

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

日本大学大学院生物資源科学研究科生物資源利用科学専攻

博士後期課程

柿崎博美

2015

目次

1. 緒言
2. 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
 - 2.1. 序論
 - 2.2. 実験方法
 - 2.2.1. キチン分解酵素の体内分布
 - 1) 粗酵素液の調製
 - 2) キチン分解酵素活性測定
 - 2.2.2. キチン分解酵素活性の至適 pH の決定
 - 2.2.3. マサバ胃キチナーゼの cDNA クローニング
 - 1) total RNA 抽出
 - 2) cDNA 合成
 - 3) PCR
 - 4) アガロースゲル電気泳動
 - 5) ゲルからの DNA 抽出
 - 6) ライゲーション
 - 7) 形質転換
 - 8) プラスミド抽出
 - 9) シーケンス解析
 - 10) データ解析
 - 2.2.4. 系統樹解析
 - 2.2.5. マサバ、シログチ体内における 2 種キチナーゼの器官発現解析
 - 2.3. 結果
 - 2.3.1. キチン分解酵素の体内分布
 - 2.3.2. キチン分解酵素活性の至適 pH の決定

- 2.3.3. マサバ胃キチナーゼの cDNA クローニング
- 2.3.4. 系統樹解析
- 2.3.5. マサバ、シログチ体内における 2 種キチナーゼの器官発現解析
 - 1) マサバ体内における *SjChi-1*, *SjChi-2* の発現解析
 - 2) シログチ体内における *PaChi-1*, *PaChi-2* の発現解析
- 2.4. 考察
 - 2.4.1. キチン分解酵素の体内分布およびキチン分解酵素活性の至適 pH の決定
 - 1) キチン分解酵素の体内分布
 - 2) キチン分解酵素活性の至適 pH の決定
 - 2.4.2. 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
 - 1) マサバ胃キチナーゼの cDNA クローニング
 - 2) 系統樹解析
 - 2.4.3. マサバ、シログチ体内における 2 種キチナーゼの器官発現解析
 - 1) マサバ体内における *SjChi-1*, *SjChi-2* の発現解析
 - 2) シログチ体内における *PaChi-1*, *PaChi-2* の発現解析
- 2.5. 小括
3. 条鰭類における新規キチナーゼの分布・種類および構造
 - 3.1. 序論
 - 3.2. 実験方法
 - 3.2.1. 10 魚種におけるキチン分解酵素の体内分布
 - 3.2.2. カサゴ腎臓キチナーゼの cDNA クローニング
 - 1) total RNA 抽出
 - 2) mRNA 精製
 - 3) cDNA 合成
 - 4) 内部配列増幅
 - 5) 5'RACE
 - 6) 全長増幅

- 3.2.3. カサゴ体内における *SmChi-1*, *SmChi-2*, *SmChi-3* の発現解析
- 3.2.4. *SmChi-1*, *SmChi-2*, *SmChi-3* の立体構造予測
- 3.2.5. アイナメ、マサバ、イサキ、シログチ腎臓キチナーゼの cDNA クローニング
- 3.2.6. 系統樹解析
- 3.3. 結果
 - 3.3.1. 10 魚種におけるキチン分解酵素の体内分布
 - 3.3.2. カサゴ腎臓キチナーゼの cDNA クローニング
 - 3.3.3. カサゴ体内における *SmChi-1*, *SmChi-2*, *SmChi-3* の発現解析
 - 3.3.4. *SmChi-1*, *SmChi-2*, *SmChi-3* の立体構造予測
 - 3.3.5. アイナメ、マサバ、イサキ、シログチ腎臓キチナーゼの cDNA クローニング
 - 3.3.6. 系統樹解析
- 3.4. 考察
 - 3.4.1. 10 魚種におけるキチン分解酵素の体内分布
 - 3.4.2. カサゴ腎臓キチナーゼの cDNA クローニングおよび体内における *SmChi-1*, *SmChi-2*, *SmChi-3* の発現解析
 - 1) カサゴ腎臓キチナーゼの cDNA クローニング
 - 2) カサゴ体内における *SmChi-1*, *SmChi-2*, *SmChi-3* の発現解析
 - 3) *SmChi-1*, *SmChi-2*, *SmChi-3* の立体構造予測
 - 3.4.3. アイナメ、マサバ、イサキ、シログチ腎臓キチナーゼの cDNA クローニング
および系統樹解析
- 3.5. 小括
- 4. 肉鰭類におけるキチナーゼの分布・種類および構造
 - 4.1. 序論
 - 4.2. 実験方法
 - 4.2.1. シーラカンス胃キチナーゼの cDNA クローニング
 - 4.2.2. シーラカンス体内における *LcChi* の発現解析
 - 4.2.3. ハイギョにおけるキチン分解酵素の体内分布および至適 pH の決定

- 4.2.4. ハイギョ食道キチナーゼの cDNA クローニング
- 4.2.5. ハイギョ体内における *PaeChi* の発現解析
- 4.2.6. 系統樹解析
- 4.3. 結果
 - 4.3.1. シーラカンス胃キチナーゼの cDNA クローニング
 - 4.3.2. シーラカンス体内における *LcChi* の発現解析
 - 4.3.3. ハイギョにおけるキチン分解酵素の体内分布および至適 pH の決定
 - 1) ハイギョにおけるキチン分解酵素の体内分布
 - 2) ハイギョにおけるキチン分解酵素活性の至適 pH の決定
 - 4.3.4. ハイギョ食道キチナーゼの cDNA クローニング
 - 4.3.5. ハイギョ体内における *PaeChi* の発現解析
 - 4.3.6. 系統樹解析
- 4.4. 考察
 - 4.4.1. シーラカンス胃キチナーゼの cDNA クローニング
 - 4.4.2. シーラカンス体内における *LcChi* の発現解析
 - 4.4.3. ハイギョにおけるキチン分解酵素の体内分布および至適 pH の決定
 - 1) ハイギョにおけるキチン分解酵素の体内分布
 - 2) ハイギョにおけるキチン分解酵素活性の至適 pH の決定
 - 4.4.4. ハイギョ食道キチナーゼの cDNA クローニング
 - 4.4.5. ハイギョ体内における *PaeChi* の発現解析
 - 4.4.6. 系統樹解析
- 4.5. 小括
- 5. 総括
 - 5.1. 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
 - 5.2. 条鰭類における新規キチナーゼの分布・種類および構造
 - 5.3. 肉鰭類におけるキチナーゼの分布・種類および構造
- 6. 参考文献

7. 謝辞

8. 補足情報

1. 緒言

キチンは、*N*-アセチル-D-グルコサミン (GlcNAc) が β -1,4 グリコシド結合で重合した多糖で、地球上に豊富に存在する再生産可能な生物資源である¹⁾。キチンは節足動物の外骨格、軟体動物の甲、真菌類の細胞壁、線虫類の表皮などに分布し^{1,2)}、セルロースに次ぐ豊富なバイオマスであると考えられている³⁻⁶⁾。自然界に分布するキチンは α または β 結晶構造で存在し、その殆どは強固な α 結晶構造で存在するため、一般的な溶媒には溶解せず利用が困難である^{5,6)}。そのため現在は、キチンを脱アセチル化することにより酸可溶性のキトサンに変換し、利用しているのが主である。また、キチンを加水分解することで得られるキチンオリゴ糖 [(GlcNAc)_n] や GlcNAc は様々な有用生理活性を示し、その生理活性はポリマーの鎖長や溶解度により異なると報告されている⁷⁾。例えば (GlcNAc)_n はビフィズス菌の増殖促進、免疫賦活作用など⁸⁾、GlcNAc は変形性関節症改善、乾燥肌改善作用⁹⁾ などの様々な生理活性を示すことが知られている。

キチン分解酵素はキチンのグリコシド結合を加水分解し、その分解様式の違いによりエンド型 [キチンの内部をランダムに分解し、(GlcNAc)_n を生成] およびエキソ型 [キチンの非還元末端から逐次分解し、GlcNAc を生成] に分類される¹⁰⁾。前者はキチナーゼ (EC 3.2.1.14) と呼ばれ、触媒ドメインのアミノ酸配列の相同性に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^{11,12)}。後者は β -*N*-アセチルヘキソサミニダーゼ (Hex) (EC 3.2.1.52) と呼ばれる¹³⁾。

自然界にはキチナーゼを持つ生物種は多く存在し、哺乳類¹⁴⁻¹⁶⁾、魚類¹⁷⁻³⁵⁾、軟体動物^{36,37)}、昆虫^{38,39)}、植物⁴⁰⁾、微生物^{41,42)} などの生物においてキチナーゼは様々な生理的役割を果たしていると考えられている。例えば、哺乳類の胃などで発現される酸性キチナーゼ (Acidic Mammalian Chitinase: AMCase)^{14, 15, 43, 44)} は主に餌料中に含まれるキチン質の消化に関与し、マクロファージが産生するキチナーゼ (Chitotriosidase)^{15, 16, 44)} は病原体に対し生体防御の役割を持つと考えられている。また、キチナーゼは喘息やアレルギーなどの発症時に肺などで検出されているため、病気と何らかの関係があると考

えられている¹⁴⁻¹⁶⁾。魚類では餌料中に含まれるキチン質を胃で消化するために^{17-26,}
²⁸⁻³⁵⁾、軟体動物のタコではカニなどの硬い殻を持つ獲物の殻に咬みつき、キチナーゼを
含む唾液を注入し、殻と筋肉間の組織を分解する役割で³⁶⁾、昆虫では脱皮時に外骨格に
含まれるキチン質を再構成する役割で^{38,39)}、植物では自己防衛のために⁴⁰⁾、微生物で
は栄養摂取^{41,42)}などの目的でキチナーゼを利用していると考えられている。

本研究では特に魚類のキチナーゼについて報告する。魚類は脊椎動物中で最も繁栄し
ているといわれ、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。条鰭類は餌
料に含まれるキチン質の消化のために消化管にキチナーゼおよび Hex を有しており、そ
れらの活性は一般に食性と関連し、キチン質を含む生物を食物とする魚種で高いことが
報告されている^{20, 24, 28, 29, 31, 32, 34)}。さらに、条鰭類は消化管の形状の違いによりキチナー
ゼ活性に差異がみられることが報告されている²⁴⁾。また、条鰭類の胃より酸性域の pH
で作用するキチナーゼアイソザイムが精製されている^{17-19, 26, 28, 29, 31, 32)}。そして、それら
の一部のアイソザイムは α -キチンに対する優れた分解能を示すことが報告されている^{23,}
^{31, 32)}。さらに、カサゴ *Sebastes marmoratus* 胃³¹⁾、イサキ *Parapristipoma trilineatum*
胃³²⁾、よりキチナーゼ全長遺伝子 (*SmChi-1*: AB686658, *SmChi-2*: AB686659, *PtChi-1*:
AB642677, *PtChi-2*: AB642678) 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^{31, 32)}。
しかしながら、魚類体内におけるキチナーゼおよび Hex の分布は明らかにされておらず、
また生息環境や食性に応じて AFCCase-1 および AFCCase-2 いずれのキチナーゼアイソザイ
ムが主に働いているかは未だ明らかにされていない。

そこで、本論文では、これまでに当研究室より胃キチナーゼの精製と性質を報告した
魚種から、海洋の表層に生息し、動物プランクトンなどのキチンを摂取するマサバ^{19, 23, 45,}
⁴⁶⁾ および海洋の砂泥底に生息し、エビ・カニ類等の強固なキチンを摂取するシログチ^{31,}
^{32, 45, 46)}を選び、消化管以外の器官におけるキチナーゼの有無を明らかにするため、キチ
ナーゼ活性および Hex 活性の体内分布を調べた。その結果、キチナーゼ活性がみられた

マサバの胃および肝臓、シログチの胃および腎臓におけるキチナーゼの至適 pH を調べた。これにより、既報^{17-19, 23, 26, 28, 29, 31, 32, 34)} にみられるように、胃に存在して酸性域で作用するキチナーゼとは異なる新規キチナーゼが存在するか否かを調べた。さらに、マサバ胃よりキチナーゼアイソザイムの cDNA クローニングを行った。また、マサバ、シログチの各器官を用いてそれぞれの魚種の AFCase-1, AFCase-2 に相当する遺伝子の発現解析を行い、発現と食性との関連を調べた。

次に、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ナーゼおよび Hex の体内分布が異なるか否かを調査した。その結果、消化器官以外にもキチナーゼ活性が検出されたが、キチナーゼ活性が検出された器官で AFCase-1 および AFCase-2 に相当する遺伝子の発現がみられなかったことより、AFCase-1 および AFCase-2 以外のキチナーゼ遺伝子の存在が推定された。そのため、消化器官以外にキチナーゼ活性のみられた部位を用いて新規キチナーゼの cDNA クローニングを行った。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に分類されるシーラカンスおよびハイギョを試料とし、それらのキチナーゼの 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。

2. 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

2.1. 序論

これまでに、当研究室では条鰭類の胃で酸性域の pH で作用し、消化に関与するキチナーゼアイソザイムの精製・性状および cDNA クローニングについて報告してきた^{19, 23, 28, 29, 31, 32)}。また、それら条鰭類の胃にはキチナーゼアイソザイムをコードする 2 種のキチナーゼ遺伝子が存在し、精製された酵素の N 末端アミノ酸配列も 2 種類に分類され、遺伝子の分類と対応していることも明らかにした^{31, 32)}。さらに、演繹アミノ酸配列に基づく系統樹解析において条鰭類胃キチナーゼは、Acidic Fish Chitinase-1: AFCase-1 および Acidic Fish Chitinase-2: AFCase-2 に分類されることを明らかにした^{31, 32)}。

本章では、当研究室で以前に胃よりキチナーゼを精製し、その性質を報告したマサバ^{19, 23)} およびシログチ^{28, 29)} を試料とし、それらのキチナーゼアイソザイムの基質である [pNp-(GlcNAc)_n], (n=2, 3) を用いたキチナーゼ活性、ならびに pNp-GlcNAc を基質として用いた Hex 活性の体内分布を調査した³⁴⁾。また、キチン分解酵素の体内分布の結果より、活性がみられたマサバの胃および肝臓、シログチの胃および腎臓のキチナーゼの至適 pH を決定した³⁴⁾。

本研究ではマサバの胃より、既報とは異なるキチナーゼアイソザイムの精製を試みたが、活性が著しく低く、精製は困難であった。当研究室においてマサバ胃より AFCase-1 に相当するキチナーゼ遺伝子 (*SjChi-1*: AB686657) が取得されていたため、本研究ではマサバ胃より AFCase-2 に相当するキチナーゼ遺伝子の取得を試みた³⁴⁾。また、マサバおよびシログチの各器官における AFCase-1, AFCase-2 に相当する遺伝子の発現解析を行い、体内におけるキチナーゼ活性測定の結果と比較検討した³⁴⁾。

2.2. 実験方法

2.2.1. キチン分解酵素の体内分布

1) 粗酵素液の調製

魚体の各器官を摘出し、細菌由来の酵素の持ち込みを防ぐために袋状の器官は切り開いて内容物を除去した後、冷却した D.W. で洗浄した。それ以外の器官も冷却した D.W. で付着している血液や粘液を洗い流した。また、洗浄時に付着した水分はキムワイプで除去した。次に、各器官をそれぞれ湿重量で 0.5 g 秤量し、3 倍量の 20 mM リン酸緩衝液 (pH 7.3) とともにホモジナイザーでホモジナイズした後、遠心分離 (9,000×g、4°C、20 min) し、得られた上清を全ての器官で 1.5 ml になるように同緩衝液で調整した。これをキチン分解酵素活性測定用の粗酵素液とした。

2) キチン分解酵素活性測定

キチナーゼおよび Hex 活性測定の基質には pNp-(GlcNAc)_n, (n=2, 3) および pNp-GlcNAc を用い、OHTAKARA の方法⁴⁷⁾ を改変して活性を測定した。すなわち、0.2 M リン酸-0.1 M クエン酸緩衝液 (pH 6.0) 6.5 μl に粗酵素液 2.5 μl と基質液 2.5 μl を添加し、37°C で 20 分間反応させた。0.2 M 炭酸ナトリウム水溶液を 65 μl 添加し反応を停止させた後、波長 420 nm で遊離した *p*-nitrophenol を比色定量した。毎分 1 μmol の *p*-nitrophenol を遊離する酵素量を 1 ユニット (U/ mg/ min) とし、器官重量当たりの活性値で表した。

2.2.2. キチン分解酵素活性の至適 pH の決定

“2.2.1.1) 粗酵素液の調製” に従い粗酵素液を調製した。pH 2.0-8.0 の範囲におけるキチン分解酵素活性測定には 0.2 M リン酸-0.1 M クエン酸緩衝液を、pH 8.5-9.0 の範囲にお

けるキチン分解酵素活性測定には 0.1 M グリシン-0.1 M NaCl-0.1 M NaOH 緩衝液を使用した。

2.2.3. マサバ胃キチナーゼの cDNA クローニング

1) total RNA 抽出

マサバ胃の total RNA は ISOGEN I 試薬を用いて抽出した。すなわち、細切した胃 80 mg に ISOGEN I を 1 ml 添加し、よく混合して 5 分間の室温放置後、クロロホルム 0.2 ml を添加した。遠心分離 (12,000×g, 4°C, 15 min) により水相、有機相および中間相に分離した。次に、水相を別のエッペンドルフチューブに移し、そこにイソプロパノール 0.8 ml を加え、遠心分離 (12,000×g, 4°C, 10 min) し、沈殿した RNA を 70%エタノールにより洗浄して回収した。回収した total RNA は 50 µl の D.W.で溶解し、cDNA 合成に使用した。

2) cDNA 合成

cDNA 合成には Reverse transcriptase M-MLV を用いた。すなわち、PCR チューブにマサバ胃の total RNA 1 µg を含む 5 µl 以下に調整した溶液に真核生物特有の poly-A tail に特異的に結合する Oligo (dT) primer を添加し、サーマルサイクラーにて 65°Cで 5 分間、4°Cで 3 分間の処理を行った。そこに、5×RTase M-MLV Buffer 4 µl、dNTP Mixture (各 10 mM) 1 µl、RNase Inhibitor 20 units、RTase M-MLV (RNase H-) 200 units を添加し、よく混合した。その後、サーマルサイクラーにて 42°Cで 60 分間、70°Cで 10 分間、4°Cで 3 分間の処理を行った。得られた溶液を cDNA 溶液とした。

3) PCR

内部配列増幅には黒川ら³⁰⁾がキチナーゼの保存アミノ酸配列より設計した縮重塩基プライマー Chi-a (F): TGYTAYTTYACNAAYTGG、Chi-b (F):

GAYATHGAYTGGGARTAYCC、Chi-c (R): TTCCARTARTTCATNGCRTARTC (Table 1) を用いて増幅した。すなわち、PCR チューブに Takara Ex Taq 0.25 μ l、10 \times Ex Taq Buffer 5 μ l、dNTP Mixture (各 2.5 mM) 4 μ l、cDNA 溶液 1 μ l、フォワードプライマー (最終濃度 1 μ M)、リバープライマー (最終濃度 1 μ M) を添加し、初期熱変性を 95 $^{\circ}$ C で 30 秒間行い、次に 95 $^{\circ}$ C で 30 秒間の熱変性、55 $^{\circ}$ C で 1 分間のアニーリング、72 $^{\circ}$ C で 2 分間の伸長反応を 35 サイクル実施した。Nested PCR は First PCR 溶液を 10 倍希釈した溶液を cDNA 溶液として使用し、同反応条件で行った。

RACE 法には内部配列増幅で得られた配列よりプライマーを設計し、RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends を用いて行った。すなわち、設計したプライマーを用いて “2. 2. 3. 2) cDNA 合成” に従い cDNA を合成した。cDNA 溶液 50 μ l と binding solution 120 μ l を混合した溶液を添加し、遠心分離 (13,000 \times g、4 $^{\circ}$ C、20 sec) した。次に、Wash buffer 400 μ l を SNAP カラムに添加し、遠心分離 (13,000 \times g、4 $^{\circ}$ C、20 sec) した。さらに、SNAP カラムに 65 $^{\circ}$ C の U. P. W. を添加し、遠心分離 (13,000 \times g、4 $^{\circ}$ C、20 sec) し、得られた溶液を精製 cDNA 溶液とした。PCR チューブに精製した cDNA 溶液 10 μ l、dCTP (2 mM) 2.5 μ l、tailing buffer 5 μ l、U. P. W. 6.5 μ l を添加し、94 $^{\circ}$ C で 2 分間保温し、冷却した。冷却した溶液と terminal deoxynucleotidyl transferase 1 μ l を混合し、37 $^{\circ}$ C で 10 分間、65 $^{\circ}$ C で 10 分間保温し、得られた溶液を dc tailing cDNA 溶液とした。次に、dc tailing cDNA を用いて初期熱変性を 95 $^{\circ}$ C で 30 秒間行い、次に 95 $^{\circ}$ C で 30 秒間の熱変性、55 $^{\circ}$ C で 1 分間のアニーリング、72 $^{\circ}$ C で 2 分間の伸長反応を 35 サイクルで PCR を実施した。

全長増幅には PCR によるエラーを極力減らすため、校正活性を持つ本酵素を用いて全長増幅を行った。すなわち、PCR チューブに 10 \times pfx Amplification Buffer 5 μ l、10 mM dNTP mixture 1.5 μ l、50 mM Magnesium Sulfate Platinum 1 μ l、フォワードプライマー (最終濃度 1 μ M)、リバープライマー (最終濃度 1 μ M)、cDNA 溶液 1 μ l、Platinum pfx DNA Polymerase 0.4 μ l を添加し、94 $^{\circ}$ C で 15 秒間、55 $^{\circ}$ C で 30 秒間、68 $^{\circ}$ C で 2 分間を 35 サイクル実施した。本項目で使用したプライマーおよび先に当研究室で全長を解析したマサバ胃キチナーゼ *SjChi-1* およびシログチ胃 2 種キチナーゼ *PaChi-1*、*PaChi-2* の増

幅に用いたプライマー情報を含め、それらの配置は Fig. 1 に、情報は Table 1 に記載した。

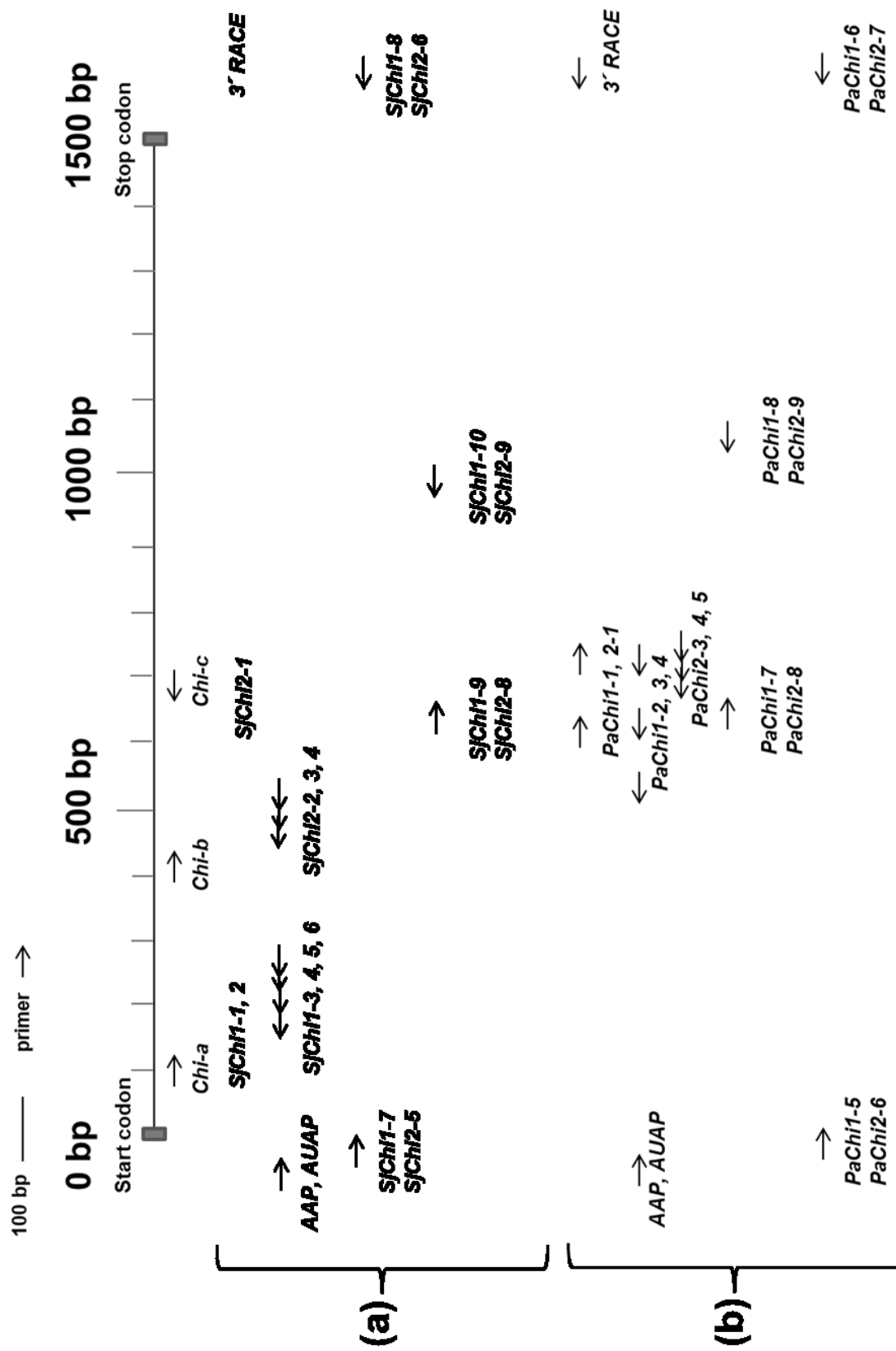


Fig. 1 Primer positions. (a) chub mackerel, (b) silver croaker.

