

博士學位論文

| | |
|---------|----------------------------------|
| 氏名（本籍） | 田畑 絵理（東京都） |
| 学位の種類 | 博士（工学） |
| 学位記番号 | 甲 第 165 号 |
| 学位授与年月日 | 令和 3 年 3 月 31 日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第 4 条第 1 項 |
| 学位論文題目 | 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 |

| | | | |
|--------|----|-------|---------|
| 論文審査委員 | 主査 | 小山 文隆 | 教授 |
| | 副査 | 今村 保忠 | 教授 |
| | 〃 | 南雲 紳史 | 教授 |
| | 〃 | 澤村 直哉 | 早稲田大学教授 |

目次

| | |
|--|-----|
| 第1章 序論..... | 3 |
| 第1節 背景..... | 3 |
| 1. キチン..... | 3 |
| 2. キチナーゼ..... | 3 |
| 3. ほ乳類キチナーゼ..... | 3 |
| 4. ほ乳類キチナーゼと疾患..... | 4 |
| 5. 人口増加と食糧..... | 4 |
| 第2節 目的..... | 5 |
| 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..... | 6 |
| 第1節 緒言..... | 6 |
| 第2節 実験材料と方法..... | 6 |
| 第3節 結果..... | 12 |
| 1. ニワトリ Chia の遺伝子発現解析と酵素機能解析..... | 12 |
| 2. ブタ Chia の消化酵素としての機能解析..... | 27 |
| 3. コモンマーモセット CHIA の消化酵素としての機能解析..... | 43 |
| 4. イヌとウシ Chia の機能解析..... | 57 |
| 第4節 考察..... | 70 |
| 第3章 不活性化酵素の活性化と食性に伴う Chia の分子進化の解明..... | 73 |
| 第1節 緒言..... | 73 |
| 第2節 実験材料と方法..... | 73 |
| 第3節 結果..... | 82 |
| 1. イヌ Chia 不活性化の原因アミノ酸の同定..... | 82 |
| 2. 食肉目動物 Chia の偽遺伝子化..... | 86 |
| 3. 食虫性のスカンク, ミーアキャット Chia の機能..... | 88 |
| 4. 食肉目動物 Chia の分子進化モデル..... | 88 |
| 第4節 考察..... | 90 |
| 第4章 Chia の精製法の確立とキトオリゴ糖の作製への応用..... | 92 |
| 第1節 緒言..... | 92 |
| 第2節 実験材料と方法..... | 93 |
| 第3節 結果..... | 97 |
| 1. キチンカラムと酢酸を用いた Chia の精製..... | 97 |
| 2. Chia によるキチンオリゴ糖の作製..... | 107 |
| 第4節 考察..... | 121 |

| | |
|-----------------|-----|
| 第 5 章 総合考察..... | 125 |
| 第 6 章 結論..... | 128 |
| 参考文献 | 129 |
| 謝辞..... | 145 |

第1章 序論

第1節 背景

1. キチン

キチンは、*N*-アセチル-*D*-グルコサミン (GlcNAc) が β -1,4 結合した直鎖状の多糖で、多くの生物の主要な構造ポリマーとして機能する [1]。キチンは、陸上から水中の生息環境に存在する多様な生物 (昆虫 [2-4], クモ [5], 真菌類 [6-9], 原生生物 [10, 11], カニ [12, 13], ロブスター [14], エビ [15, 16], サンゴ [17], 軟体動物 [18, 19], 多毛類 [20], 珪藻 [21, 22], 淡水および海生海綿 [23-25]) の構成成分である。このように、キチンは、多彩な生物種の構成成分なので、地球上で二番目に多く存在するバイオマスである [26, 27]。キチンには、分子鎖の配向とパッキングが異なる3つの多形、 α [28-30], β [30], および γ キチン [31, 32] が存在する。天然において、伸びたキチン鎖が微結晶性繊維を形成し、水素結合が鎖間で形成され、 α -キチンは逆平行、 β -キチンは平行、 γ -キチンは混合された形で配置している。キチンは、その内分子中の水素結合により、水、弱酸または弱塩基、有機溶媒には不溶である [1]。

2. キチナーゼ

キチナーゼ (EC 3.2.1.14; KO 1183) は、キチンの β -1,4 グリコシド結合を加水分解し、細菌、真菌、線虫、節足動物などの生物において、キチンの代謝に不可欠で重要な酵素である [33, 34]。

3. ほ乳類キチナーゼ

マウスやヒトなどのほ乳類はキチンを合成しないが、二つの活性型キチナーゼ、キトトリオンダーゼ (Chit1) と酸性キチナーゼ (acidic chitinase, Chia: 別名称, 酸性ほ乳類キチナーゼ, AMCase) を発現している [33, 34]。これらのほ乳類のキチナーゼは、糖質分解酵素 (glycoside hydrolase, GH) 18 ファミリーに属している [27, 34, 35]。

Chit1 は、ゴーシェ病患者のマクロファージで同定された最初のほ乳類キチナーゼである [36-38]。Chit1 のレベルは、常染色体劣性遺伝リソソーム蓄積病であるゴーシェ病患者の血漿中で顕著に上昇する [36]。Chia は、ほ乳類で二番目に発見されたキチナーゼで、酸性側に等電点をもつことからそのように命名された [39]。Chia は、マウスの胃と肺組織で高く発現し、pH 2.0 で最も高い活性を有し、キチン含有病原体からの生体防御を担っていると考えられている [39-44]。

4. ほ乳類キチナーゼと疾患

Chit1 と Chia は、特定の病態下でその発現量が変動することから、高い関心を集めている。Chit1 のレベルは、ゴーシェ病、慢性閉塞性肺疾患 (COPD)、アルツハイマー病、アテローム血栓症、真性糖尿病、嚢胞性線維症、ならびに喫煙者で著しく発現が上昇する [36, 45-50]。

Chia mRNA とタンパク質レベルの顕著な変化が、喘息、アレルギー性炎症、ドライアイ症候群、胃がんなどの病態で報告されている [51-58]。さらに、Chia の特定の遺伝子多型がヒトの喘息と関連することも報告されている [58-61]。最近、Chia が、マウスの肺で恒常的に合成され、気道でキチンを分解し、肺の機能維持のための重要な酵素として機能することが示された [62, 63]。さらに、Chia はマウスの宿主の消化器管 (gastrointestinal tract, GIT) 系で、腸内線虫に対する防御の免疫応答として働くことも報告されている [64]。

5. 人口増加と食糧

人口の増加に伴い、世界の食肉消費量が増加している。その供給量を確保するためには、限られた土地や水資源の中で、家畜飼料の持続的な増産が必要とされる [65]。これらの問題に対する有望な解決策は、栄養価に富み、低環境負荷で育つ、適当な生物種を家畜飼料として用いることである [66, 67]。約 1,900 種の昆虫が、2 億人以上の人々によって、動物性タンパク質の代わりとして日常的に消費されている [67]。

昆虫や真菌類は地球上に広く生息しており、代表的なキチン含有生物である。特に昆虫は、栄養価、生産コスト、環境への負荷が少ないため、最近、潜在的な新規動物飼料資源として注目を集めている [65, 66, 68]。多くの消費者にとって、昆虫などのキチン含有生物を栄養源として直接摂取するよりも、家畜飼料として間接的に利用することの方が、より受け入れやすいと考えられる。しかし、これらの利点にも関わらず、キチン含有生物を家畜飼料として利用する試みはあまり進んでいない [69]。これは、キチンが長い間、家畜体内において、難消化性の食物繊維であると考えられてきたことによる [70]。さらに、キチン含有生物の家畜の健康や生育への影響に関する研究があまり進んでいないことにもよる [67, 69, 71]。

第2節 目的

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。この理由の一つに、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みなされてきたことが挙げられる。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 [41, 72]。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どうかを検証し、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、生物医学的な利用で注目を集めているキトオリゴ糖の生産に利用できるかどうかを検討した。

第2章 ほ乳類，鳥類における Chia の遺伝子発現と酵素機能の解析

第1節 緒言

Chia は，マウスの胃で過剰発現していることが報告されている [39, 41]。Chia は，その至適が pH 2.0 であることから，消化物に含まれるキチン含有病原体に対する生体防御の一部を担うだけでなく，食物中のキチンを分解する消化酵素として機能する可能性が示唆されていた。Ohno らの研究によって，マウス Chia が，消化器系条件下でプロテアーゼ耐性の主要な糖質分解酵素として機能し得ることが明らかとなった [72]。しかし，家畜を含めた他の動物における Chia の生理学的な役割は不明であった。

本章では，主要な家畜動物であるニワトリ，ブタ，ウシと，飼育動物であるイヌ，コモンマーモセットの Chia が，GIT 条件下で，キチン含有生物を分解する消化酵素として機能し得るかどうかを検討した。さらに，その翻訳産物である Chia をニワトリの腺胃またはブタの胃から精製し，模倣的な GIT 条件下で，ミールワーム幼虫の殻のキチンの分解性を検討した。そして，マウス，ニワトリ，ブタ，ウシ，イヌの胃における Chia mRNA レベルと，大腸菌で発現したこれらの動物の Chia 酵素のキチナーゼ活性を測定した。

第2節 実験材料と方法

ニワトリ，ブタ，ウシの胃組織

白色レグフォンの腺胃，筋胃，6 ヶ月齢の雄ブタ（ランドレース F1）の胃，ウシの第一胃，第二胃，第三胃，第四胃は，Funakoshi 社から購入した。採取した胃組織は，速やかに凍結し，-80°C に保存した。

コモンマーモセット組織

マーモセットは，実験動物中央研究所で，既報と同様の条件下で飼育された [73]。マーモセットは L(+)-アスコルビン酸，ビタミン A，D3，E，ハチミツを含むバランス飼料ペレットを与えられた。さらに，マーモセットは，カステラとビスケットを添加物として与えられた。

全ての動物実験は，実験動物委員会（CIEA ref. nos 12025 及び 13071）によって承認され，実験動物の適正な実施に向けたガイドライン（日本学術会議）と CIEA のガイドラインに則って行った。動物管理は，実験動物の管理と使用に関する指針（研究用動物資源協会，2011）を遵守して行った。

マーモセット組織は，7 年齢の雌マーモセット（265 g, Animal I4704F）から採取した。試料採取は，ケタミン（50 mg/kg）およびキシラジン（1.5mg/kg）下

の全採血による安楽死およびイソフルエン全身麻酔後に行った。摘出した組織は液体窒素で凍結させ、 -80°C で保存した。

RNA および cDNA の調製

ニワトリ、ブタ、ウシ、イヌ Total RNA パネル (Zyagen 社) を用い、cDNA を合成した [72]。同様に、マウス Total RNA パネルは Takara Bio 社から購入し、胃 total RNA から cDNA を合成した。これらに加え、TRIzol 試薬 (Thermo Fisher Scientific 社) を用いて、ニワトリ、ブタ、ウシの胃およびCOMMONマウスモセットの各組織から total RNA を製造者のプロトコールに従って調製し、cDNA へと逆転写した [72]。

qPCR 用のプライマー対の選択

定量 PCR (quantitative PCR, qPCR) のプライマーは、PrimerQuest Input (Integrated DNA Technologies 社) で設計した。qPCR へのプライマーの適合性は、産物が一本の T_m を与えたかどうかで判断した。PCR は、 $2\times$ SYBR Green Master Mix (Brilliant II SYBR Green QPCR Master Mix, Agilent 社)、各 cDNA または standard DNA (下記参照) 2.7 ng とプライマー [Chia, pepsinogen A, H^+/K^+ -ATPase, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)] 2.5 pmol を含む、全量 13 μL 中で反応させた。PCR 反応は Mx3005P QPCR システム (Agilent 社) を用いて行った: 最初の変性およびポリメラーゼ活性ステップを 95°C で 10 分間、続いて、変性 95°C で 30 秒間、アニーリング 55°C で 30 秒間、伸長反応 72°C で 10 秒間を 40 サイクル行った。融解曲線は増幅後に作成した。

Standard DNA の構築と qPCR

ニワトリ standard DNA は、Chia, GAPDH, pepsinogen A および H^+/K^+ -ATPase の 4 遺伝子から構成され、化学合成後、pTAKN-2 ベクターに挿入された (Eurofins Genomics 社)。Standard DNA (389 bp) は、プラスミド DNA から、forward プライマー 5'-GCTGGACATTGACTGGGAATA-3' と reverse プライマー 5'-GTAATCTGGCTCGTAGGGATTG-3' を使用し、PCR 増幅した。

ブタ standard DNA は、Chia, pepsinogen A, pepsinogen C, H^+/K^+ -ATPase, gastrin, gastric intrinsic factors, mucin の 10 遺伝子から構成され、化学合成後、pTAKN-2 ベクターに挿入された (Eurofins Genomics 社)。Standard DNA (956 bp) は、プラスミド DNA から、forward プライマー 5'-TTGCCGTCCTGCATATT-3' と reverse プライマー 5'-CAAGGTCAAGGCCATCAAA-3' を使用し、PCR 増幅により調製した。

マウスモセット standard DNA は、CHIA, CHIT1, GAPDH, pepsinogen A,

H⁺/K⁺-ATPase の 5 遺伝子から構成され、化学合成後、pTAKN-2 ベクターに挿入された (Eurofins Genomics 社)。Standard DNA (399 bp) は PCR 増幅によってプラスミド DNA から、forward プライマー 5'-GTGGCCTGTACCCTGACC-3' と revers プライマー 5'-GTCACAATGGAGGCAAAGTTATC-3' を使用し、PCR 増幅により調製した。

マウス、ニワトリ、ブタ、イヌ、ウシの Chia, Chit1, pepsinogen, GAPDH 遺伝子を含む計 18 遺伝子から成る standard DNA は、化学合成後、pTAKN-2 ベクターに挿入された (Eurofins Genomics 社)。Standard DNA (2,039 bp) は、プラスミド DNA から、forward プライマー 5'-GCTGCTGGTATCTCCAACAT-3' と revers プライマー 5'-TGGGCGTGGCTCAGGTAT-3' を使用し、PCR 増幅により調製した。

qPCR 反応は、2 x SYBR Green Master Mix, 2.7 ng の各 cDNA または適切に希釈した standard DNA と 2.3 pmol のプライマーを含む終量 13 µL 中で行った。Real-time PCR は Mx3005P (Agilent 社) を用いた: 最初の変性とポリメラーゼ活性化ステップは、95°C, 10 分間行い、その後、95°C で 30 秒、アニーリングを 55°C で 30 秒、伸長反応を 72°C で 10 秒間の反応を 40 サイクル行った。それぞれの分析は 3 回行った。

胃抽出液の調製

ニワトリの腺胃 (0.1 g), ブタの胃 (0.2 g), コモンマーモセットの胃 (0.1 g), ウシの第四胃 (0.2 g) 組織をプロテアーゼ阻害剤非存在下でホモジナイズし、4°C, 15,000 g で 10 分間遠心した。胃抽出液として回収した上清に Gly-HCl 緩衝液 (pH 2.0) を終濃度 0.1 M になるよう加え、37°C で 0, 10, 40, 60 分間インキュベートした。反応後、1 M Tris-HCl (pH 7.6) を加えて中和した。ニワトリ、ブタ、コモンマーモセットについては、pH 7.6 の条件下、trypsin (Sigma-Aldrich 社) と chymotrypsin (Sigma-Aldrich 社) の等量の混合物 (10 µg) を反応溶液に加え、さらに 37°C で 1 時間反応させた。反応後、プロテアーゼインヒビター (Complete Mini, Roche 社) を加えた。

胃組織から Chia の精製

ニワトリ腺胃組織 (0.1 g), ブタの胃組織 (1 g) を、プロテアーゼインヒビター (Complete Mini) を含む 10 倍量の氷冷した TS 緩衝液 [20 mM Tris-HCl (pH 7.6), 150 mM NaCl] 中、テフロン/ガラスホモジナイザーを用いてホモジナイズした。その後、4°C, 15,000 g, 10 分間遠心し、上清を可溶性溶液として用いた。可溶性溶液はキチンビーズ (New England Biolabs 社) 3 mL を TS 緩衝液で平衡化したカラムに供した。キチンビーズカラムを密封し、4°C で 1 時

間穏やかに混合させた。TS 緩衝液による十分な洗浄後，結合したキチナーゼは 8 M 尿素でカラムから溶出させ，TS 緩衝液で平衡化した PD-10 (GE Healthcare 社) によって脱塩した。タンパク質濃度は，ウシ血清アルブミンを標準として，Bradford Protein Assay (Bio-Rad 社) により，BioPhotometer Plus UV/Vis photometer (Eppendorf 社) で測定した。Chia のユニットの定義は以前の報告のとおりに行った [42]。

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動と CBB または SYPRO Ruby 染色

得られたタンパク質溶液は，標準的な SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) [74] 後，Coomassie Brilliant Blue R-250 (Sigma-Aldrich 社) (CBB) 染色または SYPRO Ruby (Thermo Fisher Scientific 社) 染色を行った。分子量マーカーは All Blue (Bio-Rad 社) を用いた。撮影はルミノ・イメージアナライザー (ImageQuant LAS 4000, GE Healthcare 社) で行った。

N 末端アミノ酸配列分析

ニワトリの腺胃から精製されたタンパク質画分を 12.5% SDS-PAGE で分離し，ポリフッ化ビニリデン (PVDF) 膜 (Immobilon-P, Merck 社) に転写した後，CBB で染色した。膜上の 54 kDa と 57 kDa のバンドを切り出し，Procise 492 (Applied Biosystems 社) を使用したエドマン分解による N 末端配列解析を行った。

ザイモグラフィー解析

ザイモグラフィーは 0.1% Ethylene glycol chitin (FUJIFILM Wako Pure Chemical 社) を含む標準 SDS-PAGE ゲル [74] を用いた。SDS および還元剤を含まないサンプル緩衝液を使用し，熱変性せずにサンプルをゲルに供した。電気泳動後，ゲルをリフォールディング緩衝液 I [1% (V/V) Triton-X-100, 50 mM Gly-HCl (pH 2.0)] 中，37°C で 1 時間インキュベートした。その後，ゲルをリフォールディング緩衝液 II [1% (V/V) Triton-X-100, 50 mM Gly-HCl (pH 7.6)] に浸漬させ，37°C，一晩インキュベートした。リフォールディング後，ゲルは 0.01% (W/V) Calcofluor White M2R (Sigma-Aldrich)，50 mM Tris-HCl (pH 7.6) によって染色した。30 分間穏やかに振とう後，発色液をアルカリ性にした。ゲルはルミノ・イメージアナライザーで解析した。その後，ゲルを CBB で染色した。分子量マーカーは，SDS-PAGE とザイモグラムのバンド移動度の違いを示す。

キチナーゼ活性測定

キチナーゼ活性は合成発色基質である 4-nitrophenyl-*N,N'*-diacetyl- β -D-chitobioside [4-NP-(GlcNAc)₂] (Sigma-Aldrich 社) を使用して測定した。全ての酵素反応は、全量 50 μ L 中で行った [42]。

プロテアーゼ処理

精製酵素 (1.5 μ g) は、等量の pepsin A (Worthington 社) (1.5 μ g) を加えた 0.1 M Gly-HCl (pH 2.0) 中、または重量を基準に 1:1 に混合した trypsin/chymotrypsin (1.5 μ g) の混合物を加えた 0.1 M Tris-HCl (pH 7.6) 中で、37°C、0, 10, 40, 60 分間反応させた。反応後、プロテアーゼ阻害剤を加え、酸性条件は 1 M Tris-HCl (pH 7.6) によって中和した。

ミールワーム

ジャンボミールワーム (*Tenebrio molitor*) の幼虫は国内の販売店から購入した。幼虫は脱イオン水に浸漬して屠殺した後、乾燥重量を測定した。結合組織を含んだ殻の部分をキチン-タンパク質複合体基質として用いた。

精製 Chia によるコロイダルキチン、結晶性キチン、ミールワーム幼虫の殻の分解

結晶性キチンは、エビの殻のキチン (Sigma-Aldrich 社) を粒径サイズ 250 μ m に粉砕して調製した。コロイダルキチンは、結晶性キチンを濃塩酸中、40°C で 30 分間インキュベートし、ろ過後に純水で十分洗浄させることで中性に戻してから使用した [42, 72, 75]。コロイダルキチン (終濃度 1 mg/mL)、結晶性キチン (1 mg)、およびミールワーム幼虫の殻 (1 mg) は、精製酵素 (1.6 mU) と、等量の pepsin A を含む全量 50 μ L 中、pH 2.0、37°C で 1 時間、胃を模倣した条件下で反応させた。その後、精製酵素と等量の trypsin/chymotrypsin を加え、pH 7.6、37°C の腸を模倣した条件下でさらに 1 時間反応させた。GIT 条件下で生成されたキチン断片は、蛍光標識糖電気泳動 (fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis, FACE) 法によって解析した。N-アセチルキトオリゴ糖 (Seikagaku Corporation) を標準物質として用いた。

酵素反応は上述と同様に、ニワトリの腺胃から調製した可溶性タンパク質溶液 (1.6 mU) を含む反応溶液中で行った。可溶性タンパク質溶液中のプロテアーゼ活性を抑制するために、pepstatin A (Sigma-Aldrich 社) を終濃度 1 μ g/ μ L [76] になるように添加した。生成されたキチン断片は上記のように分析した。

コロイダルおよび結晶性キチンは、精製ブタ Chia (4 mU) または可溶性タンパク質溶液 (4 mU) を含む全量 50 μ L 中で反応させた。ミールワーム幼虫の殻は可溶性タンパク質溶液 (20 mU) を含む反応液中で同様に反応させた。分解産

物は FACE 法によって解析した。

コロイダルキチン (終濃度 1 mg/mL) または結晶性キチン (1 mg) は、全量 50 μ L 中、pepsin (0.6 μ g) または trypsin/chymotrypsin (0.6 μ g) 存在下、組換え体ウシ (0.01 mU) またはイヌ Chia (0.03 mU) と反応させた。

ウェスタンブロット

マウス C 末 Chia 抗体またはブタ pepsin 抗体 (GeneTex 社) を使用したウェスタンブロットによって解析した。

胃抽出液によるショウジョウバエの翅のキチン分解

ショウジョウバエ (*D. melanogaster Oregon-R*) は岡山大学の施設で飼育された。ハエをエタノールに一度浸漬した後、翅を採取した。50 枚の翅は TaKaRa BioMasher Standard (TaKaRa Bio 社) を用いてホモジナイズ後、上述のミールワーム殻と同様に胃抽出液に作用させた。37°C で 16 時間反応後、分解産物は上述の方法で、FACE 法によって解析した。分解前後の翅の形態を観察するため、翅を胃抽出液で処理後、高撥水性印刷スライドガラス (TF1205, Matsunami Glass Ind 社) を使用して、0.1 M Gly-HCl (pH 2.0) 中に 9 mU の Chia 活性を含む胃抽出物を最終量 10 μ L で処理した。形態変化は実体顕微鏡 (M205 C, Leica Microsystems 社) を用いて評価した。詳細な翅の観察は、走査型電子顕微鏡 (SEM, JCM-6000, 加速電圧: 15 kV, JEOL Ltd) を用いた。観察サンプルの表面を帯電させることなく鮮明な SEM 観察を行うため、薄くて均一なイオン液体コーティング層 [77] を形成させるための前処理を行った。サンプルを 10% 1-hexyl-3-methylimidazolium bis (fluorosulfonyl) imide (Mitsubishi Materials Electronic Chemicals Co., Ltd) のイオン液体-エタノール混合溶液に浸漬した。その後、観察前に浸漬した翅サンプルを室温で 1 時間以上乾燥させ、エタノールを除去した。

大腸菌発現ベクターの構築

ニワトリ、ブタ、ウシ、イヌ Chia cDNA の成熟型のコード領域は、各種の cDNA から KOD Plus DNA ポリメラーゼ (Toyobo 社) および EcoRI と XhoI の制限酵素サイトを付加させたオリゴヌクレオチドプライマー (Eurofins Genomics 社) を用いて PCR によって増幅させた。増幅させた cDNA は EcoRI と XhoI で切断後、同じサイトを持つ pEZZ18/pre-Protein A-Chia-V5-His ヘクローニングした。得られたプラスミド DNA (pEZZ18/Chia/V5-His) の全塩基配列はシーケンスによって決定した (Eurofins Genomics 社)。マウス Chia の発現は pEZZ18/pre-Protein A-Chia-V5-His を用いた [42]。これらのプラスミド DNA を

大腸菌で発現させると、Protein A-Chia-V5-His が生産される。

大腸菌で発現させた組換え体 Chia の調製

Pre-Protein A-Chia-V5-His タンパク質を発現させるために、プラスミド DNA (pEZZ18/pre-Protein A-Chia-V5-His) を用いて、大腸菌 BL21 (DE3) 株 (Merck Millipore 社) を形質転換した。形質転換した大腸菌をアンピシリン 100 µg/mL を含む 1.5 L LB 培地中で 37°C, 18 時間培養した。大腸菌を 4°C, 7,000 g で 20 分間遠心することにより回収した。組換えタンパク質は大腸菌から IgG セファロース (GE Healthcare) クロマトグラフィーで精製した [42]。その後 TS 緩衝液で平衡化した PD MidiTrap G-25 によって脱塩した。大腸菌組換えタンパク質は V5-HRP モノクローナル抗体 (Thermo Fisher Scientific 社) を用いてウェスタンブロットによって検出した。

統計解析

生化学データは Student's t-test で検定した。

第 3 節 結果

1. ニワトリ Chia の遺伝子発現解析と酵素機能解析

遺伝子発現解析

ニワトリは二つの胃組織、腺胃と筋胃をもつ。そこで、腺胃と筋胃における Chia mRNA レベルをニワトリの主要 9 組織と共に解析した。多くのほ乳類は、そのゲノム上に 2 つのキチナーゼ遺伝子、Chia と Chit1 遺伝子、を持つが、家禽であるニワトリ、カモ、ダチョウ、ウズラなどの鳥類は、NCBI Genome データベース上で、Chit1 遺伝子が報告されていない。そのため、ここでは Chit1 は解析しなかった。ニワトリの主要遺伝子の発現を解析するための standard DNA は、Chia, GAPDH, pepsinogen A と H⁺/K⁺-ATPase の各 cDNA を 1 分子ずつ連結することで構築した (図 1-1)。そして、既に報告した qPCR システムを用いて、Chia の遺伝子発現解析を行った [41, 43, 72]。

Chia mRNA レベルは、腺胃で顕著に高く、次いで脾臓、筋胃、肝臓、腎臓で比較的高く、筋胃では腺胃の 50 分の 1 程度の発現であった (図 1-2A)。これらの結果は、*in situ hybridization* によって、Chia mRNA がニワトリの腺胃の胃酸分泌細胞および肝臓の肝細胞で発現すること [78]、ブロイラーチキンの筋胃でキチナーゼが分泌される [79] などの先行研究と本質的に一致していた。今回、解析したニワトリの脾臓で Chia mRNA の高い発現が見られた (図 1-2A)

が、これまでに脾臓での Chia の高い発現と疾患との関係は報告されていない。脾臓は、成鳥で B 細胞と T 細胞が成熟する主要な二次免疫器官である [80]。もしかすると、解析したニワトリ個体では、何らかの免疫応答の結果として、Chia の高い発現が検出された可能性がある。しかし、Chia を過剰発現させたトランスジェニックマウスが自発的な炎症の兆候を示さない [62] ことから、胃や脾臓組織における Chia の高い発現は、ニワトリの健康に直接的な影響を与えている可能性は低いと考えられた。

