として働くことが報告されている。

「カニクイザル」はその名前の通り、カニを食べ、他にも、甲殻類や昆虫のようなキチン含有生物を食糧とする雑食性動物である。カニクイザルは構成成分にキチンを含む「カニ」を食べるので、強力なキチナーゼを発現している可能性が考えられた。

そこで、本研究では、カニクイザルにおけるほ乳類キチナーゼの遺伝子発現解析および酵素化学的性質を解析することを目的とし、研究を進めた。さらに、カニクイザル酸性キチナーゼの優れた性質を活かした応用利用について検討した。

## 第2章 カニクイザルにおけるキチナーゼの遺伝子発現解析

まず、カニクイザルにおけるキチナーゼの遺伝子発現解析を行った。次に、カニクイザルにおける遺伝子発現レベルを評価するため、得られた結果をマウスおよびヒトと比較した。

まず、キチナーゼ遺伝子が高いレベルで発現している組織を特定するために、カニクイザル主要 10 組織におけるキチナーゼの mRNA レベルを、qPCR システムを用いて解析した。CHIA は胃で、CHIT1 は肺で特異的に発現していた。キチナーゼの遺伝子発現レベルを評価するため、胃粘膜の主要なタンパク質である Pepsinogen C とハウスキーピング遺伝子である Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) の mRNA レベルと比較した。CHIA mRNA の発現レベルは、すべての細胞で高いレベルで発現することが知られている GAPDH よりも高く、胃液の主要構成成分である pepsin の前駆体である Pepsinogen C に匹敵するレベルで発現していた。このことから、カニクイザル

の胃において、CHIA mRNA は主要な転写物であることが分かった。

次に、カニクイザルの胃における CHIA mRNA の発現レベルを評価するために、マウス、カニクイザル、ヒトでの遺伝子発現レベルの種間比較を行った。カニクイザルの胃における CHIA mRNA レベルは、マウスの胃における Chia の発現レベルに匹敵していた。このことから、カニクイザルは胃で CHIA を大量に発現していると判断した。

さらに、カニクイザルの胃における CHIA mRNA の高い発現レベルが、タンパク質レベルでも認められるかどうかを検討した。マウス、カニクイザル、ヒトの胃組織および肺組織抽出液のキチナーゼ活性を測定した。その結果、キチナーゼ mRNA レベルの種間差は、基本的に、キチナーゼ活性レベルの差に反映されていた。また、CHIA が大量に発現していたカニクイザルの胃組織から非常に強いキチナーゼ活性が検出された。これらのことから、カニクイザル CHIA は強いキチナーゼ活性を有する可能性が強く示唆された。

### 第3章 カニクイザル酸性キチナーゼの酵素化学的性質の解析

第2章では、カニクイザルにおいて CHIA が胃組織で大量に発現しており、その活性が強いことが示唆された。本章では、カニクイザル CHIA を組換えタンパク質として大腸菌で発現し、よく研究されているマウス Chia と比較し、酵素化学的性質を詳細に調べた。

まず、低分子人工発色基質である 4-nitrophenyl *N,N'*-diacetyl- $\beta$ -D-chitobioside を用いてキチナーゼ活性測定を行い、カニクイザル CHIA の pH 依存性を検討した。カニクイザル CHIA は、37°C 条件における至適が pH 5.0 であり、pH 2.0, pH 7.0 条件下においても強いキチナーゼ活性を有していた。カニクイザル CHIA は、マウス Chia よりも、pH 2.0 においては 2 倍、pH 5.0 においては 16 倍、pH 7.0 においては 10 倍活性が強かった。また、両酵素の至適条件下におけるキチナーゼ活性 (カニクイザル CHIA: pH 5.0, マウス Chia: pH 2.0) を比較したところ、カニクイザル CHIA が 3 倍の強さの活性を示した。以上の結果から、すべての pH 条件下においてカニクイザル CHIA の活性はマウス Chia よりも高いことが分かった。

次に、カニクイザル CHIA の温度依存性を検討したところ、pH 5.0 条件下における至適温度は 65°C であった。pH 2.0 においては、マウス Chia は 55°C で最大活性を示し、それ以上の高温では活性が急激に減少したのに対し、カニクイザル CHIA は 65°C でも高いキチナーゼ活性を保持していた。さらに、酸耐性を有し、pH 5.0 においては 70°C まで安定であった。

最後に、カニクイザル CHIA で高分子キチン (P-キチン) の分解を行い、

Fluorophore-Assisted Carbohydrate Electrophoresis (FACE) 法で解析した。カニクイザル CHIA, マウス Chia はともに, 高分子キチンを分解し, 主に  $(\text{GlcNAc})_2$  を生成した。カニクイザル CHIA は, 高温条件下 ( $50^\circ\text{C}$  および  $65^\circ\text{C}$ ) でより高いキチン分解活性を示した。また, すべての条件下でマウス Chia よりも, より多くの分解産物を生成した。カニクイザル CHIA の高分子キチンに対する活性は, 低分子人工発色基質に対する活性と同様の特徴を示した。