4) アガロースゲル電気泳動

20 ml の 1×TAE 緩衝液 (pH 8.3) に 0.4 g の アガロース S および 0.5 μ l の SYBR safe DNA gel stain を添加し、加熱してアガロース S を溶解した後、ゲルメーカーに流し込みゲルを作成した。作成したゲルを TAE 緩衝液 300 ml で満たした泳動槽にセットし、100 v で 30 分間通電し電気泳動を行った。泳動したゲルは、LED 光を照射しバンドを確認した。

5) ゲルからの DNA 抽出

電気泳動後のアガロースゲルから目的サイズのバンドを切り取り、ろ紙の上で余分な水分を除去した後、Quantum Prep® Freeze'N Squeeze spin columns (バイオラッド) に入れ、 -20°C で 5 分間凍結した。凍結することで水分保持能力が減少したアガロースゲル切片を入れた Quantum Prep® Freeze'N Squeeze spin columns を遠心分離 (13,000 \times g、 20°C 、3 min) し、得られたフロースルーを DNA 溶液とした。

6) ライゲーション

Takara Ex Taq DNA polymerase を使用して PCR を実施した場合、増幅断片の両端に A が付与されることより、pGEM-T Easy vector を用いて TA クローニングを行った。すなわち、PCR 産物 1.5 μ l、2×Rapid Ligation Buffer 2.5 μ l、T4 DNA Ligase 0.5 μ l、pGEM-T Easy Vector 0.5 μ l を混合し、 4°C で一夜反応させた。Rapid Ligation Buffer を使用した場合、室温で 1 時間反応させてもライゲーションは可能であるが、本研究ではライゲーション効率が最も良いとされる 4°C で一夜放置した。

Platinum Pfx DNA Polymerase を使用して PCR を実施した場合、pCR® Blunt II-TOPO® Vector を使用した。すなわち、PCR チューブに PCR 産物 4 μ l、Salt Solution 1 μ l、pCR Blunt II-TOPO Vector 1 μ l を添加し、室温で 5 分間反応させた。

7) 形質転換

pGEM-T Easy vector を用いてライゲーションを行った場合は、ECOSTM Competent *E. coli* JM109 を用いて形質転換を行った。すなわち、冷凍庫（-80℃）より Competent cell を取り出し、氷上で5分間融解した。そこに、氷冷したライゲーション溶液を添加し、氷上で5分間静置した後、42℃で45秒間保持した。この溶液をアンピシリン含有 LB 平板プレートに塗抹し、37℃で一夜培養した。

pCR® Blunt II-TOPO® vector を用いてライゲーションを行った場合は、One Shot TOP10 competent cells を用いて形質転換を行った。すなわち、pCR® Blunt II-TOPO® vector ライゲーション溶液 2 µl を One Shot TOP10 competent cells 入り 1.5 ml チューブに添加し、氷上で30分間、42℃で30秒間、氷上で2分間処理した後、室温の S.O.C. medium 250 µl を添加し、37℃で1時間試験管振盪機で培養した。その後、遠心分離（13,000×g、20℃、1 min）により沈殿を回収し、カナマイシン含有 LB 平板プレートに塗抹し、37℃で一夜培養した。

8) プラスミド抽出

形質転換体の培養液 3 ml を、遠心分離（9,000×g、20℃、2 min）し、沈殿を回収し、200 µl の mP1 を添加して懸濁した。次に、200 µl の mP2 を添加し、緩やかに混合した後、室温で2分間静置した。その後、300 µl の mP3 を添加し、緩やかに混合後、遠心分離（13,000×g、20℃、2 min）した後、上清を FastGene mP カラムに移し、遠心分離（13,000×g、20℃、30 sec）した。フロースルーを捨て、600 µl の mP5 を添加し、遠心分離（13,000×g、20℃、30 sec）した。フロースルーを捨て、カラムを乾燥させるため再度、遠心分離（13,000×g、20℃、30 sec）した。次に、D.W.を 50 µl 添加し、遠心分離（13,000×g、20℃、30 sec）し、得られたフロースルーをプラスミド溶液とした。

9) シークエンス解析

BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit を用いてシークエンス解析を行った。Big Dye 2 µl、Sequencing buffer 2 µl、プライマー（それぞれのベクターに適したもの）

1 μ l、DNA 溶液 5 μ l を混合し、96°Cで1 分間反応させた後、96°Cで10 秒間、50°Cで5 秒間、60°Cで45 秒間を25 サイクル実施した。

10) データ解析

“9) シークエンス解析”により得られた塩基配列データ (Seq. file) を、DDBJ (www.ddbj.nig.ac.jp) および NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) blast で解析した。なお、サンプル数が複数の場合は、Genomenet (www.genome.jp/tools/clustalw) の Clustalw を使用し、クラスター解析によりいくつかのグループに分類した後、上記のサイトにて解析した。また、波形データ (abi. file) は A plasmid Editor: ApE で確認した。

2. 2. 4. 系統樹解析

本研究では、各種ファミリー18 キチナーゼおよびアウトグループとして *Serratia marcescens* (Accession numbers: X03657) キチナーゼの演繹アミノ酸配列の情報をもとに系統樹を作成した。まず、塩基配列解析で使用した Clustalw を使用し、dnd. file を取得した。次に、Tree view (taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html) で系統樹を作成した。

2. 2. 5. マサバ、シログチ体内における2 種キチナーゼの器官発現解析

“2. 2. 3. 1) total RNA 抽出”に従い total RNA を抽出し、“2. 2. 3. 2) cDNA 合成”に従い cDNA を合成した。また、PCR には Table 1 記載のプライマーを使用し、Go Taq Green Master Mix を用いて実施した。すなわち、PCR チューブに 2×Go Taq Green Master Mix 12.5 μ l、フォワードプライマー (最終濃度 1 μ M)、リバースプライマー (最終濃度 1 μ M)、cDNA 溶液を添加し、95°Cで2 分間、55°Cで30 秒間、72°Cで1 分間を30 サイクル、72°Cで5 分間を実施した。また、“2. 2. 3. 4) アガロースゲル電気泳動”に従いアガロースゲル電気泳動を実施し、バンドを確認した。

2.3. 結果

2.3.1. キチン分解酵素の体内分布

マサバおよびシログチ体内のキチン分解酵素活性測定の結果、pNp-(GlcNAc)₂およびpNp-(GlcNAc)₃に対するキチナーゼ活性はいずれも両魚種共に胃で最も高く、マサバ胃ではpNp-(GlcNAc)₂に対し0.014 U/g、pNp-(GlcNAc)₃に対し0.03 U/g (Fig. 2 a)、シログチ胃ではpNp-(GlcNAc)₂に対し0.039 U/g、pNp-(GlcNAc)₃に対し0.056 U/gの値が観察された (Fig. 2 b)。また、キチナーゼ活性はマサバでは鰓、腸、幽門垂、精巣、肝臓で (Fig. 2 a)、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 (Fig. 2 b)。また、Hex活性はマサバ、シログチ共に鰓および心臓での活性はやや低いが、他の部位では高い値が検出された (Fig. 2 c, d)。最も高い活性値はマサバでは肝臓で0.07 U/g (Fig. 2 c)、シログチでは腎臓で0.038 U/g (Fig. 2 d)であった。

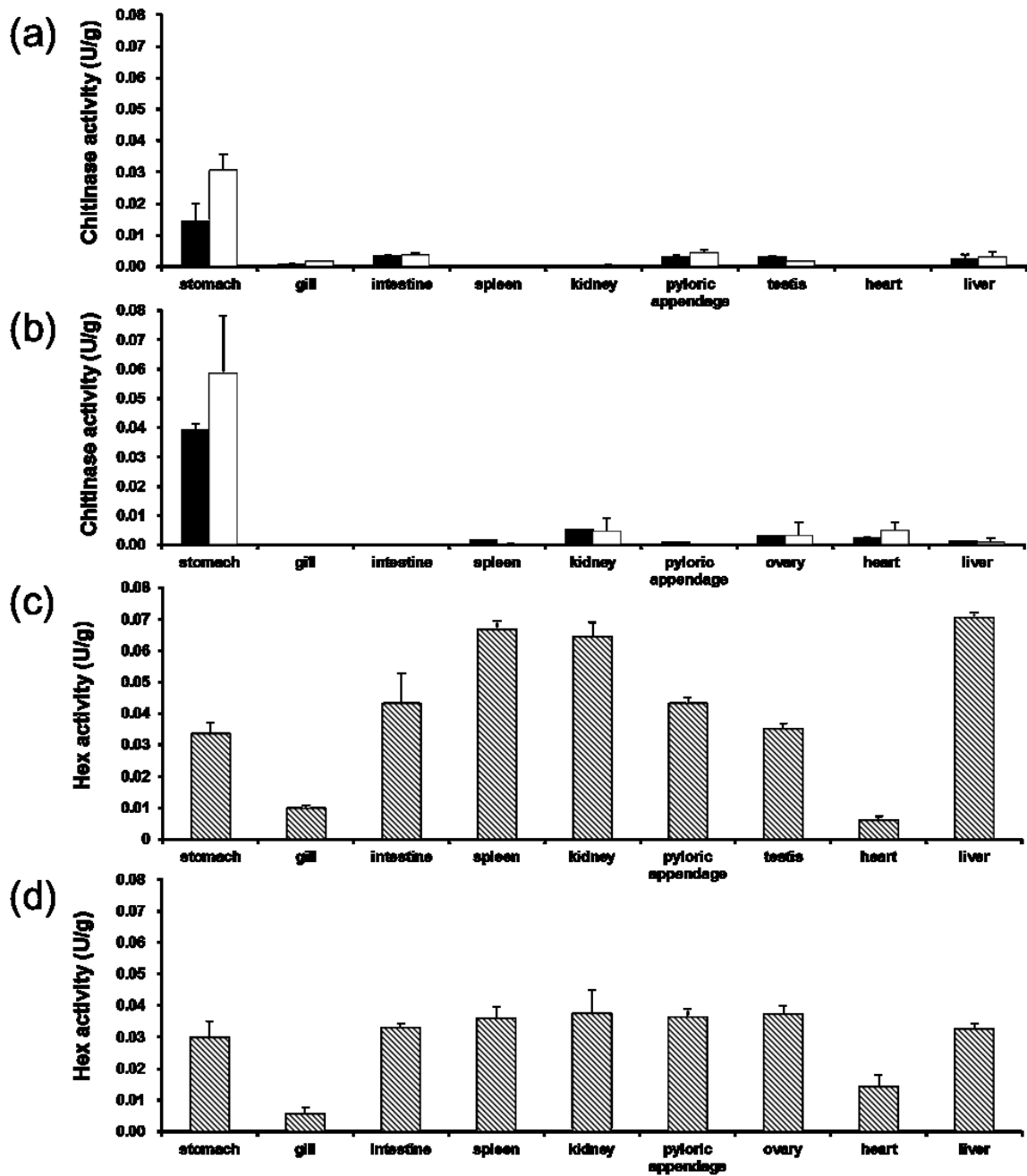


Fig. 2 The distribution of the chitinolytic activities in the body organs. (a) chub mackerel, (b) silver croaker, (c) chub mackerel, (d) silver croaker. Results show the average of three individuals. Bars represents the standard deviation. (■) pNp-(GlcNAc)₂, (□) pNp-(GlcNAc)₃, (▨) pNp-(GlcNAc).

2.3.2. キチン分解酵素活性の至適 pH の決定

消化管とそれ以外の器官におけるキチナーゼの至適 pH を比較するため、マサバでは胃と肝臓、シログチでは胃と腎臓のキチナーゼ活性の至適 pH を決定した。マサバ胃では pNp-(GlcNAc)₂ に対して pH 3.0 に、pNp-(GlcNAc)₃ に対して pH 5.0 に最大活性が認められたが、中性の pH 7.0 では両基質に対する活性は最大活性の 35% 以下に低下した (Fig. 3 a)。一方、マサバ肝臓では両基質に対する至適 pH は酸性域の pH 4.0 に認められたが、pH 7.0 においても最大活性の約 70% が保持されていた (Fig. 3 b)。シログチの胃では両基質に対して pH 3.0~6.0 に最大活性の 80% 以上の相対活性値が認められたが、pH 8.0 では最大活性の 15% 以下に低下した (Fig. 3 c)。一方、腎臓では両基質に対する最大活性は、酸性の pH 4.0 のみならず、微アルカリ性の pH 8.0 にも認められた (Fig. 3 d)。なお、Hex 活性はマサバ胃では pH 5.0 に、肝臓では pH 4.0 に認められ (Fig. 4 a)、シログチ胃では pH 3.0 および pH 6.0 に、腎臓では pH 5.0 に認められた (Fig. 4 b)。

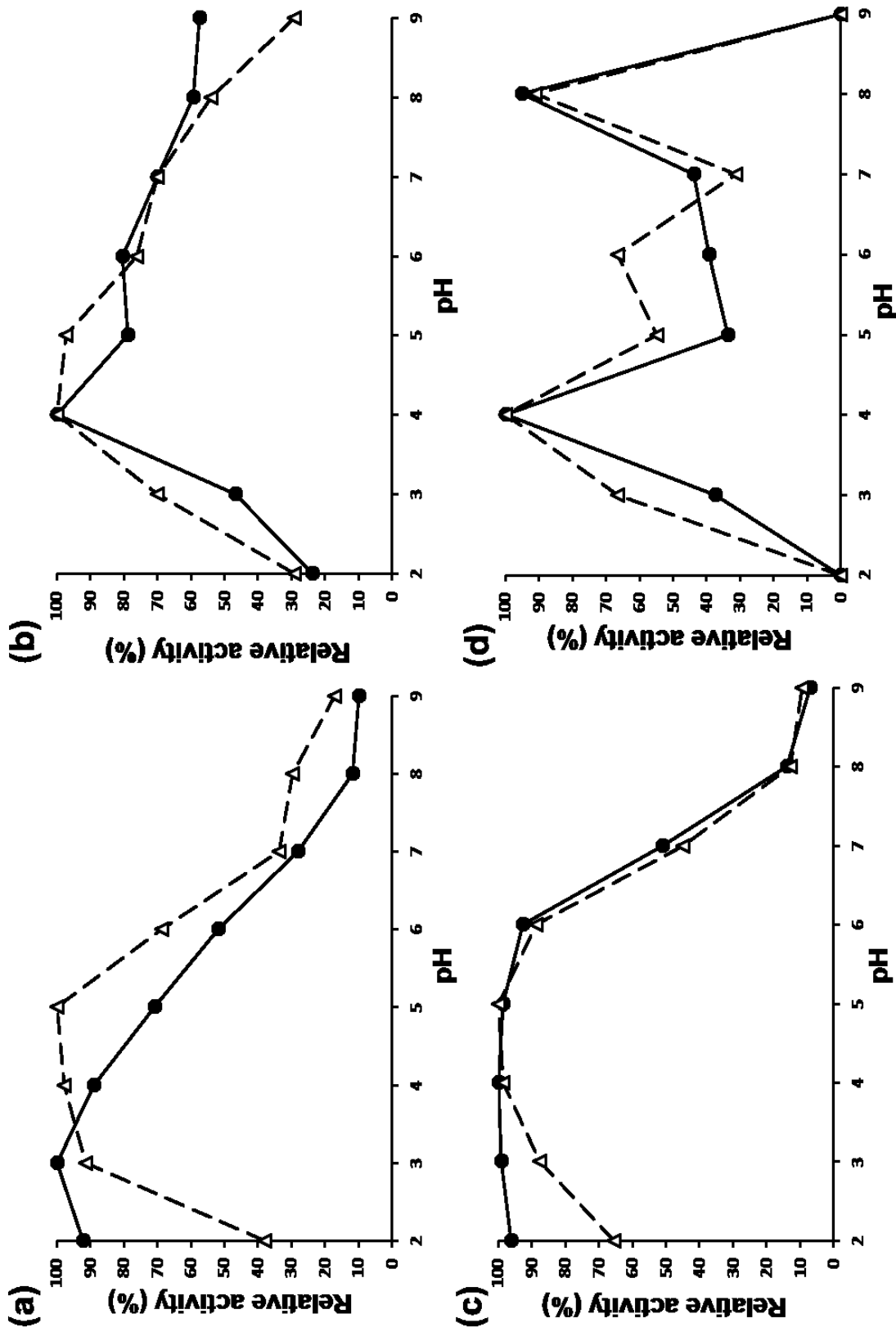


Fig. 3 Effect of pH on chitinase activity. The optimum pH when using pNp-(GlcNAc)₂ and pNp-(GlcNAc)₃ as a substrate was measured by incubating it at 37° C for 20 min in a 0.2 M sodium phosphate-0.1 M citric acid buffer (pH 2.0-8.0) and 0.1 M glycine + 0.1 M NaCl-0.1 M NaOH buffer (pH 9.0). (●) pNp-(GlcNAc)₂, (△) pNp-(GlcNAc)₃. (a) stomach, chub mackerel; (b) liver, chub mackerel; (c) stomach, silver croaker; (d) kidney, silver croaker.

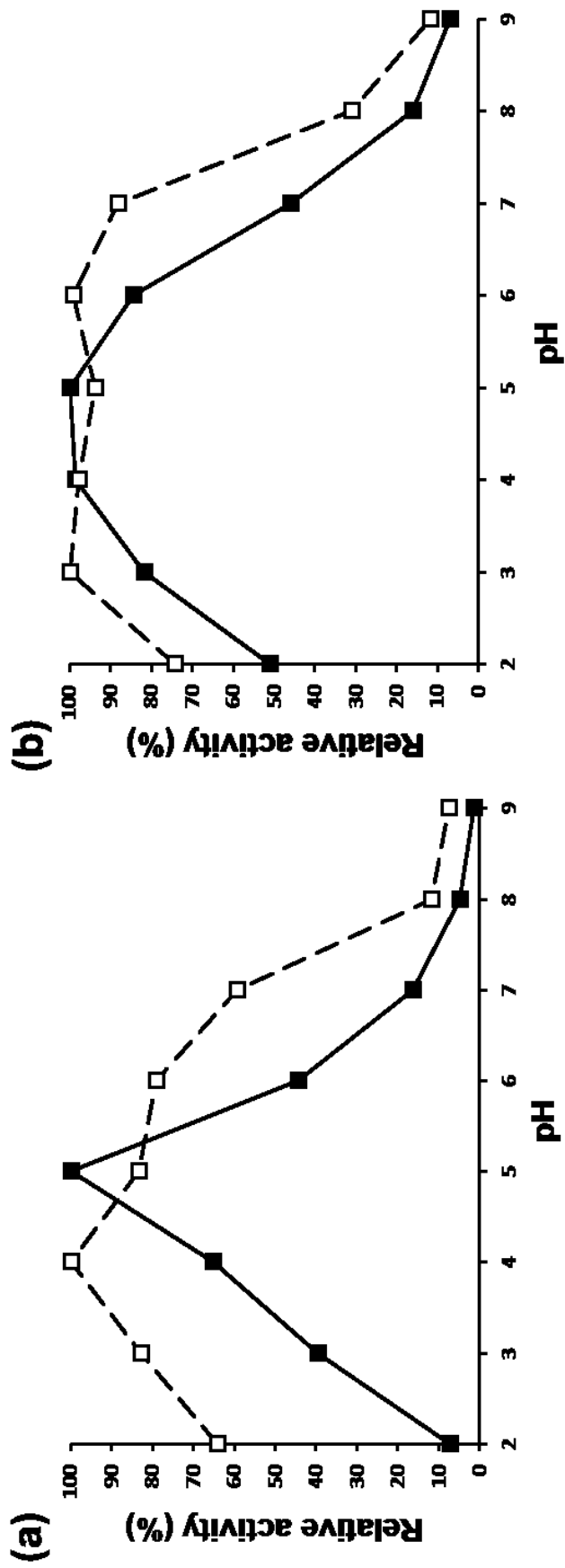


Fig. 4 Effect of pH on Hex activity. The optimum pH when using pNp-GlcNAc as a substrate was measured by incubating it at 37°C for 20 min in a 0.2 M sodium phosphate-0.1 M citric acid buffer (pH 2.0-8.0) and 0.1 M glycine + 0.1 M NaCl-0.1 M NaOH buffer (pH 9.0). (a) ■ stomach, chub mackerel; (a) □ liver, chub mackerel; (b) ■ stomach, silver croaker; (b) □ kidney, silver croaker.