次に、Chia の発現レベルを、pepsinogen A, H^+/K^+ -ATPase, GAPDH と比較した。Pepsinogen A は不活性型チモーゲンで、胃の酸性下で pepsin A へと自己消化され、活性化する [81]。 H^+/K^+ -ATPase は pepsinogen を活性化させるための H^+ の分泌に関係している [82]。GAPDH はよく知られたハウスキーピング遺伝子であり、多くの組織、細胞で恒常的に高いレベルで発現している [83]。

ニワトリ Chia mRNA は GAPDH および H^+/K^+ -ATPase よりも顕著に高く、pepsinogen A に次いで腺胃で二番目に多量に発現しており、マウスの胃における Chia と同様に高い転写物であった (図 1-2B)。Chia の相対的な発現レベルは、GAPDH のレベルを 1.0 とすると、Chia は 403, pepsinogen A は 1,176, H^+/K^+ -ATPase は 4.0 であった (図 1-2B)。これらの結果は、Chia mRNA はニワトリ腺胃で主要な転写物であり、その翻訳産物が、ニワトリの消化器系で重要な生理学的役割を担っている可能性を強く示唆した。

A

| | | | |
|------|-------|-------|--------|
| Chia | GAPDH | Pep A | ATPase |
|------|-------|-------|--------|

B

GCTGGACATTGACTGGGAATACCCTGGATCAAAGGGCAGCCCTT
 CTCAGGACAAAGGTCTCTTCACCGTCCTTGTTCAACGGATT
TGGCCGTATTGGCCGCCTGGTCACCAGGGCTGCCGTCCTCTCTG
 GCAAAGTCCAAGTGGTGGCCATCAATTGATCCCTTCATCGATCTG
AACTGTGGGTGCCCTCTATCTATTGCAAAAGCTCGGCCTGCAGC
 AACCACAAACGCTTTGACCCCTCCAAGTCCTCAACCTACGTGAG
 CACCAACGAAACCGTCTACATCGCCTACCCTGTACTACCTGGCC
TTCTACGTGGTGATGACTGGGATCTTCGCCCTCTCCATATACTC
 CCTAATGAGGACGGTCAATCCCTACGAGCCAGATTAC

図 1-1. qPCR に用いた standard DNA

(A) Standard DNA の模式図。(B) Standard DNA の塩基配列。この standard DNA は 389 塩基対であり, Chia, GAPDH, pepsinogen A, H⁺/K⁺-ATPase の cDNA 断片を含む。PCR のターゲット領域は下線で示した。赤, Chia; 紫, GAPDH; 緑, pepsinogen A; オレンジ, H⁺/K⁺-ATPase。

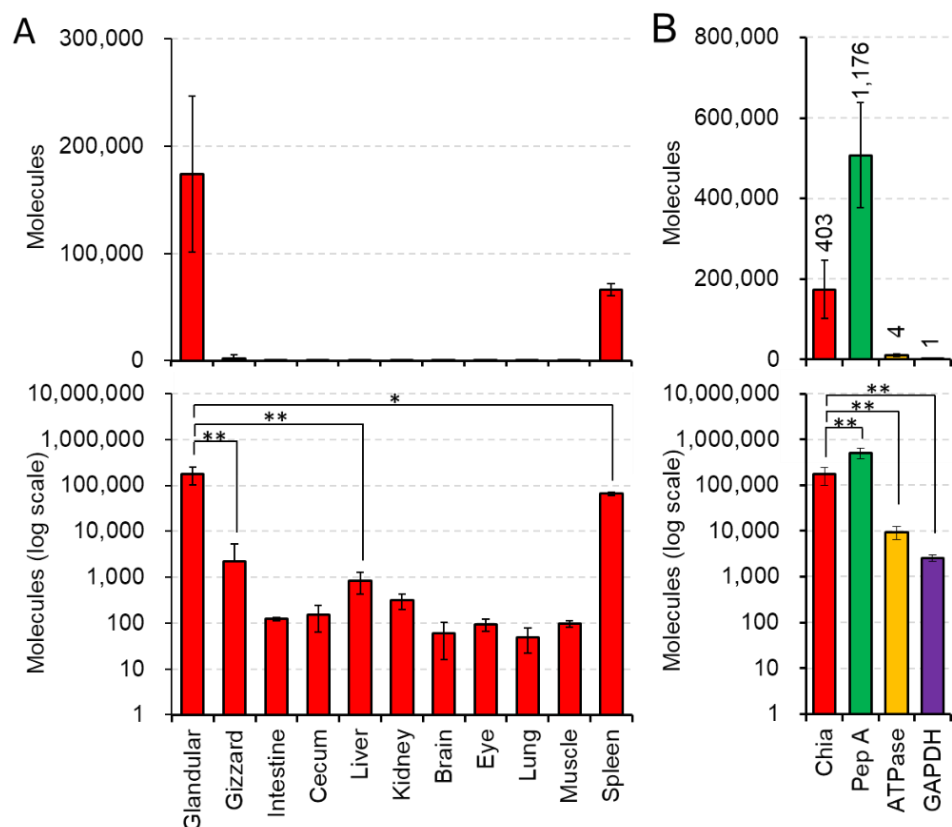


図 1-2. Chia mRNA は腺胃組織で高く発現する

ニワトリ組織における Chia mRNAs の発現レベルは、standard DNA を用いた qPCR によって同一尺度で定量した。(A) ニワトリの 11 組織における Chia mRNA レベル。(B) 腺胃組織における 4 種類の遺伝子の mRNA レベルを qPCR によって定量した。Y 軸は total RNA 10 ng あたりの分子数を表す。図中の数字は、GAPDH の発現レベルを 1.0 とした場合の相対発現レベルを示している。Pep A, pepsinogen A; ATPase, H^+/K^+ -ATPase。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 。P 値は Student's t-test によって決定した。エラーバーは、同一の実験を 3 回行って算出した標準偏差を示す。

ニワトリ腺胃から Chia の精製

ニワトリ Chia は、N 末領域の触媒ドメイン (catalytic domain, CatD) と C 末領域のキチン結合ドメイン (chitin binding domain, CBD) から構成される。Chia の CBD のキチン結合活性によるキチンビーズクロマトグラフィーを用いて、ニワトリ腺胃からニワトリ Chia 精製画分を得た。精製のまとめを表 1 に示した。SDS-PAGE と CBB 染色によって、主要な 54 kDa と微量の 57 kDa のバンドを検出した (図 1-3A)。これらのバンドの N 末端アミノ酸配列の解析を行い、54 kDa からは YVLSXYFT の配列を、57 kDa からは YVLS の配列が、それぞれ得られた。これらの配列は、ニワトリ Chia の成熟型 (GenBank Accession Number, NP_989760.1) の N 末アミノ酸配列と一致した。これらのことから、キチンビーズ精製画分に認められた主要な 54 kDa と微量の 57 kDa はニワトリ Chia であることが分かった。これら二つの成分の移動度の違いは、リン酸化または糖鎖付加のような翻訳後修飾によるものと考えられた。

さらに、ザイモグラフィーで精製画分のキチナーゼ活性を解析した。キチナーゼ活性を保つために、サンプル緩衝液から SDS と還元剤を除き、加熱せずに泳動した。ザイモグラフィーによって、54 kDa (図 1-3B, 左) 付近に強いキチナーゼ活性が認められた。続く CBB 染色では、54 kDa にバンドを検出した (図 1-3B, 右, 矢印)。以上のことから、腺胃からニワトリ Chia を精製できたと考えた。

さらに Chia の酵素化学的性質を明らかにするため、4-nitrophenyl *N,N'*-diacetyl- β -D-chitobioside [4-NP-(GlcNAc)₂] を基質に用いて、pH 1.0-8.0 においてキチナーゼ活性を測定した。精製 Chia は最大活性を pH 2.0 にもち、その活性は弱酸性から弱アルカリ性 (pH 3.0-8.0) にかけて低下した (図 1-3C)。pH 2.0 におけるキチナーゼ活性は、McIlvaine 緩衝液よりも、Gly-HCl 緩衝液を用いた場合の方が高かった。

酵素活性における温度の影響を、pH 2.0 の 0.1 M Gly-HCl 緩衝液を用いて、30-64°C の範囲で、同様の基質を用いて、30 分間反応させた。図 1-3D に示すように、Chia のキチナーゼ活性は温度上昇につれて増大し、最大活性を 58°C で示し、その後急激に低下した。

表 1 ニワトリの腺胃から Chia の精製

実験方法に記載のように，1 g の腺胃から精製タンパク質を調製した。

| 精製ステップ | 全活性 (mU) | 総タンパク質 量 (mg) | 比活性 (mU/mg) | 収率 (%) |
|-----------------|--------------|------------------|----------------|-----------|
| 全可溶性タン パク質画分 | 5845.7±239.0 | 36.4±4.6 | 160.6±6.6 | 100 |
| キチンビーズ 素通り画分 | 660.1±24.3 | 25.6±1.2 | 25.8±1.0 | 11.3±10.2 |
| 精製酵素 | 440.8±11.8 | 0.15±0.04 | 2862.1±326.4 | 7.5± 4.9 |

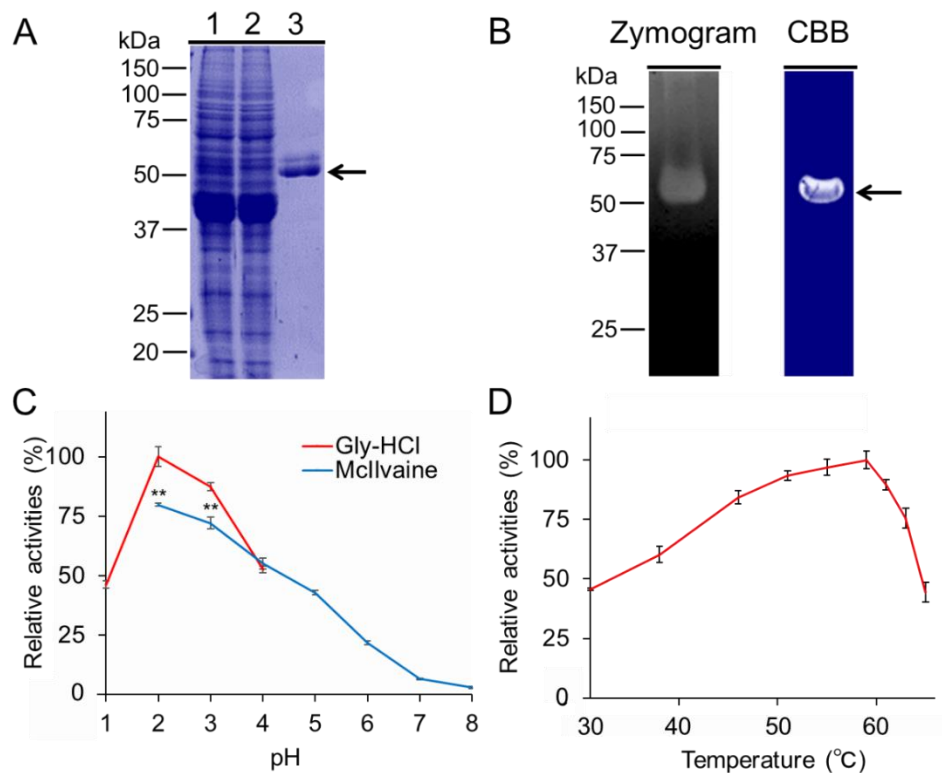


図 1-3. ニワトリ腺胃から Chia の精製とその性質

(A) Chia は、ニワトリの腺胃組織からキチンビーズクロマトグラフィーによって精製し、SDS-PAGE によって分離し、CBB 染色で可視化した。1, 抽出液; 2, 素通り; 3, 精製酵素。精製酵素は、約 1.0 μg のタンパク質量である。(B) ニワトリ Chia のザイモグラム。電気泳動後、ザイモグラフィー (左) で解析し、その後、ゲルを CBB (右) によって染色した。(C) 至適 pH, (D) 至適温度。
* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 。P 値は Student's t-test によって決定した。エラーバーは、同一の実験を 3 回行って算出した標準偏差を示す。

Chia のプロテアーゼ耐性の検討

ニワトリ Chia のプロテアーゼ耐性を検討するため、精製 Chia を、pepsin と 1:1 の比 (各 1.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) で pH 2.0 で反応した。図 1-4A に示すように、精製した Chia は、pH 2.0 における 1 時間の pepsin 処理でも大きな変化が無かった。さらに、そのキチナーゼ活性も pepsin 処理の影響を受けなかった (図 1-4B)。反応開始のキチナーゼ活性を 100% とすると、1 時間後では、Chia の活性はほぼ保持されていた。

次に、精製 Chia と trypsin/chymotrypsin を 1:1 の比 (各 1.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) で、腸を模倣した条件で反応した。図 1-4C に示すように、Chia は 1 時間反応しても依然として明確なバンドとして検出された。さらに、胃の条件と同じく、キチナーゼ活性は保持されていた (図 1-4D)。これらの結果から、Chia が胃と腸のプロテアーゼに耐性があることが分かった。

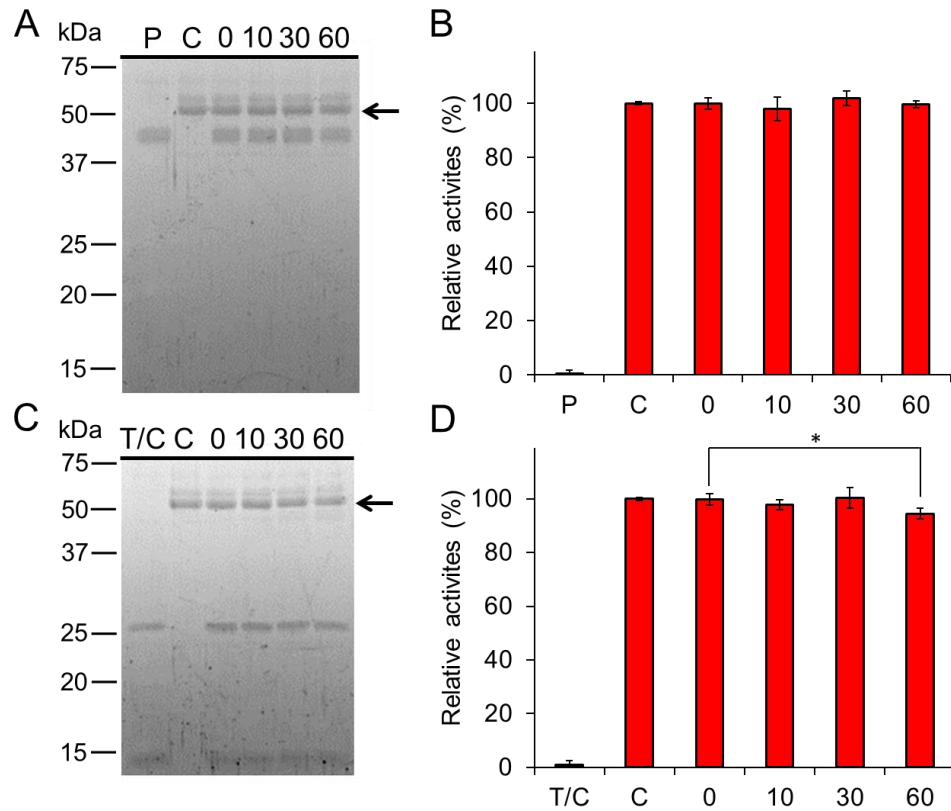


図 1-4. ニワトリ Chia の消化器系プロテアーゼに対する機能的安定性

精製 Chia は、等量の pepsin あるいは trypsin/chymotrypsin を加え、胃または腸の条件下で、0, 10, 30, 60 分間反応させた。サンプルは、SDS-PAGE で分離し、(A, C) SYPRO Ruby 染色と、(B, D) キチナーゼ活性測定によって解析した。C, 精製酵素のみ; P, pepsin のみ; T/C, trypsin/chymotrypsin のみ; 数字, 反応時間。* $p < 0.05$ 。P 値は Student's t-test によって決定した。エラーバーは、同一の実験を 3 回行って算出した標準偏差を示す。

Chia は消化器系条件下でキチン基質を分解する

ニワトリ Chia が、胃と腸の条件下でキチン基質を分解するかどうかを検討した。コロイダルキチンと結晶性キチンを、精製 Chia と共に、適当な条件下で反応させた。生成された GlcNAc または GlcNAc オリゴ糖は、Jackson によって考案され [84], 当研究室が改良した糖電気泳動 (FACE) 法 [85] で解析した。精製 Chia は、コロイダルおよび結晶性キチン基質と、pH 2.0 の条件下、pepsin 存在下で 1 時間反応したところ、主に (GlcNAc)₂ 断片と、少量の GlcNAc が検出された (図 1-5A, B)。同様に、この酵素は、腸の条件 (pH 2.0 のブレインキュベーション後) 下で両基質を分解し、主に (GlcNAc)₂ を生成した (図 1-5D, E)。これらの結果は、ニワトリ Chia が、胃だけでなく腸の条件下でも、高分子キチンを分解することができることを示した。

さらに、Chia がキチン含有生物を消化器系プロテアーゼ存在下で分解するかどうかを検討した。ミールワーム (*Tenebrio molitor*) の幼虫はよく知られた食用昆虫である [67, 71, 86-90]。Chia を、ミールワームの殻と、人工的な消化器系条件下で、1 時間または 16 時間反応した。

Chia は、プロテアーゼ存在下でミールワームのキチンを分解し、主に (GlcNAc)₂ を生成した (図 1-5C, F)。ミールワーム殻の分解産物は、コロイダルキチンまたは結晶性キチンを基質として分解した場合とは異なり、長鎖オリゴ糖も生成した (図 1-5F)。

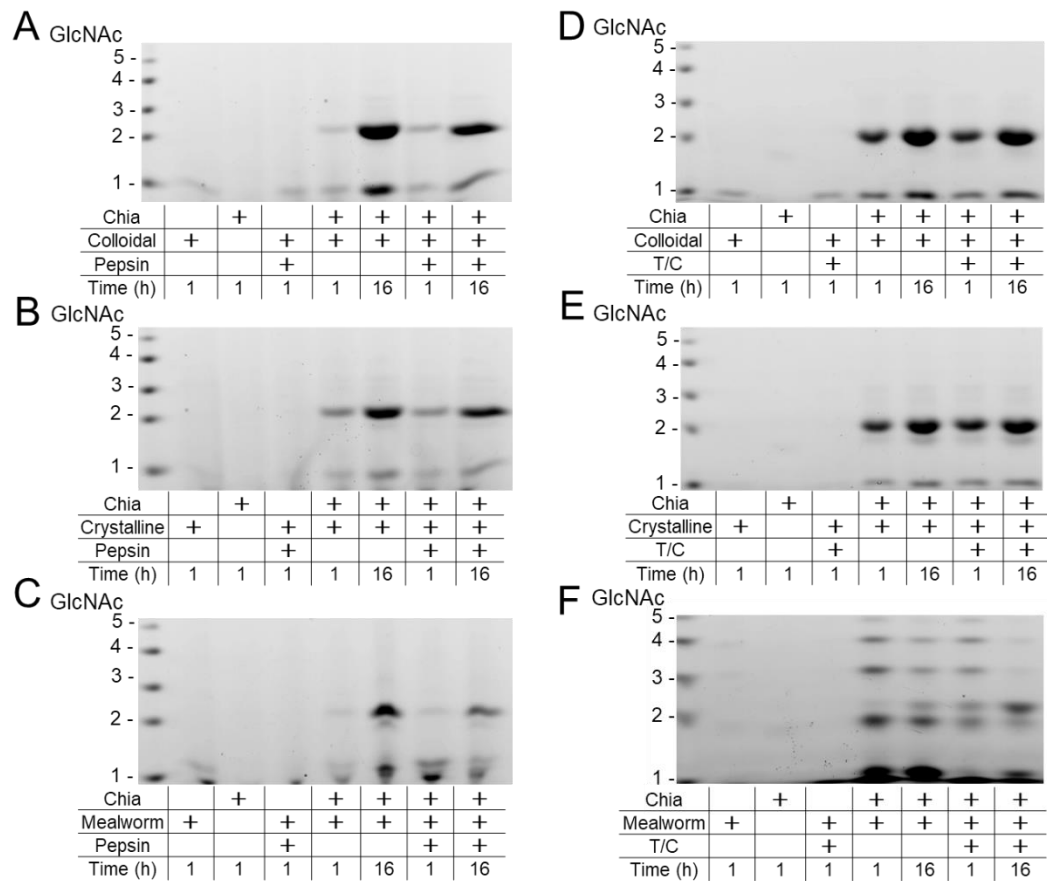


図 1-5. ニワトリ Chia は消化器系条件下でキチン基質を (GlcNAc)₂ に分解する

(A, D) コロイダルおよび (B, E) 結晶性キチン基質は、精製 Chia によって、等量の pepsin または trypsin/chymotrypsin 存在下、pH 2.0 (A, B) または pH 7.6 (D, E) で 1 または 16 時間反応した。(C, F) ミールワームの殻は、同様に、精製酵素とともに、胃 (C) または腸 (F) の条件下で、1 時間または 16 時間反応させた。生成したキチンオリゴ糖は、その還元末端を蛍光標識し、FACE 法で解析した。左側の N-アセチルキトオリゴ糖は分子量マーカーとして示した。

Chia のニワトリの胃抽出液中での安定性

Chia がニワトリの腺胃抽出液中の内在性 pepsin や他のタンパク質存在下でキチナーゼとして機能し得るかどうかを検討した。実験方法に記述したように、腺胃からプロテアーゼインヒビター非存在下で可溶性画分を調製し、pH 2.0, 37°C で 1 時間反応後、等量の trypsin/chymotrypsin を加えた腸の中性条件下で、さらに、37°C, 1 時間反応した。

可溶性タンパク質は、pH 2.0 での反応開始 10 分後に顕著に減少した (図 1-6)。他方、54 kDa を含めたいくつかのバンドは、1 時間の反応後でも変化は認められなかった (図 1-6A)。また、続く trypsin/chymotrypsin 存在下における pH 7.6 での反応で、タンパク質がさらに分解された (図 1-6D)。ザイモグラフィ解析は、Chia がキチナーゼ活性を保持していることを示した (図 1-6B, E)。これらのバンドは、pH 2.0 または pH 7.6 の条件下、60 分の反応で顕著な影響を受けなかった。これらのことから、内在性の Chia のキチナーゼ活性は、GIT 条件下で安定に存在することが明らかになった。

さらに、キチン基質を胃抽出液と共に pH 2.0 で 1 時間反応後、trypsin/chymotrypsin 存在下、pH 7.6 でさらに 1 時間反応させた。分解産物は FACE 法によって解析した (図 1-7)。胃抽出液中の Chia は、1 時間の反応後 (図 1-7A, B) と同様に、pH 7.6 の腸の条件下 (図 1-7D, E) において、キチン基質を分解し、(GlcNAc)₂ を生成した。さらに、ミールワームの殻を胃抽出液中で反応させ、分解産物を解析した。ミールワームの殻のキチンが、内在性 Chia によって、胃と腸の条件下、1 時間または 16 時間の反応後に (GlcNAc)₂ へと分解されていた (図 1-7C, F)。

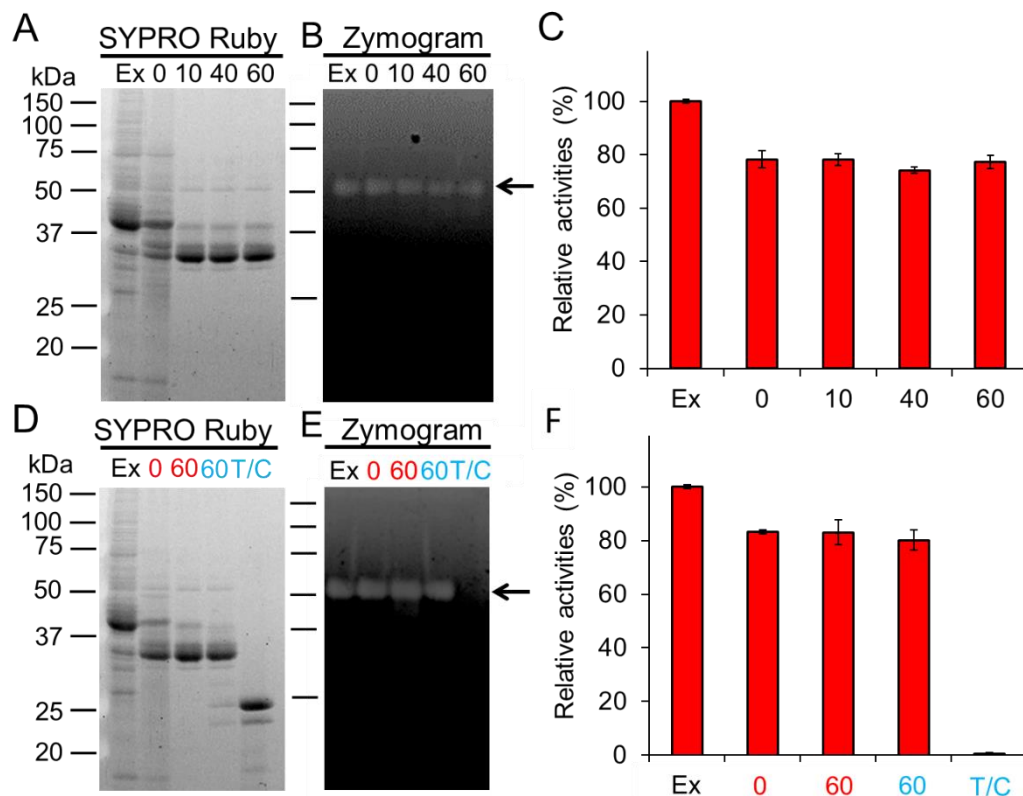


図 1-6. ニワトリ Chia の内在性 pepsin に対する機能的安定性

ニワトリの胃から可溶性タンパク質を調製し、pH 2.0, 37°C で 0, 10, 40, 60 分間反応させた (A-C)。反応後、サンプルを trypsin/chymotrypsin を加え、さらに pH 7.6 で 1 時間反応した (D-F)。(A, D) SDS-PAGE 後、SYPRO Ruby で染色した。(B, E) ザイモグラフィー解析。(C, F) キチナーゼ活性測定。Ex, 抽出液のみ; T/C, trypsin/chymotrypsin のみ; 数字, pH 2.0 (赤色) または pH 7.6 (水色) における反応時間。エラーバーは、同一の実験を 3 回行って算出した標準偏差を示す。