#### 第4章 カニクイザル酸性キチナーゼによるキチンおよびキトサンの分解

第3章では, カニクイザル CHIA が様々な条件下で強い活性を有する頑強な酵素であることを明らかにした。そこで, 生理活性をもつことが知られているキトオリゴ糖の生産にカニクイザル CHIA を利用できると考えた。本章では, カニクイザル CHIA による高分子基質分解の条件検討を行い, キチンおよびキトサン (キチンの脱アセチル化体) を分解したときに生成されるキトオリゴ糖を解析した。

まず, カニクイザル CHIA に  $70^\circ\text{C}$  までの熱耐性があったことから, 高分子基質分解の温度条件を検討した。カニクイザル CHIA は, 至適 pH 条件である pH 5.0 において, 生体内条件 ( $37^\circ\text{C}$ ) よりも高温条件下 ( $50^\circ\text{C}$ ) でより多くの分解産物を生成した。そこで,  $50^\circ\text{C}$ , pH 2.0 または pH 5.0 条件下で, 5 種類の基質 (結晶性  $\alpha$ -キチン, コロイダルキチン, P-キチン, ブロック型キトサン, ランダム型キトサン) をカニクイザル CHIA を用いて分解し, FACE 法で解析した。

キチン基質からは, 主に  $(\text{GlcNAc})_2$  が生成された。どのキチン基質に関しても, 反応時間と共に, 分解産物量が増加した。キチン基質に関しては, P-キチンでより多くの分解産物が生成された。

キトサン基質からは, 多様なキトオリゴ糖が生成された。どのキチン基質に関しても, 反応時間と共に分解産物量が増加し, さらに, 得られるキトオリゴ糖のパターンも変化した。ブロック型キトサンの長時間反応の分解では, pH 2.0 では,  $(\text{GlcNAc})_2$ ,  $(\text{GlcNAc})_3$ ,  $(\text{GlcNAc})_4$ ,  $(\text{GlcNAc})_5$ ,  $(\text{GlcNAc})_6$  が主要生成物で, pH 5.0 では,  $(\text{GlcNAc})_3$ ,  $(\text{GlcNAc})_5$ ,  $(\text{GlcNAc})_6$  が多く生成された。一方, 長時間反応によるランダム型キトサンの分解では, pH 2.0 と pH 5.0 条件下で得られた分解産物のパターンは類似していた。しかし, 短時間反応において, pH 2.0 では  $(\text{GlcNAc})_2$ ,  $(\text{GlcNAc})_3$ ,  $(\text{GlcNAc})_5$ ,  $(\text{GlcNAc})_6$  が, pH 5.0 では  $(\text{GlcNAc})_2$ ,  $(\text{GlcNAc})_4$ ,  $(\text{GlcNAc})_6$  が主要生成物として検出された。分解するキトサン基質の種類, pH 条件が得られるキトオリゴ糖の差に影響した。

また、キトサン基質に関しては、ランダム型キトサンでより大量な分解産物が生成された。

このように、カニクイザル CHIA によるキチンおよびキトサンの分解では、高温条件下における反応でより多くのキトオリゴ糖を得ることができた。また、得られる分解産物のパターンは、分解する基質および pH 条件により、異なることが明らかになった。以上のことから、カニクイザル CHIA のキトオリゴ糖生産における有用性を示し、その利用の際に必要な情報を提供した。

## 第 5 章 結論

本研究では、カニクイザル CHIA の遺伝子発現および酵素化学的性質を含む酵素特性の解析を行った。

まず、CHIA mRNA がカニクイザルの胃で特異的に発現することを明らかにした。CHIA はカニクイザルの胃における主要な転写物であり、その発現レベルはマウスおよびヒトにおけるキチナーゼの発現と比較しても高かった。このことから、カニクイザルは胃で CHIA を大量に発現していることが分かった。

次に、カニクイザル CHIA を大腸菌組換えタンパク質として発現し、その酵素化学的性質を明らかにした。カニクイザル CHIA は、マウス Chia に比べ、幅広い pH および温度条件下で強い活性を有し、pH 安定性、熱耐性を有する頑強な酵素であることを明らかにした。また、高分子キチンに対してもその優れたキチン分解特性を示した。これらのことから、カニクイザル CHIA は様々な条件下で強い活性を有する優れた酵素であることが分かった。

最後に、カニクイザル CHIA のキトオリゴ糖生産への利用における有用性を検証した。カニクイザル CHIA が熱耐性を示したことから、高温条件下での高分子基質分解を検討した。カニクイザル CHIA は、37°C (霊長類の体温) よりも 50°C 条件下で多量に分解産物を生成した。カニクイザル CHIA のキチンとキトサンの分解により得られるキトオリゴ糖は、分解する基質の種類、pH 条件により、異なることを明らかにした。これらのことは、カニクイザル CHIA を利用した効率的なキトオリゴ糖の生産が可能であることを示した。

以上の研究成果は、「カニクイザル CHIA は幅広い pH 条件下で高い活性を有する頑強な酵素」であることと、「カニクイザル CHIA のキトオリゴ糖生産への応用」の可能性を示した。本研究成果は、膨大に存在するバイオマス資源であるキチンの利用において、カニクイザル CHIA が有望な酵素であることを強く示唆した。