2.3.3. マサバ胃キチナーゼの cDNA クローニング

マサバ胃よりキチナーゼ遺伝子の内部配列増幅の結果、約 350 bp の遺伝子断片を得た。得られた遺伝子配列を NCBI Blast により解析したところ、先に報告したカサゴ胃キチナーゼ遺伝子 (*SmChi-2*)³¹⁾、イサキ胃キチナーゼ遺伝子 (*PtChi-2*)³²⁾ と相同性が認められたことから、RACE 法によりキチナーゼ遺伝子上流域、下流域の増幅を試みた。その結果、得られた遺伝子上流域に開始コドンが、また下流域に終止コドンが認められた。次に、全長遺伝子を platinum *pfx* DNA polymerase を用いて増幅した。その結果、マサバ胃より 1,512 bp の全長遺伝子 (*SjChi-2*)³⁴⁾ が得られ、1,467 bp の ORF が含まれていた (Fig. 5)。この全長遺伝子配列は DDBJ にてアクセッション番号 (*SjChi-2*: AB689022) を取得した。

2.3.4. 系統樹解析

SjChi-2 の演繹アミノ酸配列および哺乳類の AMCcase および Chitotriosidase、魚類の AFCcase-1 および AFCcase-2、その他の生物種キチナーゼのアミノ酸配列の相同性に基づく系統樹解析を行った結果、*SjChi-2* は AFCcase-2 に属することが明らかになった (Fig. 6)。

No.	Scientific name	Information	Accession No.
1	<i>Panasthis argentata</i>	Stomach <i>PaChil</i>	AB605774
2	<i>Panasthis argentata</i>	Stomach <i>PaChl2</i>	AB605775
3	<i>Scomber japonicus</i>	Stomach <i>SjChil</i>	AB686657
4	<i>Scomber japonicus</i>	Stomach <i>SjChl2</i>	AB689022
5	<i>Sebastes marmoratus</i>	Stomach <i>SmChil</i>	AB686658
6	<i>Sebastes marmoratus</i>	Stomach <i>SmChl2</i>	AB686659
7	<i>Parapristipoma trilineatum</i>	Stomach <i>PtChl-1</i>	AB642677
8	<i>Parapristipoma trilineatum</i>	Stomach <i>PtChl-2</i>	AB642678
9	<i>Latimeria chalumnae</i>	Stomach <i>LcChi</i>	AB704869
10	<i>Prionace glauca</i>	Stomach <i>PgChi</i>	AB872008
11	<i>Portunus trüberculatus</i>	Hepatopancreas <i>PotChil</i>	AB874469
12	<i>Portunus trüberculatus</i>	Hepatopancreas <i>PotChl2</i>	AB890123
13	<i>Paralichthys olivaceus</i>	Stomach <i>fChil</i>	AB121732
14	<i>Paralichthys olivaceus</i>	Stomach <i>fChl2</i>	AB121733
15	<i>Epinephelus coioides</i>	Chil	FJ169895
16	<i>Epinephelus coioides</i>	Chl2	FJ169894
17	<i>Pagrus major</i>	Hepatopancreas <i>Chl2</i>	AB678430
18	<i>Larimichthys crocea</i>	Muscle <i>AMCase-like</i>	XP_010745222
19	<i>Lethenteron japonicum</i>	Liver	EU741679
20	<i>Xenopus silurana tropicalis</i>	Whole body	BC090382
21	<i>Bytho japonicus</i>	Pancreatic	AJ345054
22	<i>Alligator mississippiensis</i>	<i>AMCase-like</i>	XP_006278821
23	<i>Gallus gallus</i>	Grainbar stomach	AB071038
24	<i>Caprimulgus carolinensis</i>	<i>AMCase</i>	XP_010171779
25	<i>Cuculus canorus</i>	<i>AMCase</i>	XP_009560368
26	<i>Mus musculus</i>	Stomach <i>AMCase</i>	EF094027
27	<i>Mus musculus</i>	Tongue Chitotriosidase	AY458654
28	<i>Rattus norvegicus</i>	Stomach <i>AMCase</i>	AY486074
29	<i>Rattus norvegicus</i>	Spleen Chitotriosidase	DQ286232
30	<i>Macaca fascicularis</i>	<i>AMCase</i>	FJ685619
31	<i>Homo sapiens</i>	Stomach Lang	AF290004
32	<i>Homo sapiens</i>	Chitotriosidase	U29615
33	<i>Serratia marcescens</i>	Bacteria chitinase	X03657

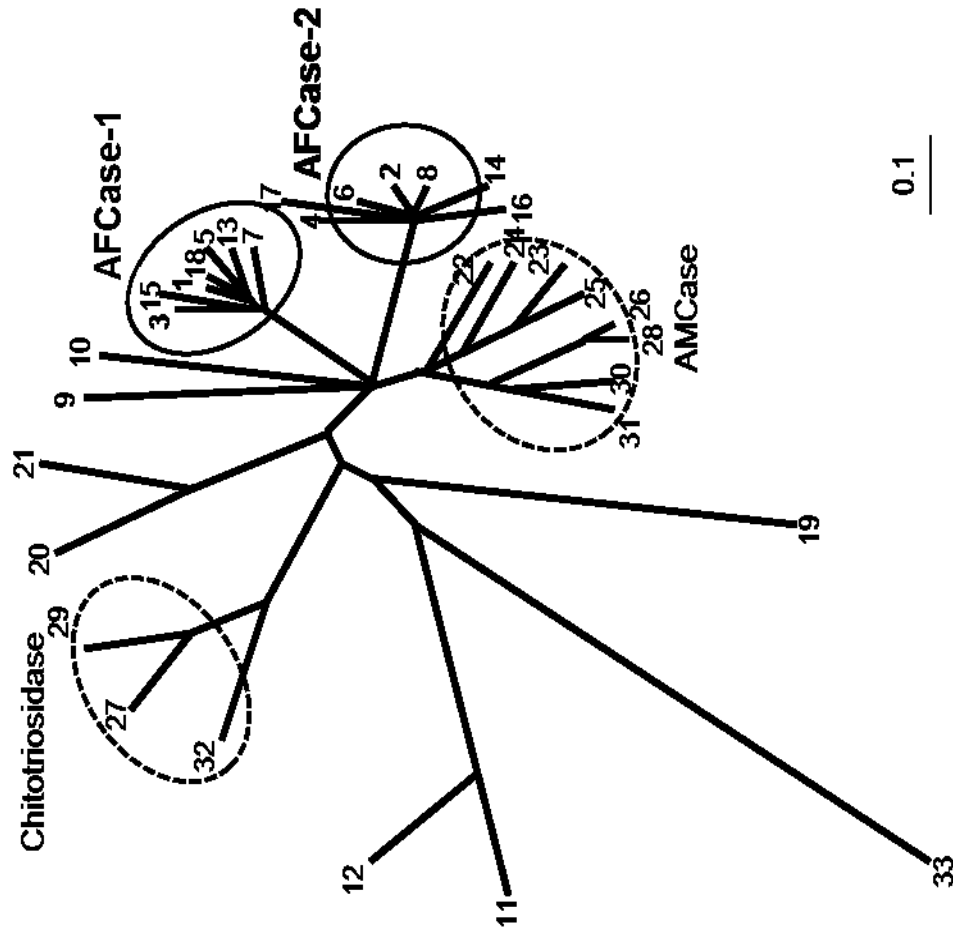


Fig. 6 Phylogenetic tree for chitinase amino acid sequences using the neighbor joining method in the clustalW program. A bacterial chitinase, *Serratia marcescens* chitinase, was used as an outgroup. The scale bar indicates the substitution rate per residue.

2.3.5. マサバ、シログチ体内における2種キチナーゼの器官発現解析

1) マサバ体内における *SjChi-1*, *SjChi-2* の発現解析

マサバの各器官の total RNA をそれぞれ 0.5 µg 用い、各器官における *SjChi-1*, *SjChi-2* の発現を半定量 PCR により解析した結果、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、“2.3.1. キチン分解酵素の体内分布” でキチナーゼ活性のみられた幽門垂においても *SjChi-1* の発現が検出された (Fig. 7 a)。

2) シログチ体内における *PaChi-1*, *PaChi-2* の発現解析

マサバと同様の手法でシログチ体内における *PaChi-1*, *PaChi-2* の発現を解析した結果、胃に *PaChi-1*, *PaChi-2* の両キチナーゼ遺伝子が強く発現していることが明らかになった。また、*PaChi-1* は卵巣においてもわずかに発現がみられた (Fig. 7 b)。

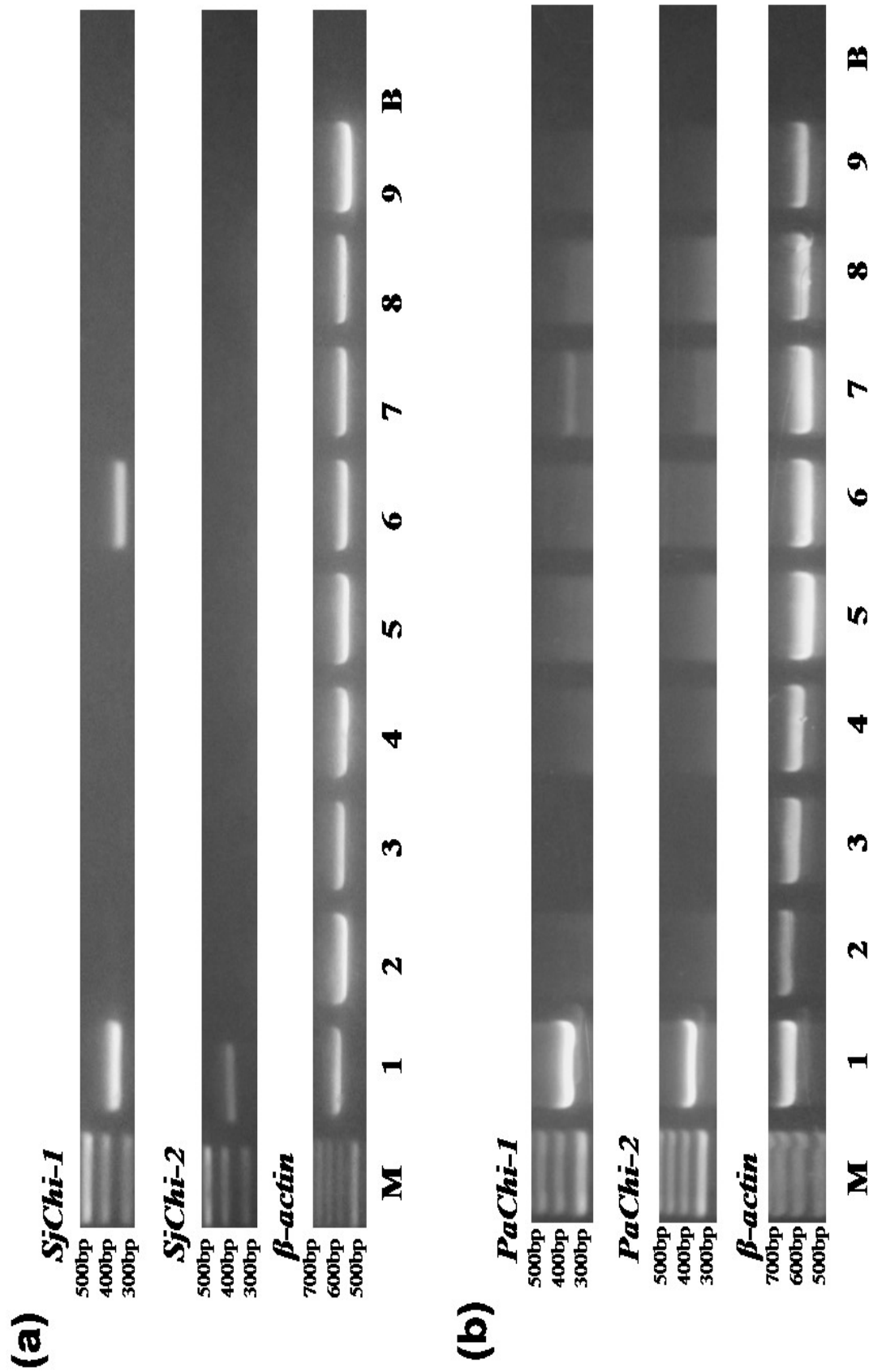


Fig. 7 Chitinase and β -actin expressions in various tissues (M, marker; 1, stomach; 2, gill; 3, intestine; 4, spleen; 5, kidney; 6, pyloric appendage; 7, ovaries; 8, heart; 9, liver; B, blank).

2.4. 考察

2.4.1. キチン分解酵素の体内分布およびキチン分解酵素活性の至適 pH の決定

1) キチン分解酵素の体内分布

魚類では消化管の胃で高活性のキチナーゼの存在が報告されており^{17-24, 26, 28, 29, 31, 32, 34)}、本研究結果においても、マサバおよびシログチの胃で魚体内では最も高い活性が認められたことより、魚類は胃に高いキチナーゼ活性を持つ傾向がある点において一致した。一方、本研究によりマサバでは鰓、精巢、肝臓、シログチでは脾臓、腎臓、卵巣、心臓、肝臓などの消化管以外の器官にもキチナーゼ活性が広く分布することが初めて明らかとなった。なお、Hex 活性は両魚種共にほとんどの部位で検出されることが判明した (Fig. 2 c, d)。これらの結果より、マサバおよびシログチは胃に高いエンド型のキチナーゼ活性を有し、胃の次に食物が消化される器官である幽門垂、腸にエキソ型の Hex 活性を有し、食物中のキチン質を GlcNAc まで消化していることが考えられた。また、マサバでは発達した幽門垂（高速遊泳する魚種で発達傾向がみられる器官）^{45, 46)}においてもキチナーゼ活性が検出されたことより、マサバは幽門垂においてもキチナーゼを分泌し、食物中のキチン質の消化効率を高めていると考えられた。さらに、消化管以外の器官においてもキチナーゼ活性および Hex 活性が検出されたことより、魚類はキチン分解酵素を食物中のキチン質の消化のみならず、ヒトなどで報告¹⁴⁾されている生体防御などの生理的役割にも利用していることが推察された。

2) キチン分解酵素活性の至適 pH の決定

両魚種の胃およびマサバの肝臓、シログチの腎臓において、キチナーゼ活性の至適 pH は酸性域の pH 3-5 に観察された (Fig. 3)。魚類胃より精製されたキチナーゼアイソ

ザイムの至適 pH は、カサゴ胃では SmChiA が pH 1.5-2.5、SmChiB が pH 2.0-2.5、SmChiC が pH 3.5-4.5³¹⁾、イサキ胃では PtChiA が pH 2-3.5、PtChiB が pH 4.5-5.5³²⁾、シログチ胃では PaChiA が pH 4.0-5.0、PaChiB が pH 4.5-5.0^{28,29)} であることが報告されている。マサバおよびシログチの至適 pH はそれらと類似していた。一方、マサバの肝臓では中性付近の pH でも活性が保持されていたことより、新たな性質のキチナーゼアイソザイムの存在も考えられた。また、シログチの造血器官である腎臓で検出された pH 8 のキチナーゼ活性のピークは、ナイルティラピア血清中キチナーゼの pH である 7.0 および 9.0²⁷⁾ と類似したことより、シログチ腎臓には胃で発現する酸性域で作用するキチナーゼに類似したキチナーゼアイソザイムの他に、pH 8 で作用するキチナーゼアイソザイムの存在も考えられた。また、カサゴ胃のキチナーゼ³¹⁾ では C 末端側のプロセシングにより至適 pH 値の上昇が観察されている。シログチ腎臓のキチナーゼも同様のプロセシングが生じた可能性も考えられた。

また、両魚種の Hex 活性の至適 pH は pH 4.0-5.0 付近に認められたが (Fig. 4)、これはマダイ肝臓の pH 4.0⁴⁸⁾、マダコ肝臓の pH 4.0⁴⁹⁾ とほぼ一致するものであった。

2.4.2. 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

1) マサバ胃キチナーゼの cDNA クローニング

マサバ胃より得られたキチナーゼ遺伝子 *SjChi-2* は、これまでに報告されている AFCase-2 のグループに属す魚類キチナーゼと構造が類似し、イサキ胃キチナーゼ (*PtChi-2*)³²⁾ と 94%、シログチ胃キチナーゼ (*PaChi-2*)³⁴⁾ と 93%、ヒラメキチナーゼ (*fChi2*)³⁰⁾ と 92% の相同性が認められた。一方、当研究室で以前に遺伝子登録をしたマサバ胃キチナーゼアイソザイム全長 cDNA (*SjChi-1*) とは 61% の相同性を示した。

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、触媒ドメイン、リンカー領域、キチン結合ドメインにより構成され、触媒ドメインには GH ファミリー 18 キチナーゼの活性部位特有の配列 (DXDXE)¹¹⁾ が認められた。また、アミノ酸配列よ

り計算した等電点は 5.16、分子質量は 50831.70 Da であった。また、これまでに報告されている魚類胃キチナーゼ³⁰⁻³⁵⁾ 同様にリンカー領域にセリン、グリシンの反復した配列がみられた (Fig. 5)。

2) 系統樹解析

SjChi-2 および数種類のファミリー 18 キチナーゼの演繹アミノ酸配列に基づく系統樹解析の結果、*SjChi-2* は当研究室で報告した AFCase-2 のグループ^{31,32,34)} に含まれた (Fig. 6)。これらの結果は、魚類の胃に存在し、酸性域で作用する 2 種キチナーゼアイソザイムをコードする 2 種類のキチナーゼ遺伝子はファミリー 18 キチナーゼの系統樹解析において独自の 2 種類の AFCase のグループを形成するという当研究室の報告^{31,32,34)} を強く支持する結果であると考えられた。

2.4.3. マサバ、シログチ体内における 2 種キチナーゼの器官発現解析

1) マサバ体内における *SjChi-1*, *SjChi-2* の発現解析

本研究において、マサバでは胃に *SjChi-1* が *SjChi-2* より強く発現していることが判明した (Fig. 7 a)。海洋において表層に生息するマサバの主な餌料の 1 つはアミ類などの動物プランクトンである^{45,46)}。その外骨格の構成成分は α キチンであることより、マサバはその分解に主に *SjChi-1* を用いていることが示唆された。また、“2.3.5. マサバ、シログチ体内における 2 種キチナーゼの器官発現解析”でキチナーゼ活性のみられた幽門垂において *SjChi-1* の発現がみられたことから、*SjChi-1* は幽門垂においてもキチン質の消化に関わる酵素であると考えられた。

本研究において、マサバではキチナーゼ活性が認められた器官の一部でしかキチナーゼ遺伝子 AFCase-1, AFCase-2 の発現が検出されなかったことより、両遺伝子がコードするキチナーゼとは異なる新規のキチナーゼの存在が示唆された。

2) シログチ体内における *PaChi-1*, *PaChi-2* の発現解析

マサバとは異なり、シログチでは胃に *PaChi-1*, *PaChi-2* の両者が強く発現していた (Fig. 7 b)。既報^{28,29)}において、シログチ胃より精製したキチナーゼアイソザイム *PaChiA*, *PaChiB* は幅広い不溶性高分子基質分解能を有することが報告されている。そのため、砂泥底に生息するシログチはエビ・カニなどの甲殻類の α キチン、イカなどの頭足類およびゴカイなどの多毛類の β キチンなど、多様な生物種のキチン質を分解するために、両キチナーゼアイソザイムを発現し消化に用いている可能性が考えられた。また、卵巣において発現がみられた *PaChi-1* がコードする *PaChiA* は、真菌類であるカビの菌糸に含まれるキチン質やキチン質の表皮を有する線虫類の侵入に対しての防御に働く可能性が推察された。

2.5. 小括

マサバおよびシログチのキチン分解酵素の体内分布の測定結果より、両魚種では胃などの消化管のみならず、体内の器官に広くキチナーゼ活性が分布していることが初めて明らかになった (Fig. 1)。マサバおよびシログチのキチナーゼ活性の至適 pH の決定において、マサバ肝臓のキチナーゼ活性は pH 4 に最大活性を示すが、pH 7 でも最大活性の 70%を示した。一方、シログチ腎臓には pH 4 のみならず、pH 8 にも至適 pH を示すキチナーゼが存在することが明らかになった (Fig. 2)。本研究結果より、両魚種では既報の pH 3-5 の酸性域に至適 pH を持つ魚類胃キチナーゼに類似する酵素の他に、遺伝子を異にする酵素およびプロセッシングによる至適 pH の変化による可能性も含まれる新たな性状を示すキチナーゼの存在が示唆された。また、マサバ胃より AFCase-2 に属するキチナーゼ遺伝子 *SjChi-2* の全長 cDNA を得た (Fig. 5)。マサバおよびシログチの各器官における AFCase-1, AFCase-2 に相当する遺伝子 (*SjChi-1*, *SjChi-2* および *PaChi-1*, *PaChi-2*) の発現状況を調べた結果、両魚種に差異が認められ、それは両魚種の食性の違いに起因すると考えられた (Fig. 7)。また、体内分布においてキチナーゼ活性が検出された器官の一部でしか AFCase-1, AFCase-2 に相当する遺伝子の発現が認められなかったことより、両遺

伝子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。

3. 条鰭類における新規キチナーゼの分布・種類および構造

3.1. 序論

“2. 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”において食性の異なるマサバおよびシログチを試料とし、各器官におけるキチン分解酵素活性およびキチナーゼ遺伝子の発現状況を比較検討した。そこで、本章ではマサバ、シログチ以外に食性や生息域の異なる 10 魚種（アイナメ、イサキ、イボダイ、カサゴ、ヤマトカマス、クロマグロ、ホウボウ、タチウオ、コチ、メジナ）を試料とし、他の条鰭類も消化器官以外にキチン分解酵素を有しているかを明らかにすることを目的とした。

次に、キチナーゼ活性が認められたカサゴの腎臓を用いて AFCase-1 および AFCase-2 に属さない新規キチナーゼの cDNA クローニングを実施した。また、cDNA クローニングにより得られた新規キチナーゼ (*SmChi-3*)、ならびに当研究室ですでに報告したカサゴ胃の 2 種キチナーゼ (*SmChi-1*: AB686658, *SmChi-2*: AB686659)³¹⁾ の各器官における発現解析を実施した。さらに、カサゴ 3 種キチナーゼ (*SmChi-1*, *SmChi-2*, *SmChi-3*) の演繹アミノ酸配列を用いて立体構造予測を行った。上記の結果を踏まえて、条鰭類に分類されるカサゴの 3 種キチナーゼの体内における役割を推定しようとした。

次に、カサゴ以外の条鰭類も腎臓に *SmChi-3* に相当する遺伝子を有しているのかを明らかにするため、4 魚種における新規キチナーゼ 3 遺伝子断片の増幅および塩基配列解析を実施した。

なお、各種クロマトグラフィーを用いてカサゴ腎臓より新規キチナーゼの精製を試みたが、pH などの条件を変えても失活しやすく、精製は困難であった。そこで、枯草菌の一種である *Bacillus brevis* を用いて異種宿主発現系構築を試みたが、キチナーゼの発現はみられなかった。そのため、現在発現条件の検討を試みている最中である。

3.2. 実験方法

3.2.1.10 魚種におけるキチン分解酵素の体内分布

アイナメ、イサキ、イボダイ、カサゴ、ヤマトカマス、クロマグロ、ホウボウ、タチウオ、コチ、メジナの各器官を用いて“2.2.1. キチン分解酵素の体内分布”に従い粗酵素液を調製し、キチン分解酵素活性を測定した。なお、本実験に用いた10魚種の生息域および食性はTable 2に示した。

Table 2. 10 fish species description

No.	魚種名&学名	目	科	生息域	食性	
					肉食性	肉食性
1	アイナメ <i>Hexagrammos otakii</i>	カサゴ目	アイナメ科	沿岸の岩礁域	肉食性	小魚、甲殻類、多毛類
2	イサキ <i>Parapristipoma trilineatum</i>	スズキ目	イサキ科	海藻の多い岩礁域	肉食性	小魚、甲殻類、多毛類
3	イボダイ <i>Psenopsis anomala</i>	スズキ目	イボダイ科	水深200m付近までの大陸棚	肉食性	甲殻類、多毛類、大型のプランクトン
4	カサゴ <i>Sebastes marmoratus</i>	カサゴ目	フサカサゴ科	沿岸の岩礁や海中林	肉食性	多毛類、甲殻類、小魚
5	ヤマトカマス <i>Sphyrænidæ japonicus</i>	スズキ目	カマス科	沿岸域の浅場	肉食性	小魚
6	クロマグロ <i>Thunnus thynnus</i>	スズキ目	サバ科	外洋の表層・中層	肉食性	魚、甲殻類、頭足類
7	ホウボウ <i>Chelidonichthys spinosus</i>	カサゴ目	ホウボウ科	100m以浅の砂泥底	肉食性	甲殻類、小魚
8	タチウオ <i>Trichiurus japonicus</i>	スズキ目	タチウオ科	表層から水深400m程度の泥底付近	肉食性	小魚、イカ類、甲殻類
9	マゴチ <i>Platycephalus indicu</i>	カサゴ目	コチ科	沿岸からやや沖合の砂泥底	肉食性	甲殻類、小型の頭足類、小魚
10	メジナ <i>Girella punctata</i>	スズキ目	メジナ科	沿岸の岩礁域	雑食性	夏:甲殻類 冬:海藻類

3.2.2. カサゴ腎臓キチナーゼの cDNA クローニング

1) total RNA 抽出

カサゴ腎臓より ISOGEN II を用いて total RNA を抽出した。すなわち、細切したカサゴ腎臓 80 mg に ISOGEN II を 800 μ l および D.W. を 320 μ l 添加し、激しく 15 秒間混合後、室温で 10 分間放置した。その後、遠心分離 (12,000 \times g、4 $^{\circ}$ C、15 min) し、上清 800 μ l をエッペンドルフチューブに移し、等量のイソプロパノールを添加後、室温で 10 分間放置した。さらに、遠心分離 (12,000 \times g、4 $^{\circ}$ C、10 min) し、沈殿した RNA を 70% エタノールにより洗浄し回収した。回収した total RNA は 50 μ l の D.W. で溶解した。

2) mRNA 精製

total RNA より mRNA を精製した。本操作は、total RNA に含まれる mRNA の含有割合が低いため、total RNA より mRNA を精製し、cDNA 合成時のテンプレート量を増やすために行った。すなわち、抽出した total RNA に 2 \times Binding Buffer および *OligotexTM-dT30<Super>* を添加し、70 $^{\circ}$ C で 3 分間放置して RNA を変性させた。その後、室温で 10 分間放置して *OligotexTM-dT30<Super>* 中の Latex 粒子に mRNA を結合させた。次に、遠心分離 (20,000 \times g、4 $^{\circ}$ C、5 min) して上清を除去した後、沈殿を Wash Buffer で洗浄し、スピンカラムに添加した。軽く遠心分離し、Buffer を除去した後、70 $^{\circ}$ C の D.W. を 50 μ l 添加し、遠心分離 (20,000 \times g、4 $^{\circ}$ C、30 sec) により mRNA 溶液を得た。

3) cDNA 合成

cDNA 合成において、複雑な構造の mRNA を鋳型にした際、逆転写酵素が非特異的に結合することにより cDNA 合成阻害が生ずる場合がある。そのため、本章では“2.2.3.2) cDNA 合成”で記載した Reverse transcriptase M-MLV を用いた cDNA 合成方法に加え、PCR で増幅が困難な場合はその阻害要因を極力抑えた Primescript II Reverse Transcriptase を用いた方法も実施した。すなわち、PCR チューブに total RNA 1 μ g を含

む 5 μ l 以下に調整した溶液および Oligo (dT) primer を添加し、サーマルサイクラーにて 65°C で 5 分間、4°C で 3 分間の処理を行った。そこに、5×PrimeScript Buffer 4 μ l、RNase Inhibitor 20 units、PrimeScript Reverse Transcriptase 100 units を添加し、よく混合した。その後サーマルサイクラーにて 42°C で 60 分間、70°C で 15 分間、3 分間の処理を行った。得られた溶液を cDNA 溶液とした。

4) 内部配列増幅

内部配列増幅には AFCase-1 および AFCase-2 に属さない魚類キチナーゼの保存アミノ酸配列 (Fig. 8) よりプライマーを設計して用いた (Table 3)。

Table 3. Primers used in this study.