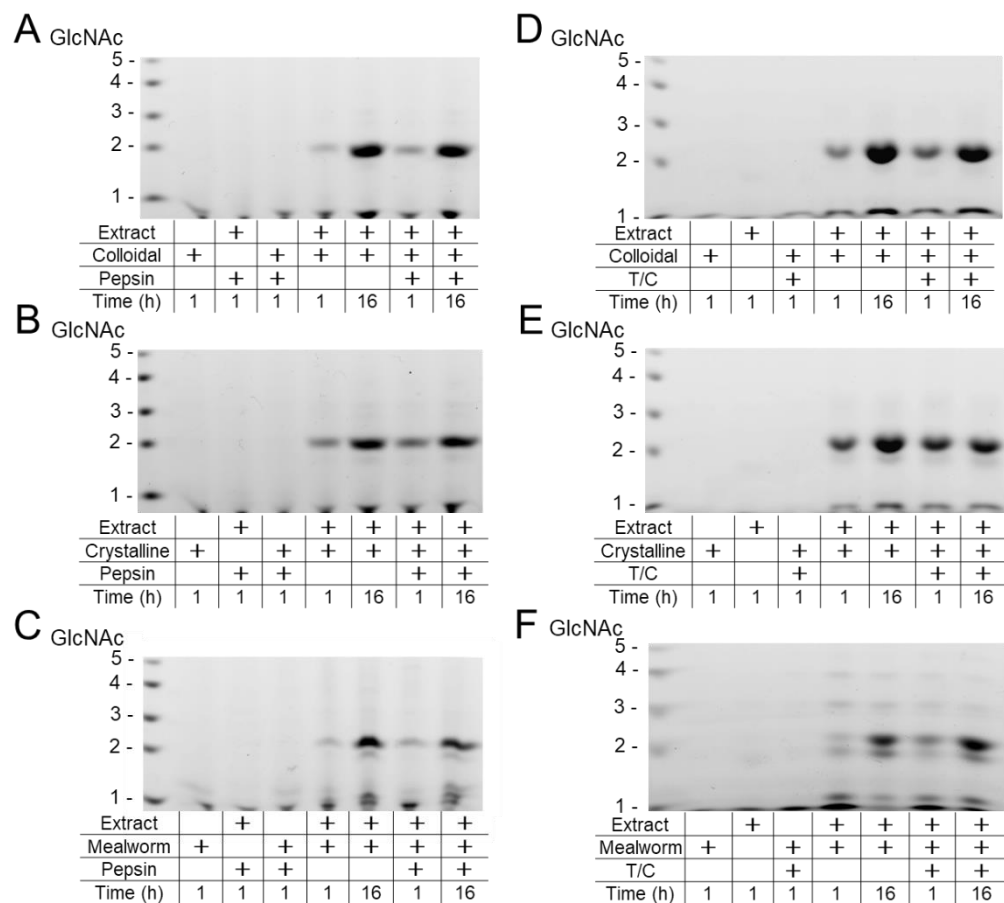


図 1-7. キチン基質およびキチン含有生物は胃の抽出液によって分解される (A, D) コロイダル, (B, E) 結晶性キチンまたは (C, F) ミールワームの殻と胃組織由来の抽出液との反応後の分解産物。各基質は, pH 2.0, pepsin 存在または pepsin 非存在下 (pepstatin A を添加) で 1 時間または 16 時間反応させた (A-C)。また, pH 7.6, trypsin/chymotrypsin 存在下, 1 時間または 16 時間反応させた (D-F)。反応後に生成した分解産物は, 前述した FACE 法で解析した。

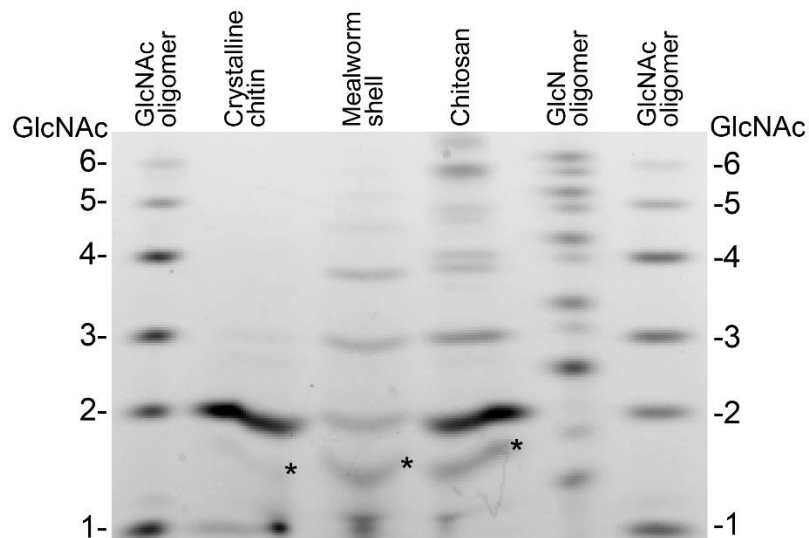


図 1-8. (GlcNAc)₂ 付近の複数のバンドおよび長鎖のキトオリゴ糖はキトサンから生成し得る

キトサン (脱アセチル化度 71% キトサン, Funakoshi 社) と結晶性キチン, ミールワーム幼虫の殻を, ニワトリ Chia と反応させ, 図 1-5 と同様の方法で解析した。グルコサミン (GlcN, Tokyo Chemical Industry 社) および GlcN オリゴ糖 [(GlcN)₂₋₆, Seikagaku Corporation] を GlcN オリゴ糖マーカーとして用いた。ゲルの両端には, GlcNAc オリゴ糖を標準物質として流した。ニワトリ Chia による, 結晶性キチン, ミールワームの幼虫の殻, キトサンの分解産物において, 同様の移動度を持つバンドをアスタリスクで示した。

2. ブタ Chia の消化酵素としての機能解析

ブタ組織における Chia の遺伝子発現解析

ブタ Chit1 と Chia の *in vivo* における遺伝子発現レベルを明らかにするため、方法に記述したように、standard DNA を標準として、正常なブタ組織から調製した total RNA を qPCR で解析した (図 2-1)。

両キチナーゼ mRNA の発現パターンには、明らかな組織特異性が見られた (図 2-2A, B, 上パネル)。Chit1 mRNA は、目において高いレベルで検出され (図 2-2A, 上パネル)、次に、肝臓、唾液腺、小腸、肺で高かった (図 2-2B, 下パネル)。Chia mRNA は胃で特異的に発現しており (図 2-2B, 上パネル)、続いて小腸、肝臓、唾液腺、肺で高かった (図 2-2B, 下パネル)。Chia の発現レベルは、目を除いた (図 2-2C, 下パネル) 組織全体において、Chit1 よりも高く、とりわけ胃でその差は大きかった (図 2-2C, 上パネル)。これらの結果から、ブタの体内で、Chia がキチンを消化し得ることが示唆された。Chia の発現が、ドライアイ症候群などの病態下で変動することは報告されている [54]。本研究での qPCR 解析では、Chia mRNA の発現レベルは、ブタの目において、Chit1 の 1/10 であることを示した。これらの結果は、Chia が目の病態下において、自然免疫応答の鍵となるメディエーターである可能性を示唆する。他方、Chia 遺伝子発現量が病態下で可変的であるのに対し、Chit1 mRNA は、ブタの目に加えて、マウスの目 [41]、ヒトの目と涙腺 [91] で恒常的に発現する。リゾチームは抗菌活性をもつのに対し、Chit1 は抗真菌活性を有すると考えられている。真菌類の細胞壁はキチン質のため、Chit1 は、ほ乳類の目において、真菌類のようなキチン含有生物から保護しているのかもしれない。



図 2-1. qPCR のための standard DNA

(A) Standard DNA の模式図。(B) Standard DNA の塩基配列。この standard DNA は、956 塩基対であり、Chia, GAPDH, β -actin, pepsinogen A (Pep A), pepsinogen C (Pep C), H⁺/K⁺-ATPase, Gastrin, gastric intrinsic factor (Gif), Mucin, Chit1 の cDNA 断片より構成される。qPCR のターゲット領域は、下線で示した。

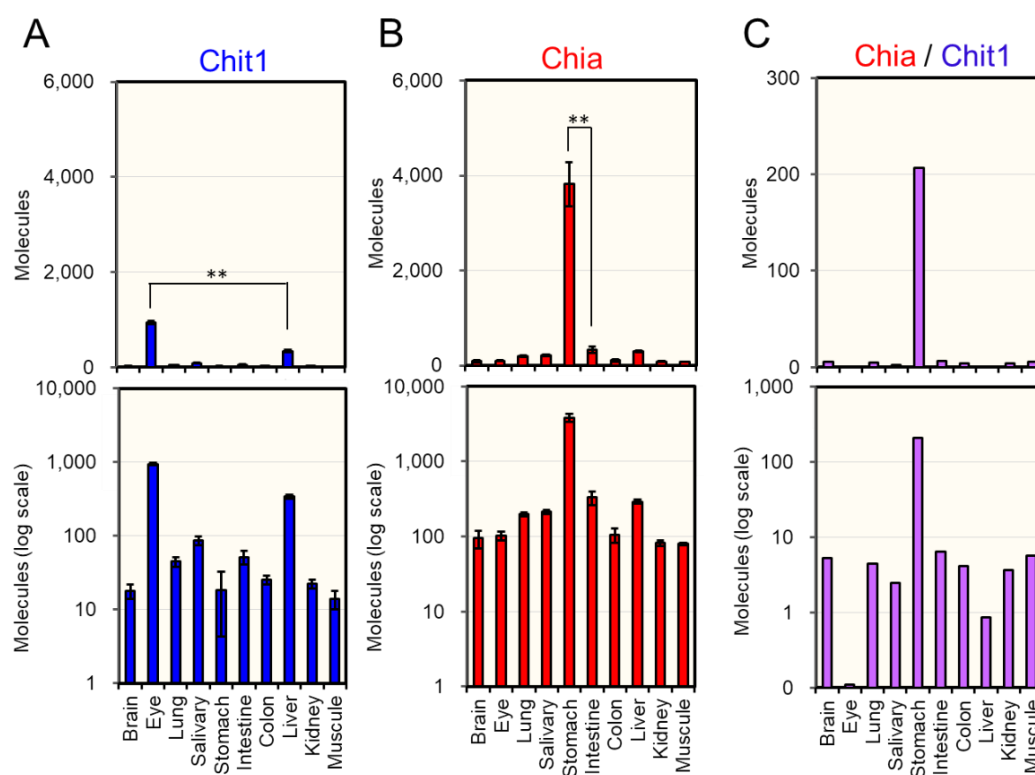


図 2-2. ブタ組織における Chit1 と Chia mRNAs の発現

ブタの主要 10 組織における (A) Chit1 と (B) Chia mRNA の定量。両キチナーゼは standard DNA を用いて qPCR によって定量した。(C) Chia と Chit1 の発現レベルの比率。Y 軸は total RNA 10 ng あたりの分子数を表す。すべての mRNA コピー数は、同じ standard DNA の希釈に基づいて算出した。上のパネルは実数値、下のパネルは対数軸を示す。 $p < 0.01$ 。P 値は Student's t-test によって決定した。エラーバーは、同一の実験を 3 回行って算出した標準偏差を示す。

ブタの胃における Chia mRNA レベル

続いてブタの胃における Chia mRNA レベルを詳細に解析した。Pepsinogen A と C, H^+/K^+ -ATPase そして Chia mRNA は、ハウスキーピング遺伝子よりも顕著に高く発現していた (図 2-3)。Pepsinogen A と C の mRNA レベルは、Chia のそれぞれ 300 倍, 15 倍も高かった (図 2-3, 上パネル)。Chia mRNA レベルは、 H^+/K^+ -ATPase に匹敵するレベルであり、GAPDH の 26 倍, β -actin の 5 倍, 胃粘膜遺伝子より数 100~数 1,000 倍高かった (図 2-3, 下パネル)。これらの結果から、Chia は、ブタの胃において、主要な転写物の一つであることが示された。

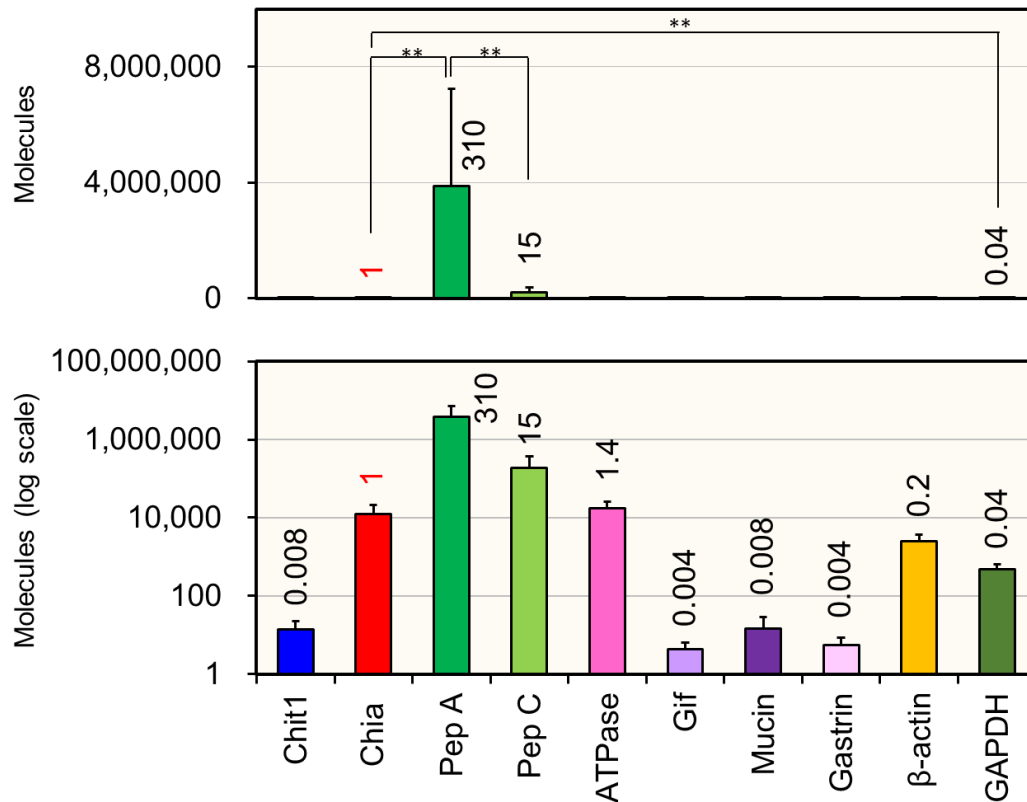


図 2-3. qPCR による、ブタの胃における mRNA 発現レベルの解析

上のパネルは実数値、下のパネルは対数軸を示す。ブタの胃における Chia mRNA 発現レベルの評価は、10 遺伝子 [Chit1, Chia, pepsinogen A (Pep A), pepsinogen C (Pep C), H^+/K^+ -ATPase, Gastric intrinsic factor (Gif), mucin, Gastrin, β -actin, GAPDH] の断片から成る standard DNA を用いて行った。Y 軸は total RNA 10 ng あたりの分子数を表す。すべての mRNA コピー数は、同じ standard DNA の希釈に基づいて算出した。バーの値は、GAPDH の発現レベルと比較した相対的な発現レベルを示した。 $**p < 0.01$ 。P 値は Student's t-test によって決定した。エラーバーは、同一の実験を 3 回行って算出した標準偏差を示す。

内在性 pepsin は胃抽出液中の可溶性タンパク質を分解する

次に、pH 2.0, 37°C の模倣的な胃の環境下、内在性 pepsin のプロテアーゼ活性を検討した。プロテアーゼ阻害剤非存在下で、ブタの胃から可溶性タンパク質画分を調製し、pH 7.6 または pH 2.0 で 60 分間反応した。そのタンパク質画分を SDS-PAGE と CBB 染色によって解析した (図 2-4A)。pH 7.6 では、60 分の反応において、バンドのパターンと強度に変化は見られなかった (図 2-4A)。これに対し、pH 2.0 では、反応 5 分後から時間依存的な可溶性タンパク質の減少が認められ、他方、いくつかのバンドは 60 分まで変化が見られなかった (図 2-4A)。Pepsin 抗体を用いたウエスタンブロットによって、pH 2.0, 反応 5 分後の pepsinogen から pepsin への変換を示すバンドシフトを検出した (図 2-4B)。マウス Chia 抗体を用いたウエスタンブロットで、pH 7.6 でも pH 2.0 でも、60 分間の反応の間、この酵素が安定であることが分かった (図 2-4C)。さらに、4-NP-(GlcNAc)₂ を用いたキチナーゼ活性測定で、この間、キチナーゼ活性が大きく変化しなかった (図 2-4D)。これらの結果は、Chia は、多量の内在性 pepsin が存在しているブタの胃で、キチナーゼ活性を保持していることを示した。

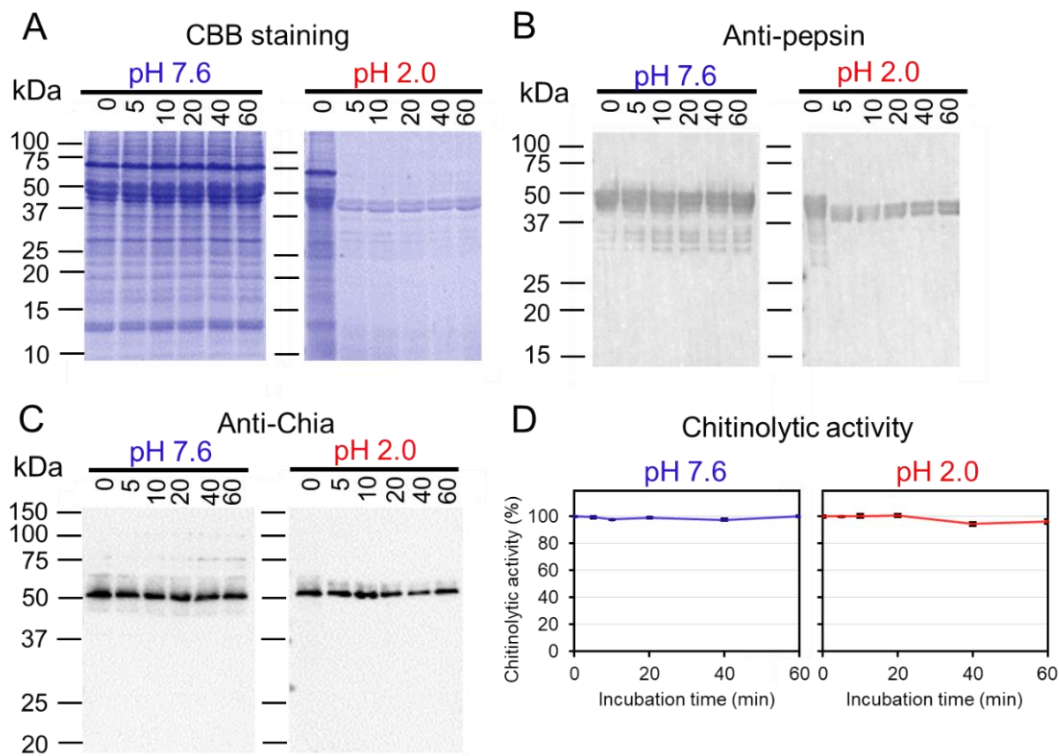


図 2-4. Pepsinogen は活性型フォームへと変換し，胃の可溶性タンパク質を分解する

模倣的なブタの胃環境 (pH 2.0, 37°C) における内因性 pepsin のプロテアーゼ活性の分析。プロテアーゼ阻害剤非存在下でブタの胃組織から可溶性タンパク質画分を調製し，pH 7.6 または pH 2.0 で最大 60 分間インキュベートし，(A) SDS-PAGE および CBB 染色によって分析した。処理された可溶性タンパク質の (B) pepsin 抗体または (C) Chia 抗体を使用したウエスタンブロット。(D) pH 7.6 または pH 2.0 でインキュベートした抽出物中の Chia のキチナーゼ活性。

胃組織からのブタ Chia の精製とその性質

Chia のキチナーゼ活性の性質をさらに明らかにするため、キチンビーズカラムを用いて、胃の抽出液から Chia を精製した。カラムに結合したキチナーゼは、8 M 尿素で溶出し、直ちに脱塩した。タンパク質画分を SDS-PAGE で分離したところ、54 kDa に主要な一本のバンドを検出した (図 2-5A)。このようにして、*in vitro* における解析が可能な Chia を精製酵素として取得できた。酵素の精製過程は表 2 に要約した。

Chia の至適 pH は、4-NP-(GlcNAc)₂ を基質に用い、0.1 M Gly-HCl (pH 1.0-3.0) または McIlvaine (pH 2.0-8.0) 緩衝液の各 pH で、37°C、30 分間の酵素活性測定により決定した。最大活性は 0.1 M Gly-HCl の pH 2.0 で検出した (図 2-5B)。McIlvaine 緩衝液を用いた場合、酵素活性は pH 2.0-5.0 で高く、ピークは pH 2.0 および pH 4.0 にあり、弱酸性下 (pH 6.0-8.0) で低下した (図 2-5B)。ブタ Chia は、マウスやニワトリの Chia と、それぞれ、81 と 89% の相同性を示すが、これらの pH や緩衝液における特異性は異なっていた。さらに、McIlvaine 緩衝液を用いると、pH 2.0-5.0 に活性が見られ、pH 2.0 と pH 4.0 に活性のピークが見られ、弱酸性下 (pH 6.0-8.0) で徐々に低下した (図 2-5B)。このように、Chia のキチナーゼ活性は、使用する緩衝液によって、pH 依存性に差が認められた。酵素活性に対する温度の影響は、0.1 M Gly-HCl (pH 2.0) 緩衝液中、30-64°C の範囲で、30 分間の反応を行い、決定した。図 2-5C に示すように、Chia の触媒反応は温度の上昇につれて徐々に高まり、60°C で最大活性を示し、その後低下した。次にブタ Chia の pH 安定性を決定した。酵素を Gly-HCl または McIlvaine 緩衝液の各 pH で氷上 1 時間反応した。酵素活性は pH 2.0、37°C で反応を行った。図 2-5D のように、ブタ Chia は、pH 2.0 において顕著な活性の低下は見られず、酸耐性を持つことが分かった。

表 2. ブタの胃から Chia の精製

実験方法に記述の通りに、ブタの胃 1 g からタンパク質を精製した。

| 精製ステップ | 全活性 (mU) | 総タンパク質 (mg) | 比活性 (mU/mg) | 収率 (%) |
|-----------------|-----------|-------------|-------------|--------|
| 可溶性画分 | 542.9±3.3 | 20.2±1.5 | 26.8±0.2 | 100 |
| キチンビーズ 素通り画分 | 61.5±2.4 | 12.2±2.1 | 5.0±0.2 | 11.3 |
| 精製画分 | 49.6±2.1 | 0.023±0.006 | 2174.0±90.4 | 10.3 |

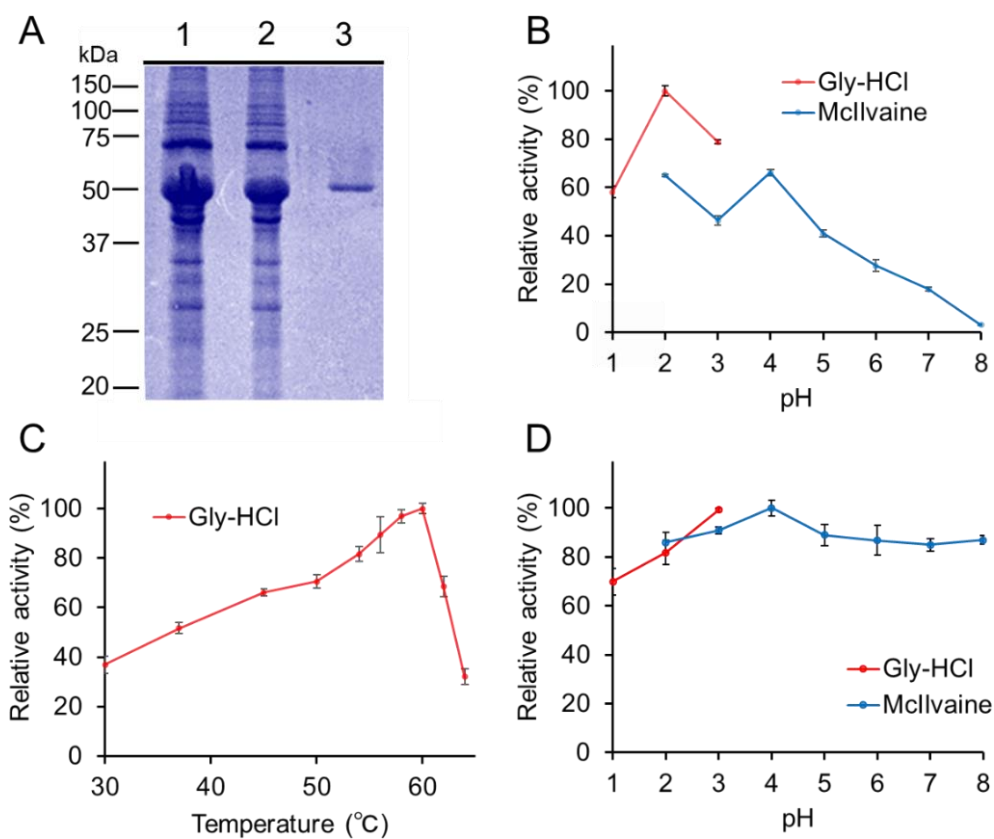


図 2-5. ブタの胃からの Chia の精製とその性質

(A) Chia をブタの胃組織からキチンビーズクロマトグラフィーによって精製し、SDS-PAGE で分離し、CBB 染色で可視化した。1, 抽出物; 2, 素通り; 3, 精製酵素。Chia の活性における (B) 至適 pH, (C) 至適温度, (D) pH 安定性。エラーバーは、同一の実験を 3 回行って算出した標準偏差を示す。

ブタ Chia は胃の条件下で高分子キチン基質を分解する

精製 Chia に等量の pepsin (0.4 μ g) を加え, pH 2.0, 1 時間反応し, Chia が pH 2.0 の強酸性下において安定で (図 2-6A), キチナーゼ活性を保持することを確認した (図 2-6B)。

次に, Chia がブタの胃の条件下で, キチン基質を分解し得るかどうかを検討した。コロイダルまたは結晶性キチンを, 精製した Chia と反応し, 分解産物を FACE 法によって解析した。精製酵素は, pepsin 存在下, pH 2.0 で 1 時間反応すると, 両基質を分解し, 主に (GlcNAc)₂ 断片を生成した (図 2-6C, D)。

