

論文の内容の要旨

氏名: 柿崎 博美

博士の専攻分野の名称: 博士(生物資源科学)

論文題名: 魚類におけるキチナーゼの分布・種類および構造に関する研究

キチンは、*N*-アセチル-D-グルコサミン(GlcNAc)が β -1,4 結合した多糖で、節足動物の外骨格、軟体動物の甲、真菌類の細胞壁などの主要な構成成分として地球上に広く分布し、セルロースに次ぐ豊富なバイオマスである。自然界に分布するキチンは α または β 結晶構造で存在するが、その殆どは強固な α -キチンである。一方、キチンの分解産物であるキチンオリゴ糖((GlcNAc)_n)は免疫賦活活性を、GlcNAcは変形性膝関節症改善効果などの様々な生理活性を示すことが知られている。

キチン分解酵素はその分解様式の違いによりエンド型およびエキソ型に分類される。前者はキチナーゼ(EC 3.2.1.14)と呼ばれ、キチンの β -1,4 グリコシド結合をランダムに加水分解する。また、触媒ドメインのアミノ酸配列の相同性に基づき、糖質加水分解酵素(GH)ファミリー18または19に分類される。後者は β -*N*-アセチルヘキソサミニダーゼ(Hex)(EC 3.2.1.52)と呼ばれ、(GlcNAc)_nを非還元末端より逐次分解し、GlcNAcを生成する。キチナーゼは動物、植物、微生物に広く分布し、栄養摂取、形態形成、防御などの重要な生理的役割を果たしていると考えられている。

魚類は主にサバ、カサゴなどの条鰭類、サメ、エイなどの軟骨魚類、シーラカンス、ハイギョなどの肉鰭類、ヤツメウナギなどの無顎類に分類されるが、条鰭類は地球上に約2万5000種存在し、脊椎動物中で最も繁栄している種である。条鰭類は餌料に含まれるキチン質を消化するために、胃に2種類以上のキチナーゼアイソザイムを持つ事が報告されている。さらに、一部の魚種のアイソザイムは α -キチンに対する優れた分解能を示し、それは魚類の食性に関連すると考えられている。また、数種の条鰭類胃より2種類のキチナーゼ全長遺伝子が得られ、それらは系統樹解析により Acidic fish chitinase-1 (AFCCase-1)および Acidic fish chitinase-2 (AFCCase-2)に分類されている。

本研究では、情報の少ない条鰭類体内におけるキチン分解酵素活性の分布と、キチナーゼ遺伝子 AFCCase-1 および AFCCase-2 の発現状況を食性の異なる2魚種を用いて比較検討した。また、数種の条鰭類を試料とし、その食性や生息域等によりキチン分解酵素活性の体内分布が異なるかを調査した。上記の研究結果より、条鰭類における新規キチナーゼの存在を推定し、消化器官以外に活性のみられた部位を用いて新規キチナーゼの cDNA クローニングを行い、また *Bacillus brevis* を用いた異種宿主発現系の構築も試みた。本研究ではさらに魚類の中で四肢動物に近縁で、生きた化石と呼ばれる肉鰭類を試料とし、そのキチナーゼの cDNA クローニングを行い、条鰭類や他の生物キチナーゼとの差異を比較検討した。

1. 条鰭類マサバおよびシログチにおけるキチナーゼの分布・種類および構造の比較

1-1. キチン分解酵素活性の体内分布およびキチナーゼ活性の最適 pH

食性の異なる条鰭類体内におけるキチナーゼおよび Hex 活性の分布を測定するため、マサバおよびシログチの各器官より粗酵素液を調製した。キチナーゼ活性測定には pNp-(GlcNAc)_n (n=2, 3)を、Hex 活性測定には pNp-(GlcNAc)を基質として用いた。

キチナーゼ活性は両魚種共に胃で最も高い値が検出された。一方、マサバではエラ、腸、幽門垂、精巢、肝臓で、シログチでは脾臓、腎臓、幽門垂、卵巣、心臓、肝臓でも検出された。また、Hex 活性は両魚種共にエラおよび心臓での活性はやや低いが、いずれの部位においても高い値が検出された。最適 pH 測定により、両魚種の胃およびマサバの肝臓、シログチの腎臓に酸性域で作用するキチナーゼ活性が検出された。また、キチナーゼ活性はマサバの肝臓では中性付近でも活性を保持し、シログチの腎臓では pH 8 に最大活性を示したことより、既報の酸性域で作用する魚類胃キチナーゼとは性状の異なるキチナーゼが存在する可能性が示唆された。

1-2. マサバ胃キチナーゼの cDNA クローニングおよび系統樹解析

マサバの胃よりキチナーゼ遺伝子 *SjChi-1* およびシログチ胃よりキチナーゼ遺伝子 *PaChi-1*、*PaChi-2* はすでに当研究室で得られている。そこで、マサバ胃より AFCase-2 に相当する遺伝子の取得を試みた。すなわち、マサバの胃より total RNA を抽出し、RT-PCR 法および RACE 法を用いてキチナーゼ遺伝子を増幅し、校正活性を持つ酵素を用いて全長塩基配列を増幅、決定した。