Primer name	Sequence (5'-3')	Length	Usage
Oligo dT	CTGTGAATGCTGCGACTACGATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT	40 mer	cDNA synthesis
Chi3 F1 (F)	TGYTAYTTYACNAAAYTGG	19 mer	Conserved region PCR
Chi3 F2 (F)	GAYATHGAYTGGGARTAYCC	19 mer	
Chi3 R (R)	TTCCARTARTTCAATNGCRTARTC	23 mer	
3'RACE (R)	CTGTGAATGCGACTACGAT	19 mer	3' RACE PCR
Chi3 3' F1 (F)	AAGAGGAAAGTCTCTGGAGG	20 mer	
Chi3 3' F2 (F)	GCTGAGGGAACACAGCAACTGG	20 mer	
Chi3 5' R1 (R)	GCAGCGGAGACCAATTAATC	19 mer	5' RACE PCR
Chi3 5' R2 (R)	CCAGTTGCTGTCCCTCA	18 mer	
Chi3 5' F1 (F)	AGGAACCAATTGATGCTGGTT	20 mer	
Chi3 5' F2 (F)	TGGCAAAGTACCTGGACTT	19 mer	
Chi3 5' F3 (F)	CGTGATGACGTATGACTTTCATG	23 mer	
Chi3 5' P	GTGATGTCTGTCAACGCT	18 mer	
Chi3 full F (F)	GACATGACAAGAGACCATCCAA	22 mer	Full length amplification
Chi3 full R (R)	ACAGAGCAATTTCAAACAGAGGG	22 mer	
SmChi-1 ex (F)	ACTAGCGTGATCAAGTTCC	19 mer	Organ expression
SmChi-1 ex (R)	ACAGCTCCAATCGCGGA	17 mer	
SmChi-2 ex (F)	CTCAGTCATTTAATTCCTGA	20 mer	
SmChi-2 ex (R)	CCTGGCCAAAGCTTGGGAAT	19 mer	
SmChi-3 ex (F)	CAGTCTTGTCAACCTAC	19 mer	
SmChi-3 ex (R)	GGTACTTTGCCATCTCTGC	19 mer	

5) 5'RACE

5'側の未知領域を解析するため、cDNA を環状化して PCR を実施した。cDNA の環状化には 5'-Full RACE Core Set を用いた。すなわち、total RNA 1 µg を含む 5 µl 以下に調整した溶液に、10×RT Buffer 1.5 µl、RNase Inhibitor (40U/µl) 0.5 µl、AMV Reverse Transcriptase XL (5U/µl) 1 µl、5'末端リン酸化 RT-プライマー (200 pmol/µl) 1 µl を添加し、サーマルサイクラーで 30°C で 10 分間、50°C で 60 分間、80°C で 2 分間、4°C で 5 分間反応させ cDNA を合成した。次に、得られた cDNA 溶液 15 µl に 5×Hybrid RNA Degradation Buffer、RNase H 1 µl を添加し、サーマルサイクラーで 30°C で 60 分間反応させた後、エタノール沈殿を行い Hybrid RNA を分解した。次に、エタノール沈殿により回収した 1 本鎖 cDNA に 5×RNA (ssDNA) Ligation Buffer 8 µl、40% PEG #6000 20 µl を添加し、T4 RNA Ligase 1 µl 添加し、15°C で 1 夜反応させ 1 本鎖 cDNA の環状化を行った。

PCR は、Go Taq Green Master Mix を用いて行った。Go Taq Green Master Mix は、テンプレート、プライマーおよび D. W. を添加するだけで PCR 用の反応液が完成し、増幅効率も良いため使用した。すなわち、PCR チューブに 2×Go Taq Green Master Mix 12.5 µl、フォワードプライマー (最終濃度 1 µM)、リバープライマー (最終濃度 1 µM)、cDNA 溶液を添加し、95°C で 2 分間、55°C で 30 秒間、72°C で 1 分間を 30 サイクル、72°C で 5 分間反応させた。

6) 全長増幅

全長増幅には PrimeSTAR Max DNA polymerase を用いて行った。PrimeSTAR Max DNA polymerase は高い正確性を有し、PCR のための時間も従来の酵素の半分程度で済むことより、カサゴ *SmChi-3* 全長の増幅に使用した。すなわち、PCR チューブに、2×PrimeSTAR Max Premix 25 µl、フォワードプライマー (最終濃度 1 µM)、リバープライマー (最終濃度 1 µM)、cDNA 溶液 1 µl を添加し、98°C で 10 秒間、55°C で 5 秒間、72°C で 5 秒間を 30 サイクル実施した。

3. 2. 3. カサゴ体内における *SmChi-1*, *SmChi-2*, *SmChi-3* の発現解析

発現解析は、“3. 2. 3. マサバ、シログチ体内における 2 種キチナーゼの体内分布” に記載した手法で行った。すなわち、ISOGEN II を用いて total RNA を抽出し、Primescript II Reverse Transcriptase を用いて cDNA を合成した。また、PCR は Go Taq Green Master Mix を用い、アガロースゲル電気泳動でバンドを確認した。本章で使用したプライマーの詳細は Table 3 に記載した。

3. 2. 4. *SmChi-1*, *SmChi-2*, *SmChi-3* の立体構造予測

SmChi-1, *SmChi-2*, *SmChi-3* の予測立体構造モデルは、SWISS-MODEL (swissmodel.expasy.org) に *SmChi-1*, *SmChi-2*, *SmChi-3* の演繹アミノ酸配列を入力し Protein Data Bank: PDB を参照して作成した。

3. 2. 5. アイナメ、マサバ、イサキ、シログチ腎臓キチナーゼの cDNA クローニング

アイナメ、マサバ、イサキ、シログチ腎臓キチナーゼの cDNA クローニングは “3. 2. 2. カサゴ腎臓キチナーゼの cDNA クローニング” に記載した手法で行った。すなわち、ISOGEN II を用いて total RNA を抽出し、Primescript II Reverse Transcriptase を用いて cDNA を合成した。また、内部配列増幅は Go Taq Green Master Mix を用い、アガロースゲル電気泳動でバンドを確認した。

3. 2. 6. 系統樹解析

系統樹解析は“2. 3. 4. 系統樹解析”に従い行った。

3.3. 結果

3.3.1.10 魚種におけるキチン分解酵素の体内分布

10 魚種におけるキチン分解酵素の体内分布を調査した結果、全ての魚種で胃や腸などの消化器官以外にもキチナーゼ活性が検出された。また、10 魚種中 8 魚種の体内では胃で最も高い値が検出された。一方、イボダイ胃ではキチナーゼ活性は検出されなかったが、肝臓において pNp-(GlcNAc)_2 に対する分解能を示した。コチ腎臓では pNp-(GlcNAc)_2 および pNp-(GlcNAc)_3 に対するキチナーゼ活性が胃よりも高い値で検出された。また、Hex 活性は全ての魚種の体内で広く検出された (Fig. 9)。

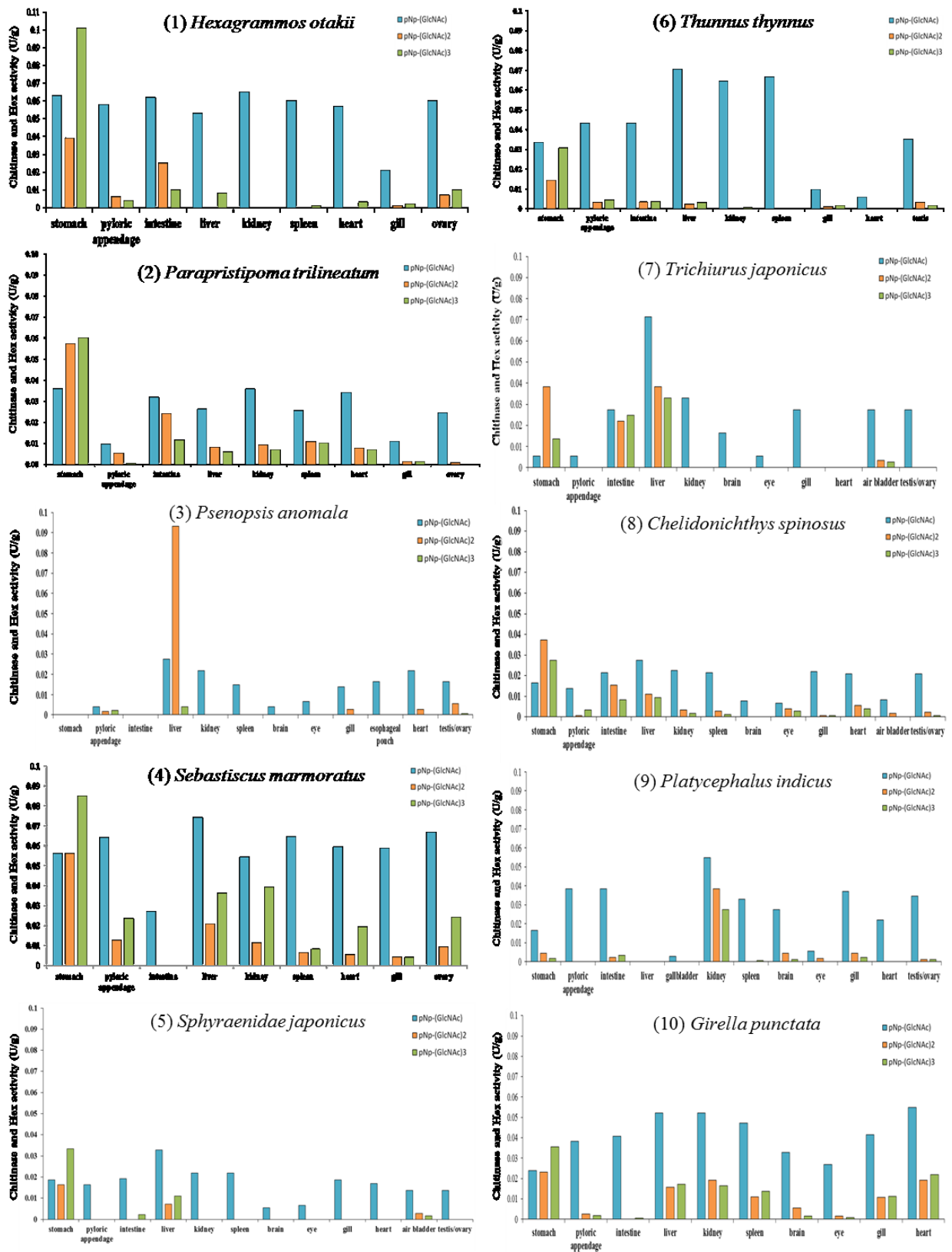


Fig. 9 The distribution of the chitinolytic activities in the body organs of ten fishes.

3.3.2. カサゴ腎臓キチナーゼの cDNA クローニング

カサゴ腎臓より新規キチナーゼ遺伝子の内部配列増幅の結果、約 350 bp のキチナーゼ遺伝子断片を得た。次に RACE 法によりキチナーゼ遺伝子上流域、下流域の増幅を試みた。その結果、得られたキチナーゼ遺伝子上流域に開始コドンが、また下流域に終止コドンが認められた。次に、カサゴ腎臓キチナーゼ全長遺伝子を PrimeSTAR Max DNA polymerase を用いて増幅した。その結果、1,440 bp の ORF を含む 1,618 bp の全長遺伝子 (*SmChi-3*) が得られた (Fig. 10)。また、*SmChi-3* の演繹アミノ酸配列のドメイン構造はこれまでに報告されている魚類胃キチナーゼのそれらと同様に N 末端より、シグナルペプチド、触媒ドメイン、リンカー領域、キチン結合ドメインにより構成され、触媒ドメインには GH ファミリー 18 キチナーゼの活性部位特有の配列 (DXDXE)¹¹⁾ が認められた。また、アミノ酸配列より計算した等電点は 5.87、分子量は 51257.63 Da であった。この全長遺伝子配列は DDBJ にてアクセッション番号 (*SmChi-3*: LC077733) を取得した。

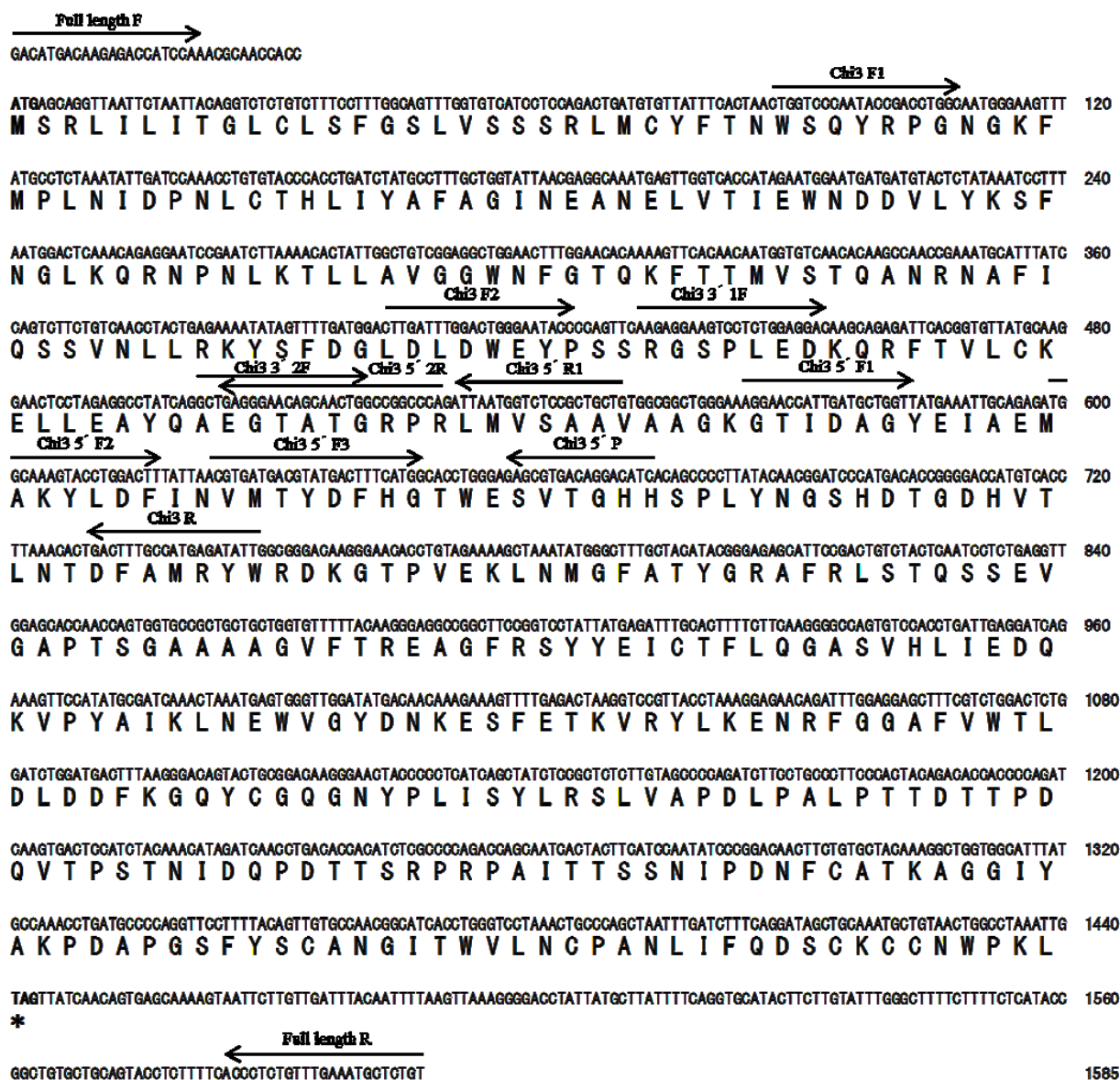


Fig. 10 Deduced amino acid sequences and bases for *SmChi-3*. DDBJ accession No. LC077733. The primers position was shown by arrows in the figure.

3.3.3. カサゴ体内における *SmChi-1*, *SmChi-2*, *SmChi-3* の発現解析

カサゴ3種キチナーゼの器官発現解析の結果、*SmChi-1* は胃、幽門垂、卵、心臓に、*SmChi-2* は胃、心臓に、*SmChi-3* は肝臓、腎臓に発現が認められた (Fig. 11)。カサゴの胃ではシログチと同様に AFCase-1, AFCase-2 に相当する *SmChi-1*, *SmChi-2* の両遺伝子が強く発現していた。また、*SmChi-1* が卵巣と心臓に、*SmChi-2* が心臓にも発現が認められた。

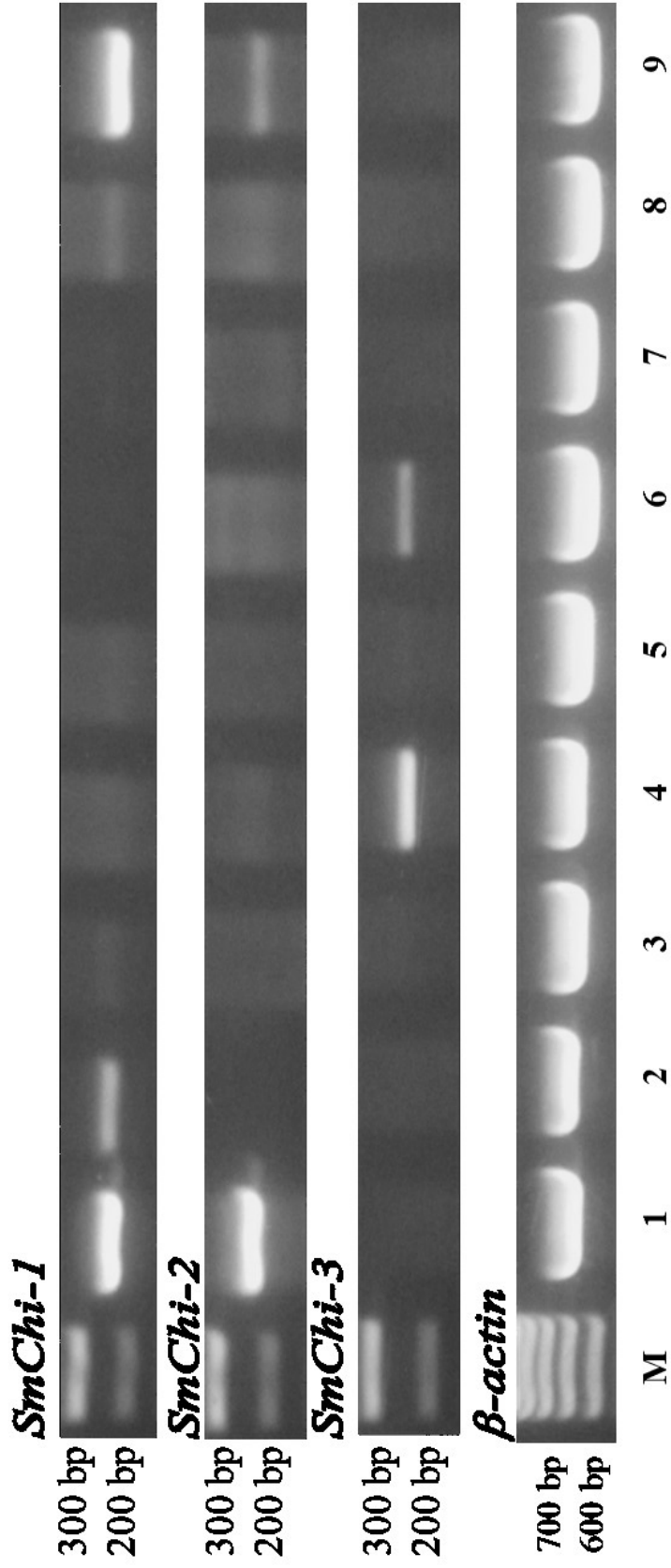


Fig. 11 Chitinase and β -actin expressions in various tissues (M, marker; 1, stomach; 2, pyloric appendage; 3, intestine; 4, liver; 5, spleen; 6, kidney; 7, swim bladder; 8, ovaries; 9, heart).

3.3.4. *SmChi-1*, *SmChi-2*, *SmChi-3* の立体構造予測

SmChi-1, *SmChi-2*, *SmChi-3* の立体構造予測の結果、*SmChi-1* の触媒ドメインは 70.8% 一致する“The acidic mammalian chitinase catalytic domain in complex with methylallosamidin” およびキチン結合ドメインは 22% 一致する“NMR solution structure of chitin-binding domain from dust XII allergen BLO T 12”でモデリングされた。*SmChi-2* の触媒ドメインは 63.4% 一致する“The acidic mammalian chitinase catalytic domain in complex with methylallosamidin” およびキチン結合ドメインは 22.5% 一致する“NMR solution structure of chitin-binding domain from dust XII allergen BLO T 12”でモデリングされた。*SmChi-3* の触媒ドメインは 57.1% 一致する“Acidic mammalian chitinase catalytic domain experiment” およびキチン結合ドメインは 25.5% 一致する“Solution structure of tachycitin, an antimicrobial protein with chitin-binding function”でモデリングされた。

3 種とも GH 18 活性ドメインおよびキチン結合ドメインを有するマルチドメイン構造を示し、典型的なファミリー 18 キチナーゼにみられる基質クレフトや TIM バレル構造がみられた⁴⁴⁾ (Fig. 12)。

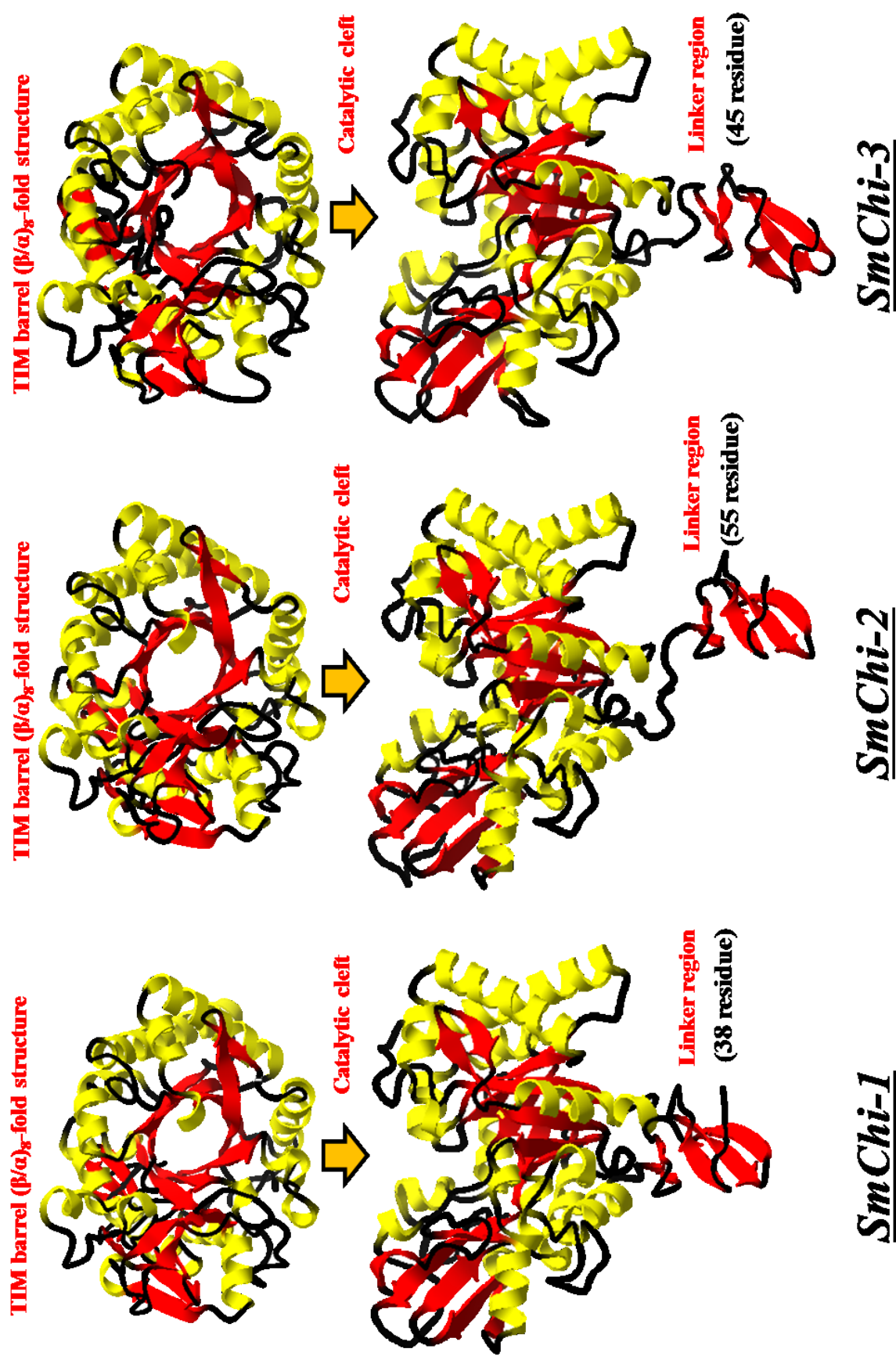


Fig. 12 3D structure prediction models of *SmChi-1*, *SmChi-2*, and *SmChi-3*.