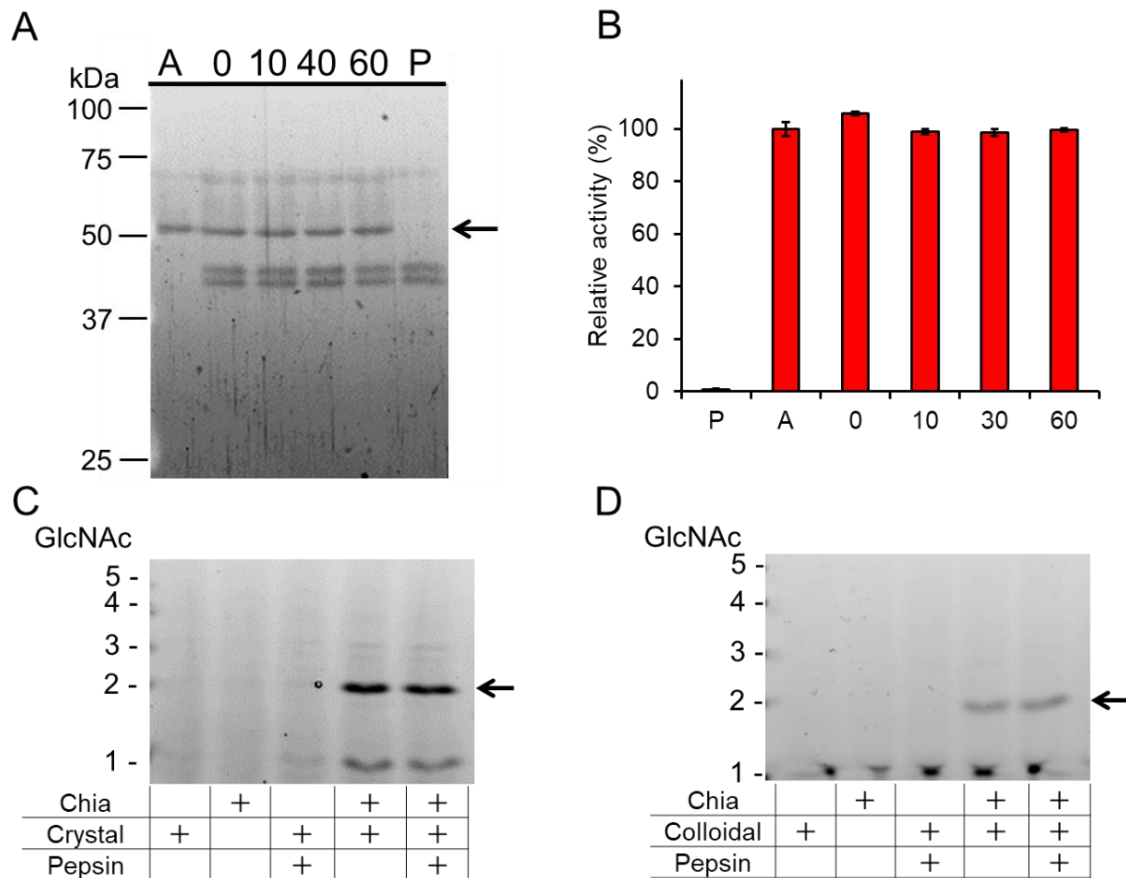


図 2-6. ブタ Chia の pepsin に対する機能的安定性

精製 Chia は、等量の pepsin を加え、胃の条件下で、0, 10, 40, 60 分間反応させた。サンプルは SDS-PAGE で分離し、SYPRO Ruby 染色 (A) と、キチナーゼ活性測定 (B) によって解析した。C, 精製酵素のみ; P, pepsin のみ; 数字, 反応時間。エラーバーは、同一の実験を 3 回行って算出した標準偏差を示す。(C) 結晶性または (D) コロイダルキチンを、精製 Chia によって、等量の pepsin 存在下、pH 2.0 で 16 時間反応した。生成した単糖または多糖は、FACE 法で解析した。

ブタ Chia のプロテアーゼ耐性

次に、ブタ Chia が腸の環境下においても安定かどうかを検討した。精製 Chia を等量の trypsin/chymotrypsin (0.4 μ g) とともに、pH 7.6 で反応させた結果、この条件下で Chia が安定であり、活性を保持していることが分かった (図 2-7A, B)。コロイダルおよび結晶性キチンを、精製した Chia と等量の trypsin/chymotrypsin (0.4 μ g) とともに、pH 7.6 で 1 時間反応し、分解産物を上述のように解析した (図 2-7C, D)。胃の条件と同様に、腸の条件下においても、Chia のキチナーゼ活性によって (GlcNAc)₂ が生成した。さらに、GIT の生理条件を模倣し、pH 2.0 で 1 時間のプレインキュベーション後、pH 7.6 に中和し、trypsin/chymotrypsin を加えてさらに 1 時間反応した (図 2-7E, F)。胃の条件よりも、腸の条件の方が、コロイダルおよび結晶性キチンから、より多くの (GlcNAc)₂ を生成することを認めた (図 2-7E, F)。このように、ブタ Chia は、プロテアーゼ耐性の糖質分解酵素として機能し、胃と腸の条件下で高分子キチンを分解し得ることが分かった。

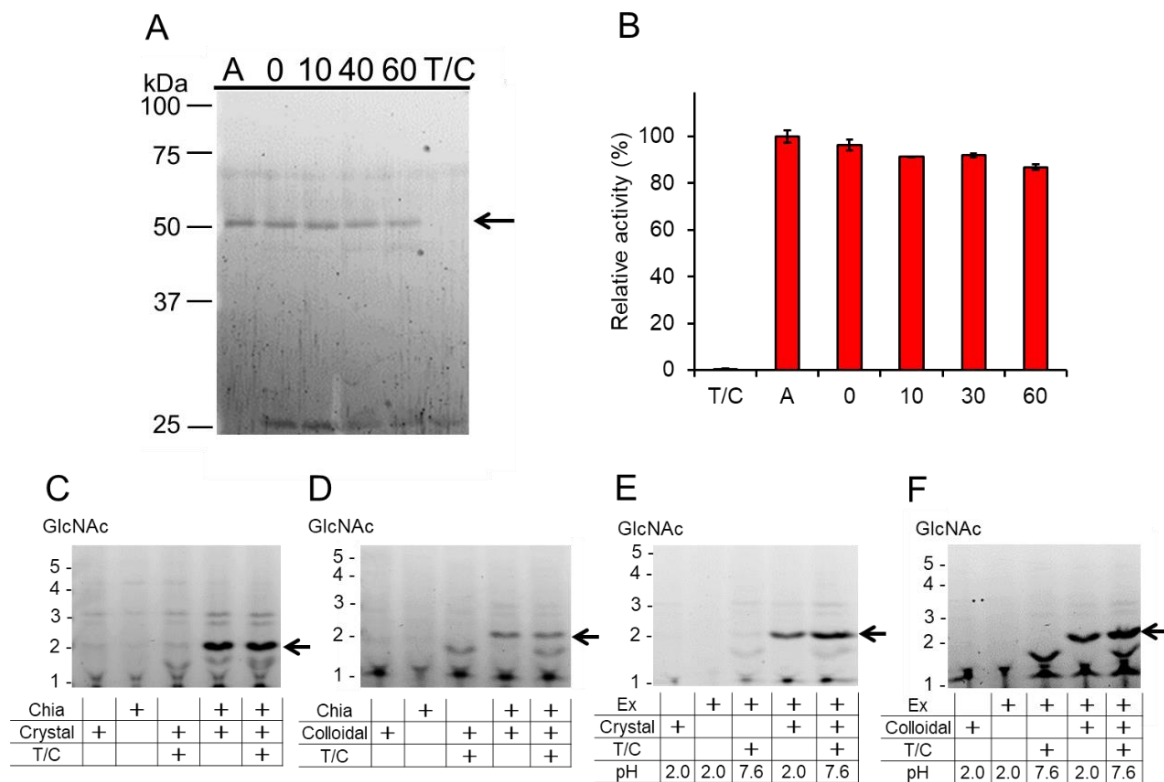


図 2-7. ブタ Chia の trypsin/chymotrypsin に対する機能的安定性

精製 Chia は、等量の trypsin/chymotrypsin を加え、pH 7.6 の腸の条件下で、0, 10, 40, 60 分間反応させた。サンプルは、SDS-PAGE で分離し、SYPRO Ruby 染色 (A) と、キチナーゼ活性測定 (B) によって解析した。C, 精製酵素のみ; T/C, trypsin/chymotrypsin のみ; 数字, 反応時間。エラーバーは、同一の実験を 3 回行って算出した標準偏差を示す。(C, E) 結晶性または (D, F) コロイダルキチンを、精製 Chia (C, D) または胃の抽出液 (E, F) によって、等量の pepsin 存在下、pH 2.0 で 16 時間反応した。生成した単糖または多糖は、その還元末端を蛍光標識し、FACE 法で解析した。

ブタ Chia によるミールワームの殻とショウジョウバエの翅中のキチン分解

Chia と pepsin が、キチン含有生物中のキチン-タンパク質複合体を分解するかどうかを、ブタの胃の条件下で検討した。ミールワーム (*Tenebrio molitor*) の幼虫の殻を、胃の抽出液と共に pH 2.0 で反応し、FACE 法で解析した。胃抽出液中の Chia は、pH 2.0, 16 時間の反応で、ミールワームの殻を分解し、主に (GlcNAc)₂ と、それとは移動度が異なる GlcNAc 断片も生成した (図 2-8A)。

さらなるキチン含有生物の消化性を検討するため、ショウジョウバエの翅を用いて検討した。はじめに翅をホモジナイズし、胃の抽出液と共に反応し、分解産物を FACE 法で解析し、(GlcNAc)₂ 断片を検出した (図 2-8B)。また、ショウジョウバエの翅の表面を、実体顕微鏡を用いて可視化し (図 2-8C, D), 0.1 M Gly-HCl (pH 2.0) で、胃の抽出液存在下 (図 2-8E-H) または非存在下 (図 2-8D, H, F) の反応を 16 時間行い、翅の表面を走査型電子顕微鏡 (SEM) で解析した (図 2-8E-H)。ショウジョウバエの翅と溶液では、胃抽出液による処理後の濁り (図 2-8D) と、部分的な損傷が認められた (図 2-8F, H)。他方、緩衝液のみで反応した翅には損傷は見られなかった (図 2-8C, E, G)。以上の結果から、胃の抽出液中の Chia は、ショウジョウバエの翅のキチン質の完全性を変質させることが出来ることが示された。

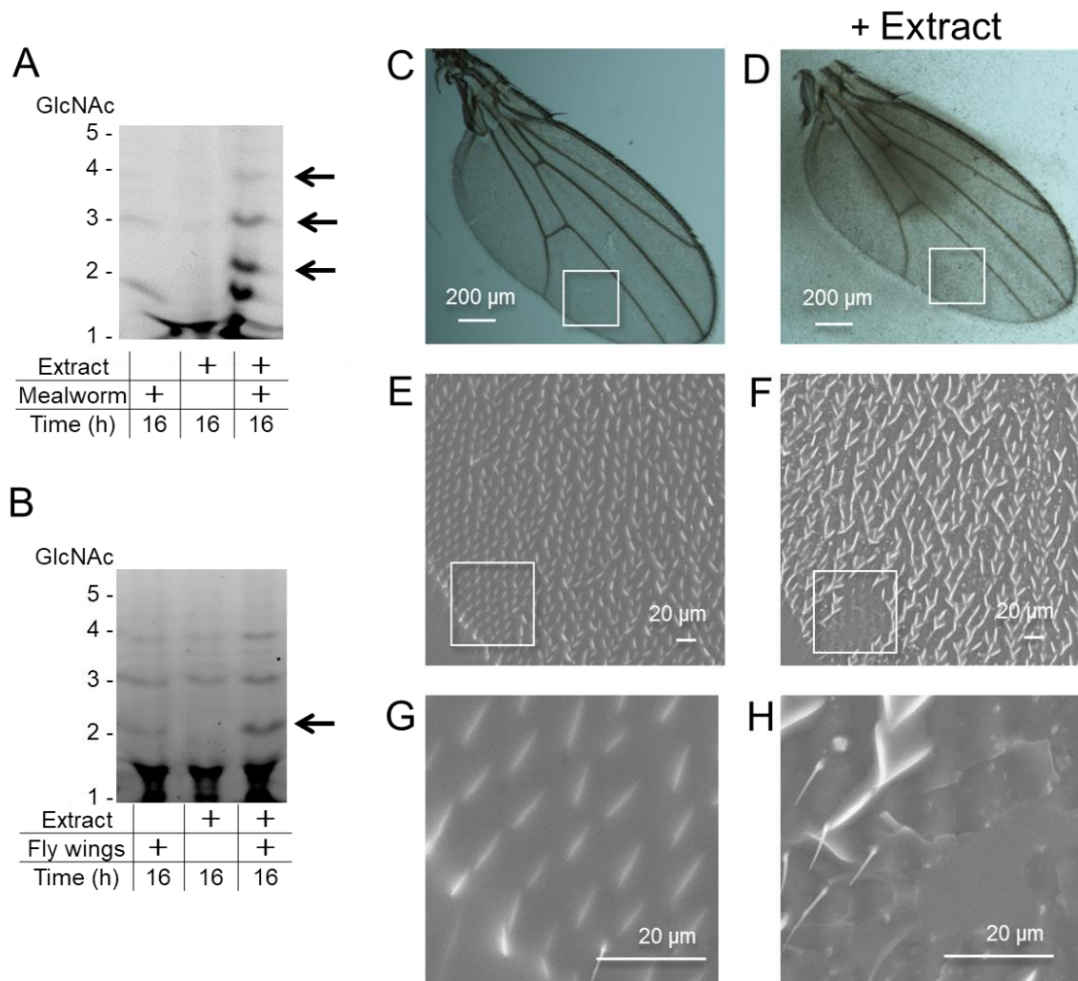


図 2-8. 胃抽出液によるミールワーム幼虫の殻およびハエ翅の分解

(A) ミールワーム幼虫の殻または (B) ショウジョウバエの翅を胃抽出液と作用させ、分解産物を FACE 法によって解析した。0.1 M Gly-HCl (pH 2.0) 中の胃抽出物を含む (D, F, H) または含まない (C, E, G) ハエ翅の顕微鏡観察。(C, D) 立体顕微鏡写真。(E-H) SEM 写真。

3. コモンマーモセット CHIA の消化酵素としての機能解析

CHIA はコモンマーモセットの胃で組織特異的に発現する

コモンマーモセット (*Callithrix jacchus*) は、新世界ザルに属し、免疫学的性質がヒトに近く、身体サイズが小さく、生殖効率が高い。これらの特性から、コモンマーモセットは、マウスモデルとヒトの疾患の治療の橋渡しとなり得るため、生物・医学の研究領域で注目を集めている [73, 92-94]。このサルは、ブラジル北東の多湿な大西洋側の森林に生息し、果実、花、木の滲出液、昆虫を食べている [93]。

コモンマーモセットの CHIT1 と CHIA mRNA レベルを、正常なコモンマーモセットの組織 (脳、唾液腺、肺、心臓、胃、小腸、結腸、肝臓、腎臓、脾臓) で解析した。マーモセットの CHIA, CHIT1, GAPDH, pepsinogen A, H^+/K^+ -ATPase の cDNA 断片が 1 分子ずつ連結した standard DNA を構築し、qPCR によって遺伝子発現解析を行った (図 3-1)。

CHIT1 mRNA が相対的に高いレベルで発現していたのは、肺、肝臓、脾臓であった (図 3-2A, 下パネル)。CHIA mRNA 発現において、明らかな組織特異的なパターンが認められた (図 3-2A, 上パネル)。CHIA mRNA は、胃で特異的に検出され、CHIT1 の 4,000 倍高かった (図 3-2A, 上パネル)。他の組織では、CHIT1 と同等か、それよりも低かった (図 3-2B, 下パネル)。

次に、マーモセットの胃における CHIA mRNA レベルを詳細に解析した。Pepsinogen A, H^+/K^+ -ATPase, GAPDH は参照 (基準) 遺伝子として用いた。CHIA mRNA レベルは、CHIT1, H^+/K^+ -ATPase, GAPDH よりも顕著に高いレベルで発現していたが、pepsinogen A より 23 倍低かった (図 3-2B)。これらの結果は、CHIA が、マーモセットの胃において、主要な転写物の 1 つであることを示した。

A

| | | | | |
|------|-------|-------|-------|--|
| CHIA | CHIT1 | GAPDH | Pep A | H ⁺ /K ⁺ -ATPase |
|------|-------|-------|-------|--|

B

GTGGCCTGTACCCTGACCCCACTGACAAGAATGCCTTCTACCACTGTTTG
 AATGGAAAGACTTTCATCCAGCACTGCCAGACTGGCCTTGTCTTCGATGC
CTCCTGCTCCTGCTGCAACTGGGTCAACTCAGCCATCAGGTTTCTGCGCA
 AATACGGCTTTGACGGTCTTGACCTTGATGGAAATCCCATCACCATCTTC
 CAGGAGCGAGATCCCTCCAAAATCAAGTGGGGCGTACCCTGTGCCAGCCA
GTGCCTACATCCTGCAGGACGAGGGGGGGCTGCACCAGCGGCTTCCAAGAA
GGCAGACATTGGAGTAGCCATGGGCATTGCTGGCTCAGATGCTGCCAAAA
 ATGCAGCCGACATGATCCTGCTGGATGATAACTTTGCCTCCATTGTGAC

図 3-1. qPCR のための standard DNA

(A) Standard DNA の模式図。(B) Standard DNA の塩基配列。この standard DNA は、399 塩基対であり、CHIA, CHIT1, GAPDH, pepsinogen A (Pep A), H⁺/K⁺-ATPase の cDNA 断片を含む。qPCR における増幅のターゲット領域を下線で示した。

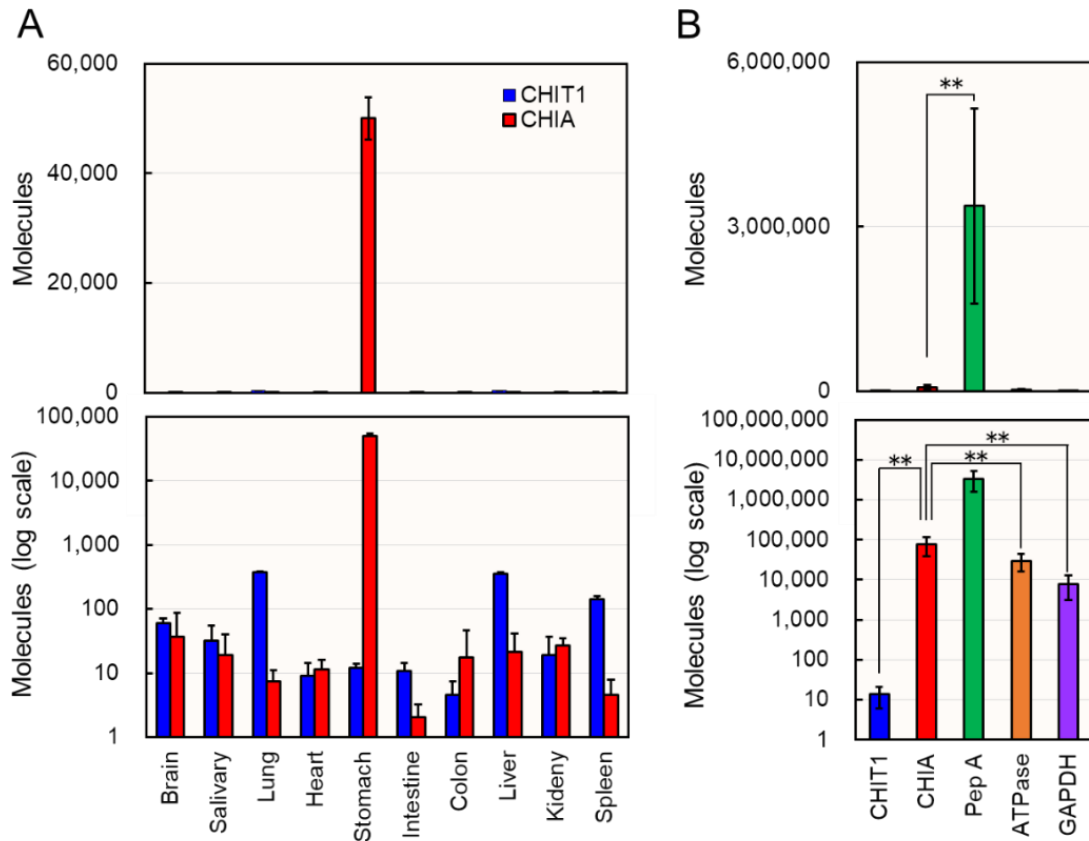


図 3-2. コモンマーモセット組織における CHIT1 と CHIA mRNAs の定量
 (A) コモンマーモセット組織における CHIT1 と CHIA mRNAs は standard DNA を用いて qPCR によって定量した。(B) マーモセット胃における CHIA mRNA レベル を評価するため、5 つの遺伝子断片 [CHIA, CHIT1, GAPDH, pepsinogen A (Pep A), H^+/K^+ -ATPase] を含む standard DNA を用いた。得られたすべての値は、10 ng の total RNA における分子数として表した。すべての mRNA コピー数は、同じ standard DNA の希釈に基づく。上のパネルは実数値、下のパネルは対数スケールで表示した。 $**p < 0.01$ 。各 p 値 は Student's t-test によって決定した。エラーバーは、同一の実験を 3 回行って算出した標準偏差を示す。

CHIA は胃抽出液中の内在性 pepsin に耐性がある

次に、pH 2.0, 37°C の胃の環境中における、CHIA の内在性 pepsin に対する耐性を解析した。マーモセットの胃から、プロテアーゼ阻害剤非存在下で、可溶性タンパク質溶液を調製し、pH 7.6 または pH 2.0 で 60 分まで反応した。タンパク質画分は、SDS-PAGE 後、CBB 染色で解析した (図 3-3A)。pH 7.6 における 60 分の反応中に、バンドのパターンと強度に変化は無かった (図 3-3A)。これに対し、pH 2.0 での反応 5 分後に、時間依存的な可溶性タンパク質の顕著な減少が見られたが、いくつかのバンドは 60 分の反応でも変化は無かった (図 3-3A)。Pepsin 抗体を用いたウエスタンブロットは、pH 2.0 での反応開始 5 分後にバンドシフトを示し、pepsinogen から pepsin への変換を示唆した (図 3-3B, 矢印)。Pepsin レベルは、pH 2.0 における 60 分間のインキュベーションの間において、実質的に変わらなかった。

次に、マーモセット CHIA を、抗ブタ Chia 抗体を用いたウエスタンブロットによって評価した。Chia 抗体は 50 kDa のバンドを認識した (図 3-3B)。全タンパク質量は、pH 2.0 において酸変性および pepsin 消化によって急激に減少したが (図 3-3C)、50 kDa のバンドは、60 分間のインキュベーション中に大きく変動しなかった (図 3-3B)。さらに、4-NP-(GlcNAc)₂ によって測定したキチナーゼ活性の減少は、緩やかだった (図 3-3D)。これらの結果は、マーモセット CHIA (52 kDa タンパク質) が、pH 2.0 での pepsin 消化に安定で、キチナーゼ活性を保持していることを示した。

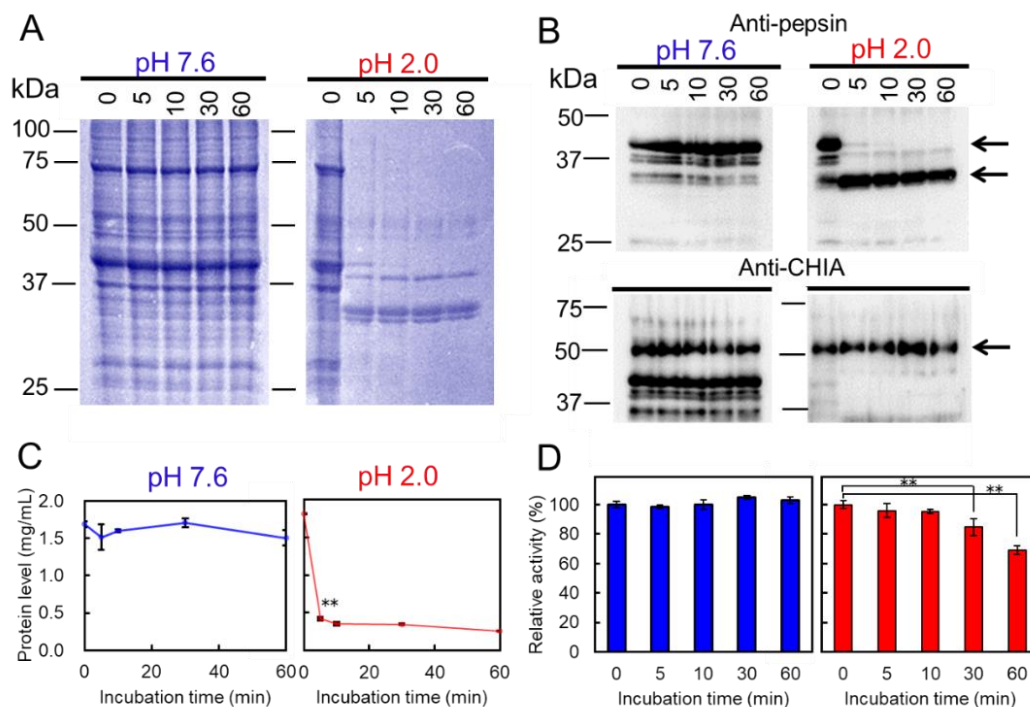


図 3-3. CHIA は内在性 pepsin によって分解されない

コモンマーモセットの胃から得た可溶性タンパク質は、37°C で 0, 5, 10, 30, 60 分間、pH 7.6 または 2.0 の条件下でインキュベートした。全タンパク質は、(A) CBB 染色、(B) Western blot、(C) 全タンパク質量測定および (D) pH 2.0 におけるキチナーゼ活性測定によって解析した。エラーバーは、同一の実験を 3 回行って算出した標準偏差を示す。** $p < 0.01$ 。P 値は Student's t-test で決定した。

コモンマーモセット CHIA の酵素学的特徴付け

至適 pH は、4-NP-(GlcNAc)₂ を基質に用い、pH 1.0-8.0 において、37°C、30 分間酵素活性を測定することで決定した。最大活性は pH 2.0 で検出され、弱酸性下で徐々に低下した (pH 8.0 まで) (図 3-4A)。

酵素活性への温度の影響は、0.1 M Gly-HCl 緩衝液中 (pH 2.0) で、30-65°C の温度範囲で測定した。図 3-4B に示すように、CHIA の触媒反応は、温度依存的に徐々に上昇し、55°C で最大に達した後、急激に低下した。

次に、マーモセット CHIA の pH 安定性を決定した。酵素を pH 1.0-8.0 の条件下、氷上で 60 分ブレインキュベートした後、pH 2.0、37°C の条件で酵素活性を測定した。図 3-4C に示すように、マーモセット CHIA は、pH 2.0 におけるブレインキュベートによるキチナーゼ活性の明らかな低下は無く、顕著な酸耐性を示した。

最後に、マーモセット CHIA の熱安定性について測定した。サンプルを 30-65°C の温度下で pH 2.0、15 分間ブレインキュベートし、残存活性を pH 2.0、37°C で測定した。マーモセット CHIA は 55°C まで安定で (図 3-4D)、55°C を超えると活性は低下した。