マサバの胃より、*SjChi-1* とは異なる 490 のアミノ酸をコードする 1,470bp の ORF を含む全長 1,512bp のキチナーゼ遺伝子 (*SjChi-2*) を得た。*SjChi-2* の演繹アミノ酸配列は N 末端側よりシグナルペプチド、GH 18 触媒ドメイン、リンカー領域、キチン結合ドメインで構成され、GH18 触媒ドメインには active site が認められた。また、系統樹解析の結果、*SjChi-2* は AFCase-2 のグループに属し、条鰭類胃には AFCase-1 および AFCase-2 の 2 種類が存在するというこれまでの報告を強く支持する結果を得た。

1-3. 2 種キチナーゼの器官発現解析

マサバおよびシログチの各器官より total RNA を抽出し cDNA を合成した。それらと *SjChi-1*、*SjChi-2* および *PaChi-1*、*PaChi-2* の特異的プライマーを用いて各部位における発現量を半定量 PCR により解析した。その結果、沿岸域の表層に生息し、動物プランクトンを主に餌料とするマサバでは胃に *SjChi-1* が強く発現し、*SjChi-2* の発現はわずかであった。また、体内分布でキチナーゼ活性のみられた幽門垂においても *SjChi-1* の発現がみられた。一方、砂泥底に生息し、エビ・カニ等の比較的大型の甲殻類を主に餌料とするシログチでは胃に *PaChi-1*、*PaChi-2* 両方のキチナーゼが強く発現していた。これらのことより、条鰭類ではその食性に応じて AFCase-1 および AFCase-2 の発現が異なる可能性が示唆された。また、シログチでは卵巣においても *PaChi-1* の発現がみられたことより、*PaChi-1* は魚類卵におけるキチン質を含有する線虫、節足動物、真菌等に対する防御の機能を果たしていると考えられた。一方、キチナーゼ活性が検出された器官の一部でしか両遺伝子の発現が認められなかったことより、AFCase-1 および AFCase-2 のグループがコードするキチナーゼとは異なる新規キチナーゼの存在が示唆された。

2. 条鰭類における新規キチナーゼの分布・種類および構造

2-1. 8 魚種におけるキチン分解酵素活性の体内分布

条鰭類に分類され、食性と生息域の異なるアイナメ、イボダイ、カサゴ、カマス、タチウオ、ホウボウ、マゴチ、メジナの各組織を用いてキチナーゼおよび Hex 活性の体内分布を測定した。キチナーゼ活性はイボダイでは肝臓、マゴチでは腎臓においてのみ認められた。アイナメでは胃と腸、カマスでは胃と肝臓、タチウオでは胃、腸、肝臓等の消化器官にキチナーゼ活性が認められた。カサゴ、ホウボウ、メジナでは体内に広くキチナーゼ

活性が検出された。また、Hex 活性はいずれの魚種においても体内に広く分布した。キチナーゼ活性の検出される部位やその強さが魚種間でそれぞれ異なることより、魚種によりキチナーゼは消化以外にも様々な生理的役割を果たすことが示唆された。

2-2. カサゴ腎臓キチナーゼの cDNA クローニングおよび器官発現解析

上記の研究結果より、消化器官以外に活性のみられた部位を用いてキチナーゼの精製を試みたが、非常に不安定で失活しやすい酵素であったため、cDNA クローニングにより新規キチナーゼ遺伝子の増幅を試みた。まず、DDBJ に登録されている魚類キチナーゼの中で、AFCCase-1 および AFCCase-2 のグループに分類されない数種類のキチナーゼ遺伝子配列より内部配列増幅用の縮重プライマーを設計した。カサゴ腎臓キチナーゼの cDNA クローニングの結果、480 のアミノ酸をコードする 1,440bp の ORF を含む全長 1,583bp のキチナーゼ遺伝子 (*SmChi-3*) を得た。*SmChi-3* は AFCCase-1 および AFCCase-2 にそれぞれ相当する *SmChi-1*、*SmChi-2* と同様に、典型的な family18 キチナーゼの構造を示した。一方、*SmChi-3* は *SmChi-1*、*SmChi-2* がリンカー領域に持つセリン-グリシンの繰り返し配列を持たず、哺乳類で生体防御の役割を果たすと考えられるキトリオンダーゼに類似したリンカー領域の配列を示した。

各器官における *SmChi-1*、*SmChi-2*、*SmChi-3* の発現状況を比較した結果、*SmChi-1* は胃、幽門垂、卵に、*SmChi-2* は胃に、*SmChi-3* は肝臓および腎臓に発現が認められた。これらの結果より、*SmChi-3* は、*SmChi-1* および *SmChi-2* とは異なり、生体防御の役割を果たすと考えられた。