3.3.5. アイナメ、マサバ、イサキ、シログチ腎臓キチナーゼの

cDNA クローニング

AFCase-1, AFCase-2 に属さないキチナーゼ遺伝子より設計した縮重プライマーを用いて、アイナメ、マサバ、イサキ、シログチの腎臓よりキチナーゼ 3 に相当する遺伝子の増幅を試みた。その結果、キチナーゼ 3 に相当する約 350 bp の遺伝子断片をアイナメ (*HoChi-3*)、マサバ (*SjChi-3*)、イサキ (*PtChi-3*)、シログチ (*PaChi-3*) より得た。また、増幅個所の模式図および演繹アミノ酸配列は Fig. 13 に記した。

3.3.6. 系統樹解析

SmChi-3, *HoChi-3*, *SjChi-3*, *PtChi-3*, *PaChi-3* の演繹アミノ酸配列を含めて系統樹解析を行った結果、キチナーゼ 3 遺伝子はこれまでの AFCase-1 および AFCase-2 には属さなかった (Fig. 14)。

No.	Scientific name	Information	Accession No.
1	<i>Serratia marcescens</i>	Bacteria chitinase	X03657
2	<i>Morone saxatilis</i>	Gastric	EU048546
3	<i>Paralichthys olivaceus</i>	Stomach, <i>/Chi1</i>	AB121732
4	<i>Gallus gallus</i>	Grandular stomach	AB071038
5	<i>Xenopus siturana tropicalis</i>	Whole body	BC090382
6	<i>Macaca fascicularis</i>	AMCase	FJ685619
7	<i>Homo sapiens</i>	Stomach, Lung	AF290004
8	<i>Homo sapiens</i>	Chitotriosidase	U29615
9	<i>Paralichthys olivaceus</i>	Stomach, <i>/Chi2</i>	AB121733
10	<i>Mus musculus</i>	Stomach, AMCase	EF094027
11	<i>Rattus norvegicus</i>	Stomach, AMCase	AY486074
12	<i>Bufo japonicus</i>	Toad pancreatic chitinase	AJ345054
13	<i>Equus caballus</i>	Chitotriosidase	EF694759
14	<i>Lethenteron japonicum</i>	Liver	EU741679
15	<i>Paraprisipoma trilineatum</i>	Stomach, <i>PtChi-1</i>	AB642677
16	<i>Paraprisipoma trilineatum</i>	Stomach, <i>PtChi-2</i>	AB642678
17	<i>Mus musculus</i>	Tongue, Chitotriosidase	AY458654
18	<i>Rattus norvegicus</i>	Spleen, Chitotriosidase	DQ286232
19	<i>Latimeria chalumnae</i>	Stomach	AB704869
20	<i>Pagrus major</i>	Hepatopancreas, Chi2	AB678430
21	<i>Saimiri boliviensis boliviensis</i>	AMCase	XM003933450
22	<i>Sarcophilus harrisi</i>	AMCase	XM003769766
23	<i>Paralichthys olivaceus</i>	Pancreas, Chi3	AB121734
24	<i>Thunnus orientalis</i>	whole body	AB678426
25	<i>Takifugu rubripes</i>	AMCase like	XP_003963551
26	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	myeloid cell	ACG58868
27	<i>Epinephelus coioides</i>	Chi1	FJ169895
28	<i>Epinephelus coioides</i>	Chi2	FJ169894
29	<i>Pennahia argentata</i>	Stomach, <i>PaChi2</i>	AB605775
30	<i>Sebastiscus marmoratus</i>	Stomach, <i>SmChi1</i>	AB686658
31	<i>Sebastiscus marmoratus</i>	Stomach, <i>SmChi2</i>	AB686659
32	<i>Pennahia argentata</i>	Stomach, <i>PaChi1</i>	AB605774

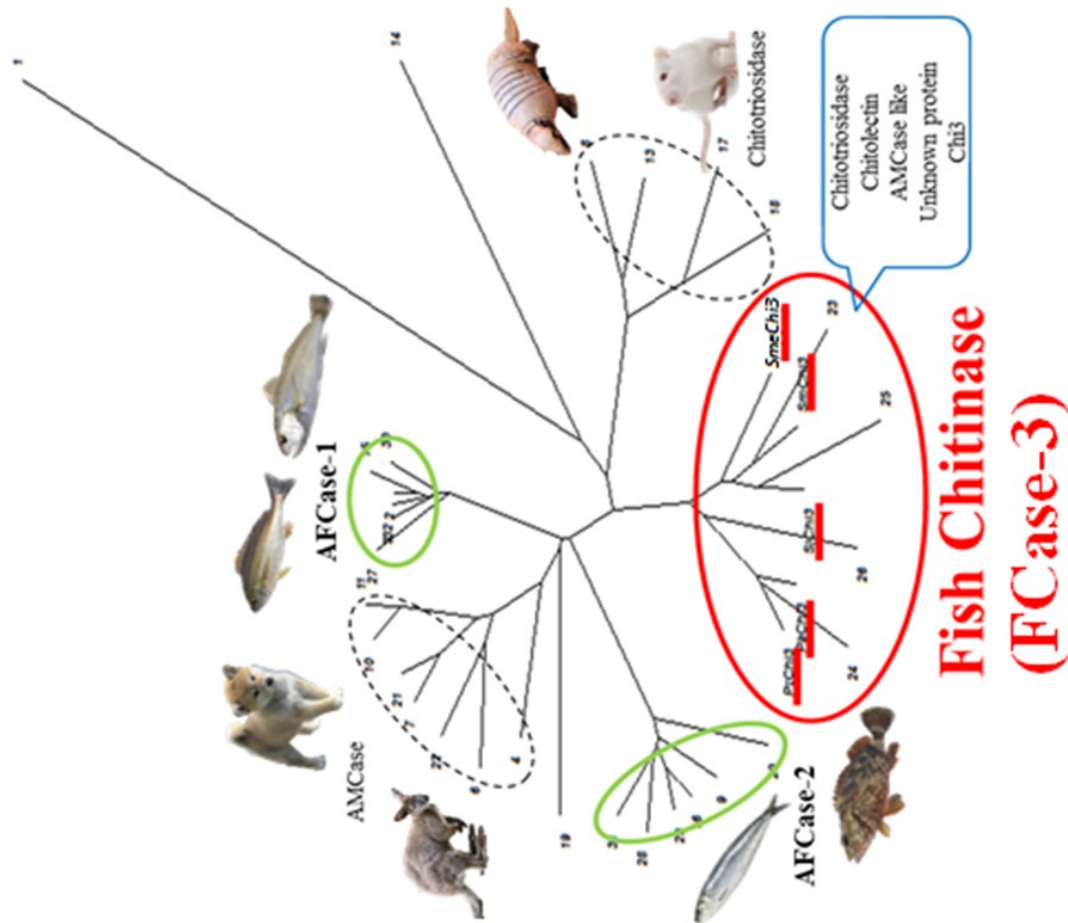


Fig. 14 Phylogenetic tree for chitinase amino acid sequences using the neighbor joining method in the clustalW program. A bacterial chitinase, *Serratia marcescens* chitinase, was used as an outgroup.

3.4. 考察

3.4.1.10 魚種におけるキチン分解酵素の体内分布

本研究で生息域や食性の異なる 10 魚種を試料としてキチン分解酵素の体内分布を測定した結果、10 魚種中 7 魚種で胃に最も高いキチナーゼ活性が検出された。“2. 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”でもマサバ、シログチで同様の結果を得ていることより、条鰭類においてキチナーゼは主に胃に高活性で分布し、その主な役割は餌料中のキチン質の消化であると考えられた。この結果は既報^{20,24,34)}と一致するものである。一方、マサバ、シログチのみならず本章で実施した 10 魚種においても全ての魚種で消化器官以外にもキチナーゼ活性が広く分布することを初めて明らかにした。すなわち、条鰭類には消化器官以外にキチナーゼが広く分布していると考えられる。

個々の魚種について考察すると、カサゴには胃に 3 種類のキチナーゼアイソザイム (SmChiA: 46 kDa, SmChiB: 52 kDa, SmChiC: 56 kDa) および 2 種類のキチナーゼ遺伝子 (*SmChi-1*, *SmChi-2*) が存在し、*SmChi-1* が SmChiA および SmChiB を、*SmChi-2* が SmChiC をコードする遺伝子であることが当研究室の池田ら³¹⁾により報告されている。また、pNp-(GlcNAc)₂ および pNp-(GlcNAc)₃ に対する比活性は、SmChiA では 1.40 U/mg、0.416 U/mg、SmChiB では 0.771 U/mg、0.44 U/mg、SmChiC では 0.0789 U/mg、0.299 U/mg を示すことが明らかにされている。さらに、*SmChi-1* がコードする SmChiB の C 末端側がプロセッシングを受けることにより SmChiA が生じ、それにより pNp-(GlcNAc)₂ に対する比活性が約 2 倍に上昇することが報告されている。本研究結果のカサゴにおいて、キチナーゼ活性の検出されたほとんどの器官で pNp-(GlcNAc)₂ よりも pNp-(GlcNAc)₃ に対しての活性が高かったことより、SmChiA および SmChiB に類似した基質特異性を示す酵素が体内で働いている可能性が示唆された。

イボダイの胃にはキチナーゼおよび Hex 活性が検出されず、肝臓において高い両活

性が検出された。イボダイの仲間は、食道後方に“食道のう”と呼ばれる袋状の器官を有しており、主に食道のうにおいて餌料を細かくして消化器官に送る構造を有するため、胃には活性が検出されなかった可能性が考えられた。また、肝臓において検出された pNp-(GlcNAc)₂ 分解活性は、肝臓においてキチナーゼを含んだ胆液を作り、腸において主に餌料を消化しているのではないかと考えられた。また、コチにおいて、造血や老廃物の代謝に関与する腎臓で pNp-(GlcNAc)₂ に対し 0.037 U/g、pNp-(GlcNAc)₃ に対し 0.027 U/g と高いキチナーゼ活性が検出された。

本研究結果より、魚種によりキチナーゼ活性が検出される部位やその活性値も異なるが、条鰭類では消化器官に分布するキチナーゼは餌料中のキチン質の消化の役割を、他の器官に広く分布するキチナーゼはそれとは異なる役割を果たす可能性が示唆された。

3.4.2. カサゴ腎臓キチナーゼの cDNA クローニングおよび体内における *SmChi-1*, *SmChi-2*, *SmChi-3* の発現解析

1) カサゴ腎臓キチナーゼの cDNA クローニング

カサゴ腎臓より *SmChi-3* が得られ、*SmChi-3* を NCBI BLAST を用いて解析したところ、ヒラメの fChi3³⁰⁾ と 82%の相同性を示すことが明らかになった。また、既報³¹⁾の *SmChi-1*, *SmChi-2* を含めた演繹アミノ酸配列を Clustalw で比較した結果、ドメイン構造は一致し、*SmChi-1*, *SmChi-2* ではリンカー領域にセリン、グリシンの反復配列がみられた。一方、*SmChi-3* ではセリン、グリシンの反復配列がみられなかった (Fig. 15)。これは、黒川らのヒラメ 3 種キチナーゼの演繹アミノ酸配列の比較³⁰⁾ に類似した。ヒトでは¹⁵⁾、胃で消化に関与するキチナーゼ (Acidic Mammalian Chitinase: AMCCase) はリンカー領域におけるセリン、グリシンの反復配列がみられるのに対して、血中のマクロファージが産生し生体防御に関連すると考えられている Chitotriosidase¹⁶⁾ においてはそれがみられない。これより、*SmChi-3* も fChi3³⁰⁾ と同様にヒトの Chitotriosidase^{15,16)} に

役割が類似し、生体防御に関連する可能性が示唆された。

2) カサゴ体内における *SmChi-1*, *SmChi-2*, *SmChi-3* の発現解析

カサゴの胃ではシログチと同様に AFCase-1, AFCase-2 に相当する *SmChi-1*, *SmChi-2* の両遺伝子が強く発現しており、シログチ同様^{28, 29)} にキチン質を含む多様な餌料の消化に対応するためであると考えられた。また、*SmChi-1* が卵巣と心臓に、*SmChi-2* が心臓にも発現がみられたことから、両遺伝子は消化だけでなく真菌類¹⁾ や寄生虫¹⁾ などから卵や自身を守る生体防御などの役割を果たしていることが推察された (Fig. 11)。

本研究結果より、キチナーゼ活性が検出された肝臓、腎臓では *SmChi-3* のみ発現がみられた。肝臓は胆汁の生産、栄養備蓄、解毒などを行う器官である^{45, 46)}。一方、腎臓は塩分や老廃物を排出する器官である^{45, 46)}。これらのことより *SmChi-3* は生体防御や代謝などにも関与する可能性が示唆された。近年、条鰭類にもキチン合成酵素遺伝子が存在することが報告されたことより⁵⁰⁾、*SmChi-3* が魚体内で合成されるキチン質の代謝に関与している可能性が考えられる。さらに、*SmChi-1*, *SmChi-2*, *SmChi-3* が発現していない脾臓、鰹においてもキチナーゼ活性が検出されたことより 3 種キチナーゼ以外の新たなキチナーゼの存在が示唆された。

3) *SmChi-1*, *SmChi-2*, *SmChi-3* の立体構造予測

SmChi-1, *SmChi-2*, *SmChi-3* の立体構造予測の結果、3 種とも GH 18 活性ドメインおよびキチン結合ドメインを有するマルチドメイン構造を示し、典型的なファミリー 18 キチナーゼにみられる基質クレフトや TIM バレル構造がみられた⁴⁴⁾ (Fig. 12)。また、リンカー領域の長さが *SmChi-1* では 38 残基、*SmChi-2* では 55 残基、*SmChi-3* では 45 残基とそれぞれわずかな差異がみられた。

3.4.3. アイナメ、マサバ、イサキ、シログチ腎臓キチナーゼの cDNA

クローニングおよび系統樹解析

本研究結果より、条鰭類に分類される魚類の腎臓には本研究で試料とした 5 魚種全て

で検出したキチナーゼ 3 に相当するキチナーゼ遺伝子が広く分布する可能性が示唆された。また、系統樹解析によりデータベース上で魚類の Chitotriosidase、Acidic Mammalian Chitinase-like、キトレクチン、Chi3 などの様々な名称で登録されている遺伝子も含めて魚類の新規キチナーゼのグループを形成することが明らかになった (Fig. 14)。

また、これらキチナーゼ 3 の遺伝子がコードするキチナーゼアイソザイムの精製の報告はなく、性状が明らかにされていない。そのため、数魚種の腎臓を用いてキチナーゼアイソザイムの精製を試みたが失活しやすく不安定なため困難であった。現時点で性状は不明であるが系統樹解析により明らかになった新たな魚類独自のキチナーゼグループを魚類キチナーゼ 3 (Fish Chitinase-3: FCCase-3) と命名した。

3.5. 小括

食性や生息域の異なる 10 種条鰭類におけるキチナーゼ活性測定により、本研究で利用した条鰭類は胃以外にもキチナーゼを有していることを明らかにした (Fig. 2, 9)。また、条鰭類は種によりキチナーゼ活性が検出される器官などが異なり、消化以外にも生体防御などの役割を果たしている事が示唆された。

カサゴ腎臓より、新規キチナーゼの cDNA クローニングを試みたところ *SmChi-3* を得ることができた。また、*SmChi-1*, *SmChi-2*, *SmChi-3* の演繹アミノ酸配列を比較した結果、*SmChi-1* および *SmChi-2* はリンカー領域にセリン、グリシンの反復配列を持つヒトの胃のキチナーゼ AMCase に類似し^{15, 16, 30)}、*SmChi-3* にはリンカー領域にセリン、グリシンの反復がみられずヒトの Chitotriosidase に類似していることが明らかになった^{15, 16, 30)}。

SmChi-1, *SmChi-2*, *SmChi-3* の各器官における発現解析により、*SmChi-1* は胃や幽門垂といった消化器官以外にも卵や心臓に、*SmChi-2* は胃および心臓に発現がみられたことより、両酵素は消化だけでなく真菌類¹⁾ や寄生虫¹⁾ などから卵や自身を守る生体防御などの役割を果たしていることが示唆された。また、肝臓や腎臓に発現がみられた *SmChi-3* の主な役割は異物の分解や老廃物の排出などに関与する生体防御である可能性が示唆された。また、*SmChi-1*, *SmChi-2*, *SmChi-3* は黒川らのヒラメ 3 種キチナーゼの報告³⁰⁾ に類似し、

SmChi-1, *SmChi-2* はこれまでの魚類胃キチナーゼ^{31,32,34)} に、*SmChi-3* はヒトの Chitotriosidase に構造に近いことが明らかになった。また立体構造予測により、3 種とも GH 18 活性ドメインおよびキチン結合ドメインを有するマルチドメイン構造を示し、典型的なファミリー18 キチナーゼにみられる基質クレフトや TIM バレル構造がみられた⁴⁴⁾。また、リンカー領域の長さがそれぞれ 10 残基程異なることが明らかになった (Fig. 15)。

さらに、食性や生息域の異なる条鰭類でも *SmChi-3* に相当する遺伝子を持つのかを PCR を用いて調査した結果、アイナメ、マサバ、イサキ、シログチの 4 種で約 350 bp の遺伝子断片を得ることができた。この結果より、食性や生息域が異なっても条鰭類はこの 3 番目のキチナーゼを腎臓に持つことが示唆された。

4. 肉鰭類におけるキチナーゼの分布・種類および構造

4.1. 序論

魚類の胃に存在するキチナーゼに関しては、魚種により 1~3 種類のタンパク質とそれらをコードする 1~2 種類の遺伝子の存在が報告されている¹⁷⁻³⁵⁾。その中で現在の地球上で最も繁栄している比較的研究報告の多い条鰭類の胃では、キチナーゼ遺伝子は演繹アミノ酸配列に基づく系統樹解析より、2 種類の AFCase-1, AFCase-2 のグループに分類されることが報告されている^{31, 32, 34)}。一方、軟骨魚類ではヨシキリザメ胃より 1 種類のキチナーゼ遺伝子が報告されている³³⁾。また、生物の進化の分類について、生きた化石と呼ばれるシーラカンスの全ゲノムを研究した報告⁵¹⁾より、これまでシーラカンスが四肢動物に最も近いとされてきたが、ハイギョが一番近いことが証明されている⁵¹⁾。さらに、松宮らが肉鰭類であるシーラカンス胃より 46 kDa のキチナーゼを精製し、その性状について報告している^{21, 22)}。しかし、その遺伝子は未だ明らかになっていない。そこで本論文ではシーラカンス胃よりキチナーゼ cDNA のクローニングを行った。また、前章で報告した条鰭類と同様に半定量 PCR を用いた器官発現解析により、いずれの器官で発現しているかを明らかにしようとした。

さらに、同じ肉鰭類に分類され四肢動物に最も近いとされているハイギョの各器官を用いてキチン分解酵素の体内分布を測定し、条鰭類との差異を比較した。また、活性のみられた器官を用いてキチン分解酵素の至適 pH を調べた。次に、高い活性のみられたハイギョ食道キチナーゼの性状を明らかにするため精製を試みたが、酸性域の pH で失活しやすく精製が困難であった。そのため、ハイギョ食道よりキチナーゼの cDNA クローニングを実施し、各器官の発現解析を行った。また、これまでの魚類キチナーゼを含めて系統樹解析を行い、進化の過程も含めて様々な生物キチナーゼとの比較検討を行った。

4.2. 実験方法

4.2.1. シーラカンス胃キチナーゼの cDNA クローニング

シーラカンス胃を試料とし“2.2.3.1) total RNA 抽出”に従い total RNA を抽出した。また、ゲノム DNA を除去するため DNase 処理を行った。すなわち、total RNA 溶液 8 μ l、RQ1 RNase-Free DNase 10 \times Reaction Buffer 1 μ l、RQ1 RNase-Free DNase 1 U を混合し、37 $^{\circ}$ C で 30 分間保持した後、RQ1 DNase Stop Solution 1 μ l 添加し、65 $^{\circ}$ C に 10 分間保持しゲノム DNA を分解した。cDNA 合成は“2.2.3.2) cDNA 合成”に従い cDNA を合成した。また、PCR は“2.2.3.3) PCR”に従った。プライマー設計箇所の模式図は Fig. 16 に、その詳細は Table 4 に記載した。

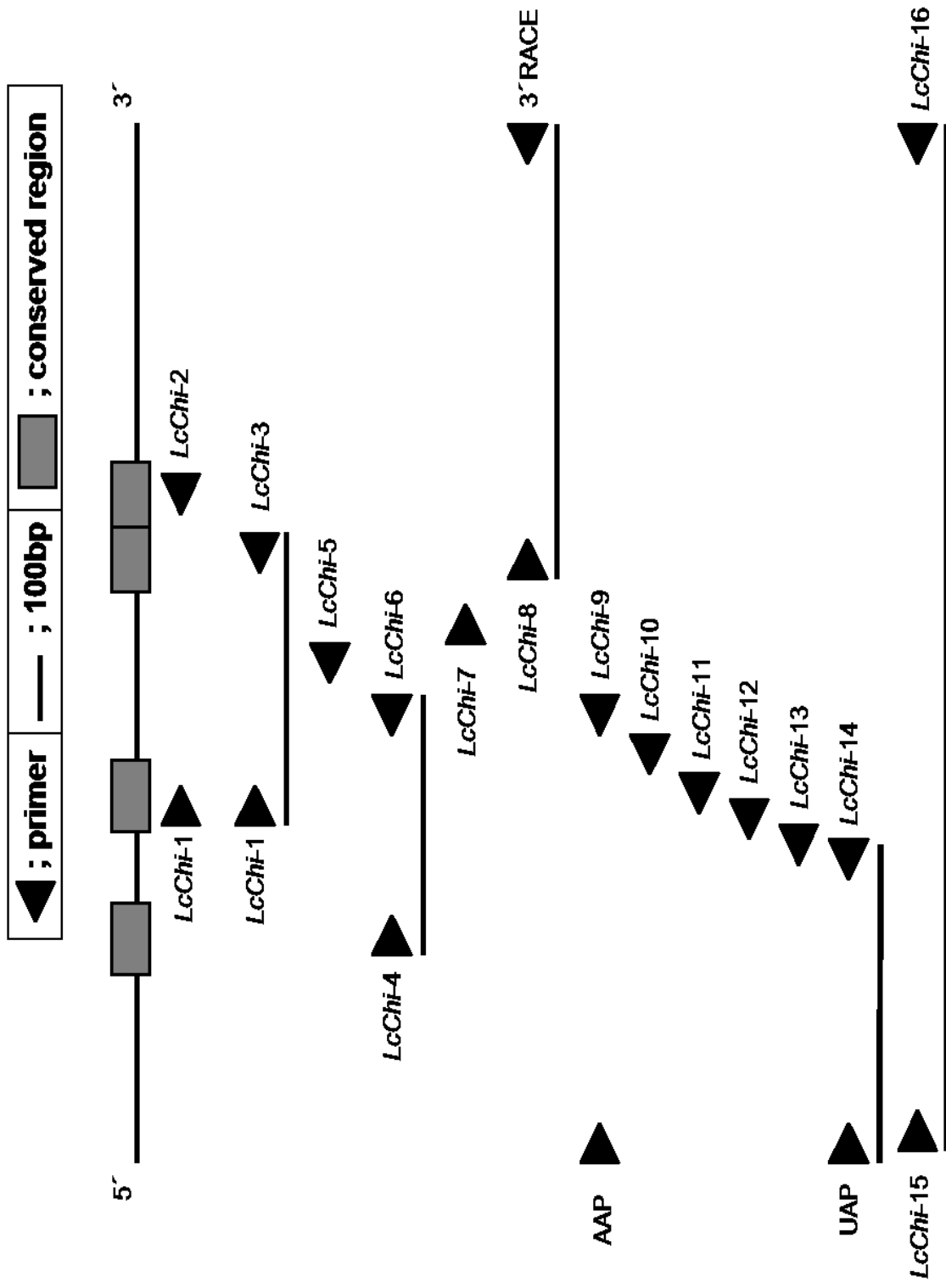


Fig. 16 The position of the primers used in this study.