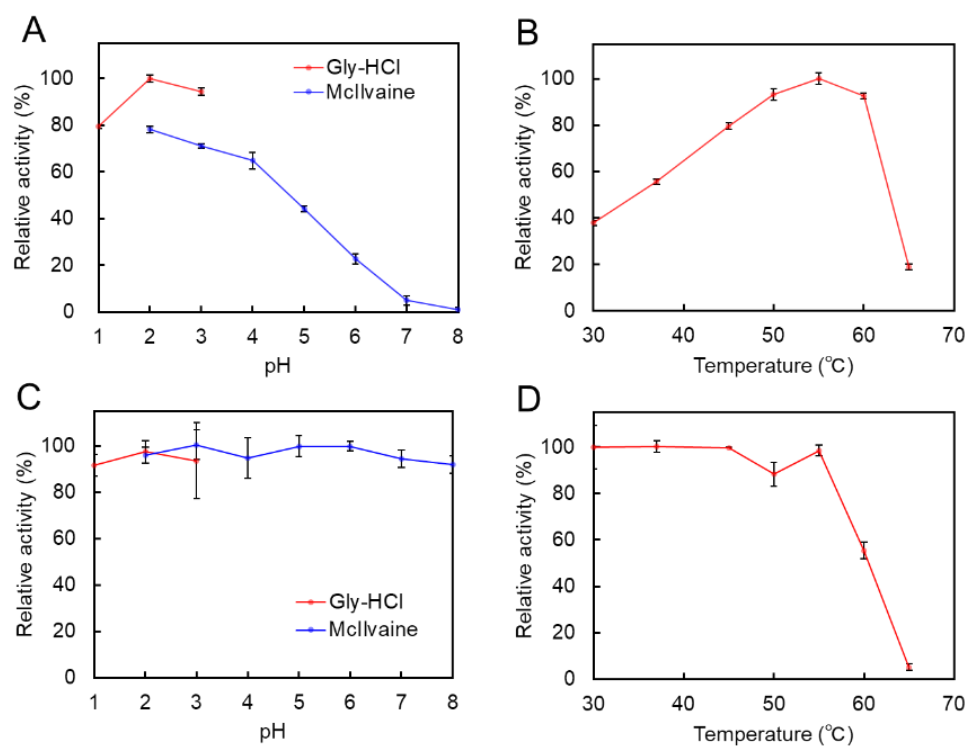


図 3-4. コモンマーモセット CHIA の特性解析

胃の抽出液中のキチナーゼ活性は 4-NP-(GlcNAc)₂ を用いて測定した。(A) 至適 pH, (B) 至適温度, (C) pH 安定性, (D) 熱安定性。エラーバーは、同一の実験を 3 回行って算出した標準偏差を示す。

コモンマーモセット CHIA は trypsin/chymotrypsin に耐性がある

次に, trypsin と chymotrypsin 存在下 (模倣的な腸の条件下) での pepsin および CHIA の安定性を検討した。マーモセットの胃由来の可溶性タンパク質を, pH 2.0, 37°C で 1 時間プレインキュベーションさせ, 続いて等量の trypsin/chymotrypsin (0.5 μ g) を加え, 中性 (pH 7.6) の腸の条件下で 1 時間インキュベートした。前の実験と同じく (図 3-3), 全タンパク質量は pH 2.0 のインキュベーション中に劇的に減少した。続く trypsin と chymotrypsin 存在下の pH 7.6 でのインキュベーションによって, さらにタンパク質が分解された (図 3-5A)。Trypsin と chymotrypsin によって Pepsin は完全に分解されたのに対し, CHIA は, 等量の trypsin と chymotrypsin 存在下でも分解されなかった (図 3-5B)。さらに, キチナーゼ活性は, わずかに減少したが, この条件の反応においても高いレベルを保持していた (図 3-5D)。これらの結果は, CHIA が, pH 7.6 の trypsin と chymotrypsin 存在下で安定であることを示した。

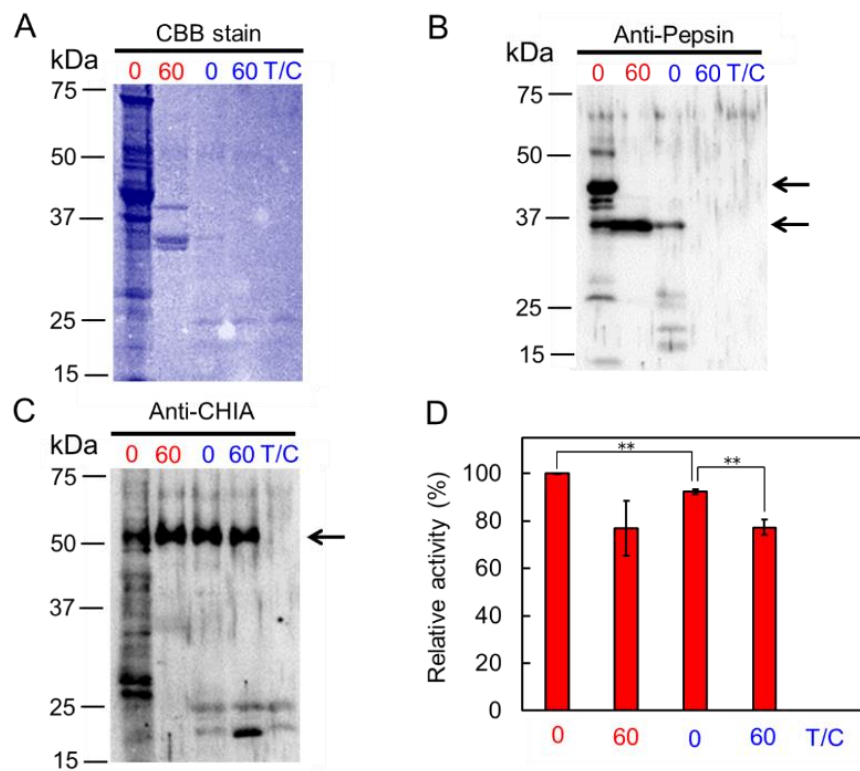


図 3-5. CHIA は trypsin, chymotrypsin による消化に耐性がある

コモンマーモセットの胃から得た可溶性タンパク質は、胃の条件下でインキュベートした後、可溶性タンパク質と等量の trypsin, chymotrypsin を含む腸の環境下でインキュベートした。サンプルは、(A) CBB 染色、(B) pepsin 抗体を用いたウエスタンブロット、(C) ブタ Chia 抗体を用いたウエスタンブロット、(D) キチナーゼ活性測定によって解析した。すべての反応は 37°C で行った。T/C, trypsin/chymotrypsin のみ; 数字, 胃 (赤) または腸 (青) の環境下における、抽出液と trypsin と chymotrypsin のインキュベーション時間。エラーバーは、同一の実験を 3 回行って算出した標準偏差を示す。** $p < 0.01$ 。P 値は Student's t-test で決定した。

コモンマーモセット CHIA は胃と腸の条件下で高分子キチンを分解する

次に、高分子キチン基質が、胃と腸の条件下で CHIA によって分解されうるかどうかを検討した。 α -キチン、 β -キチンまたはコロイダルキチンを、胃抽出液と共に pH 2.0 または trypsin/chymotrypsin (0.5 μ g) を加えた pH 7.6 でインキュベーションした (図 3-6A-C)。また、ミールワーム幼虫の殻はキチン含有生物の基質として用い、上記と同様に処理をした (図 3-6D)。分解産物は FACE 法によって解析した。すべての基質は、1 または 18 時間の胃および腸の条件下における反応で、胃抽出液中の内在性 CHIA の活性によって分解され、主に (GlcNAc)₂ 断片を生成した。このように、CHIA は胃および腸の疑似環境下で高分子キチン基質を分解することが分かった。

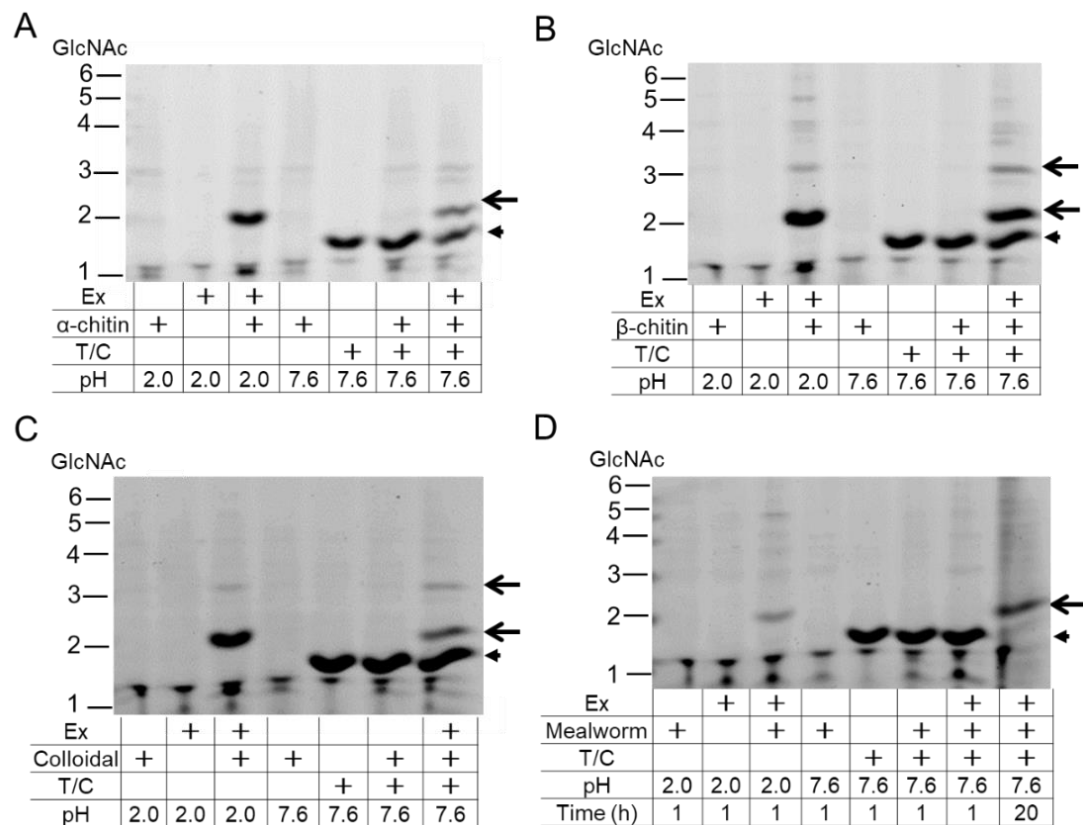


図 3-6. キチン基質とミールワーム幼虫の殻は模倣的な GIT 条件下で CHIA によって分解される

(A) α -キチン, (B) β -キチン, (C) コロイダルキチンを, コモンマーモセットの胃抽出液と共に, pH 2.0 または trypsin と chymotrypsin を加えた pH 7.6 の条件下で反応させた。反応後の分解産物を FACE 法によって解析した。(D) ミールワーム幼虫の殻もまた, 可溶性タンパク質と共に, 模倣的な GIT 環境下でインキュベートした。キチン分解産物は矢印で示し, 人工産物は矢頭で示した。GlcNAc と (GlcNAc)₂ (矢印で示した) 間の特異的なバンドは pH 7.6 のサンプルで見られた。Trypsin/chymotrypsin 由来の産物だと思われる特異的なバンドは, 矢頭で示した。

1 つの CHIA 遺伝子が主にマーモセットの胃で発現していた

最近の報告により、霊長類はいくつかの CHIA 遺伝子をゲノムにもつ [95]。コモンマーモセットは 2 つの CHIA 遺伝子, CHIA [ここで CHIA (CHIA1) と呼ぶ; GenBank Accession Number, XM_017975081.1] と CHIA2 (XM_009001910.1) を有し, 同様に, カニクイザル (旧世界ザル) もまた, CHIA1 (NM_001284548.1) と CHIA2 (XM_015431295.1) をもつ (図 3-7A)。以前の報告では, これらの遺伝子は, それぞれ, mCHIA (マカク CHIA) と hCHIA (ヒト CHIA) と呼ばれている [95, 96]。ヒトでは, CHIAP2 (NR_003928.2; 偽遺伝子) と CHIA (NM_201653.3) が, CHIA (CHIA1) と CHIA2 に関連している (図 3-6A)。CHIA2 はカニクイザルにおいて偽遺伝子であることが報告されているが [96], コモンマーモセットにおいて, その発現は分かっていない。

コモンマーモセットにおける CHIA2 mRNA を評価するため, カニクイザルをコントロールとして, 両種から利用可能 [97] な 8 つの主要組織 (脳, 肺, 胃, 小腸, 結腸, 肝臓, 腎臓, 脾臓) において行った。CHIA (CHIA1) mRNA はコモンマーモセットの胃で高く発現し (図 3-7A, 上のパネル), 図 3-2A と一致していた。同じく, カニクイザルもまた CHIA1 をその組織で高いレベルで発現しており (図 3-7B, 下のパネル), 以前の報告と一致していた [97]。

対照的に, CHIA2 mRNA は解析した全てのマーモセットの組織で低いレベルで転写されていた (図 3-7B, 上のパネル)。マーモセット CHIA2 は, 胃においてバックグラウンドに近いレベル [CHIA (CHIA1) より 6,600 倍低かった] であり, その他の 7 つの組織でもわずかに転写されているレベルで, GAPDH の数百から数千倍低かった。カニクイザル CHIA2 は低いレベルで発現していたが, その組織で検出可能であり (図 3-7B, 下のパネル), 以前の報告と一致していた。これらの結果は, コモンマーモセットの CHIA2 もまた偽遺伝子であると解釈でき [96], この動物では, 胃組織では, 1 つの CHIA 遺伝子 (CHIA1) を主として発現していることが示された。

最近の報告では, 非ヒト霊長類において, CHIA の進化は食虫性と関係しており, 非ヒト霊長類ゲノムでは複数の CHIA 遺伝子が発見された [95]。例えば, アビシニアコロブス (草食性のサル) はタンパク質をコードしうる CHIA 遺伝子を 1 つも持っておらず, 一方で, 食虫性サルのフィリピンメガネザルは 5 つのタンパク質をコードし得る CHIA 遺伝子を有している。今回の結果は, 最近の関連した研究 [95, 96] と合わせて, コモンマーモセットとカニクイザルは, 1 つの CHIA 遺伝子を実質的に胃で発現していることを示した。これらの結果は, コモンマーモセットとカニクイザルは, 1 つの遺伝子をキチンの消化に特化させ, 片方は恐らく, その機能を進化過程で喪失し, 他の 1 つの機能的 CHIA 遺伝子のみをもつ霊長類に近づくように, 現在も進化しつつある可

能性を示唆した。これらの結果は、非ヒト霊長類における、食性と CHIA の分子進化との関係や、昆虫の栄養価や生理活性を明らかにする上での重要な知見となりうる。

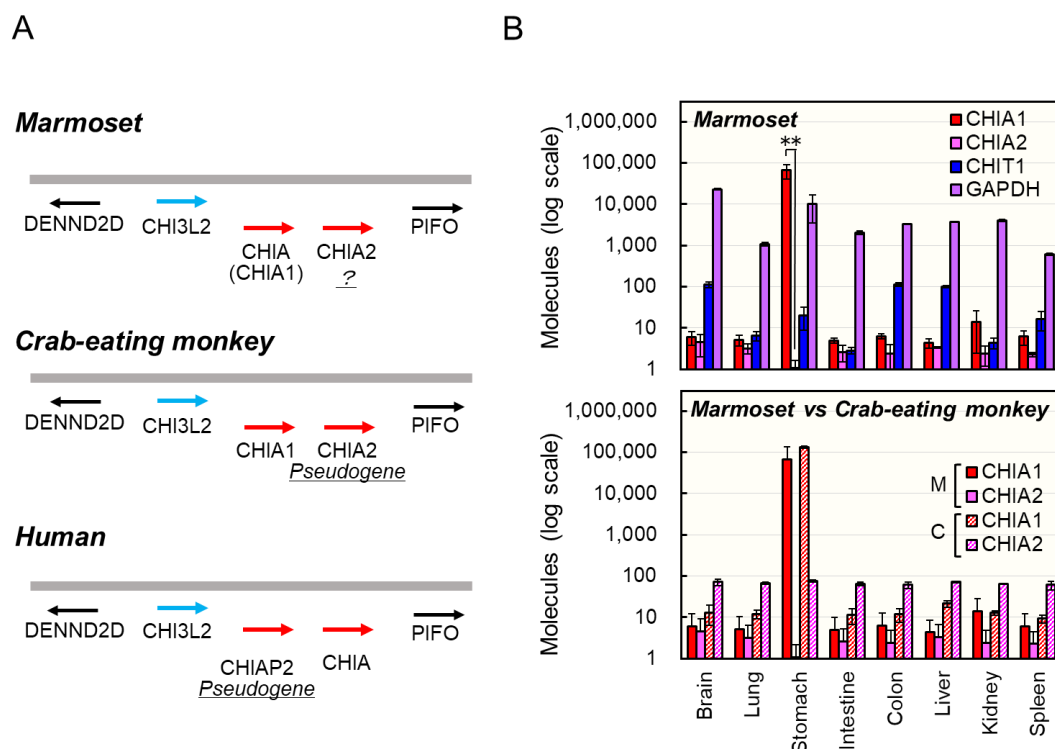


図 3-7. CHIA (CHIA1) は、コモンマーモセットの胃で、カニクイザルと同じく主要な転写物である

(A) CHIA 遺伝子 (赤色) および隣接マーカー遺伝子 (黒色または青色) の概略図。CHIA-like 領域は、DENND2D と PIFO 間から検出した。コモンマーモセットとカニクイザルはその領域に、CHI3L2 (キチナーゼ様タンパク質として知られる), CHIA (CHIA1) および CHIA2 をもつ。ヒトでは、CHIAP2 と CHIA である。(B) コモンマーモセット (上パネル) とカニクイザル (下パネル) の組織における CHIA (CHIA1) と CHIA2 mRNA レベルの評価。7つの遺伝子断片 [マーモセット CHIA (CHIA1), CHIA2, CHIT1, GAPDH とカニクイザル CHIA1, CHIA2, GAPDH] から成る standard DNA を用いた。得られたすべての値は、10 ng の total RNA における分子数として表した。すべての mRNA コピー数は、同じ standard DNA の希釈に基づく。パネルは対数スケールで表示している。各反応は 3 度行なった。** $p < 0.01$ 。P 値は Student's t-test で決定した。

4. イヌとウシ Chia の機能解析

Chia mRNA レベルはウシとイヌの胃組織ではとても低い

これまでの結果より、Chia mRNA は、マウス、ニワトリ、ブタ、コモンマーモセットの胃組織で高く発現することが分かった。キチナーゼ mRNA レベルを、他の家畜および飼育動物と比較するため、正常なウシとイヌの組織由来の total RNAs を、qPCR 法を用いて解析した (図 4-1)。Pepsinogen と GAPDH を参照遺伝子として用いた。ウシ Chia mRNA は、肺と肝臓で高く発現しており (図 4-2A)、これは先行研究と一致していた [98]。Chit1 mRNA の高いレベルは、肺と腎臓で認められた (図 4-2A)。しかし、Chia と Chit1 の mRNA の発現レベルは、共に、ウシの組織においては、GAPDH より低かった。さらに、キチナーゼと参照遺伝子の発現レベルを、4 つのウシの胃組織より調製した cDNA を用いて比較した。Chia mRNA は、すべての胃で同じようなレベルであり、GAPDH よりも低かった (図 4-2B)。また、Chit1 mRNA はこれらの組織で非常に低かった (図 4-2B)。Pepsinogen A は、胃の主要なプロテアーゼであり、胃粘膜の主要な構成成分である。このタンパク質は消化酵素として機能し、マウス、ニワトリ、ブタの胃で多量に合成される [41, 72, 99, 100]。ウシの胃において、pepsinogen A mRNA は、第四胃 (abomasum と呼ばれる) で顕著に発現しており、GAPDH と同等のレベルであった (図 4-2B)。

次に、イヌ組織における遺伝子発現解析を行った。NCBI Genome データベースを検索した限り、イヌはゲノム上に Chit1 を持っていなかった。イヌ Chia mRNA は小腸、肝臓、胃、脳で比較的高く発現していた (図 4-2C)。しかし、Chia 発現レベルは、肺と肝臓では低かった (図 4-2C)。マウス、ヒト、ニワトリ、ブタのこれらの組織では、Chia が高く発現していた。GAPDH mRNA レベルは、解析した全てのイヌの組織において、Chia よりも高かった (図 4-2C)。

次に、キチナーゼと参照遺伝子の発現レベルを、standard DNA (図 4-1) と、ウシ、イヌ、ブタ、ニワトリ、マウスの胃の total RNAs から逆転写した cDNA を用いて、比較した (図 4-3)。ウシとイヌの胃では Chia mRNA が低いレベルで発現し、それぞれ、GAPDH の 1/60 と 1/6 のレベルであった。これに対し、Chia mRNA レベルは、マウスとニワトリの胃組織で顕著に高く、それぞれ、GAPDH の 86 倍、156 倍であった。ブタの Chia mRNA レベルは GAPDH の 25 倍であった (図 4-3)。これらの結果は、ウシ (草食性) とイヌ (肉食性) では、胃における Chia mRNA の発現量は低く、一方で、マウス、ブタ、ニワトリのような雑食動物は多量の Chia mRNA を発現することを示した (図 4-3)。Pepsinogen mRNA レベルは、ブタの胃組織でとりわけ高く、続いて、マウス、ニワトリの順であり、ウシとイヌでは、Chia と同様に、低かった

(図 4-3)。これらの結果は，Chia と pepsinogen はともに，ブタ，ニワトリ，マウスと比べると，ウシとイヌの胃では多量に転写されていないことを示した。以上の結果から，胃において，Chia のみならず pepsinogen の発現も，食性によって調節されていることが示唆された。



図 4-1. qPCR のための standard DNA

(A) Standard DNA の模式図。(B) Standard DNA の塩基配列。この standard DNA は、2,039 塩基対であり、イヌ、ニワトリ、ブタ、ウシ、マウスの Chia, GAPDH (GAP), pepsinogen (Pep), Chit1 (ブタ、ウシ、マウスのみ) の cDNA 断片を含む。qPCR のターゲット領域は、下線で示した。

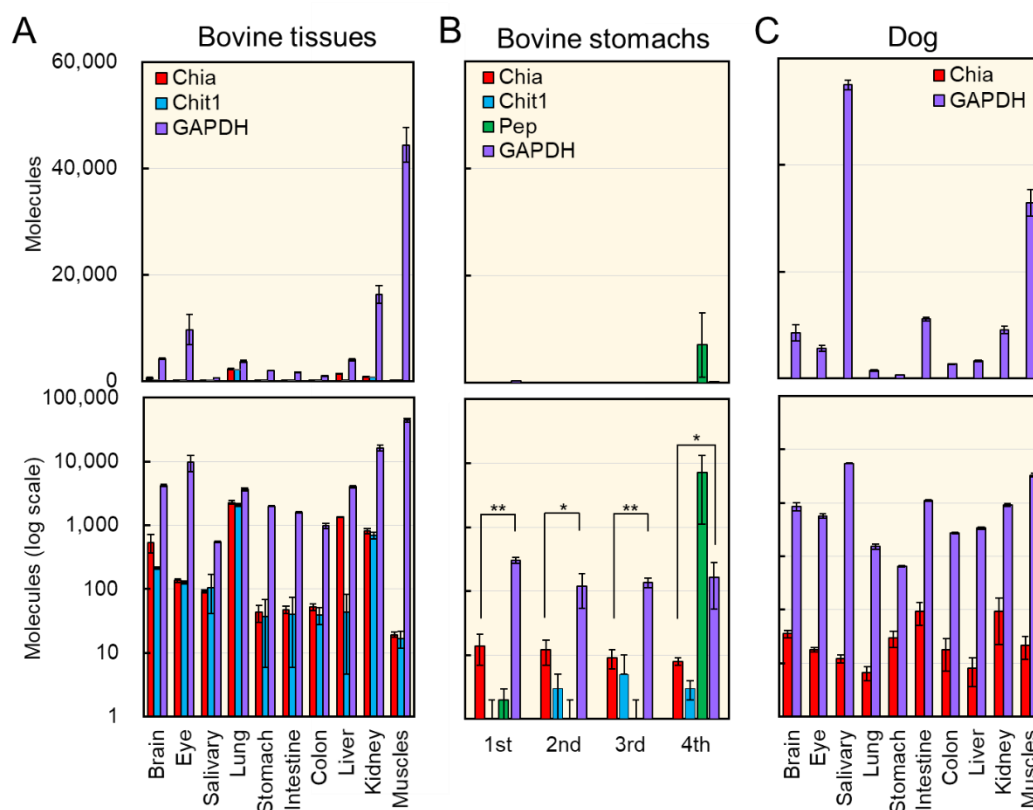


図 4-2. ウシとイヌの主要組織における **Chia** と **Chit1** の発現レベルの定量
Chia, GAPDH, pepsinogen A (Pep A) およびウシおよび Chia の Chit1, GAPDH
および pepsinogen B を含む遺伝子断片を含む standard DNA を使用したウシ
(A, B) およびイヌ (C) 組織における Chia および Chit1 mRNA 発現の評価。
両方のキチナーゼは, standard DNA を使用した qPCR によって定量した。Y
軸は total RNA 10 ng あたりの分子数を表す。すべての mRNA コピー数は, 同
じ standard DNA の希釈に基づいて導いた。上のパネルは実数値, 下のパネル
は対数軸を示す。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 。P 値は Student's t-test によって決定し
た。エラーバーは, 同一の実験を 3 回行って算出した標準偏差を示す。

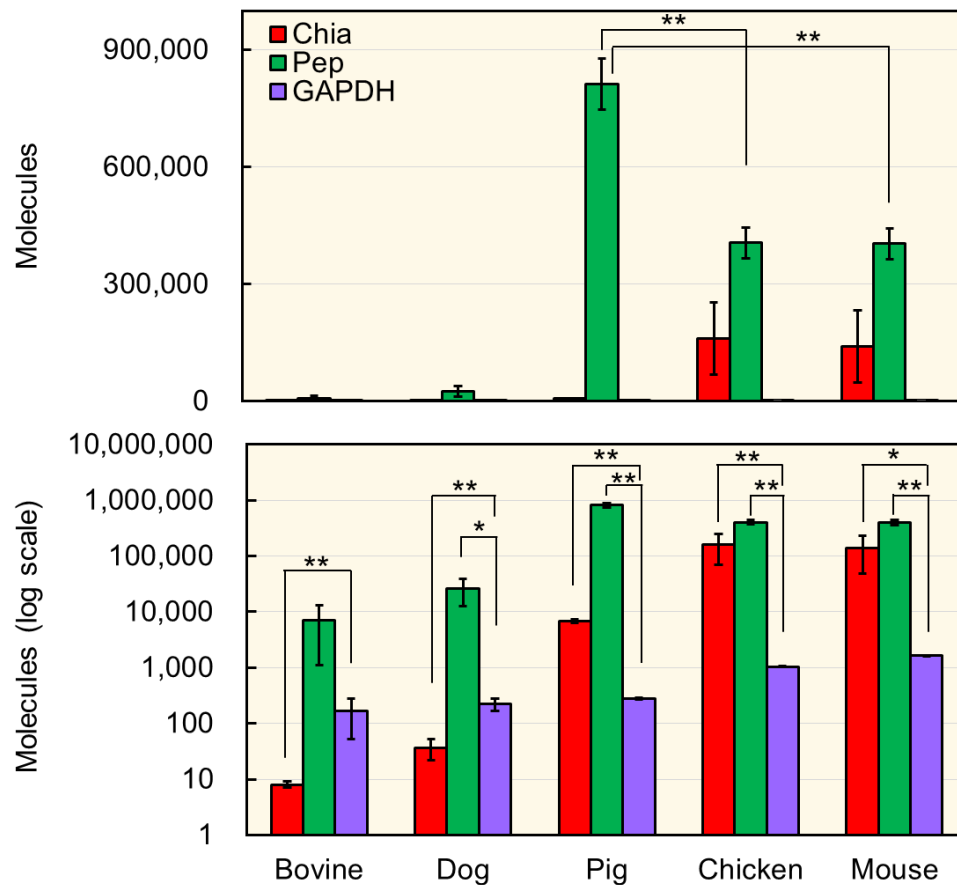


図 4-3. Chia mRNA は雑食性動物の胃で多量に発現する

ウシ、イヌ、ブタ、ニワトリおよびマウスの胃組織における standard DNA を使用した qPCR により、Chia, pepsin, GAPDH の発現レベルを同じスケールで定量化した。Y 軸は total RNA 10 ng あたりの分子数を表す。すべての mRNA コピー数は、同じ standard DNA の希釈に基づいて計算した。上のパネルは実数値、下のパネルは対数軸を示す。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 。P 値は Student's t-test によって決定した。エラーバーは、同一の実験を 3 回行って算出した標準偏差を示す。