2-3. 4 魚種における新規キチナーゼの存在および系統樹解析

カサゴ腎臓キチナーゼで使用した内部配列増幅用縮重プライマーを用いて、アイナメ、イサキ、シログチ、マサバの腎臓より cDNA クローニングを試みた。その結果、*SmChi-3* と相同性を示す約 350bp のキチナーゼの遺伝子断片をそれぞれの魚種より得ることができた。系統樹解析の結果、*SmChi-3* および 4 魚種の増幅断片は、既報のマグロ、ヒラメのキチナーゼ3などを含め、AFCCase-1 および AFCCase-2 とは異なる 3 種類目の新しい魚類キチナーゼのグループ (Fish Chitinase-3: FCCase-3) を形成する事が判明した。

2-4. 魚類キチナーゼの異種宿主発現系の構築

B. brevis 発現系を用い魚類キチナーゼ遺伝子の発現系の構築を試みた。分泌シグナルの下流にフレームを合わせてキチナーゼ遺伝子を挿入し、発現用プラスミドを構築した。シングルコロニーをピックアップし、培養液中で 30°C、24-72h 培養した。培養後、遠心分離して培養液上清と沈殿に分け、沈殿は超音波処理した後、さらに沈殿上清と沈殿に分けた。SDS-PAGE により発現の有無の確認および pNp-(GlcNAc)_n (n=2-4) を用いてキチナーゼ活性の測定を試みた。SDS-PAGE の結果、菌体外へのタンパク質の分泌は確認できたが活性は検出されなかった。現在、発現条件の検討を試みている。

3. 肉鰭類におけるキチナーゼの分布・種類および構造

3-1. シーラカンス胃キチナーゼの cDNA クローニングおよび器官発現解析

シーラカンスの胃より、477 のアミノ酸をコードする 1,431bp の ORF を含む全長 1,581bp のキチナーゼ遺伝子 (*LcChi*) を得た。*LcChi* の演繹アミノ酸配列の一部は以前にシーラカンスの胃より精製されたキチナーゼの N 末端アミノ酸配列と一致した。また、発現解析により *LcChi* は全ての組織で発現が確認されたことより、*LcChi* が

消化以外に生体防御の役割を果たすことが示唆された。

3-2. ハイギョにおけるキチン分解酵素活性の体内分布および最適 pH

ハイギョ体内のキチン分解酵素活性を測定した結果、食道、腸、腎臓にキチナーゼ活性が、腸、肝臓、腎臓、卵において Hex 活性が検出された。胃を持たないハイギョは摂取した餌料中のキチン質を食道でエンド型のキチナーゼを用いて分解し、さらに発達した螺旋腸において、それらを Hex で分解していると考えられた。また、高い活性が検出された食道、腸、腎臓のキチナーゼ活性におよぼす pH の影響を測定した結果、食道では条鰭類の胃のキチナーゼと至適 pH が類似したことより、ハイギョの食道でも条鰭類の胃のキチナーゼと機能が類似する酵素の存在が示唆された。また、腸、腎臓において酸性域から中性域まで広い pH で活性を保持するキチナーゼ活性が観察されたことより、腸、腎臓にはキチナーゼアイソザイムが存在する可能性が示唆された。

3-3. ハイギョ食道キチナーゼの cDNA クローニングおよび器官発現解析

ハイギョ食道より予想される遺伝子全長の 95%にあたる 1,344bp の遺伝子断片を得ることができた。また、このドメイン構造はこれまでの魚類での報告と一致した。現在、残りの 5%部分(シグナルペプチド)の増幅を試みている。器官発現解析によりほとんどの器官で発現がみられたことから、ハイギョはシーラカンスと同様に、1 種類の遺伝子によりコードされたキチナーゼが体内で消化と生体防御の生理的役割を果たしているのではないかと考えられた。

3-4. 肉鰭類キチナーゼの系統樹解析

同じ肉鰭類に分類されるシーラカンスおよびハイギョのキチナーゼを含めた系統樹解析により、両者のキチナーゼはこれまでの AFCase-1 および AFCase-2 のグループ、ならびに本研究で明らかにした FCCase-3 グループのいずれにも属さないことが明らかになった。また、ハイギョのキチナーゼの構造は両生類のキチナーゼに近いことが明らかになった。

4. 総括

現存する魚類で最も繁栄している条鰭類と、四肢動物に最も近縁で、生きた化石と呼ばれる肉鰭類を試料とし、キチナーゼの分布・種類および構造に関する研究を実施した。

本研究により、条鰭類および肉鰭類の体内にはキチナーゼおよび Hex が広く分布していること、また条鰭類は食性や生息環境に応じて、胃のキチナーゼ遺伝子 AFCase-1 および AFCase-2 の発現が異なることを明らかにした。さらに、条鰭類には AFCase-1 および AFCase-2 のキチナーゼとは分布および生理的役割を異にし、生体防御に関わると考えられる Fish Chitinase-3 (FCCase-3)のグループが存在することを明らかにした。また、肉鰭類のシーラカンスとハイギョには、魚体内の多くの器官で発現している 1 種類のキチナーゼ遺伝子がそれぞれ存在し、それは条鰭類の 3 種キチナーゼ AFCase-1, AFCase-2 および FCCase-3 のいずれのグループにも属さないことを明らかにした。