Table 4. Primers used in this study.

Primer name	Sequence (5' - 3')	Length	Usage
Oligo dT	CTGTGAATGCTGCGACTACGATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT	40mer	
<i>LcChi-1</i>	ATGACNTAYGAYTTYCA YGG	20mer	Conserved region PCR
<i>LcChi-2</i>	CCANACCAATNGCNCCNCCRAA	21mer	
<i>LcChi-3</i>	TANBKNCCYTWNYR CARAANGTNCC	26mer	
<i>LcChi-4</i>	GAYATHGAYTGGGARTAYCC	20mer	
<i>LcChi-5</i>	GGTTGGGCACCAACGCCAATTGTT	24mer	
<i>LcChi-6</i>	TGGGGCACCACTGTTCTTCCAGA	23mer	
<i>LcChi-7</i>	AACAATGGCGTTGGTGCCCCCAACC	24mer	3' RACE PCR
<i>LcChi-8</i>	TGAGATCTGTACCTTCTTGAATG	21mer	
3' RACE AP	GGCCACGGCGGACAGTACTTTTTTTTTTTT	30mer	
3' RACE	GGCCACGGCTCGACTAGTAC	21mer	
<i>LcChi-9</i>	ACGAGGTCATAGGTCA TCACATC	24mer	5' RACE PCR
<i>LcChi-10</i>	TTAGCGATCTCAGCAACCTGGTAG	24mer	
<i>LcChi-11</i>	ATTTAGCAGAGGCCACAGCGGCTG	24mer	
<i>LcChi-12</i>	CTTGGTTTGTGCTGGACTGGGCT	23mer	
<i>LcChi-13</i>	CCTTTACGAAAGGCATCATGT	20mer	
<i>LcChi-14</i>	AGTGATTTCTTCTTTGGTCTGTGG	23mer	
AAP	GGCCACGGCTCGACTAGTACGGGIIIGGGIIIG	36mer	5' RACE Abridged anchor primer
UAP	CUACUACUACUAGGCCACGCGTCGACTAGTAC	32mer	Universal amplification primer
<i>LcChi-15</i>	TACAGAGGCAATCATGTTGAAGTTTGT	27mer	Full length amplification
<i>LcChi-16</i>	AACATGCAATAGATTTAATTTTATCGA	27mer	
<i>LcChi-17</i> (F)	TGACCTATGACCTCCGTGGGCCAT	24mer	Tissue expression PCR
<i>LcChi-18</i> (R)	CCACTTTTCAGTGGCGCCATTCAA	24mer	
β -actin-1 (F)	AGCCAACAGAGGAGGCTCTTA	21mer	
β -actin-2 (R)	GATTCCTAAGAGTGAATG	18mer	

4.2.2. シーラカンス体内における *LcChi* の発現解析

器官発現解析は“2.2.5. マサバ、シログチ体内における2種キチナーゼの器官発現解析”に従って行った。

4.2.3. ハイギョにおけるキチン分解酵素の体内分布および至適 pH の決定

ハイギョにおけるキチン分解酵素の体内分布は“2.2.1. キチン分解酵素の体内分布”に従った。また、至適 pH の決定は“2.2.2. キチン分解酵素活性の至適 pH の決定”に従って行った。

4.2.4. ハイギョ食道キチナーゼの cDNA クローニング

ハイギョ胃キチナーゼの cDNA クローニングは“3.2.2. カサゴ腎臓キチナーゼの cDNA クローニング”に従って行った。また、プライマー設計個所の模式図は Fig. 17 に、その詳細は Table 5 に記載した。

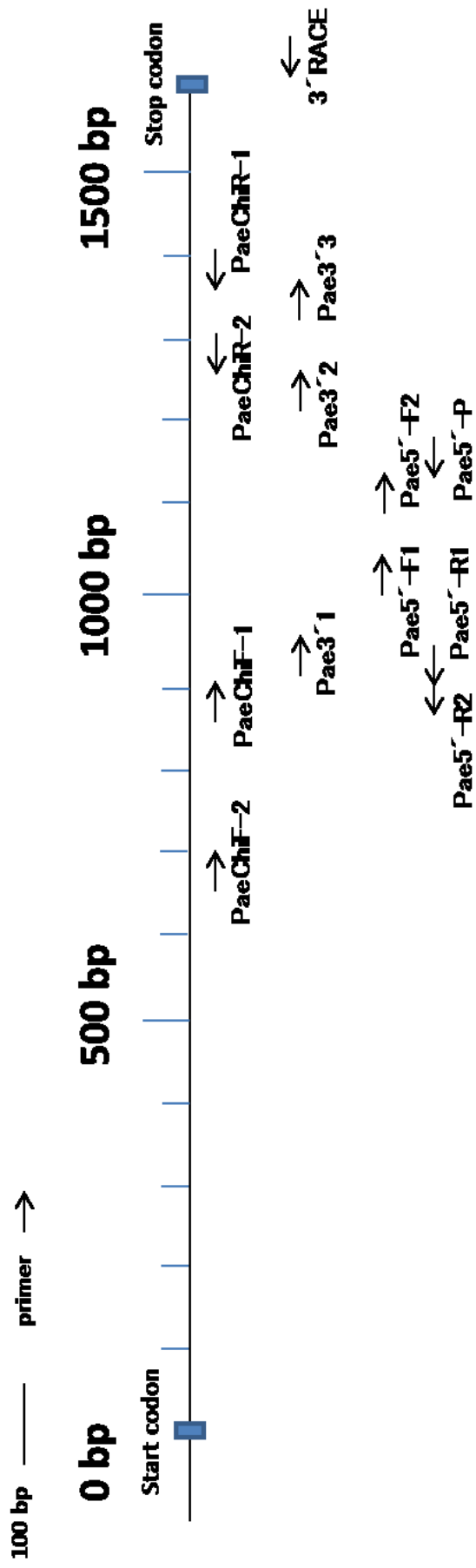


Fig. 17 The position of the primers used in this study.

Table 5. Primers used in this study.

Primer name	Sequence(5´-3´)	Length	Usage
PaeChiF-1	ATGACNTAYGAYTTYCAYGG	20mer	Conserved region PCR
PaeChiR-1	CCANACCATNGCNCNCRCRAA	21mer	
PaeChiR-2	TANBKNCCYTWNYRCARAANGTNCC	26mer	
PaeChiF-2	GAYATHGAYTGGGARTAYCC	20mer	
Pae3´1	CACAACAGCCCTCTCTATAGA	21mer	3´ RACE-PCR
Pae3´2	CTGCACATTTCTACAAGGAG	20mer	
Pae3´3	GAAGGAAAGGTGCAGTATC	19mer	
Pae5´-F1	GCTCATTATGGGAATACCAACC	22mer	5´ RACE-PCR
Pae5´-F2	GCAGCTGGACAATACACAA	19mer	
Pae5´-R1	GTCTCTCCAGTATTTTCATGGC	21mer	
Pae5´-R2	GTTGTGGCCTGTGAAGGTATC	21mer	
Pae5´-P	GTGCAGATCTCATAATAGGCCCC	22mer	

4.2.5. ハイギョ体内における *PaeChi* の発現解析

PaeChi の器官発現解析は“2.2.5. マサバ、シログチ体内における2種キチナーゼの器官発現解析”に従って行った。

4.2.6. 系統樹解析

系統樹解析は“2.2.4. 系統樹解析”に従って行った。

4.3. 結果

4.3.1. シーラカンス胃キチナーゼの cDNA クローニング

シーラカンス胃キチナーゼ遺伝子の内部配列の増幅を行った。その結果、450 bp の増幅断片を得ることができた。この塩基配列を NCBI BLAST を使用して解析した結果、哺乳類のポリビアリスザルキチナーゼ(AMCase)と75%、条鰭類のイサキ胃キチナーゼ1 (AFCCase-1)と66%の相同性を示した。これらの結果より、450 bp の増幅断片はシーラカンス胃キチナーゼの cDNA の一部であると考えられた。そこで、5'側と3'側の増幅を試みた結果、それぞれ481 bp と657 bp のシーラカンス胃キチナーゼ遺伝子の増幅断片を得ることができた。前者は5'側にアダプタープライマーに使用した配列と開始コドンを、後者は真核生物特有の poly-A 配列と終止コドンを含んでいた。シーラカンス胃キチナーゼの全長遺伝子を増幅した結果、1,581 bp の遺伝子 (*LcChi*: AB704869) を得ることができ、その配列は1,431 bp の ORF を含んでいた (Fig. 18)。

LcChi

TACAGAGGCAATC -1
ATGGTGAAGTTGTCCCTGACTGTTCTGGCCGTCCTGCTGCAACTGCAGCTAGGCTCCACCTTTAAACCTTGTTGGTATTTT CAGCAACTGGGGCCAGTACAGACCAGGAGCTGGGAAA 120
MVKFVLLTLVLA VLLQLQLQLGLGSTFKLV CYFSNWNWGGQYRPGAGK
TACTCCCTAGGAACATGGATCCCTGGCTGTACCCACATGATCTACGGCTTGGCTGGAAATGAAGAACAAATGAAATGGGATGATGGAACACTCTATGGGMAATTC 240
YFP T N I D P C L C T H M I Y A F A G M K N N E I T T I E W D D V K L Y G E F
AACGGCTTGAAGAGTCAGAACAGTGACCTGAAACCTGCTGTCTGTGGAGGCTGGAAGTTGGTACCCAGAAAGTTGAGTGGCTTCTCCTCAGAGCCGTCGAACATTTCATC 360
NGLK SQNSDLKTL LSVGGWKF GTQKFSAMV A SPQRSRTFI
CAGTCCGCCATTAAGTTCCCTGCTCAGTATGCATTTGATGGTCTGGATCTTGACTGGGAATACCCTGGCTCCAGAGGAAGCCCCACAGACCAAGAMGAMATACACTGTCTCCCTGCAG 480
QSAIKFLRQYAFDGLDL DWEYPGSRGSPPTK E E Y T V F L Q
GAAGCACATGATGCCTTGTAAAGGAGCCAGTCCAGCAACAACCMGGCTGCTTACAGCCGCTGTGGCTCTGCTAATCCATTCAGGTCGGCTACCAGGTTGCTGAGATC 600
E A H D A F V K E A Q S S N K P R L L T A A V A S A K S I I E V G Y Q V A E I
GCTAAGTACCTGGACTTATTGATGTGATGACCTATGACCTCCGTGGCCATGGGAACGTTT CACAGGAGAGAAATAGTCCCTCTCTATGGCGGGCCAGAGGACACCGGTGCTTACAATAC 720
A K Y L D F I D V M T Y D L R G P W E R F T G E N S P L Y A G P E D T G A Y K Y
TTCATGTGGACTACATGAAGTCTCGGAAGMACAGTGGTGGCCAGCTGAGAACCTCATGTTGGAA TGGCAACCTATGGACACACCTTCCGCCTCACCAACCCATCCAACAATGGC 840
F N V D Y I M N F W K N S G A P A E K L I V G M P T Y G H T F R L T N P S N N G
GTTGGTGGCCCAACCTGGCCCTGGCCAGCTGGACCTACACTAGACAGCGTGGATTGCTGGCTACTATGAGATCTGACTCTCTGAAATGGCGCCACTGAAAAGTGGAAATGCTGCC 960
V G A P T S G P G P A G P Y T R Q P G F L A Y E I C T F L N G A T E K W N A P
CAGGAAGCTCCTTATGCCCTACAAGGAAGAAATGGGTGGATATGACAACAAGAAAGATTCAGGTC AAGGCCCAGTGGTGGTGAAGAACAACTTCGGAGCCGCTATGGTTTGGACT 1080
Q E A P Y A Y K G N E W V G Y D N K K S I Q L K A Q W V V K N N F G G A M V W T
CTTGACCTGGATGACTTCTGACCAAGGCAATACCCTCTTATTACACAAATCCGGTCTGCTGGCATTCAGAGCCGCAAAATGGCAATCCAAAATGCTCCATTGGCT 1200
L D L D D F S G T F C N Q G K Y P L I N T I R S V L G I Q S A N C N P N A P L R
CCAAATTAGTGGTGGCGGTGGTGGCAGCAGTGGAGGCAACATCCCAAGCCGTGGCAGTGGATTCTGTGCTAGCAGAGCTAGCCGGCTGTACCCCACTC 1320
P I S G G G G S I P S G G S S S G G N I P S G S G F C A S R A S G L Y P V
CCAAACAACAAGAACCCAGTCTACCATGGCTGMAATGGAAAACCTACATCCAGCACCTGCCAGGCTGGACTGGTTCGATCCCAAGTGTAAAGTGGCAACTGGGCATGAAGCTAGATC 1440
P N N K N Q F Y H C L N G K T Y I Q H C Q A G L V F D P S C K C C N W A *
AGTGACAATAGAAAAAGAAACCAAGGAAGAATCATGGTATCTAAGTATCATGGTGAACCTACGGCTACATCGATAAAAATTAATATCTATTGCAATGTTAAAAAATAAAAAA 1560
AAAAAAA

Fig. 18 Deduced amino acid sequences and bases of *LcChi*. GenBank accession No. *LcChi*, AB704869.

4.3.2. シーラカンス体内における *LcChi* の発現解析

LcChi の器官発現解析は、各器官の total RNA をそれぞれ 0.2 µg 使用し、“2.2.5. マサバ、シログチ体内における2種キチナーゼの器官発現解析”に従って行った。その結果、*LcChi* は肝臓では発現量が少ないが、今回試料とした組織全て、すなわち胃、肝臓、脾臓、腎臓、浮袋、筋肉、鰓で発現していることが明らかとなった (Fig. 19)。

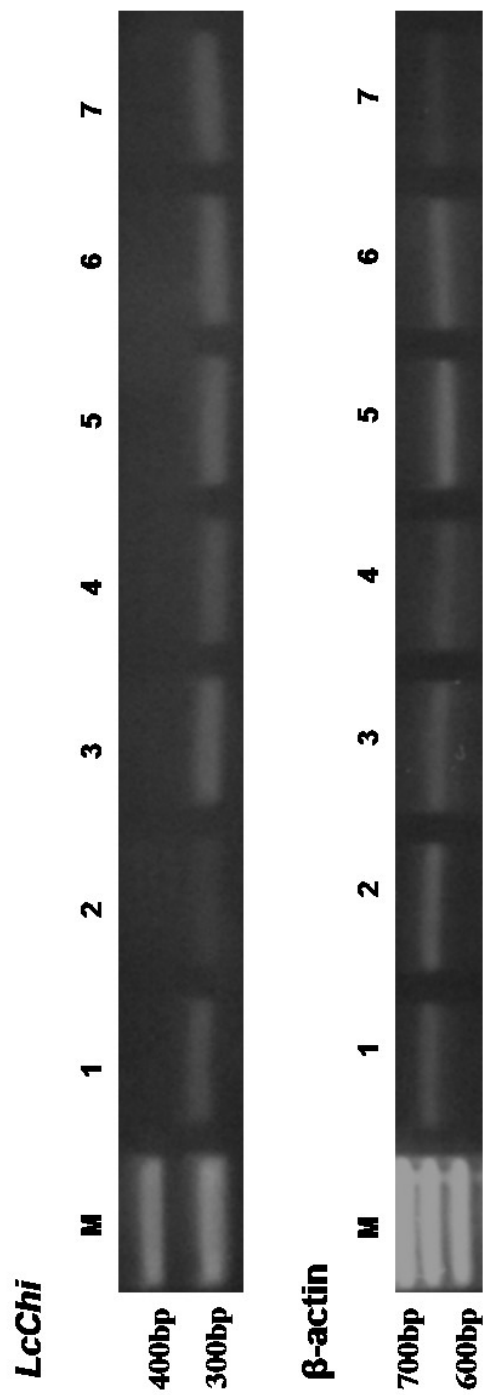


Fig. 19 Chitinase and β -actin expressions in various tissues (M, marker; 1, stomach; 2, liver; 3, spleen; 4, kidney; 5, swim bladder; 6, muscle; 7, gill).

4.3.3. ハイギョにおけるキチン分解酵素の体内分布および至適 pH の決定

1) ハイギョにおけるキチン分解酵素の体内分布

ハイギョ体内におけるキチン分解酵素活性測定の結果、食道、腸、腎臓に高いキチナーゼ活性が、腸、腎臓、卵巣に高い Hex 活性が検出された (Fig. 20)。

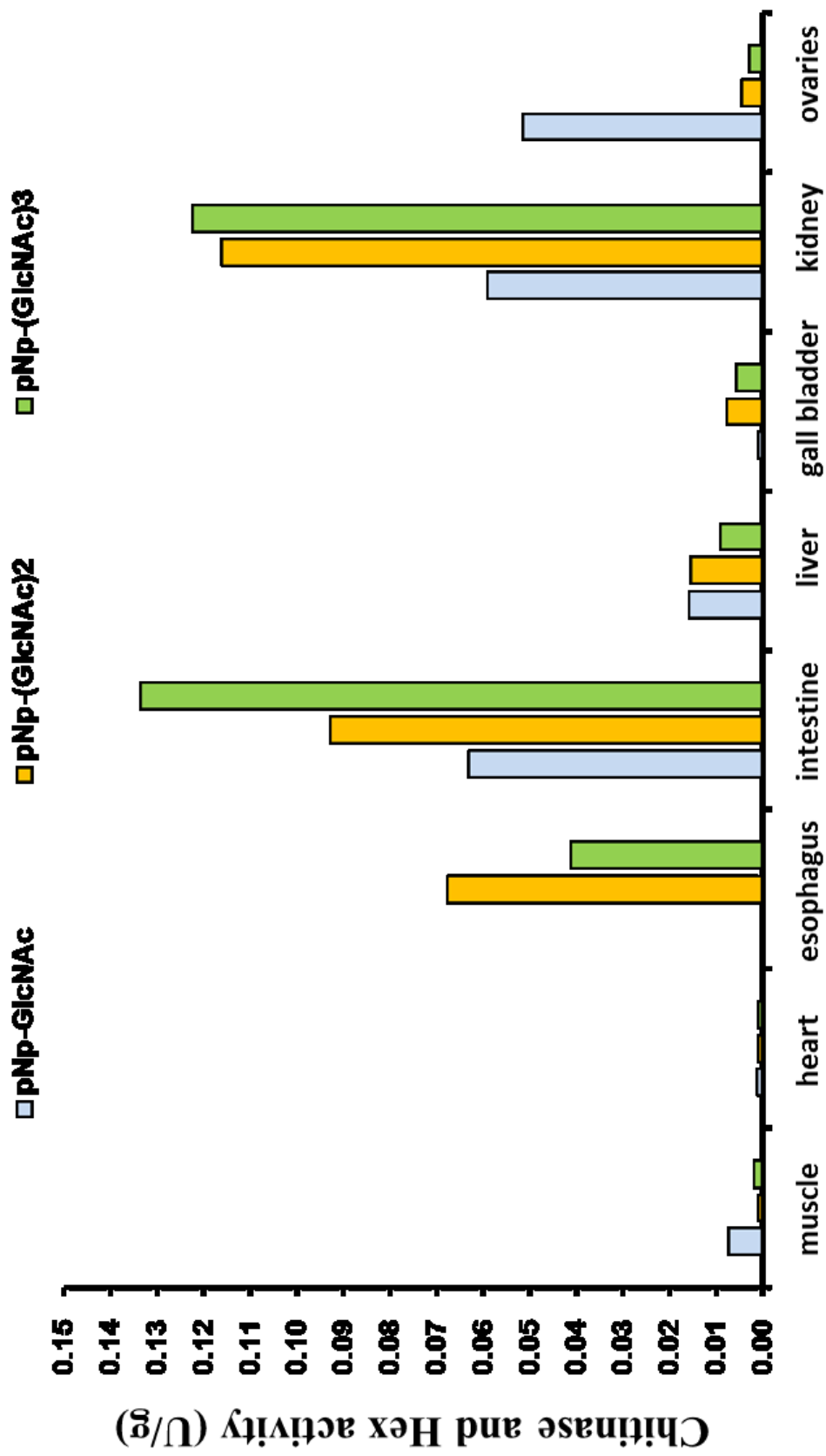


Fig. 20 The distribution of the chitinolytic activities in the body organs of *Protopterus aethiopicus*.

2) ハイギョにおけるキチン分解酵素活性の至適 pH の決定

活性の検出された食道、腸、腎臓キチナーゼの至適 pH を決定した。その結果、食道において pNp-(GlcNAc)₂ に対して pH 3.5-4.0 および pNp-(GlcNAc)₃ に対して pH 3.5-5.0 と酸性域で至適 pH が観察された。また、Hex 活性の基質である pNp-GlcNAc に対して pH 4.0-5.5 に至適 pH が観察された。また、腸において、pNp-(GlcNAc)₂ に対して pH 3.0-5.5 および pNp-(GlcNAc)₃ に対して pH 3.0-6.5 と食道よりも広い至適 pH が観察された。また、pNp-(GlcNAc) に対して pH 3.0-7.0 に至適 pH が観察された。腎臓において pNp-(GlcNAc)₂ に対して pH 2.0-8.0 と 80%以上の活性が観察され、pNp-(GlcNAc)₃ に対して pH 3.0-6.5 とこちらも広い至適 pH が観察された。また、pNp-(GlcNAc) に対して pH 3.0-6.5 に至適 pH が観察された (Fig. 21)。

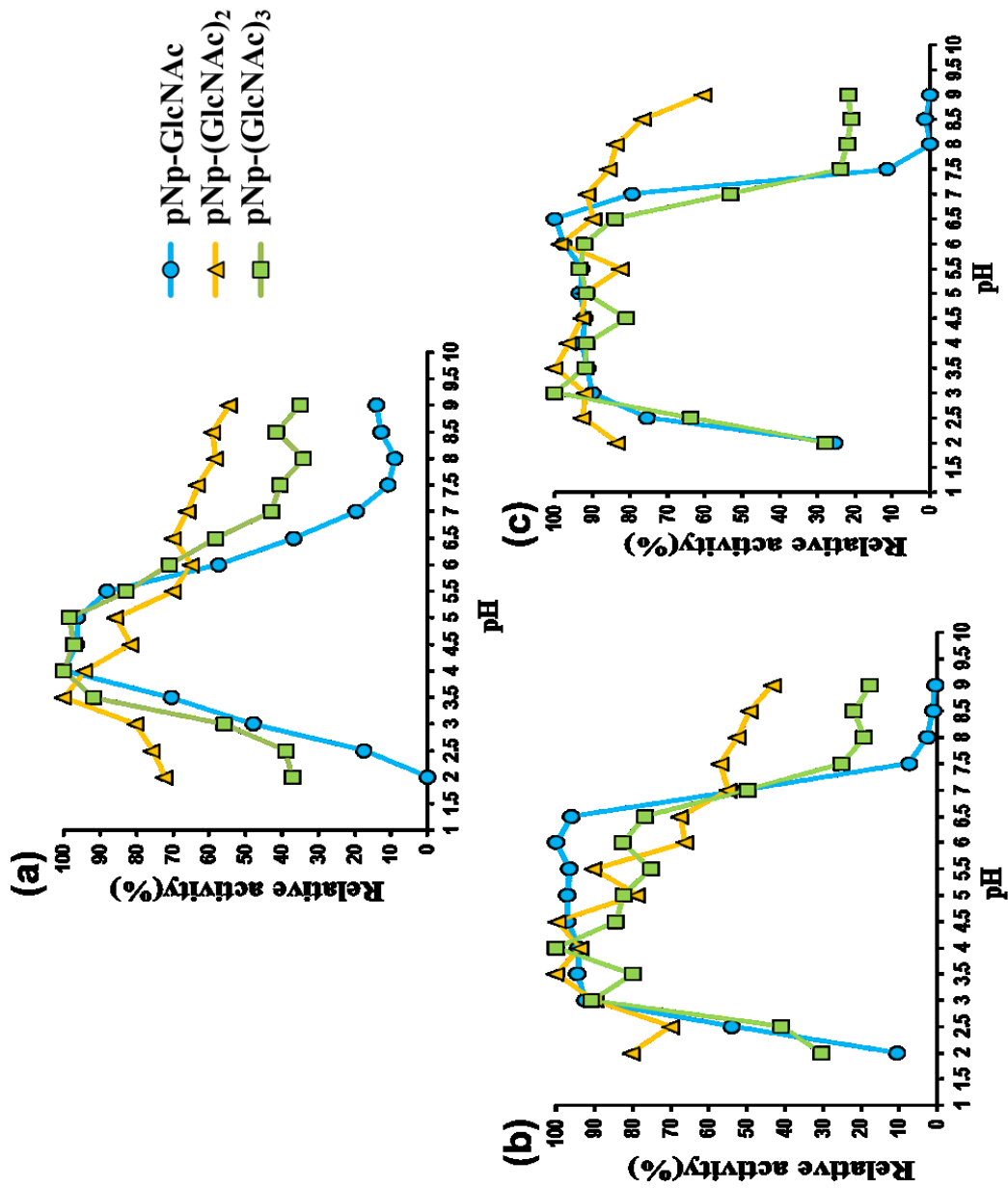


Fig. 21 Effect of pH on chitinase and Hex activity. The optimum pH when using pNp-(GlcNAc), pNp-(GlcNAc)₂, and pNp-(GlcNAc)₃ as a substrate was measured by incubating it at 37°C for 20 min in a 0.2 M sodium phosphate-0.1 M citric acid buffer (pH 2.0-8.0) and 0.1 M glycine + 0.1 M NaCl-0.1 M NaOH buffer (pH 9.0). (a) esophagus (b) intestine (c) kidney.