ウシの胃抽出液における Chia と pepsinogen のタンパク質レベルは低い

ウシ Chia タンパク質とそのキチナーゼ活性について、すでに述べた方法に従って、pH 2.0, 37°C の胃の環境下で検討した。可溶性タンパク質溶液を、プロテアーゼ阻害剤非存在下でウシの第 4 胃より調製し、pH 7.6 または pH 2.0 で 60 分まで反応した。タンパク質画分は、SDS-PAGE で分離し、CBB で染色した (図 4-4A)。pH 7.6 では、60 分の反応中にバンドパターンおよび強度に変化は認められなかった (図 4-4A)。これに対し、pH 2.0 での反応 5 分後、時間依存的な可溶性タンパク質の明らかな減少が見られた (図 4-4A, B)。Chia および pepsin のタンパク質レベルを評価するために、ウシとブタの胃の可溶性画分を pH 2.0 で 10 分間処理した後、タンパク質の解析を行った。ブタにおけるキチナーゼと pepsin の活性は、ウシと比べて顕著に高かった (図 4-4C)。さらに、抗 Chia 抗体および抗 pepsin 抗体を用いたウェスタンブロットによって、これらの酵素は、pH 2.0 で 10 分の反応後に、検出されなくなった (図 4-4D)。これらの結果は、mRNA レベルと一致し、Chia と pepsin がウシの胃ではとても低いレベルであることを示した (図 4-4B, 図 4-3)。

ウシの胃には、微生物細菌叢によって生産される多量のセルラーゼ (草食性動物において主要な消化酵素) が存在する [101, 102]。ウシはしばしば、餌である草とともに少量の昆虫を食す機会があることが予想される。ウシは、GIT 内で数億のバクテリアと共生している [103]。ウシの胃組織における Chia mRNA のレベルは低いが、一つの可能性として、セルラーゼのように、GIT 内の細菌がキチナーゼを提供するかもしれない。このように、細菌キチナーゼが、ウシや、場合によってはイヌでも、キチンの消化において、貢献しているかもしれない。この仮説については、研究によるさらなる検証が必要である。

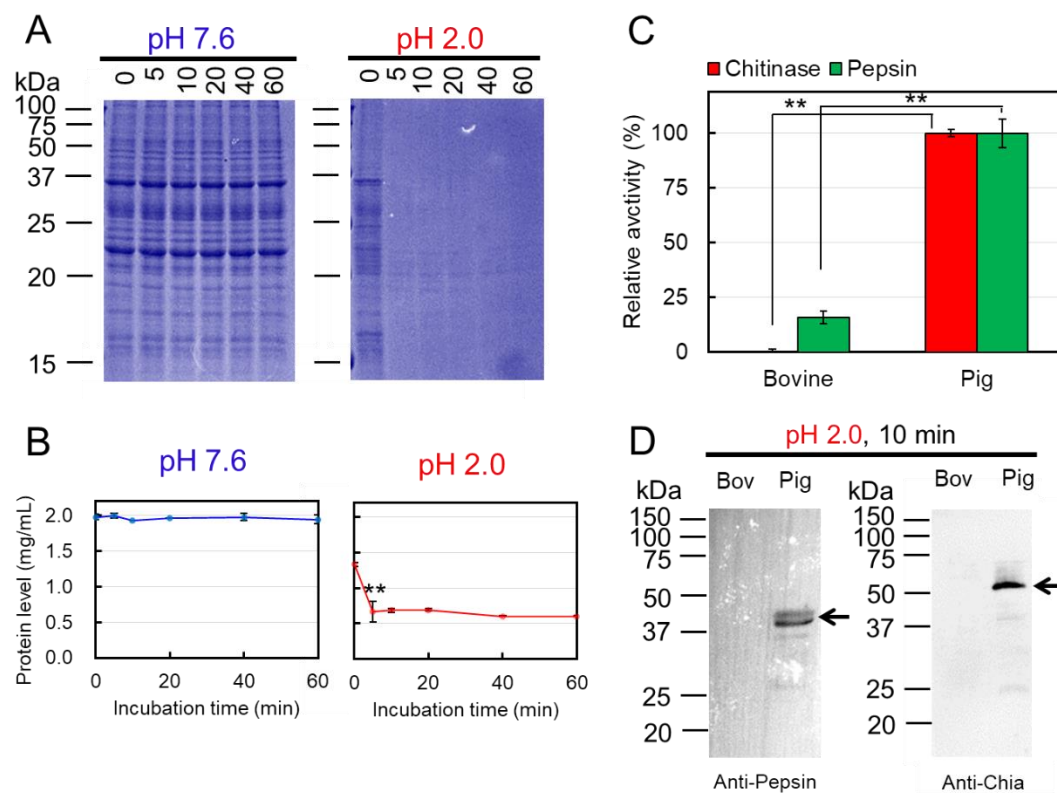


図 4-4. ウシの胃抽出液中の Chia と pepsinogen レベル

プロテアーゼ阻害剤非存在下でウシの第四胃組織から可溶性タンパク質画分を調製し、pH 7.6 または pH 2.0 で 60 分までインキュベートし、(A) SDS-PAGE, (B) 総タンパク質レベルの定量化, (C) キチナーゼおよびプロテアーゼ活性測定によって分析した。ブタ pepsin C 抗体またはマウス Chia 抗体を使用したウェスタンブロット, (D) 方法に記載されているように pH 2.0 でウシおよびブタの胃抽出物で測定されたキチン分解活性およびプロテアーゼ活性。* $p < 0.05$ 。P 値は、Student's t-test を使用して決定した。

ウシとイヌ Chia のキチン分解活性は、雑食動物と比べて低い

Chia のキチナーゼ活性を決定するために、ウシ、イヌ、ブタ、ニワトリ、マウス酵素を、*Staphylococcus aureus* の Protein A の切断型と V5-His tag を含む、融合タンパク質として、大腸菌で発現させた。4-NP-(GlcNAc)₂ を基質としてキチナーゼ活性を測定した。

組換え体マウスおよびニワトリ Chia は pH 2.0 に活性の至適を持ち、ブタは pH 2.0-4.0 であった (図 4-5C)。イヌ Chia の活性は pH 2.0 で最も高かったが、ウシは pH 4.0 付近であった (図 4-5C)。しかし、イヌとウシ Chia は、マウス、ニワトリ、ブタよりも活性が低く、ブタ Chia の pH 4.0 および pH 2.0 における活性に対し、それぞれ、1/6 (ウシ)、1/4 (イヌ) であった。

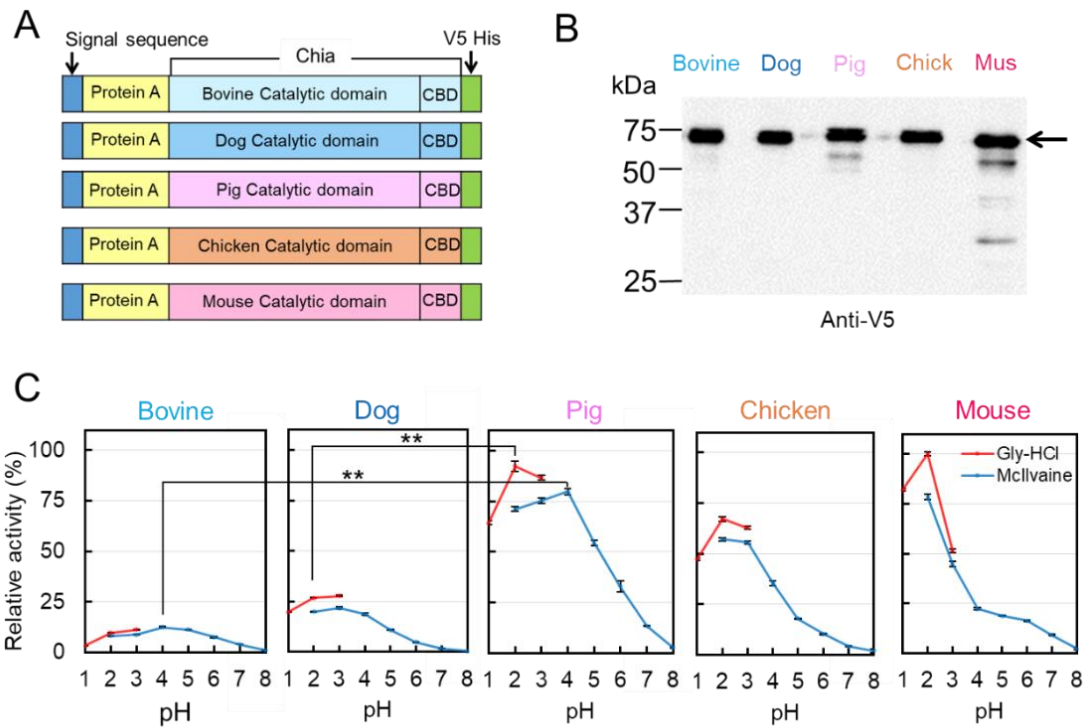


図 4-5. 雑食性動物の Chia のキチナーゼ活性は、肉食性動物や草食性動物よりも高い

(A) 大腸菌で発現したウシ、イヌ、ブタ、ニワトリおよびマウスの Chia 融合タンパク質の模式図。Chia は、分子量が約 50 kDa の分泌タンパク質で、N 末端の触媒ドメイン (CatD) と C 末端のキチン結合ドメイン (CBD) を含む。大腸菌で生成されたタンパク質は、N 末端に Protein A、C 末端に V5-His を含む。(B) V5 抗体を使用した組換えタンパク質のウエスタンブロット分析。矢印は、融合タンパク質 (Protein A-Chia-V5-His) の位置を強調している。(C) 4-NP-(GlcNAc)₂ を使用した Chia タンパク質のキチナーゼ活性の比較。

組換え体ウシおよびイヌ Chia タンパク質は、模倣的 GIT 条件下でキチン基質を分解できる

ウシとイヌ Chia タンパク質は低いキチナーゼ活性を示すが、これらの酵素は模倣的な GIT 条件下で高分子キチンを分解する能力を持つかどうかを検討した。コロイダルおよび結晶性キチンを、ウシ (図 4-6A, C) およびイヌ (図 4-6C, D) の組換えタンパク質と、疑似的な GIT 環境下で反応させた。ウシとイヌの Chia は主に (GlcNAc)₂ をコロイダル (図 4-6A, C) と結晶性 (図 4-6B, D) キチンから生成した。これらの結果は、ウシとイヌの Chia が、GIT 下でキチンを分解できることを意味する。

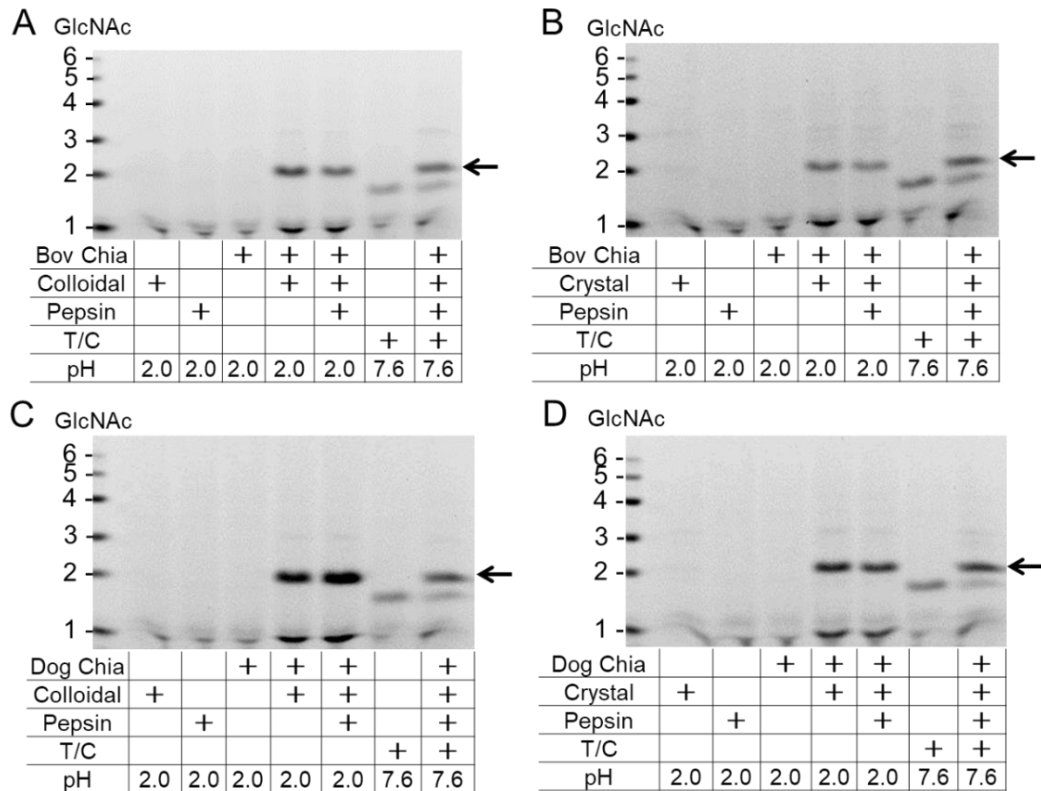


図 4-6. キチンおよびキチン含有生物は、ウシとイヌの消化器系で分解されうる

ウシとイヌの組換え Chia タンパク質を、等量の pepsin または trypsin/chymotrypsin 存在(GIT を模倣した条件) 下、37°C、60 分間インキュベートした。(A, C) コロイダルキチンまたは (B, D) 結晶性キチンを模倣的な GIT 条件下でインキュベートすることによって生成された分解産物を FACE 法で解析した。

食性に適応した機能的 Chia 遺伝子と Chia 偽遺伝子

上述のように、Chia mRNA レベルは、ウシ (草食性) は、雑食性と比べて極めて低い (図 4-3)。NCBI Gene 検索により、いくつかの動物、例えば、ウサギやモルモットでは、Chia 遺伝子をコードしていない (図 4-7A)。ウサギとモルモットが Chia 遺伝子に類似した配列を持っているかどうか、DENN/MADD Domain Containing 2D (DENND2D) および Pitchfork (PIFO) 遺伝子間の領域を、NCBI Blast 検索によって解析した。これらの遺伝子は、マウス、ウサギ、モルモット、ブタ、ヒトで保存されており、Chia 遺伝子断片の目印として使用した。DENND2D は発癌制御 [104, 105], PIFO は繊毛分解を抑制する [106]。ウサギとモルモットにおいて、Chia 遺伝子の痕跡を見つけたが、それらは不活性型の偽遺伝子となり、タンパク質コード機能を失っていた (図 4-7A)。

主要な家畜と飼育動物における、食性とキチンの消化性の関係は、胃における Chia の転写レベルとキチナーゼ活性、および偽遺伝子化の結果に基づく、図 4-7B に示す概念図に要約される。キチンを含む食餌への適応性は、Chia の発現と活性レベルの低い肉食性と草食性と比べて、胃組織で十分な Chia mRNA とタンパク質レベルをもつ雑食性の方が、高いようである。

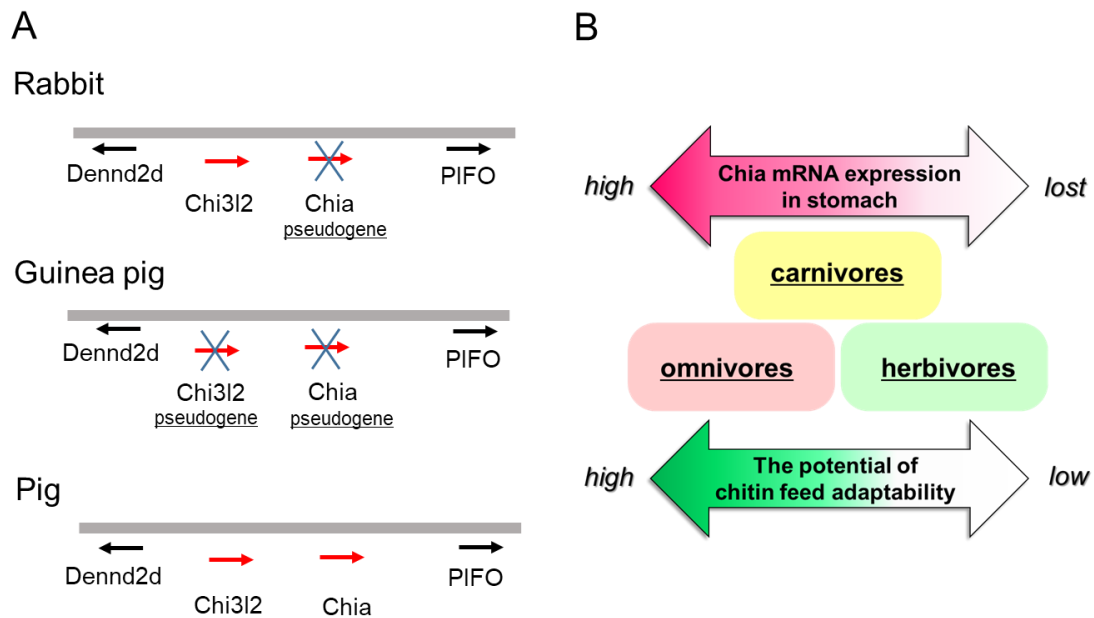


図 4-7. キチンの消化率を決定する可能性のある摂食行動の影響を受ける Chia 遺伝子の進化

(A) Chia 遺伝子および隣接するマーカー遺伝子の概略図。草食性動物であるウサギとモルモットは、ゲノムに Chia 遺伝子を持っていない。タンパク質をコードする能力を欠いた Chia の痕跡遺伝子が、Dennd2d と PIFO の間で見られた。(B) 胃の Chia の転写レベル、キチン分解活性および偽遺伝子化に基づく、主要な家畜、実験動物の摂食行動とキチン消化率との関係。

第4節 考察

本章では、代表的な家畜動物である、ニワトリ、ブタ、ウシに加えて、実験及び飼育動物であるコモンマーモセットとイヌの *Chia* の遺伝子発現解析と酵素機能の解析を行った。その結果、胃におけるキチンの消化性は、動物の食性に依存し、雑食・食虫性動物の胃では *Chia* mRNA が多量に発現し、高いキチン分解活性を持つことを明らかにした。それに対して、草食性・肉食性動物の胃では、*Chia* はほとんど発現しておらず、キチン分解能も、雑食性動物と比べて低いことも示した。本研究で解析した動物に加えて、最近の研究で、*Chia* は、食虫性のコウモリ [107]、マウス [72]、アリを主食とするセンザンコウ [108] などの食虫性および雑食性の動物の胃で発現することが示されている。

本章で解析した雑食性動物 *Chia* は、消化器系プロテアーゼ存在下でミールワーム幼虫の殻を分解し、 $(\text{GlcNAc})_2$ を生成した。この分解産物のパターンは、コロイダルキチンと結晶性キチンを基質に用いた場合と多少異なっていた。ミールワーム幼虫の殻の処理後に、 $(\text{GlcNAc})_2$ 付近の複数のバンドと共に、長鎖キチンオリゴ糖を検出した。当研究室の最近の研究で、pH 5.0-8.0 の酵素反応後に蛍光標識した場合、副産物として、キチンオリゴ糖マーカよりも移動度の遅い特異的断片が生成することを見出し、このような副産物を減らす改良 FACE 法を報告した [85]。本研究での蛍光標識では、改良法を用いたが、長鎖キチンオリゴ糖のバンドが認められた。したがって、長鎖キチンオリゴ糖の生成理由について完全には説明できない。しかし、次のような可能性は考えられる。*Serratia marcescens* のキチナーゼは部分的に脱アセチル化されたキチンを分解し、予想とは異なる分子量のキチンオリゴ糖を生成することが報告されている [109, 110]。このような結果は、ヒト CHIT1 でも報告されている [111]。加えて、この産物パターンは *Chia* によるキトサン分解によって得られる産物と似ていた (図 1-8 参照)。このように、異なるキトオリゴ糖は、部分的に脱アセチル化されたミールワームの殻や結晶性キチンが、*Chia* により分解され、生成し得ると考えることが出来る。また、マウス *Chia* が加水分解に加え、糖転移反応も触媒し、生理的条件下で新規の機能をもつことも報告されている [112]。これらの研究から、異なるキトオリゴ糖は、部分的に脱アセチル化されたミールワームの殻のキチンから、*Chia* による糖転移によって生成された可能性も考えられる。

Chia の mRNA とタンパク質レベルの上昇は、喘息やアレルギー性炎症のような病態下に関係があると報告されてきた [51, 52]。キチン含有生物中のキチンが、*Chia* の発現を増加させ、生体へ悪影響を与える可能性が懸念される。しかし、*Chia* の過剰発現トランスジェニックマウスは、自発的な炎症の兆候を示

さない [62]。このことは、Chia が、肺のキチンを酵素的に分解することによって、キチン誘導性のアレルギー性自然免疫反応を減弱化させる可能性を示唆する。さらに、最近の Chia 欠損マウスを用いた研究で、肺機能の維持において、Chia が恒常的に生産され、気道中のキチンを分解する必要があること [52, 63]、さらに、Chia が宿主の GIT 内で腸内線虫に対して 2 型免疫構築の重要な役割を果たすことも示された [64]。そして、*Helicobacter pylori* によって引き起こされる胃癌において、炎症が起きた際に Chia が過剰発現されず、むしろ発現が減少することが示されている [56, 57]。以上の報告は、Chia 自体が有害ではなく、また、炎症が Chia の過剰発現を誘導するわけでもないことを示す。そして、それらの報告は、Chia がマウスやヒトの健康にとって必要であることを示す。これらのことから、Chia の胃における恒常的な高い発現は、ニワトリやブタ、コモンマーモセットにとっても安全であるように思われる。

ブタ、ニワトリ、コモンマーモセット、マウス Chia は、pH 2.0 において、Gly-HCl 緩衝液中の方が、McIlvaine 緩衝液よりも高い活性を示す (図 1-3C, 2-5B, 3-4A, 4-5C)。このように、Chia のキチナーゼ活性は、用いる緩衝液によって、pH 依存性に若干の差異が生じる。この理由をはっきりとは分かっていない。しかし以下の可能性が考えられる。ヒトの膵臓 α -アミラーゼの活性が、Cl イオンによって活性化されるという知見 [112] から、この問題を解くヒントが得られるかもしれない。アミラーゼタンパク質ファミリーの中には、最大活性を示すために Cl イオンを必要とする [44, 77, 113]。塩酸は胃で分泌され、生み出された酸性条件 (~pH 2.0) が、同様の Chia の活性化を起こす可能性がある。この点について、さらなる詳細な検討が必要である。

本章では、組換え体マウス、ニワトリ、ブタ、ウシ、イヌ Chia タンパク質の比活性を比べた。これらの Chia のアミノ酸配列同一性は 70-79% であるにも関わらず、ニワトリとブタ Chia は 4-10 倍、イヌとウシの酵素よりも高かった。これらの結果から、いくつかの非保存性のアミノ酸残基が、Chia の活性と pH 依存性に影響を与えているのかもしれない。さらに、ウシ Chia のみ、キチナーゼ活性が pH 4.0 (他の種は pH 2.0) で最も高かった。これらの結果から、草食性であるウシの胃は、弱酸性下に活性の至適をもつように Chia を適応させたのかもしれない。

配列の変化や発現パターンは、しばしば、生物の環境刺激の応答によって決まる [114]。たとえば、反芻動物のような種では、胃粘膜において、顕著に高い濃度のリゾチーム c (EC 3.2.1.17) を検出し、通常のは乳類リゾチーム c とは異なる細菌溶解速度の時間、pH、イオン強度の依存性を示す [115]。同じく、うま味受容体遺伝子、Tas1r1 は、パンダにおいて、主食が笹へと移行する

間に、機能制約の緩和と ORF の破壊的な置換によって偽遺伝子化している [116]。ヒトの *Chia* の酵素活性と遺伝子発現は、5' UTR への挿入、プロモーター多型 [60]、非同義型置換 [58, 61] によって影響を受ける。この知見は、草食性や肉食性などの特定の食性の変化が、*Chia* 遺伝子のコード領域あるいは非コード領域の保存に重要な影響を与えている可能性を示唆する。

ハエの幼虫、ミールワーム、コオロギを含むキチン含有生物はタンパク質、脂質、ミネラル、ビタミンに富み [117]、その一部は、抗生物質やトウモロコシ、大豆由来の飼料の代替として、ニワトリの飼料として利用がされている [71, 86, 118]。乾燥ミールワームの食品添加物は、ニワトリの食餌摂取量を増加させ、IgG と IgA レベルを上昇させ、他方、飼料要求率、致死率は減少したことが報告されている [90]。さらに、他の研究では、ミールワーム飼料は、嗜好性に悪影響が無く、生育期間中にニワトリの大豆飼料と代替可能であることも報告されている [89]。幼仔期のブタに、乾燥ミールワームを添加した飼料を与えた例では、生育パフォーマンスや、栄養素の消化性の改善が、免疫応答への悪影響無しに見られた [113]。さらに、キチンの派生物が、妊娠中のブタの免疫応答を高め、抗菌活性/生菌として働くことも報告されている [41]。これらの *in vivo* の研究結果と、本研究で明らかにした *Chia* の機能から、ブタやニワトリ、コモンマーモセットなどの雑食・食虫性動物に対して、昆虫を飼料として与えることは、動物の生育、健康にとって問題ないと言える。

第3章 不活性化酵素の活性化と食性に伴う Chia の分子進化の解明

第1節 緒言

胎盤ほ乳動物の祖先は、昆虫を食べる小さな生物で、恐竜の大量絶滅直後に進化した [119]。この出来事は、食餌のニッチ空間を開き、肉食性動物、草食性動物、雑食性動物といった多様なほ乳類の出現につながった。このような食餌の変化は、ほ乳類の多様性を形作る上で重要な要素となっている [116, 120-122]。

第2章では、ニワトリ、ブタ、コモンマーモセット (雑食・食虫性) は、胃で Chia を高発現し、GIT 系条件下でエビや昆虫のキチン質を分解するが、イヌ (肉食性動物) とウシ (草食性動物) では、Chia の mRNA およびタンパク質の発現レベルが低く、キチン分解活性が著しく低下していたことを明らかにした。

最近のゲノム研究により、食虫性の胎盤ほ乳類の祖先が 5 つの Chia 遺伝子を保有し、これらの遺伝子の喪失が、食餌中の無脊椎動物の摂取が少ないほ乳類で起こったことが示された [123]。また、ヒト以外の霊長類の CHIA パラログ遺伝子の多くは、昆虫の消費と体の大きさに関連していることも示された [95]。したがって、Chia 遺伝子の機能喪失的な変化は、食虫性祖先から進化したほ乳類にとっての分子記録となる [123]。しかし、それらの動物が、どのようにして、Chia の機能を失ったかについての理解はあまり進んでいない。

本章では、活性の高いマウスと低いイヌの Chia 間でキメラ体、変異体タンパク質を作製し、イヌ Chia を活性化させることで、その不活性化の原因領域、原因アミノ酸の同定を行った。さらに、イヌが属する食肉目動物 41 種の Chia の塩基配列を解析することで、食虫性祖先から進化した現代の動物における Chia の構造と機能の変化を探った。