4.3.4. ハイギョ食道キチナーゼの cDNA クローニング

ハイギョ食道より cDNA クローニングを試みた結果、内部配列増幅では、約 350 bp の遺伝子断片を得た。さらに、RACE 法により上流域・下流域の増幅を試みた結果、ハイギョ食道キチナーゼ全長遺伝子 (*PaeChi*) の約 95%にあたる 1,428 bp の遺伝子断片を得た (Fig. 22)。

PaeChi

TICGCTACAAGCTGGTCTGCTACTTTACAAACTGGGCCCCAATAIAGCCAGAAACAGCCCAAGTACAAACCCAGAAAATGTGGACCCCGITTTGGTACTCNCCTCATCTACGCCCTTGGCC 120
S A Y K L V C Y F T N W A Q Y R P E X A K Y K P E N V D P C L C T X L I Y A F A
 AGCATGCCAATAGCTATGAAATACCACCTTAGAATGGAATGATGAAGTCCCTTACCAGTCCTTAATGCACCTTAGAACAGAAAATGGAAAGCTTACAACTACTGGCTATTGGAGGA 240
S M T N S Y E I T T Y E W N D E V L Y Q S L N A L K N R N G K L T T L L A I G G
 TGGAACTTTGGGACCGACAGATTACAAAGGATGGTTCTACTGCTCAGAACCGTCAAACATTCATAAATTCGTGTAATCAAAATTCCTTCGAAATATGGATTGATGGCTTGGATCTAGAT 360
W N F G T D R F T R M V S T A Q N R Q T F I N S V I K F L R N Y G F D G L D L D
 TGGAAATATCCTGGCTCCAGAGGAGCCCTCCAGAGGACAAACGTTTACCACATCITGGTCCAGGAATGTGGACGCCITTTGAGAAAGAGGGCCAGAGACTGGACGTCCCTAGATTA 480
W E Y P G S R G S P P E D K Q R F T I L V Q E M L A A F E K E G A E T G R P R L
 CITGTTACTGCTGCAGTATCAGCTGGAAAAGCCACCATCGATGCTGGCTAAGAAATGCCAAATAGCTCAGTCCTTGGACTTCATTAATGTGATGAGCTACGACTTCCACGGTGCCTGG 600
L V T A A V S A G K G T I D A G Y E I A K I A Q S L D F I N V M S Y D F H G A W
 GATACCTTCAGAGCCACACAGCCCTCTATAGAGGCTCTGATCAGGGGATTTCACTACTTTAATACAGATTATGCCATGMAATACCTGGAGAGACAAATGGAAACCCACAGCTGAG 720
D T F T G H N S P L Y R G S A D Q G D F I Y F N T D Y A M K Y W R D N G T P A E
 AAGTCATTATGGAAATACCAGCTATGGCCGTACCTTCAGGCTGACATCTCAACACACTGGTGTGGTCCCAACATCTGGTCCAGCTGGACAAATACACAAAGGGAGGCTGGA 840
K L I M G I P T Y G R T F R L T S S N T G V G A P T S G P A A A G Q Y T R E A G
 TTCTGGCCCTATTATGAGATCTGCACATTTCTACAAGGAGCCACACAGCTTGGATCACTGACCAGAAATGTCCTTATGCCCTACAGGGAGGTGAGTGGGTAGGCTACGACAAACATCAAG 960
F W A Y E I C T F L Q G A T T A W I T D Q N V P Y A Y K G S E W V G Y D N I K
 AGTATTGAGGAAGGTGCAGTATCTGAAGGACCAATGGTTTGGAGGTGCTATGGTTGGGCTATTGACCTTGACGACCTCCTTGGGTCGATATGCAATGAGGGTCCCTATCCCCTGATT 1080
S I E G K V Q Y L K D H G F G G A M V W A I D L D D L L G S I C N E G P Y P L I
 GGCAGGCTGAATTCCTGTGGAAATGCTGAGTCAAGGCTGCACCTCCATCTCAACACACTGCCCTCCACCACCAACCCACCCCGGTTGGTAGTGGCGGGTGGAGATGGTGGATT 1200
G R L N S L L G I A E S G C T P S S T I L P P P T I T T P G G S G G G D G G F
 TCGATGGGAAAACCTGATGGCATCTAGCAGCCAGAGATAGGACCAAGTTCTACGAGTGTGCTGGAGGAGGACCTTTCACAAAACCTGCTATGAACCTTGTGTTTGTATGAAMAAC 1320
C D G K I D G I Y A D P E D R T K F Y E C A G G R I F H K T C Y E N L V F D E N
 TGCAGTGTGCAACTGGCCATGAGGCAAAAATACATTAATAACTTATAACAATTAACAGTTATATAATAAAGTAAACACCTCTGAACACAAAAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 1440
C K C C N W P *

Fig. 22 Deduced amino acid sequences and bases of chitinase from *Protopterus aethiopicus*.

— : catalytic domain, : linker region, ---- : chitin binding domain

4.3.5. ハイギョ体内における *PaeChi* の発現解析

器官発現解析の結果、シーラカンス同様に食道、腸、肝臓、腎臓、心臓、筋肉において発現が検出された。肝臓で最も強い発現が観察され、次いで腎臓において良く発現していることが明らかになった (Fig. 23)。

PaeChi

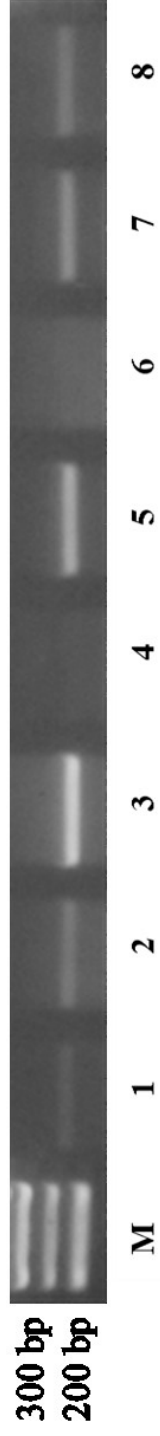


Fig. 23 Chitinase expressions in various tissues (M, marker; 1, esophagus; 2, Intestine; 3, liver; 4, gall bladder; 5, kidney; 6, ovaries; 7, heart; 8, muscle.).

4.3.6. 系統樹解析

LcChi および *PaeChi* の演繹アミノ酸配列を含めて、これまでの魚類キチナーゼおよび他の生物種キチナーゼのアミノ酸配列の相同性に基づく系統樹解析を実施した (Fig. 24)。その結果、既往の報告³⁰⁻³⁵⁾と同様に、哺乳類胃キチナーゼは AMCCase に、哺乳類 Chitotriosidase は Chitotriosidase に、条鰭類胃キチナーゼは AFCCase-1 と AFCCase-2 に分類され、また“3. 条鰭類における新規キチナーゼの分布・種類および構造”により明らかにした条鰭類腎臓キチナーゼは Fish Chitinase-3 のグループに分類された。一方、本章で明らかにした肉鰭類に属するキチナーゼ遺伝子 *LcChi* および *PaeChi* は、AFCCase-1、AFCCase-2、FCCase-3 には属さなかった。また、同じ肉鰭類より得られたキチナーゼ遺伝子 *LcChi* および *PaeChi* は離れた個所に配置された。

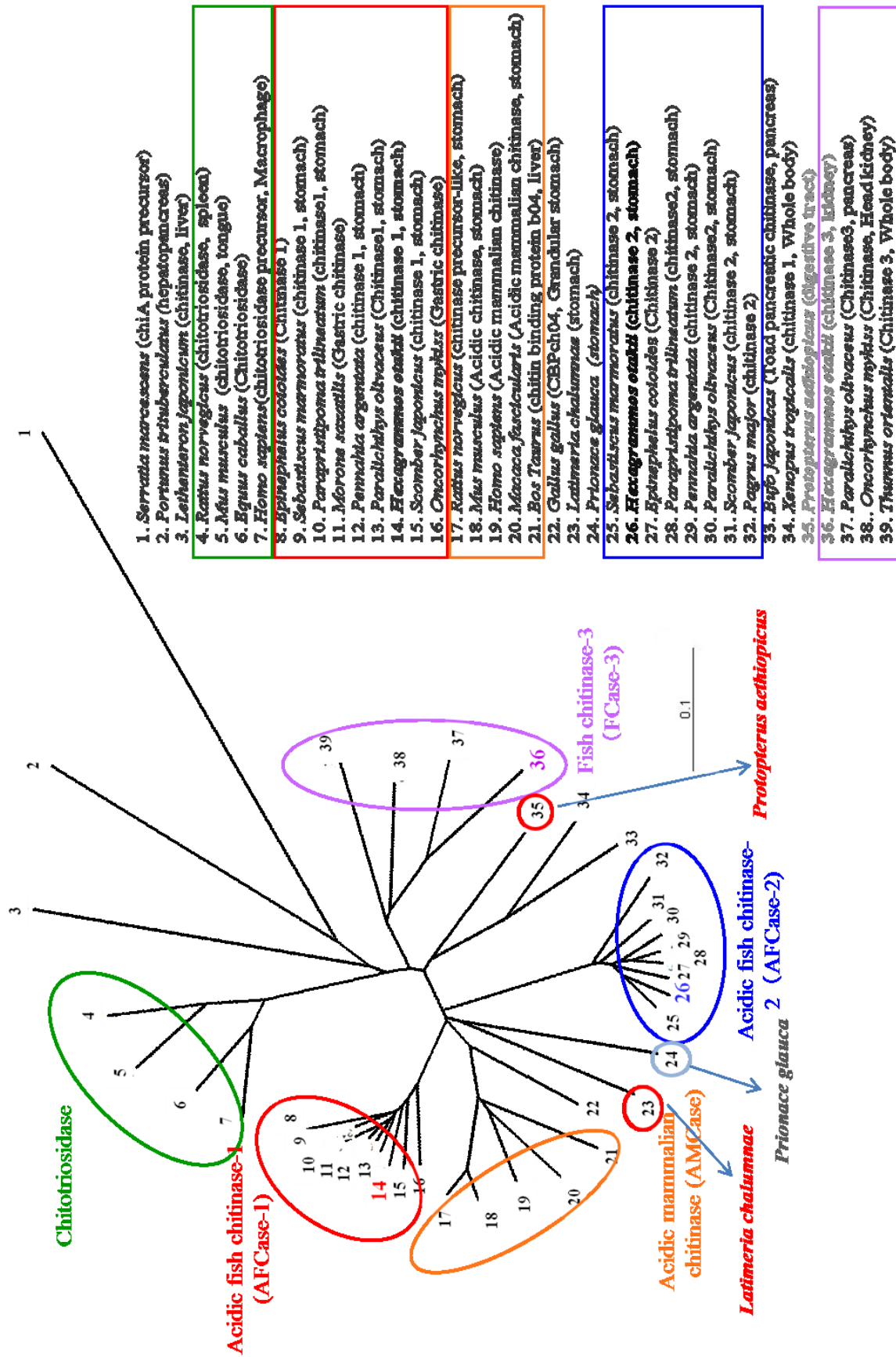


Fig. 24 Phylogenetic tree for chitinase amino acid sequences using the neighbor joining method in the clustalW program. A bacterial chitinase, *Serratia marcescens* chitinase, was used as an outgroup.

4.4. 考察

4.4.1. シーラカンス胃キチナーゼの cDNA クローニング

シーラカンス胃キチナーゼの全長遺伝子を増幅した結果、全長 1,581 bp で 1,431 bp の ORF を含む *LcChi* を得ることができた。*LcChi* の演繹アミノ酸配列の一部（アミノ酸残基の 22～43 番目）は以前に松宮ら²²⁾ が精製した 46 kDa シーラカンス胃キチナーゼの N 末端アミノ酸配列とほぼ一致した (Fig. 17 下線部)。また、*LcChi* の演繹アミノ酸配列を BLAST 検索により他の生物と比較したところ、哺乳類のヒトキチナーゼ (AMCase) と 66%、次いで両生類のアフリカツメガエルキチナーゼと 65%、魚類の *PtChi-1* (AFCCase-1) と 64% の相同性が認められた。さらに、Clustalw プログラムを使用して *LcChi* の演繹アミノ酸配列および哺乳類 (ヒト: AF 290004)、鳥類 (ニワトリ: AB 071038)、爬虫類 (グリーンアノール: XM 003220321)、両生類 (アフリカツメガエル: BC 090382)、魚類 (ヒラメ: AB 121733、イサキ: AB 642677) のキチナーゼと比較した結果、この *LcChi* のドメイン構造は、今回比較対象とした生物のキチナーゼのそれと一致し、これまでの魚類胃キチナーゼに類似することが明らかになった (Fig. 25)。このことから、哺乳類、爬虫類、両生類の祖先と考えられるシーラカンス (肉鱗類) が出現した時代においてそれらのドメイン構造が形成されていたことが示唆された。



Fig. 25 Alignment of the amino-acid sequence of *LcChi* with mammalian, amphibian, reptile, bird, and two fishes.

4.4.2. シーラカンス体内における *LcChi* の発現解析

条鰭類では AFCase-1, AFCase-2 に相当する遺伝子は胃に強く発現していることが報告されている^{30-32, 34)}。一方、*LcChi* は、体内の器官に広く発現しており、これまでの魚類胃キチナーゼとは役割が異なる可能性が示唆された。つまり、消化だけでなく哺乳類などで存在が確認されている生体防御^{14, 41, 43)}という生理的役割も同時に担うキチナーゼであると考えられた。また、精製された 46 kDa シーラカンス胃キチナーゼは pNp-(GlcNAc)₃ よりも pNp-(GlcNAc)₂ に高い活性を示し、pNp-(GlcNAc)_n の非還元末端側より 2 番目のグリコシド結合を良く分解し、その至適 pH は 1.5 と酸性域で最も高い活性を示したことが報告されている^{21, 22)}。これは、胃酸が存在する条件下で高い活性を示すヒトの AMCase^{15, 41, 43, 44)}、マサバ胃キチナーゼ^{19, 23)}、イサキ胃キチナーゼ³²⁾の報告と類似していた。また、種々の高分子基質、グリコールキチン、コロイダルキチン、エビ殻 α キチン、カニ殻 α キチン、カイコ表皮 α キチン、イカ甲 β キチンに対し、分解能を持つことが報告されている²²⁾。これらの性状は、シーラカンス胃キチナーゼが生体内で複数の生理的役割を果たすのに適しているのかもしれない。

4.4.3. ハイギョにおけるキチン分解酵素の体内分布および至適 pH の決定

1) ハイギョにおけるキチン分解酵素の体内分布

ハイギョは無胃魚であり、主に腸で消化を行っていると考えられていたが、本研究結果より食道においても高いキチナーゼ活性が認められたことより、食道も消化に関与していることが明らかになった。また、食道では Hex 活性が検出されなかったことより、摂取された餌料は食道においてまずキチナーゼにより分解され、腸においてキチナーゼによりさらに消化され、Hex により GlcNAc にまで消化されていることが示唆された。また、腎臓にも高いキチナーゼ活性が検出されたことより、このキチナーゼはコチの腎臓で得られた結果と同様に、老廃物の排出に関連する役割も果たすことが示唆された。

(Fig. 20)。また、食道、肝臓、鰾、卵では AFCase-1 がコードする SmChiA, SmChiB³¹⁾ のように pNp-(GlcNAc)₃ よりも pNp-(GlcNA)₂ に対する活性値が高く、腸、腎臓においては AFCase-2 がコードする SmChiC³¹⁾ のように pNp-(GlcNAc)₂ よりも pNp-(GlcNA)₃ に対する活性値が高いことが明らかになった。

2) ハイギョにおけるキチン分解酵素活性の至適 pH の決定

活性の検出された食道、腸、腎臓キチナーゼの至適 pH を決定した。その結果、食道において酸性域で至適 pH が観察されたことより、条鰭類胃のキチナーゼ^{17-19, 28, 29, 31, 32, 34)} と性状が類似し、酸性条件下の pH でよく作用する酵素であることが示唆された (Fig. 21)。また、腸、腎臓において pH 3.0-7.0 の広い範囲で活性が保持されたことより食道のキチナーゼに類似する酵素の他に、新たなキチナーゼアイソザイムの存在、あるいはカサゴ胃キチナーゼ³¹⁾ と同じくプロセシングで至適 pH が変化し、広範囲で活性を示す酵素が存在する可能性を含むことが示唆された (Fig. 21)。

4.4.4. ハイギョ食道キチナーゼの cDNA クローニング

ハイギョ食道よりキチナーゼの cDNA クローニングを行った結果、シグナルペプチドを除く 1,428 bp の *PaeChi* 遺伝子断片を得ることができ (Fig. 22)、それはゾウギンザメキチナーゼ (XM 007899533) と 82% の相同性を示した。この遺伝子のドメイン構造は、ファミリー 18 キチナーゼおよび既報の魚類キチナーゼ³⁰⁻³⁵⁾ と類似した。また、*PaeChi* は条鰭類胃のキチナーゼとは異なりリンカー領域における明瞭なセリン、グリシンの反復配列がみられなかったことより、ヒトの Chitotriosidase^{15, 16)} に類似した。また、“3. 条鰭類における新規キチナーゼの分布・種類および構造” で報告したカサゴ腎臓キチナーゼ (*SmChi-3*) や fChi3³⁰⁾ に類似する生体防御に関与すると考えられる遺伝子であることが推察された。

4.4.5. ハイギョ体内における *PaeChi* の発現解析

器官発現解析の結果、食道、腸、肝臓、腎臓、心臓、筋肉において発現が検出されたことより、シーラカンスのキチナーゼと同様に1つの酵素が消化ならびにヒトの Chitotriosidase^{15,16)} のような生体防御の役割を持つことが推察された (Fig. 23)。本研究結果より、肉鰭類のシーラカンスおよびハイギョでは、1つのキチナーゼ遺伝子が複数の器官に存在し、消化および生体防御などの複数の役割を果たしていることが示唆された。サメ³³⁾ においても1種のキチナーゼ遺伝子しか得られていないことより、進化の停滞した魚類である肉鰭類および軟骨魚類では条鰭類と比較して体内に持つキチナーゼ遺伝子の数も少ないのかもしれない。

4.4.6. 系統樹解析

既往の研究および本研究により、条鰭類のキチナーゼは AFCase-1, AFCase-2, FCCase-3 の3つのグループに分類されることが明らかになった。一方、ヨシキリザメ³³⁾、シーラカンス³⁵⁾、ハイギョはそれらのグループには属さなかったことより、魚類はその進化の過程においてキチナーゼも独自に進化している可能性が示唆された。特に進化した魚類である条鰭類は胃に2種のキチナーゼ遺伝子を持つが、軟骨魚類、肉鰭類からは1つの遺伝子しか取得されていない。現在繁栄している条鰭類は繁栄するために環境に適応し、様々に体を変化させ、その過程でキチナーゼもそれぞれの主な餌料に対応して変化してきたことが考えられた。また、キチン質を含むカビ、吸血性甲殻類、線虫類などの外敵生物も多様化していることが予想され、そのための生体防御の役割を持つキチナーゼなども多様に変化してきた可能性が示唆された。さらに、本研究によりシーラカンスの *LcChi* は AFCase のグループに近く、ハイギョの *PaeChi* は両生類のキチナーゼに近いことが明らかになった。これら魚類キチナーゼの系統樹解析の結果は Amemiya らが報告⁵¹⁾ した脊椎動物のゲノム進化の系統樹に類似したことより、キチナーゼも進化分類の系統樹に従い分類される可能性がある。

4.5. 小括

シーラカンス胃キチナーゼおよびハイギョ食道キチナーゼの cDNA クローニングを試みた結果、シーラカンス胃キチナーゼについては全長 (*LcChi*) の 1,581 bp を、ハイギョ食道キチナーゼでは全体の約 95%にあたる 1,428 bp の遺伝子を得ることであった。また、それらのドメイン構造はファミリー18 キチナーゼやこれまでの魚類キチナーゼと類似することが明らかになった。

ハイギョ体内におけるキチン分解酵素活性測定の結果、食道、腸、腎臓にキチナーゼ活性が、腸、肝臓、腎臓、卵巣に Hex 活性が検出された。また、食道では酸性域の pH で作用するキチナーゼの存在が、腸、腎臓においては pH 3.0-7.0 までの広い範囲で活性を保持するキチナーゼの存在が認められた。これらの結果より、これまでの条鰭類胃キチナーゼと類似した酵素の他にヒトの Chitotriosidase^{15,16)} 様の新たなキチナーゼアイソザイムの存在が示唆された。

さらに、*LcChi* および *PaeChi* の器官発現解析の結果、消化器官以外にも複数の器官で発現がみられたことより、肉鰭類では1つの酵素が消化以外にも生体防御などの複数の役割を果たす可能性が示唆された。また、系統樹解析の結果、肉鰭類キチナーゼはこれまでのいずれのキチナーゼグループにも属さず、Amemiya らの進化分類の系統樹⁵¹⁾ に類似し、*LcChi* は AFCase に、*PaeChi* は両生類のキチナーゼに近いことが明らかになった。これらのことより、魚類のキチナーゼも進化に伴い分類される可能性が示唆された。

5. 総括

これまでに条鰭類の消化器官である胃には酸性域で作用し餌料の消化に関与するキチナーゼが存在し、その精製およびその性状、cDNA クローニングに関する知見が報告されてきた^{17-24, 26, 28-35)}。そこで本論文において、未だ情報の少ない条鰭類体内におけるキチン分解酵素の分布を調査した結果、条鰭類は消化器官以外にもキチナーゼを持つことを明らかにした。また、消化器官以外のキチナーゼは至適 pH などの性状が異なり、肝臓や腎臓においてその生理的条件化で生体防御の役割を果たしている可能性のあるキチナーゼアイソザイムの存在を明らかにした。

これまでに条鰭類は胃に2種類のキチナーゼ遺伝子を持ち、それらは AFCase-1 あるいは AFCase-2 に分類されると報告^{31, 32, 34)}されている。本研究より、マサバ胃より AFCase-2 に属す *SjChi-2* を得、既往の報告を強く支持する結果となった^{31, 32, 34)}。さらに、半定量 PCR による器官発現解析の結果、これまでの AFCase-1, AFCase-2 に相当する胃のキチナーゼ遺伝子は魚種により発現量に差異が認められ、また消化器官以外にも発現することを明らかにした。条鰭類は魚種により生息環境や食性に呼応して、各器官におけるキチナーゼの発現や活性の程度に差異があり、それぞれが消化、生体防御などの役割を果たしていることが示唆された。

さらに、10種条鰭類のキチン分解酵素の体内分布を調査した結果、本研究で試料とした条鰭類は胃以外にもキチナーゼを有していることを明らかにした。また、条鰭類は種によりキチナーゼ活性が検出される器官や活性の強弱が異なり、消化以外にも生体防御などの役割を果たしている事が示唆された。また、カサゴのキチナーゼ活性測定において消化器官以外で活性の検出された腎臓より新規キチナーゼ全長 cDNA (*SmChi-3*) を得た。*SmChi-3* のドメイン構造は、リンカー領域のセリン、グリシンの反復配列がヒトの Chitotriosidase^{15, 16)} に類似することを明らかにした。また、カサゴ3種キチナーゼの立体構造予測では、3種とも GH 18 活性ドメインおよびキチン結合ドメインを有するマルチドメイン構造を示し、基質クレフトや TIM バレル構造がみられ⁴⁴⁾、リンカー領域の長さ

がそれぞれ 10 残基程異なることを明らかにした。さらに、食性や生息域の異なる 4 種条鰭類でもキチナーゼ 3 遺伝子を腎臓に持つことを明らかにした。

系統樹解析において *SmChi-3* はこれまでの AFCase-1, AFCase-2 のグループには属さず、新規の FCCase-3 グループを形成した。この FCCase-3 には、遺伝子データベースに登録されている AMCase グループに当てはまらないほとんどの魚類キチナーゼ遺伝子がこちらに含まれることを明らかにした。

また、魚類の中で四肢動物に最も近い生きた化石と呼ばれる肉鰭類に属すシーラカンズおよびハイギョを試料とし、魚類の進化に伴うキチナーゼの変化を調査した。まず、cDNA クローニングの結果³⁵⁾、シーラカンズ胃よりキチナーゼ全長 cDNA (*LcChi*) が得られ、ハイギョ食道より全体の 95%にあたる *PaeChi* の遺伝子断片を得た。さらに、ハイギョ体内におけるキチン分解酵素活性測定の結果、食道、腸、腎臓にキチナーゼ活性が、腸、肝臓、腎臓、卵巣に Hex 活性が検出された。また、食道では酸性域の pH で作用するキチナーゼの存在が、腸、腎臓においては pH 3.0-7.0 までの広い範囲で活性を保持するキチナーゼの存在が認められた。これらの結果より、無胃魚であるハイギョの食道では既往の報告の条鰭類胃キチナーゼ^{17-19, 26, 28, 29, 31, 32, 34)}と類似した酵素の他にヒトの Chitotriosidase^{15, 16)} 様の新たなキチナーゼアイソザイムの存在が示唆された。また、器官発現解析の結果、*LcChi* および *PaeChi* は胃のみならず体内に広く発現が検出されたことより、肉鰭類では 1 つの酵素が消化以外にも生体防御などの複数の役割を果たす可能性が示唆された。

これまでの、魚類キチナーゼの系統樹解析を試みた結果、条鰭類は AFCase-1, AFCase-2, FCCase-3 に分類される 3 つのキチナーゼグループを持つが、肉鰭類に属すシーラカンズ³⁵⁾、ハイギョ および軟骨魚類に属すヨシキリザメ³³⁾ などはこの 3 つのグループに当てはまらないことを明らかにした。また、*LcChi*³⁵⁾ およびヨシキリザメ³³⁾ は AFCase-1 および AFCase-2 グループに近く、*PaeChi* は両生類のキチナーゼに近く位置することを明らかにした。本研究結果は、生命の進化に伴い魚類キチナーゼ遺伝子も変化し、魚類の分類ごとにキチナーゼも分類できる可能性を示唆した。

6. 参考文献

1. キチン・キトサン研究会 編. 「キチン、キトサンハンドブック」 p. 4-5 技報堂, 東京. 1995
2. Muzzarelli R.A.A (1999) *Native, industrial and fossil chitins*: In Jolles P, Muzzarelli R.A.A. (Eds.), *Chitin and Chitinase* pp. 1-6. Birkhauser Verlag Basel /Switzerland
3. Karthik N, Akanksha K, Binod P, Pandey A (2014) Production, purification and properties of fungal chitinases-A review. *Indian J. Exp. Biol.* 52: 1025-1035
4. Khoushab F, Yamabhai M (2010) Chitin research revisited. *Mar Drugs* 8: 1988-2012
5. Rinaudo M (2006) Chitin and chitosan: Properties and applications. *Prog. Polym. Sci.* 31: 603-632
6. Ravi Kumar M N V (2000) A review of chitin and chitosan applications. *React. Funct. Polym.* 46: 1-27
7. Liu C-L, Lan C-Y, Fu C-C, Juang R-S (2014) Production of hexaoligochitin from colloidal chitin using a chitinase from *Aeromonas schubertii*. *Int. J. Biol. Macromol.* 69: 59-63
8. Mei Y-X, Chen H-X, Zhang J, Zhang X-D, Liang Y-X (2013) Protective effect of chitooligosaccharides against cyclophosphamide-induced immunosuppression in mice. *Int. J. Biol. Macromol.* 62: 330-335
9. Kurita K (2006) Chitin and chitosan: Functional biopolymers from marine crustaceans. *Mar. Biotechnol.* 8: 203-226
10. Patil R S, Ghormade V, Deshpande M V (2000) Chitinolytic enzymes: an exploration. *Enzyme Microb. Tech.* 26: 473-483
11. Rovertus D J and Monzingo F A (1999) *The structure and action of chitinases*: In Jolles P, Muzzarelli R.A.A. (Eds.) *Chitin and Chitinase* pp. 125-135. Birkhauser Verlag Basel /Switzerland
12. Henrissat B (1999) *Classification of chitinase modules*: In Jolles P, Muzzarelli R.A.A. (Eds.) *Chitin and Chitinase* pp. 137-156. Birkhauser Verlag Basel /Switzerland
13. Slamova K, Bojarova P, Petraskova L, Kren V (2010) β -N-acetylhexosaminidase: What's in a name...?. *Biotech. Adv.* 28: 682-693
14. Shuhui L, Mok Y-K, Wong W S F (2009) Role of mammalian chitinase in asthma. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 149: 369-377
15. Boot R G, Blommaert E F C, Swart E, Vlugt K G-V D, Bijl N, Moe C, Place A, Aerts J M F G (2001) Identification of a novel acidic mammalian chitinase distinct from chitotriosidase. *J. Biol. Chem.* 276: 6770-6778
16. Boot R G, Renkema H, Strijland A, Zonneveld A J V, Aerts J M F G (1995) Cloning of a cDNA encoding chitotriosidase, a human chitinase produced by macrophages. *J. Biol. Chem.* 270: 26252-26256
17. Kono M, Matsui T, Shimizu C (1987) Purification and some properties of chitinase from the

- stomach of red sea bream *Pagrus major*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 53: 1 131-136
18. Kono M, Matsui T, Shimizu C, Koga D (1990) Purification and some properties of chitinase from the stomach of Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Agric. Biol. Chem* 54 : 4 973-978
 19. 松宮 政弘、望月 篤 (1995) マサバ胃キチナーゼの精製および性質、日本大学農獣医学部学術研究報告 52: p. 131-136
 20. Matsumiya M, Mochizuki A (1996) Distribution of chitinase and β -N-Acetylhexosaminidase in the organs of several fishes. *Fish. Sci.* 62: 150-151
 21. 松宮 政弘、宮内 浩二、望月 篤 (1997) シーラカンス胃のキチン分解酵素、日本大学農獣医学部学術研究報告 54: p. 10-17
 22. Matsumiya M, Karasuda S, Miyauchi K and Mochizuki A (2008) Substrate specificity and partial amino acid sequence of a chitinase from the stomach of coelacanth *Latimeria chalumnae*, *Fish. Sci.* 74 : 1360-1362
 23. Matsumiya M, Arakane Y, Haga A, Muthukrishnan S, Kramer K J (2006) Substrate specificity of chitinase from two species of fish, greenling, *Hexagrammos otakii*, and common mackerel, *Scomber japonicus*, and the insect, tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70: 971-979
 24. Gutowska M A, Drazen J C, Robinson B H (2004) Digestive chitinolytic activity in marine fishes of Monterey Bay, California. *Comp. Biochem. Phys. A* 139: 351-358
 25. Teng Z, Sun C, Liu S, Wang H, Zhang S (2014) Functional characterization of chitinase-3 reveals involvement of chitinases in early embryo immunity in zebrafish. *Dev. Comp. Immunol.* 46: 489-498
 26. Hassiba L-H, Maya D, Abdelmalek B, Samia M, Nabil M (2012) Purification and Characterization of a Highly Thermostable Chitinase from the Stomach of the Red Scorpionfish *Scorpaena scrofa* with Bioinsecticidal Activity toward Cowpea Weevil *Callosobruchus maculatus*(Coleoptera: Bruchidae). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 76: 9 1733-1740
 27. Molinari L M, Pedroso R B, Scoaris D O, Ueda-Nakamura T, Nakamura C V, Filho B P D (2007) Identification and partial characterization of a chitinase from Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Comp. Biochem. Phys. B* 146: 81-87
 28. Ikeda M, Miyauchi K, Matsumiya M (2012) Purification and characterization of a 56 kDa chitinase isozymes (PaChiB) from the stomach of the silver croaker, *Pennahia argentatus*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 76: 971-979
 29. Ikeda M, Miyauchi K, Mochizuki A, Matsumiya M (2009) Purification and characterization of chitinase from the stomach of silver croaker *Pennahia argentatus*. *Protein Express. Purif.* 65: 214-222
 30. Kurokawa T, Uji S, Suzuki T (2004) Molecular cloning of multiple chitinase genes in Japanese flounder, *Paralichthys olivaseus*. *Comp. Biochem. Phys. B* 138: 255-264
 31. Ikeda M, Shirase D, Sato T, Ueda M, Hirabayashi S, Matsumiya M (2014) Primary structure and enzymatic properties of chitinase isozymes purification from the stomach of the marbled rockfish *Sebastes marmoratus*. *J. Chitin Chitosan Sci.* 2: 106-116

32. Ikeda M, Kondo Y, Matsumiya M (2013) Purification, characterization, and molecular cloning of chitinases from the stomach of the threeline grunt *Parapristipoma trilineatum*. *Process Biochem.* 48: 1324-1334
33. Suzuki T, Kakizaki H, Ikeda M, Matsumiya M (2014) Molecular cloning of a novel chitinase gene from blue shark (*Prionace glauca*; chondrichthyes) stomach. *J. Chitin Chitosan Sci.* 2: 143-148
34. Kakizaki H, Ikeda M, Fukushima H, Matsumiya M (2015) Distribution of chitinolytic enzymes in the organs and cDNA cloning of chitinase isozymes from the stomach of two species of fish, chub mackerel (*Scomber japonicus*) and silver croaker (*Pennahia argentata*). *Open Journal of Marine Science* 5: 398-411
35. Kakizaki H, Hamaguchi K, Ikeda M, Matsumiya M (2014) Cloning of a novel chitinase cDNA from the stomach of the coelacanth *Latimeria chalumnae* (sarcopterygii). *J. Chitin Chitosan Sci.* 2: 123-129
36. Ogino T, Tabata H, Ikeda M, Kakizaki H, Matsumiya M (2014) Purification of a chitinase from the posterior salivary gland of common octopus *Octopus vulgaris* and its properties. *J. Chitin Chitosan Sci.* 2: 135-142
37. Nishino R, Suyama A, Ikeda M, Kakizaki H, Matsumiya M (2014) Purification and characterization of a liver chitinase from golden cuttlefish, *Sepia esculenta*. *J. Chitin Chitosan Sci.* 2: 238-243
38. Merzendorfer H, Zimoch L (2003) Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. *J. Exp. Biol.* 206: 4393-4412
39. Kramer K J, Muthukrishnan S (1997) Insect chitinases: molecular biology and potential use as biopesticides. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 27: 887-900
40. Ahmed N U, Park J I, Jung H J, Kang K K, Hur Y, Lim Y P, Nou I S (2012) Molecular characterization of stress resistance-related chitinase genes of *Brassica rapa*. *Plant Physiol. Bioch.* 58: 106-115
41. Adrangi S, Faramarzi M A (2013) From bacteria to human: A journey into the world of chitinases. *Biotechnol. Adv.* 31: 1786-1795
42. Bhattacharya D, Nagpure A, Gupta R K (2007) Bacterial chitinases: properties and potential. *Crit. Rev. Biotechnol.* 27: 21-28
43. Muzzarelli R A A, Boudrant J, Meyer D, Manno N, Demarchis M, Paoletti M G (2012) Current views on fungal chitin/chitosan, human chitinases, food preservation, glucans, pectins and inulin: A tribute to henri braconnot, precursor of the carbohydrate polymers science, on the chitin bicentennial. *Carbohydr. Polym.* 87: 995-1012
44. Cozzarini E, Bellin M, Norberto L, Polese L, Musumeci S, Lanfranchi G (2009) CHIT1 and AMCase expression in human gastric mucosa: Correlation with inflammation and *Helicobacter pylori* infection. *Eur. J. Gastroen. Hepat.* 21: 10 1119–1126
45. 木村清志, 森田猛. 「新魚類解剖図鑑」 p. 46-57, p60-65 緑書房, 東京. 2010
46. 落合明, 中村利一. 「魚類解剖大図鑑」 p. 21-28, 114, 115, 132, 133 緑書房, 東京. 1994

47. Ohtakara A (1988) Chitinase and β -N-Acetylhexosaminidase from *Pycnopus cinnabarinus*. *Methods in Enzymol.* 161: 462-470
48. Nakagawa H, Enomoto N, Asakawa M, Sumi T (1989) Purification and characterization of β -N-Acetylhexosaminidase from the liver of red sea bream. *Nippon Suisan Gakkaishi* 55: 2 341-347
49. Nakagawa H, Enomoto N, Asakawa M (1987) Purification and enzymatic properties of β -N-aseetylhexosaminidase from common octopus liver. *Nippon Suisan Gakkaishi* 53: 6 1025-1031
50. Tang W J, Fernandez J G, Sohn J J, Amemiya C T (2015) Chitin is endogenously produced in vertebrates. *Cull. Biol.* 25: 897-900
51. Amemiya C.T, Alfoldi J, Lee A.P, Fan S, Brinkmann H, MacCallum I, Braasch I, Manousaki T, Schneider I, Rohner N, Organ C, Chalopin D, Smith J.J, Robinson M, Dorrington R.A, Gerdol M, Aken B, Biscotti M.A, Barucca M, Baurain D, Berlin A.M, Blatch G.L, Buonocore F, Burmester T, Campbell M.S, Canapa A, Christoffels A, Moro G, Edkins A.L, Fan L, Fausto A.M, Feiner N, Forconi M, Gamiieldien J, Gnerre S, Haerty W, Hahn M.E, Hesse U, Hoffmann S, Johnson J, Karchner S.I, Lara M, Levin J, Litman G.W, Mauceli E, Miyake T, Mueller M.G, Nitsche A, Olmo E, Ota T, Pallavicini A, Panji S, Picone B, Ponting C.P, Prohaska S.J, Przybylski D, Saha N.R, Ravi V, Ribeiro F, Sauka-Spengler T, Scapigliati G, Searle S.M.J, Sharpe T, Simakov O, Stadler P.F, Sumiyama K, Tafer H, Turner-Maie J, van Heusden P, White S, Yandell M, Philippe H, Volff J.N, Tabin C.J, Shubin N, Scharl M, Jaffe D, Postlethwait J.H, Venkatesh B, Palma F.D, Lander E.S, Meyer A, and Lindblad-Toh K (2013) Comparative analysis of the genome of the African Coelacanth, *Latimeria chalumnae*, sheds light on tetrapod evolution, *Nature* 496: 311–316

7. 謝辞

本研究を遂行し学位論文をまとめるに当たり、多くのご支援と適切なお指導を賜りました、指導教官である 松宮 政弘 教授、また本論文に対し詳細で有益なお助言を頂きました 小田 宗宏 教授、西尾 俊幸 教授 並びに 福島 英登 准教授に心から御礼申し上げます。また、本研究を行うに当たり多くのお助言を頂いた大阪府立大学の 上田 光宏 准教授並びに慈恵医大の 池田 愛 博士に心より感謝の意を表します。また、キチナーゼの cDNA クローニングおよび新規キチナーゼの精製で多くの協力を頂いた平成 24 年卒 濱口 兼行君、平成 26 年卒 岩田 龍一君、勝瀬 竜土君、平成 27 年卒 上野 翼君、塚本 太郎君、藤原 美玖さん、平成 28 年卒 草間 綺音さん、藤森 春香さん、渡邊 未来さんに心より感謝の意を表します。

8. 補足情報

略語

- Complementary deoxyribonucleic acid: cDNA
- Distilled water: D.W.
- DNA Data Bank of Japan: DDBJ
- Glycoside hydrolase: GH
- Luria-Bertani: LB
- Messenger ribonucleic acid: mRNA
- Polymerase chain reaction: PCR
- *p*-Nitrophenyl *N*-acetyl Glucosamine: pNp-GlcNAc
- *p*-Nitrophenyl di-*N*-acetyl- β -Chitobioside: pNp-(GlcNAc)₂
- *p*-Nitrophenyl Tri-*N*-acetyl- β -Chitotrioside: pNp-(GlcNAc)₃
- Rapid amplification of cDNA ends: RACE
- Sodium dodecyl sulfate- polyacrylamide gel electrophoresis: SDS-PAGE
- The National Center for Biotechnology Information: NCBI
- Total ribonucleic acid: total RNA

供試魚種の和名、英名、学名

- マサバ chub mackerel *Scomber japonicus*
- シログチ silver croaker *Pennahia argentata*
- アイナメ fat greenling *Hexagrammos otakii*
- イサキ threeline grunt *Parapristipoma trilineatum*
- イボダイ Pacific rudderfish *Psenopsis anomala*
- カサゴ marbled rockfish *Sebastiscus marmoratus*

- ・ ヤマトカマス Japanese barracuda *Sphyraenidae japonica*
- ・ クロマグロ northern bluefin tuna *Thunnus thynnus*
- ・ タチウオ largehead hairtail *Trichiurus japonicus*
- ・ ホウボウ bluefin searobin *Chelidonichthys spinosus*
- ・ コチ flathead *Platycephalus indicus*
- ・ メジナ largescale blackfin *Girella punctata*
- ・ シーラカンス coelacanth *Latimeria chalumnae*
- ・ ハイギョ lungfish *Protopterus aethiopicus*

使用機器

- ・ ホモジナイザー：ULTRA-TURRAX T25 (Janke and Kunkel)
- ・ 遠心分離機：マルチパーパス高速冷却遠心機 6800 (KUBOTA)
- ・ 恒温槽：EYELA BATH SB-9 (EYELA)
- ・ 分光光度計：Gene Quant 1300 (GE ヘルスケア)
- ・ 分光光度計 (RNA および DNA の濃度・純度測定)：Nano Vue Plus (GE ヘルスケア)
- ・ サーマルサイクラー：Takara PCR Thermal Cycler Dice Gradient (タカラバイオ)
- ・ アガロースゲル電気泳動槽：Mupid-2 plus (ADVANCE)
- ・ 超音波処理機：ULTRASONIC DISRUPTOR UD-200 (TOMY)
- ・ SDS-PAGE 槽：ラピダス・ミニスラブ AE-6530P (ATTO)
- ・ シークエンサー：ABI PRISM 3130 genetic analyzer (アプライドバイオシステム)

試薬

1. 酵素活性測定用試薬

- 1) 粗酵素液調製用緩衝液 (Sorensen, pH 7.3) 調製試薬: リン酸二水素カリウム (和光純薬)、リン酸水素二ナトリウム・12水和物 (和光純薬)

- 2) キチン分解酵素活性測定用緩衝液 (McIlvaine, pH 2.0-8.0) 調製試薬: リン酸水素二ナトリウム・12水和物 (和光純薬)、クエン酸一水和物 (和光純薬)
 - 3) キチン分解酵素活性測定用緩衝液 (Sorensen, pH 8.5-9.0) 調製試薬: グリシン (和光純薬)、塩化ナトリウム (和光純薬)、水酸化ナトリウム (和光純薬)
 - 4) 反応停止液調製試薬: 炭酸ナトリウム (和光純薬)
 - 5) キチン分解酵素活性測定用基質: pNp-(GlcNAc) (生化学工業)、pNp-(GlcNAc)₂ (生化学工業)、pNp-(GlcNAc)₃ (生化学工業)
2. total RNA 抽出試薬: ISOGEN I (ニッポンジーン)、ISOGEN II (ニッポンジーン)、イソプロパノール (和光純薬)、クロロホルム (和光純薬)、エタノール (和光純薬)
 3. DNase 処理試薬: RQ1 RNase-Free DNase (プロメガ)
 4. mRNA 精製試薬: *OligotexTM-dT30<Super>* mRNA Purification Kit (From Total RNA) (タカラバイオ)
 5. cDNA 合成試薬
 - 1) Reverse transcriptase: Reverse transcriptase M-MLV、5×Reverse transcriptase M-MLV buffer (RNase H-)、RNase Inhibitor (タカラバイオ)
 - 2) PrimeScript II Reverse Transcriptase: PrimeScript II Reverse Transcriptase、5×PrimeScript II Reverse Transcriptase buffer (タカラバイオ)
6. PCR 試薬
 - 1) Takara Ex Taq: Takara Ex Taq、10×Ex Taq Buffer (20 mM Mg²⁺ plus)、dNTP Mixture (2.5 mM each) (タカラバイオ)
 - 2) Platinum *pfx* DNA polymerase: Platinum *Pfx* DNA Polymerase、50 mM Magnesium Sulfate、10×*Pfx* Amplification Buffer、10×PCR Enhancer Solution (インビトロジェン)
 - 3) Go Taq Green Master Mix: Go Taq Green Master Mix (プロメガ)
 - 4) PrimeSTAR Max DNA polymerase: PrimeSTAR Max DNA polymerase (タカラバイオ)
 - 5) プライマー: 簡易カラム精製プライマー (北海道システムサイエンス)
 7. RACE 増幅用試薬

- 1) 5'および3'RACE 増幅用試薬: RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends (インビトロジェン)
- 2) 5'RACE (環状化) 増幅用試薬: 5'-Full RACE Core Set (インビトロジェン)
8. A-Tailing 用試薬: Takara Ex Taq HS (タカラバイオ)、dATP mixture (10 mM) (プロメガ)
9. アガロースゲル電気泳動用試薬
 - 1) TAE 緩衝液調製用試薬: トリスヒドロキシメチルアミノメタン (和光純薬)、酢酸 (和光純薬)、EDTA・2Na (和光純薬)
 - 2) アガロースゲル: アガロース S (ニッポンジーン)
 - 3) DNA 電気泳動用マーカー: HyperLadder (日本ジェネティクス)
 - 4) DNA 発色用試薬: SYBR Safe DNA Gel Stain (インビトロジェン)
10. ベクター
 - 1) サブクローニング用ベクター: pGEM-T Easy Vector (プロメガ)、pCR® Blunt II-TOPO® vector (インビトロジェン)
 - 2) 発現用ベクター: pNCMO2 vector (タカラバイオ)
11. ライゲーション試薬: T4 DNA ligase (プロメガ)、In-Fusion HD cloning kit (タカラバイオ)
12. 形質転換用菌体: ECOS™ Competent *E. coli* DH5 α (ニッポンジーン)、ECOS™ Competent *E. coli* JM109 (ニッポンジーン)、One Shot TOP10 competent cells (インビトロジェン)、*Brevibacillus* Competent Cells (タカラバイオ)
13. 培地用試薬
 - 1) LB 培地用試薬: LB Medium (フナコシ)、LB-Agar Medium (フナコシ)、アンピシリンナトリウム (ロシエ)
 - 2) MT 培地用試薬: Manganese (II) Sulfate tetrahydrate (Alfa Aesar)、硫酸亜鉛 7 水和物 (ナカライテスク)、硫酸第一鉄 (和光純薬)、D-グルコース (和光純薬)、BBC Phytton Pepton (Becton, Dickinson and Company)、Bacto Soyton (Becton, Dickinson and

Company)、DRIED YEAST EXTRACT SH (和光純薬)、エルリッヒカツオエキス (極東製薬)、ネオマイシン硫酸塩 (ナカライテスク)

14. プラスミド抽出キット : FastGene™ プラスミドミニキット (ファストジーン)

15. シーケンス PCR 用試薬 : BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (アプライドバイオシステム)