第2節 実験材料と方法

大腸菌発現ベクター、キメラおよび変異タンパク質 cDNA の調製

第2章では、*Staphylococcus aureus* (黄色ブドウ球菌) の Protein A プロモーターによってドライブされる pEZZ18 を使用して、Protein A-Chia-V5-His の融合タンパク質として Chia タンパク質を大腸菌 BL21 (DE3) で発現してきた。本章では、pEZZ18 から T7 プロモーターシステムを使用する pET22b (Merck Millipore 社) に変更し、マウス、イヌの Chia タンパク質、ならびにそれらの

キメラおよび変異タンパク質を発現させた。イヌの Chia を Protein A と V5-His (pEZZ18 / Protein A-dog Chia-V5-His) との組換え融合タンパク質として発現させた [124]。ここでは、T7 プロモーターシステムを使用した pET22b によって、PA-dog Chia-V5-His と PA-mouse Chia-V5-His のキメラタンパク質または変異タンパク質を発現した (pET22b / pre-Protein A-Chia-V5-His)。

pET22b / pre-Protein A-Chia-V5-His を以下のように構築した。KOD Plus DNA ポリメラーゼ (Toyobo 社) とプライマー (Eurofins Genomics 社) を使用した PCR により、Protein A-dogChia-V5-His をコードする領域を pEZZ18 /pre-Protein A-Chia-V5-His から増幅した。増幅に用いたプライマーに NdeI および SalI の制限サイトを付加しており、それらのサイトは、増幅された DNA の 5',3' 末端にそれぞれ導入される。Forward primer (5'-

GGAGATATACATATGAAAAAGAAAAACATTTATTCAAT-3') には、NdeI 認識配列 (下線) と 24 塩基の長さの Protein A 領域が含まれており、細胞外分泌のためのシグナル配列を備えている。Reverse primer (5'-

CATGCCTGCAGGTCGACTAGAAAGTCGAGGCTGATCA-3') には、SalI 認識配列 (下線) が含まれており、pcDNA3.1 / V5-His C ベクター

(http://tools.invitrogen.com/content/sfs/vectors/pcdna3_1v5hisc_seq.txt) のヌクレオチド 1080~1106 に相補的である。両方のプライマーには、末端近くが制限酵素で効率的に切断されるように、9 塩基または 11 塩基の付加的な配列 (太字) が含まれている。PCR 産物は、Wizard SV Gel および PCR Clean-Up System (Promega 社) を使用して精製し、NdeI および SalI で消化した。切断された DNA 断片を 1.5% アガロースゲルで精製し、pET22b 発現ベクターの NdeI および XhoI 部位にサブクローニングした。得られた pET22b /pre-Protein A-dog Chia-V5-His の全塩基配列を確認した (Eurofins Genomics 社)。pEZZ18 / Protein A-mouse Chia-V5-His を EcoRI および XhoI で消化した。

切断された DNA 断片を精製し、同様に消化した pET22b /pre-Protein A-dog Chia-V5-His にサブクローニングし、pET22b / pre-Protein A -mouse Chia-V5-His を作製した。

キメラタンパク質の構築

マウスとイヌの Chia タンパク質間でキメラタンパク質を構築した。2 つの分子は塩基配列レベルで類似の exon 構造を持っているため、exon 3-5, exon 6-7, exon 8-10, exon 11 の接合部位で 2 つの成分を融合した (図 5-1A)。キメラ C1, C2 および C3 の構築は次のように行った。C1, C2 および C3 の 5' 部分は、Protein A_Fw_2533 および Mu_Dog_C1_Rv, Mu_Dog_C2_Rv(C2), あるいは Mu_Dog_C3_Rv(C3) を用いて、pEZZ18/Protein A-mouse Chia-V5-His

(mouse version) より増幅した。3' 部分は, Mu_Dog_C1_Fw(C1), Mu_Dog_C2_Fw(C2) あるいは Mu_Dog_C3_Fw(C3) および Sal_BGH_Rv を用いて, pEZZ18 / Protein A-dog Chia-V5-His(dog version) から増幅した。得られた DNA 断片を精製し, 混合し, Protein A_Fw_2533 および Sal_BGH_Rv を用いて PCR で増幅した。増幅された cDNA を EcoRI および XhoI で切断し, pET22b-Protein A -V5-His ベクターにクローニングし, pET22b/pre-Protein A-chimera-V5-His を作成した。キメラ C4-C12 についても上記と同様の操作で増幅し, 作製した。使用したテンプレート DNA とプライマーの組み合わせは下記の表に記載した (表 3, 4)。

表 3. キメラ体作製のためのプライマーとテンプレート DNA の組み合わせ

| キメラ名 | 部品 | テンプレート | Forward | Reverse |
|------|----|------------|-------------------|----------------|
| C1 | 5' | Mouse Chia | Protein A_Fw_2533 | Mu_Dog_C1_Rv |
| | 3' | Dog Chia | Mu_Dog_C1_Fw | Sal_BDH_RV |
| C2 | 5' | Mouse Chia | Protein A_Fw_2533 | Mu_Dog_C2_Rv |
| | 3' | Dog Chia | Mu_Dog_C2_Fw | Sal_BDH_RV |
| C3 | 5' | Mouse Chia | Protein A_Fw_2533 | Mu_Dog_C3_Rv |
| | 3' | Dog Chia | Mu_Dog_C3_Fw | Sal_BDH_RV |
| C4 | 5' | Dog Chia | Protein A_Fw | Mu_Dog_C4_Rv |
| | 3' | Mouse Chia | Mu_Dog_C4_Fw | Sal_BDH_RV |
| C5 | 5' | Dog Chia | Protein A_Fw_2533 | Mu_Dog_C5_Rv |
| | 3' | Mouse Chia | Mu_Dog_C5_Fw | Sal_BDH_RV |
| C6 | 5' | Dog Chia | Protein A_Fw_2533 | Mu_Dog_C6_Rv |
| | 3' | Mouse Chia | Mu_Dog_C6_Fw | Sal_BDH_RV |
| C7 | 5' | C3 | Protein A_Fw_2533 | Mu_Dog_C5_Rv |
| | 3' | Mouse Chia | Mu_Dog_C5_Fw | Sal_BDH_RV |
| C8 | 5' | C6 | Protein A_Fw_2533 | Mu_Dog_C2_Rv |
| | 3' | Dog Chia | Mu_Dog_C2_Fw | Sal_BDH_RV |
| C9 | 5' | C3 | Protein A_Fw_2533 | Mu_Dog_Ex6_Rv |
| | 3' | Mouse Chia | Mu_Dog_Ex6_Fw | Sal_BDH_RV |
| C10 | 5' | Mouse Chia | Protein A_Fw_2533 | Mu_Dog_Ex6_Rv |
| | 3' | C5 | Mu_Dog_Ex7_Fw | Sal_BDH_RV |
| C11 | 5' | C6 | Protein A_Fw_2533 | Dog_Mus_Ex6_Rv |
| | 3' | Dog Chia | Dog_Mus_Ex6_Fw | Sal_BDH_RV |
| C12 | 5' | Dog Chia | Protein A_Fw_2533 | Dog_Mus_Ex7_Rv |
| | 3' | C2 | Dog_Mus_Ex7_Fw | Sal_BDH_RV |

表 4. キメラ体作製のためのプライマーリスト

| プライマー名 | 配列 |
|----------------|---|
| Mu_Dog_C1_Rv | GGCTGAGCAGGGGCGGTACAACCTTCAGTGGATATGCCAA |
| Mu_Dog_C1_Fw | TTGGCATATCCACTGAAGGTTGTACCGCCCCTGCTCAGCC |
| Mu_Dog_C2_Rv | CAGTAGTTCATGACATAATCCACATTGAGGTAGGCATTGC |
| Mu_Dog_C2_Fw | GCAATGCCTACCTCAATGTGGATTATGTCATGAACACTG |
| Mu_Dog_C3_Rv | TCAAAAGCTTCACGCATTTCTTCACCAGGACAGTGAAGA |
| Mu_Dog_C3_Fw | TCTTCACTGTCCTGGTGAAGGAAATGCGTGAAGCTTTTGA |
| Mu_Dog_C4_Rv | GGCACGTCAGGAGCTGTGCAACTTGCACTCTGTAGCCCAA |
| Mu_Dog_C4_Fw | TTGGGCTACAGAGTGCAAGTTGCACAGCTCCTGACGTGCC |
| Mu_Dog_C5_Rv | CAATAGTTCATGACATAATCCACATTGAGGTAGGCATTGC |
| Mu_Dog_C5_Fw | GCAATGCCTACCTCAATGTGGATTATGTCATGAACATTG |
| Mu_Dog_C6_Rv | TCAAAAGCTTCACGCATTTCTTCACCAGGACGGTGAAGA |
| Mu_Dog_C6_Fw | TCTTCACTGTCCTGGTGCAGGAAATGCGTGAAGCTTTTGA |
| Mu_Dog_C5_Rv | CAATAGTTCATGACATAATCCACATTGAGGTAGGCATTGC |
| Mu_Dog_C5_Fw | GCAATGCCTACCTCAATGTGGATTATGTCATGAACATTG |
| Mu_Dog_C2_Rv | CAGTAGTTCATGACATAATCCACATTGAGGTAGGCATTGC |
| Mu_Dog_C2_Fw | GCAATGCCTACCTCAATGTGGATTATGTCATGAACACTG |
| Mu_Dog_Ex6_Rv | CATGGATGAAATCCAGGTACTGGGACAGCTGGGGGATGTC |
| Mu_Dog_Ex6_Fw | GACATCCCCCAGCTGTCCCAGTACCTGGATTTCATCCATG |
| Mu_Dog_Ex6_Rv | CATGGATGTAGTCCAGGTACTTAGAGAGCTCAGCAATCTG |
| Mu_Dog_Ex7_Fw | CAGATTGCTGAGCTCTCTAAGTACCTGGACTACATCCATG |
| Dog_Mus_Ex6_Rv | CATGGATGTAGTCCAGGTACTTAGAAAAGTTCAGGGATCTC |
| Dog_Mus_Ex6_Fw | GAGATCCCTGAACCTTTCTAAGTACCTGGACTACATCCATG |
| Dog_Mus_Ex7_Rv | CATGGATGAAATCCAGGTACTGGGACAGCTGGGGGATGTC |
| Dog_Mus_Ex7_Fw | GACATCCCCCAGCTGTCCCAGTACCTGGATTTCATCCATG |

イヌ Chia 変異タンパク質の構築

マウスとイヌ Chia 変異体タンパク質は、表 5,6 に記載したプライマーを用いて、PCR によって調製した。はじめに、目的の塩基置換の入った forward および reverse プライマーを用いて 5'- および 3'-領域の断片を増幅した。DNA 断片をゲル精製、混合し、Protein A_Fw_2533 および Sal_BGH_Rv を使用した PCR で増幅した。上記のように、増幅された cDNA を EcoRI および XhoI で消化し、pET22b / pre-Protein A-V5-His ベクターにクローニングした。

表 5. 変異体作製のためのプライマーとテンプレート DNA の組み合わせ

| 変異体名 | 部品 | テンプレート | Forward | Reverse |
|-----------|----|------------|----------------|----------------|
| Dog Y206F | 5' | Dog Chia | pEZZ18_Fw2533 | 2_C14_YtoF_Rv |
| | 3' | Dog Chia | 1_C14_YtoF_Fw | Sal_BGH_RV |
| Dog FLG | 5' | Dog_Y206F | pEZZ18_Fw2533 | Dog_LHG_Mut_Rv |
| | 3' | Dog_Y206F | Dog_LHG_Mut_Fw | Sal_BGH_RV |
| Dog TE | 5' | Dog Chia | pEZZ18_Fw2533 | Dog_TE_Mut_Rv |
| | 3' | Dog Chia | Dog_TE_Mut_Fw | Sal_BGH_RV |
| Mus FA | 5' | Mus Chia | pEZZ18_Fw2533 | Mus_FHA_Mut_Rv |
| | 3' | Mus Chia | Mus_FHA_Mut_Fw | Sal_BGH_RV |
| Dog LG | 5' | Dog Chia | pEZZ18_Fw2533 | Dog_LHG_Mut_Rv |
| | 3' | Dog Chia | Dog_LHG_Mut_Fw | Sal_BGH_RV |
| Dog LGT | 5' | Dog_LG_Mut | pEZZ18_Fw2533 | Dog_S233T_Rv |
| | 3' | Dog_LG_Mut | Dog_S233T_Fw | Sal_BGH_RV |
| Dog LGE | 5' | Dog_LG_Mut | pEZZ18_Fw2533 | Dog_D234E_Rv |
| | 3' | Dog_LG_Mut | Dog_D234E_Fw | Sal_BGH_RV |

表 6. キメラ体作製のためのプライマーリスト

| プライマー名 | 配列 |
|----------------|--|
| 2_C14_YtoF_Rv | GGTCATGACATGGATGAAGTCCAGGTACTTAGA |
| 1_C14_YtoF_Fw | TCTAAGTACCTGGACTTCATCCATGTCATGACC |
| Dog_LHG_Mut_Rv | CAGTGTAGCCCTCCCAGGAGCCATGGAGGTCATAGGTCATGACATGGA |
| Dog_LHG_Mut_Fw | TCCATGTCATGACCTATGACCTCCATGGCTCCTGGGAGGGCTACACTG |
| Dog_TE_Mut_Rv | AGGTAGGCATTGCTGCCAGTCTCAGTAGGGTATTTGTATAAGGGGC |
| Dog_TE_Mut_Fw | GCCCCTTATACAAATACCCTACTGAGACTGGCAGCAATGCCTACCT |
| Mus_FHA_Mut_Rv | CAGTGTAGCCCTCCCAGGAGGCATGGAAGTCATATGTCATGACATGGA |
| Mus_FHA Mut_Fw | TCCATGTCATGACATATGACTTCCATGCCTCCTGGGAGGGCTACACTG |
| Mus_FHA_Mut_Rv | CAGTGTAGCCCTCCCAGGAGGCATGGAAGTCATATGTCATGACATGGA |
| Mus_FHA Mut_Fw | TCCATGTCATGACATATGACTTCCATGCCTCCTGGGAGGGCTACACTG |
| Dog_S233T_Rv | GCATTGCTGCCAGTGTGAGTAGGGTATTTGTATAAGGGG |
| Dog_S233T_Fw | CCCCTTATACAAATACCCTaCTGACACTGGCAGCAATGC |
| Dog_D234E_Rv | GGTAGGCATTGCTGCCAGTCTCAGAAGGGTATTTGTATA |
| Dog_D234E_Fw | TATACAAATACCCTTCTGAgACTGGCAGCAATGCCTACC |

組換え Chia タンパク質の調製

pET22b/pre-Protein A-Chia-V5-His を用いて大腸菌 BL21 (DE3) を形質転換し、pre-Protein A-Chia-V5-His タンパク質を発現させた。形質転換された大腸菌は、100 µg/ mL ampicillin を含む 250 mL LB 培地、37°C で 18 時間培養した。0.1 mM の isopropyl-β-D-thiogalactoside (IPTG) で誘導後、さらに 2 時間培養した。4°C で 6,500 g で 20 分間遠心分離することにより菌体を回収した。第 2 章で記載した方法に従い、組換えタンパク質を大腸菌から調製し、IgG セファロースクロマトグラフィーで精製した [42]。TS 緩衝液 [20 mM Tris-HCl(pH 7.6), 150 mM NaCl およびプロテアーゼ阻害剤] で平衡化した PD MidiTrap G-25 を使用して、タンパク質含有画分を脱塩した。組換え産物は、V5-HRP モノクローナル抗体を使用したウエスタンブロットで検出した。

キチナーゼ活性測定

キチナーゼ活性は、Gly-HCl 緩衝液または McIlvaine 緩衝液中で、合成蛍光基質の 4-methyl umbelliferyl β-D-N, N'-diacetyl chitobioside [4-MU-(GlcNAc)₂, Sigma-Aldrich 社] を使用し、37°C で 30 分間の反応で決定した。遊離した 4-methyl umbelliferon (4-MU) の蛍光は、励起波長 365 nm, 蛍光波長 445 nm で、GloMax Discover Microplate Reader (Promega 社) で測定した。

統計分析

すでに 第 2 章で述べた方法で行った。

第3節 結果

1. イヌ Chia 不活性化の原因アミノ酸の同定

イヌ Chia はマウスの exon 7 配列と交換することで活性化する

第2章で、雑食性動物では Chia が高いレベルで発現し、キチン分解活性も高いが、肉食性動物と草食性動物では Chia mRNA の転写レベルが低く、その酵素活性も低下していることを示した。肉食性動物であるイヌ Chia はマウスと 79% の配列同一性を有するにもかかわらず、そのキチン分解活性はマウスの数倍低い。本章では、イヌ Chia のキチン分解活性低下の原因となるアミノ酸を明らかにするため、イヌーマウス Chia のキメラ体が大腸菌で発現し、蛍光基質である 4-MU-(GlcNAc)₂ を用いてキチン分解活性を解析した。

マウスの exon 2-7 およびイヌの exon 8-11 によってコードされるキメラ C1 および C2 は、野生型 (WT) マウス Chia に匹敵する強力なキチン分解活性を示した (図 5-1B)。しかし、イヌの exon 6-11 (キメラ C3) では活動が低下した (図 5-1B)。マウスの Chia と比較して、キメラ C4 および C5 ではキチン分解活性が非常に低かった。対照的に、キメラ C6 は強い活性を示し、そのレベルはマウスと同等であった (図 5-1B)。これらの結果は、exon 6 および 7 が Chia のキチン分解活性に重要であり、マウス配列が活性化し、イヌ配列が酵素活性を低下することを示している。

酵素活性の調節における exon 6 および 7 の役割を明らかにするため、キメラ C7 および C8 を構築した (図 5-1C)。基本的にマウスのオープンリーディングフレーム (ORF) であり、イヌの exon 6 および 7 を有するキメラ C7 は、WT マウス Chia と比較して 10 倍低いキチン分解活性を示した (図 5-1D)。一方、マウスの exon 6 および 7 を持つイヌの酵素であるキメラ C8 は、WT イヌ Chia と比較して、活性が 9 倍上昇した。これらの結果から、exon 6 と 7 がイヌとマウスの Chia の活性を制御していることが分かった。

活性調節への各 exon の寄与をさらに明らかにするために、キメラ C9-C12 を作製した (図 5-1E)。キメラ C9 および C10、イヌの exon 6 または 7 を有するマウス ORF は、WT マウス Chia と比較して、活性が、それぞれ 1.4 倍または 5 倍低下した (図 5-1F)。逆に、キメラ C11 と C12 (マウスの exon 6 または 7 を持つイヌの酵素) は、WT イヌ Chia と比較して、それぞれ 1.2 倍または 5 倍高いキチン分解活性を示した (図 5-1F)。これらの結果は、マウスの exon 7 領域がイヌ Chia の活性化に関与していることを示している。

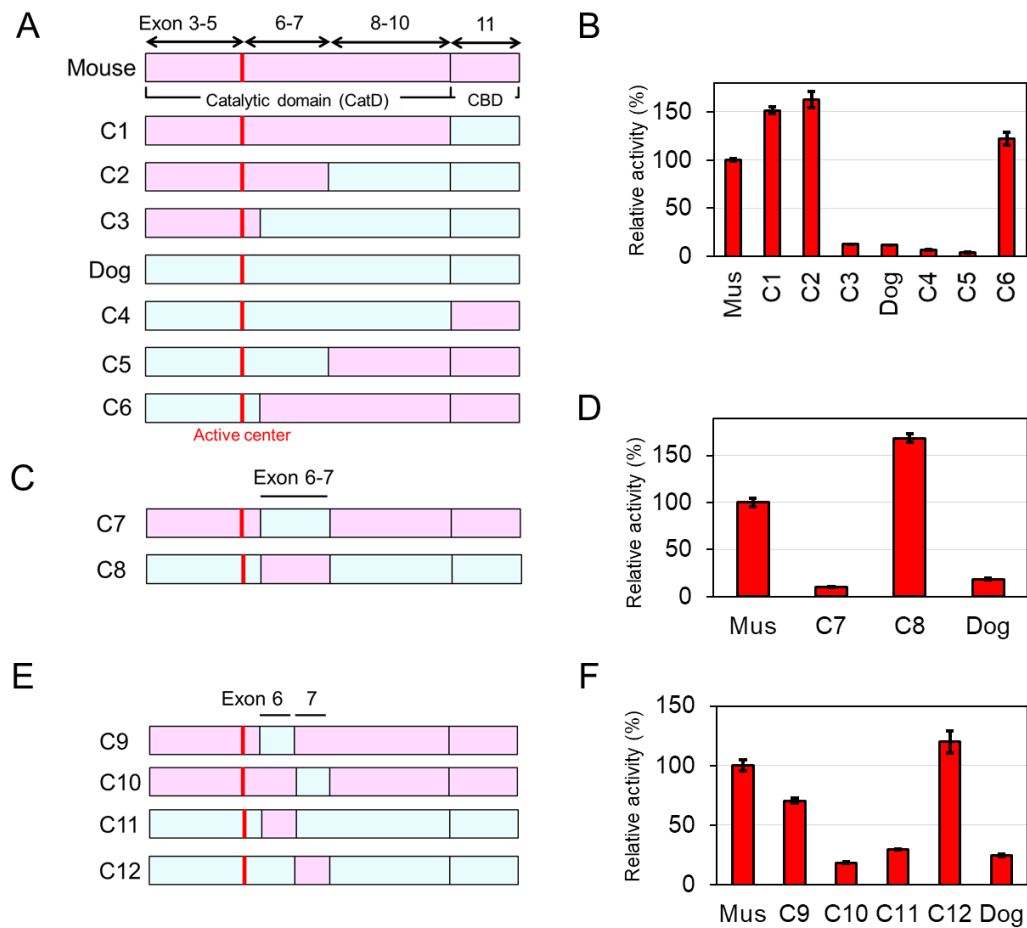


図 5-1. Exon 7 は、イヌ Chia のキチン分解活性を低下させる

(A) 大腸菌組換え Chia キメラタンパク質の模式図。アミノ酸配列は、マウスはピンク色、イヌは水色で色分けした。(B) キメラタンパク質ならびにマウスおよびイヌの Chia タンパク質のキチン分解活性の比較。(C) Chia キメラタンパク質の模式図。(D) キメラタンパク質のキチナーゼ活性のマウスおよびイヌ Chia との比較。(E) Chia キメラタンパク質の模式図。(F) キメラタンパク質のキチン分解活性のマウスおよびイヌ Chia との比較。

イヌ Chia の F214L と A216G は、高いキチン分解活性に不可欠である

Exon 7 の領域では、マウスとイヌ Chia の間に 5 つのアミノ酸の違いがある (図 5-2A)。イヌ Chia の活性化に最も重要な領域を同定するために、イヌ FLG (exon 7 の N 末端の Y206F, F214L, A216G の置換) とイヌ TE (exon 7 の C 末端の S233T と D234E の置換) の 2 つの変異体を構築した (図 5-2B)。イヌ FLG 変異体は、マウス Chia ほど活性を示さなかったが、WT のイヌ Chia と比較して 10 倍活性化した (図 5-2C)。対照的に、イヌ TE 変異体は活性化しなかった (図 5-2C)。これらの結果は、exon 7 の N 末端に存在する 3 つのアミノ酸 (Y206F, F214L, および A216G) がイヌ Chia の活性化に重要である可能性を示唆した。

この活性化に関与するアミノ酸を絞り込むために、イヌ Chia に F214L と A216G を導入した (図 5-2D)。これらの 2 つのアミノ酸置換により、9 倍の活性化が達成された (図 5-2E)。逆に、L214F および G216A をマウス Chia (マウス FA 変異体) に導入したところ (図 5-2D)、マウス FA 変異体は、WT マウス Chia よりもキチナーゼ活性が有意に低下した (図 5-2E)。単一アミノ酸の置換は酵素活性 (イヌ 214L または 216G 変異体) に有意な影響を与えず、両方のアミノ酸がイヌ Chia の活性化に必要であることを確認した。

最後に、S233T または D234E 置換をイヌ LG 変異体 (イヌ LGT および LGE 変異体) に導入することにより、マウス酵素を超えるイヌ Chia の超活性化が達成されるかどうかを検討した。両変異タンパク質は、WT マウス Chia と同等のレベルまで活性化された (図 5-2G)。これらの結果から、L214 および G216 はイヌ Chia の活性化に重要であり、T233 または E234 はさらに高いキチン分解活性の達成に関与していることが分かった。

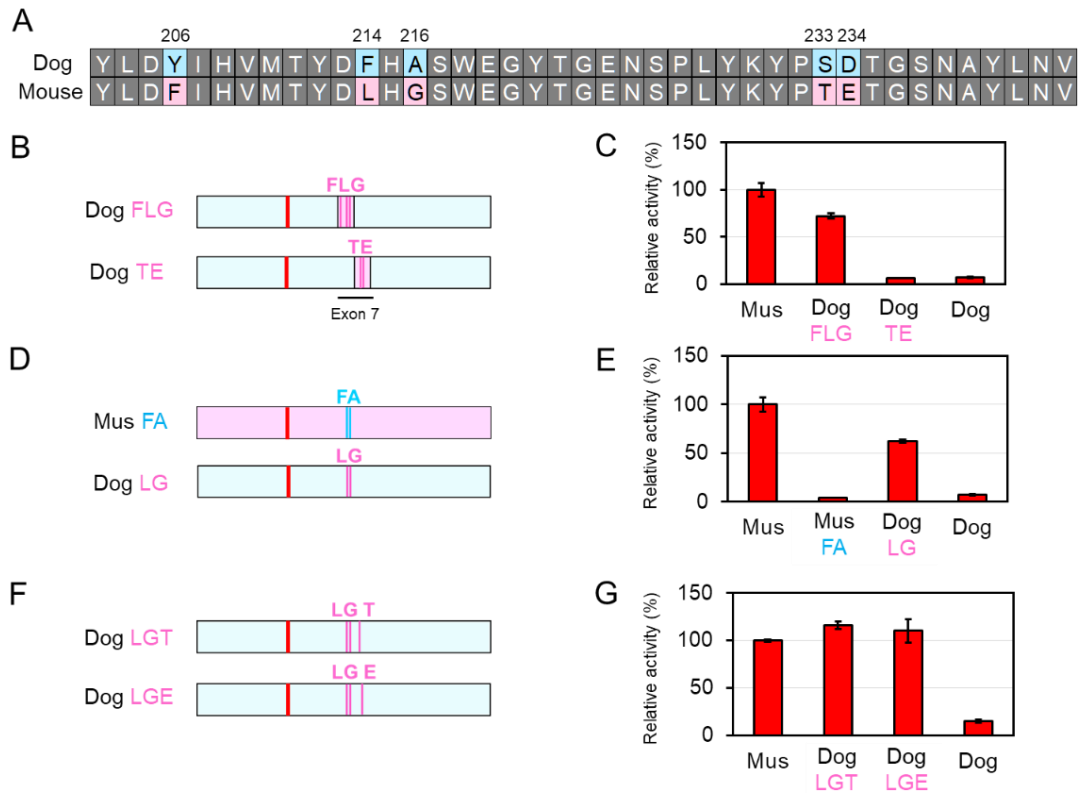


図 5-2. 2つのアミノ酸がイヌの Chia を活性化する

(A) イヌとマウス Chia の exon 7 領域のアライメント。(B) 原因領域を絞り込む Chia キメラタンパク質の概略図。アミノ酸配列は次のように色分けした。ピンク，マウス配列；水色，イヌの配列。(C) パネル B で示した変異タンパク質のキチン分解活性とマウスおよびイヌの Chia タンパク質との比較。(D) 大腸菌で発現した Chia 変異タンパク質の模式図。(E) パネル D で示した変異タンパク質のキチン分解活性のマウスおよびイヌ Chia との比較。(F) 大腸菌で発現した Chia 変異タンパク質の模式図。(G) パネル F で示した変異タンパク質のキチン分解活性とマウスおよびイヌ Chia との比較。

2. 食肉目動物 Chia の偽遺伝子化

イヌ Chia は、雑食性動物で保存されている 2 アミノ酸置換でマウス Chia と同程度まで活性が回復した (図 5-2G)。マウスは雑食性で、キチンを含む昆虫を食べる。これに対し、イヌは肉食性で、その食餌には昆虫は含まれていない。この結果は、エサに昆虫 (つまりキチン) が含まれないことに適応し、イヌ Chia に 2 アミノ酸置換が導入され、不活性化した可能性を強く示唆した。

この知見をより明確にするため、41 種類の食肉目動物の食性と Chia 遺伝子の塩基配列の完全性を分析し、イヌの Chia で同定した不活性化に関わる 2 つのアミノ酸置換が食餌への適応によるものかどうかを検討した。NCBI Genome データベースを利用し、41 種類の肉食性動物の食性 (図 5-3A) と Chia タンパク質コード領域の塩基配列の関係を調べた (図 5-3B, C)。イヌの Chia の不活性化に関わる F214 および G216 は、ディンゴ、リカオン、キツネなどのイヌ科の動物でのみ保存されており、他の食肉目動物 Chia はマウスに近い配列だった。このことは、イヌで認められた Chia の不活性化がイヌ科で特異的に起こっていることを示している (図 5-3A-C)。

非昆虫ベースの食餌 (肉, 魚, 果物, または葉など) を食べる種は、コード領域上に、欠失, 挿入, および置換によって引き起こされる未成熟終止コドンを含んでいた (図 5-3A-C)。これらの変異のほとんどは、同じ系統内で保存されていた。

これに対し、イヌ科以外に、昆虫をよく食べるスカンクやミーアキャットが属するスカンク科およびマングース科は、完全長 Chia ORF を保持していた (図 5-3A-C)。これらの結果は、非昆虫ベースの食餌をとる種では Chia ORF の部分を失うのに対し、昆虫を食べる種では完全長の ORF を保持していることを強く示唆した。

3. 食虫性のスカンク、ミーアキャット Chia の機能

食肉目は 3 つのグループに大別することができる。すなわち、i) 昆虫を食べないが、全長の Chia を保持している種 (イヌなど), ii) 昆虫を食さず, Chia を失った種 (フェレット, セイウチ, クマ, ネコなど), iii) 昆虫を食べ, Chia を維持する種 (スカンクとミーアキャット) である。

食虫性のスカンクとミーアキャット Chia は、保存された触媒モチーフ (DXXDXDXE) と、Chia タンパク質に 12 個の保存されたシステインが存在する。さらに、これらの Chia は、214 位と 216 位が、それぞれ L と G である (マウスタイプ) (図 5-4A)。これまでの結果と Chia の遺伝子構造に基づいて、スカンクとミーアキャットの両方の Chia タンパク質が高いキチン分解活性を有すると予想した。

この仮説を検証するために、スカンクとミーアキャットの Chia cDNA を化学合成し、上記のように大腸菌で発現させた (図 5-4A)。両方の酵素は pH 2.0 で最も活性が高く、イヌ Chia の 4-5 倍であった (図 5-4B)。これらの結果は、Chia のキチン分解活性が、食肉目群の摂食行動に強く関連していることをさらに示唆していた。

4. 食虫性の祖先からの肉食性動物 Chia の分子進化のモデル

ほ乳類の祖先は食虫性であったが、恐竜絶滅後の約 6,500 万年前に、それらの祖先は昆虫以外の食餌を選択できるようになったと考えられている [119, 123]。本章のここまでの結果に基づいて、肉食性動物がもつ Chia 遺伝子が、昆虫に代表されるキチン含有食餌に依存していた食虫性の祖先から、どのように構造と機能が変化してきたかを推定した。

非昆虫ベースの食餌をとる動物では、Chia が不活性になっていた。まず、イヌ科では、2 つのアミノ酸置換により不活性な Chia となった (不活性型 Chia) (図 5-5C, 上)。イヌ科以外の種では、活性中心の変異, ORF に変異が蓄積することにより、進化の過程で偽遺伝子化した (機能喪失型 Chia) (図 5-5C, 中)。昆虫以外の食餌を選択した種では、Chia の機能的制約が緩和され、系統ごとに独立して非活性または非機能分子に進化したと考えられる。

これに対し、ミーアキャットやスカンクなどの昆虫を食べる種は、昆虫の消化酵素として機能する Chia 遺伝子を保持していた (図 5-5C, 下)。このことから肉食性動物であっても、昆虫を食べ続けている種は、Chia 遺伝子に機能的制約が働いていると推定できる (活性型 Chia)。

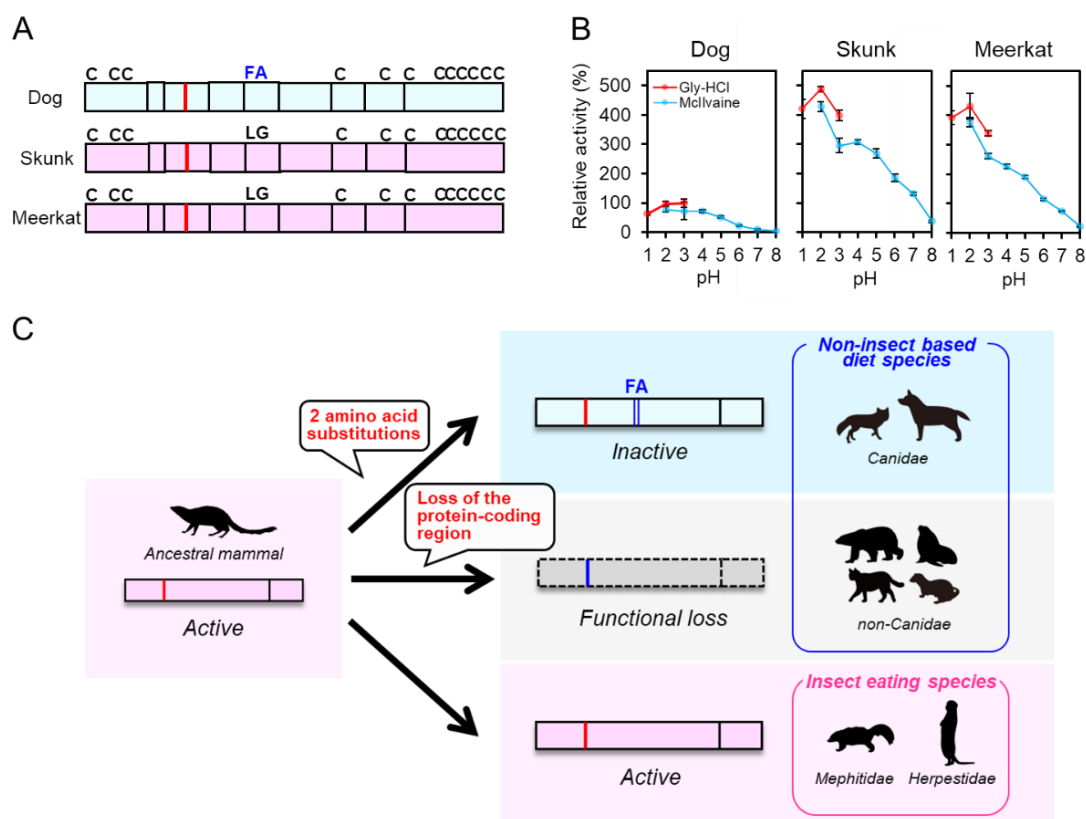


図 5-4. 食虫性動物の Chia のキチナーゼ活性と肉食性動物における Chia 遺伝子の進化過程の概念図

(A) 大腸菌組換えイヌ，スカンク，ミーアキャットの Chia の構造の模式図。C は活性を有する Chia タンパク質に保存されたシステイン残基を示す。(B) イヌ，スカンク，ミーアキャットの Chia タンパク質のキチナーゼ活性。(C) 食虫性の祖先の Chia 遺伝子から食餌の変化でどのように進化したかを示した概念図。昆虫を食べない種では，遺伝子の構造と活性が変化している。イヌ科における Chia の酵素活性は，2 アミノ酸置換 (F214 および A216) によって大幅に低下した (不活性型 Chia)。イヌ科を除いた肉食性動物の Chia は，終止コドンまたは活性低下をひき起こす突然変異の蓄積により，非機能的遺伝子 (機能喪失型 Chia) に進化した。これに対し，昆虫を食べる種は，マウスと同じアミノ酸を有し (L214 および G216)，キチナーゼ活性の高い Chia (活性型 Chia) を保持している。

第4節 考察

イヌは最初に家畜化された動物であり、人間の良きパートナーとしての歴史は、少なくとも 1 万 5 千年前にさかのぼる。デンプン食への変化は、イヌのアミラーゼ遺伝子や腸内細菌に大きな影響を与えたが、Chia のアミノ酸配列は、イヌ、タイリクオオカミ、キツネ間で 99% の同一性を示すことから影響はなかったと考えられる。しかし、昆虫を消費しないのであれば、なぜイヌ科で Chia 遺伝子は保持され続けているのだろうか。この疑問に答えることは難しいが、このグループにとって Chia が消化以外の目的で必要であった可能性が高い。イヌ科では Chit1 が喪失しており、遺伝子がゲノム上に見当たらなかった。キチンはダニやカビなどの病原体にも存在するので、特定の条件下で生体防御に働くのかもしれない。あるいは、イヌ Chia は、キチナーゼと同様の構造を有するがキチン分解活性を欠く、キチナーゼ様タンパク質のような形で様々な疾患に関与している可能性がある。イヌ科における Chia の不活性化と Chit1 遺伝子喪失のタイミングは、太古のイヌあるいはオオカミのゲノム解析が進むことにより、明らかになるかもしれない [125, 126]。

食肉目の歴史の早い段階で、その目は 2 つのグループ、イヌ亜目 (イヌのような肉食性動物) とネコ亜目 (ネコのような肉食性動物) に分かれた。スカンクは前者、ミーアキャットは後者に属し、これらの動物は、食虫性で活性型 Chia を保持している。それぞれのグループは、新生代で多様化し、19 の科 (ファミリー) を生み出し、そのうち 16 科が現在も生存している [127]。食肉目動物が多様化したことの理由の 1 つは、初期の食肉目が肉以外の食餌をとることが可能な臼歯を持っていたためだと考えられている [127]。このことから、初期の食肉目動物は昆虫を食餌として摂取し、Chia を食物消化に機能していた可能性がある。そして、今日まで昆虫を食べ続けた種では、強い選択圧がかかり、活性型 Chia を保持していることを示唆している。他方、Chia の不活性化は、多くの変異が同一科内で保存されていたことから、各科に分岐した後起こった可能性が高い。食虫性のクマ科のナマケグマ (*Melursus ursinus*)、ハイエナ科のツチオオカミ (*Proteles cristatus*) などの食肉目動物のゲノム解析が明らかになれば、このグループにおける食への適応に伴う Chia の進化の理解がさらに深まるであろう。

環境に適応した遺伝子喪失に関する研究は数多く報告されているが、どのように偽遺伝子化したのか、その歴史について機能の面から取り組んだ研究は少ない。当研究室では以前、ヒト CHIA の不活性化要因を、その機能を回復させることにより明らかにした [58]。その他の先行研究では、3 つのヒトに固有の苦味受容体偽遺伝子の機能を回復させることで、その機能はチンパンジーがもつオロソグとは異なることが明らかにされた [128]。別の研究では、*Petunia*

secreta の転写因子 AN2 偽遺伝子の復活により、この分子がペチュニアの色の進化的変化のホットスポットであることを明らかにした [129]。本章で、食性と進化の観点からキメラタンパク質を解析することで、イヌ Chia を活性化させ、食性に伴うアミノ酸置換を同定した。このアプローチは、環境適応的な表現型を引き起こす遺伝子喪失に関して、新しい情報を提供することが期待できる。

すべての胎盤ほ乳類の祖先は、恐竜の絶滅直後に進化した小さな昆虫を食べる生物であった [130]。Chia 遺伝子は、昆虫のキチン質を分解することが出来る酵素をコードし、近年、食虫性ほ乳類祖先から進化してきた痕跡を示す分子として注目されている [123]。ゲノムに存在する遺伝子情報も重要であるが、その翻訳産物の機能もまた、進化情報として重要である。しかし、Chia の機能が低下または喪失した理由と過程に焦点を当てた研究はほとんどなかった。本章で解析した食肉目 Chia の結果から、このグループで昆虫を食べる種は機能的な Chia を保持しているが、昆虫を食べていない種は不活性な Chia、あるいは偽遺伝子として保持していることが分かった。すなわち (1) アミノ酸置換によって不活性化 (イヌ科) と、(2) 劇的な遺伝的变化によってタンパク質コード領域が破壊され、偽遺伝子化 (非イヌ科)、が存在することを明らかにした。これらの結果は、非昆虫食への適応が、消化に関わる分子の機能を変化させ、ほ乳類の多様性形成に関わることを示した。ここで説明したこの新しい概念は、ほ乳類の進化の歴史をよりよく理解するための重要な情報であり、考古学、ゲノム進化学、生化学における研究の橋渡しとなることが期待できる。

第4章 Chia の精製法の確立とキトオリゴ糖の作製への応用

第1節 緒言

ここまでの研究により、Chia が全ての動物の胃で多量に発現されているわけではないことを明らかにした。特に、ウシやイヌのような草食性と肉食性動物は、雑食性動物と比べて、体内におけるキチンの消化性が低い。この知見は、Chia が、キチン消化の向上または Chia のレベルや活性の低下によって起こる特定の疾患の治療について、補充的に用いられうる可能性を提示した。この補充目的のためには、多量の精製天然酵素が必要となる。

多くのキチナーゼが、細菌、植物、動物から、キチンカラムを用いて単離された [98, 131-136]。第2章で、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 が精製できることは示した [99, 100]。細菌由来、あるいは、ほ乳類由来のキチナーゼが、キチンカラムから、酢酸によって溶出されることが報告されているが、その詳細なメカニズムについては示されていない [98, 131-136]。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。ニワトリおよびブタ Chia は、顕著な酸耐性を有するため [99, 100]、キチンカラムと酢酸を組み合わせた Chia の精製法は有効であると考えた。

キトオリゴ糖は、GlcN と GlcNAc のホモまたはヘテロなポリマーである。それらは、抗菌性 [137]、コレステロールの低下 [138]、抗炎症性 [139]、抗腫瘍効果 [140]、ドラッグデリバリー [141]、カルシウムと鉄の効率的な吸収 [142] などの幅広い生物医学的な効能を持つことから注目されている。キトオリゴ糖は、酸加水分解や酵素分解などのいくつかの方法によって調製されてきた [143, 144]。酵素的調製法は、安全性とプロセスコントロールが容易であることから、潜在的に産物の価値を高める [145]。これまで、キトサナーゼに加え、セルラーゼやリパーゼ、プロテアーゼなどの多くの非特異的酵素がキトオリゴ糖の調製に用いられてきた [145-147]。特に、市販のブタ pepsin 標品は、キトサナーゼ活性を持つことが報告されてきた [145, 148-150] が、この活性の理由はよく分かっていない。

本章では、まず Chia-キチン複合体が、0.1 M 酢酸によって解離することを検討した。次に、pepsin 標品中のキトサン分解活性の本体を明らかにすることを目指した。そして、Chia 酵素を用いたキトオリゴ糖の作製について検討した。

第2節 実験材料と方法

ニワトリおよびブタの胃組織からの可溶性タンパク質の調製

ニワトリの腺胃 (1 g) またはブタの胃 (1 g) を 10 倍量の TS 緩衝液中、プロテアーゼ阻害剤存在下でホモジナイズした。その後 4°C, 15,000 g, 10 分遠心し、上清を可溶性タンパク質画分として用いた。

Chia タンパク質のキチンカラムからの溶出の検討

キチンカラムは 2 mL のキチンビーズをカラムに充填し、TS 緩衝液で平衡化した。抽出液をカラムに供し、密封後、4°C, 1 時間穏やかに攪拌した。TS 緩衝液で洗浄後、結合したタンパク質は、0.1 M Gly-HCl (pH 2.5), 0.1 M 酢酸 (pH 2.8), 0.1 M 酢酸 Na (pH 4.0), 0.1 M 酢酸 Na (pH 5.5), 0.1 M ギ酸 (pH 2.5), 0.1 M クエン酸 (pH 2.5), 0.1 M シュウ酸 (pH 2.5) または 0.1 M プロピオン酸 (pH 2.5) によって溶出後、1 M Tris-HCl (pH 7.6) で中和した。

8 M 尿素または 0.1 M 酢酸を用いたキチンカラムからニワトリまたはブタ

Chia タンパク質の溶出

Chia 酵素は上述のようにキチンカラムから 8 M 尿素によって溶出した。同様に、酵素は 0.1 M 酢酸によってキチンカラムから溶出させた。溶出したタンパク質は、中和後、TS 緩衝液で平衡化した PD10 によって脱塩した。タンパク質濃度は上述と同様に行った。

SDS-PAGE および SYPRO Ruby 染色

得られたタンパク質画分は SDS-PAGE 後、SYPRO Ruby 染色をした。

示差走査蛍光光度解析法

示差走査蛍光光度 (DSF) による解析は、Niesen らの報告 [151] を参照に、real-time PCR システム (Mx3005p; Agilent 社) と MxPro ソフトウェア (Agilent 社) を用いて行った。タンパク質溶液 39 μ l と DMSO で 10 倍希釈した SYPRO Orange (Thermo Fisher Scientific) 1 μ l を混合させ、PCR マシンにセットし、25°C-95°C の間で毎分 1°C ごとに温度スキャンを行った。フィルター構成は、SYPRO Orange に最適な励起および発光波長 (励起波長 492 nm, 発光波長 610 nm) を設定した。タンパク質の融解温度 (T_m) を示す遷移曲線の変曲点は、既報に従って推定した [152]。

フーリエ変換赤外分光分析 (FT-IR)

α -キチンは、水、0.1 M 酢酸 (pH 2.8), 0.1 M Gly-HCl (pH 2.5) または 8 M

尿素中でインキュベートした。室温で 24 時間の反応後、キチンはろ過、洗浄、乾燥を行った。緩衝液で処理したキチンは、乾燥した KBr と共に完全に粉砕してペレットを形成した。FT-IR 解析は FT-IR 分析器 (IRPrestige-21, Shimadzu 社) で行った。

キチナーゼ活性測定

キチナーゼ活性は 4-NP-(GlcNAc)₂ を基質に用いて、第 2 章で記載したように測定した。

Chia によるキチンビーズ、コロイダルキチン、結晶性キチンの分解

キチンビーズ (10 μ L) は全量 50 μ L 中、精製 Chia (4 mU) 存在下/非存在下、0.1 M 酢酸 (pH 2.8) または 0.1 M Tris-HCl (pH 7.6) の条件下、37°C、1 時間反応させた。コロイダルキチン、結晶性キチンは全量 50 μ L 中、精製 Chia (4 mU) と共に、0.1 M Gly-HCl (pH 2.8) または 0.1 M 酢酸 (pH 2.8) 下で反応させた。生成したキチン断片を FACE 法で解析した。

大腸菌発現ベクターと組換えタンパク質の調製

ニワトリ Chia の CatD または CBD を Protein A (PA) と V5-His との融合タンパク質として発現させるため、ニワトリ Chia 発現プラスミド DNA (pEZZ18/PA-Chia) から、オリゴヌクレオチドプライマーを用いてそれぞれ増幅させた。増幅した DNA は EcoRI と XhoI で切断後、pEZZ18 発現ベクターへクローニングした。得たプラスミド DNA [pEZZ18/PA-CatD または pEZZ18/PA-CBD] の全塩基配列はシーケンスで決定した (Eurofins Genomics 社)。組換え体 PA-Chia, PA-CatD, PA-CBD, PA は第 2 章で記載したように調製した。

Pepsin 標品

Sigma-Aldrich 社の pepsin 標品 (製品番号 P7012) および Worthington 社の精製 pepsin A (2 回結晶化済み, LS003319) を最初に使用した。次に、4 社の pepsin 標品 [Sigma-Aldrich 社 (P7125), Tokyo Chemical Industry 社 (9001-75-6), Promega 社 (V1959) および FUJIFILM Wako Pure Chemical 社 (165-18711)] も使用した。

Pepsin 標品によるキトサンおよび α -または β -結晶性キチン基質の分解

キトサン [脱アセチル化度 (DD) 80%, キトサン 100, FUJIFILM Wako Pure Chemical 社], エビの殻由来の α -キチン, イカ由来の β -キチン (Katakura &

Co-op Agri Corporation 社からの提供品) を用いた。DD は元素分析によって決定した (東京薬科大学分析センター) [143]。キトサン, α - または β -結晶性キチン基質 (1 mg/mL) を, McIlvaine 緩衝液中, pepsin 標品 (P7012, Sigma-Aldrich 社) (0.5 mg/mL) または pepsin A (0.5 mg/mL) を含む全量 50 μ L 中, pH 4.0, 37°C, 16 時間反応させた。生成されたキチン断片は, FACE 法 [84, 85] によって分析した。

Pepsin 標品中のキチナーゼ活性測定

至適 pH 決定するために, キチナーゼ活性を 4-NP-(GlcNAc)₂ を基質とし, 0.1 M Gly-HCl 緩衝液 (pH 1.0-3.0) または McIlvaine 緩衝液 (0.1 M クエン酸, 0.2 M Na₂HPO₄; pH 2.0-8.0) 中, 37°C で 30 分間インキュベートすることによって評価した。至適温度を決定するために, キチナーゼ活性を 0.1 M Gly-HCl 緩衝液 (pH 2.0) 中で 30-64°C の温度範囲で測定した。

SDS-PAGE およびウエスタンブロット

得られたタンパク質画分を SDS-PAGE, 続いて CBB 染色または抗ブタ N 末端 Chia (ウサギ) [153], 抗マウス C 末端 Chia (ウサギ) [43], 抗ブタ pepsin (ロバ) 抗体 (GeneTex 社), 続く抗ウサギ IgG (H+L) 抗体 (Jackson 社) または抗ヤギ IgG-HRP 抗体 (Jackson 社) を用いたウエスタンブロット法で分析した。

Pepsin の活性測定

Pepsin 標品のタンパク質分解活性は, ウシ血液由来のヘモグロビン (Sigma-Aldrich 社) を基質として使用して既報に従って測定した [72]。

Pepsin 標品または pepsin A によるキトサン分解

キトサン基質 (1 mg/mL) は pepsin 標品または pepsin A (0.5 mg/mL) を含む全量 50 μ L 中, McIlvaine 緩衝液 (pH 4.0), 37°C で 16 時間反応させた。生成したキチン断片は上述と同様に解析した。

Pepsin 標品中から切断型 Chia の検出

試験した pepsin 標品中のブタ Chia の存在を調べるために, 標品 (0.5 μ g) を trypsin および chymotrypsin (0.5 μ g) (Sigma-Aldrich 社) と共に pH 7.6 で 10 分間インキュベートした。インキュベーション後, プロテアーゼインヒビター (Complete Mini, Roche 社) を添加し, 上記のようにウエスタンブロット法またはそのキチン分解活性を測定した。

組換えブタ Chia および短縮ブタ Chia タンパク質の調製

Protein A (PA) および V5-His との組換え融合タンパク質として、ブタ Chia の全長触媒ドメイン (CatD) または切断型 CatD を発現させた。pEZZ18/PA-ブタ Chia-V5-His は上述のように調製した。目的領域をブタ全長 Chia 発現プラスミド DNA (pEZZ18/pre-PA-ブタ Chia-V5-His) から使用して増幅した。次に、各増幅 DNA を EcoRI および XhoI で切断し、pEZZ18 発現ベクターにクローニングした。得られたプラスミド DNA (pEZZ18/PA-CatD, pEZZ18/PA-CatD Δ 21, pEZZ18/PA-CatD Δ 46) の全塩基配列をシーケンス (Eurofins Genomics 社) により確認した。組換え体 PA-Chia, PA-CatD, PA-CatD Δ 21, PA-CatD Δ 46 を上述のように調製した。

5 種類の pepsin 標品または精製 pepsin A によるキトサンの分解

Sigma-Aldrich 社 (P7125) および Tokyo Chemical Industry 社 (9001-75-6) の標品由来の糖を除去するために、これらの標品を McIlvaine 緩衝液 (pH 4.0) 中、37°C で 16 時間インキュベートした。そして TS 緩衝液で平衡化した PD MiniTrap G (GE Healthcare) に供し、その後の分析に使用した。キトサン基質 (1mg/mL) を、Sigma-Aldrich 社 (P7012 および P7125), Tokyo Chemical Industry 社 (9001-75-6), Promega 社 (V1959) または FUJIFILM Wako Pure Chemical 社 (165-18711) からの 5 つの pepsin 標品 (各 0.5mg/mL) ならびに精製 pepsin A (0.5mg/mL) を含有する 50 μ L の容量を McIlvaine 緩衝液 (pH 4.0) 中 37°C で 16 時間インキュベートした。生成したキチン断片を FACE 法で分析した。

Chia, 切断型 Chia, pepsin 標品による DD の異なるキトサンの分解

DD が 69%, 73%, 84% および 95% ブロック型キトサンは、Funakoshi 社からの提供品であった。完全長または切断型 Chia, PA-Chia, PA-CatD または pepsin 調製物 (4 μ U) を、キトサン基質 (1mg/mL) を含む 50 μ L の容量でインキュベートした。生成したキチン断片を FACE 法で解析した。

統計解析

第 2 章と同様に行った。

第3節 結果

1. 酢酸による Chia の精製

0.1 M 酢酸によるニワトリ Chia-キチン複合体の解離

ニワトリの胃抽出液をキチンビーズカラムに供し、Chia を、いくつかの溶出条件下で精製した。8 M 尿素によって、酵素は単一のピークで溶出された (図 6-1A)。この溶出画分を、SDS-PAGE および SYPRO Ruby 染色によって解析した。タンパク質画分の SDS-PAGE 解析で、それぞれ 54 および 57 kDa の、一つの主要なバンドと、もう一つのマイナーバンドが認められ (図 6-1B)、これらは、以前の報告と一致していた [99]。

次に、Chia-キチン複合体が、0.1 M Gly-HCl (pH 2.5) または 0.1 M 酢酸 (pH 2.8) によって解離するかどうかを検討した。Chia は 0.1 M 酢酸 (pH 2.8) で溶出されたが、0.1 M Gly-HCl (pH 2.5) では溶出されなかった (図 6-1B, C)。0.1 M 酢酸で処理したカラムは、さらに 0.5 M 酢酸で溶出した。しかし、さらなるタンパク質は検出されなかった (図 6-1B, C)。これらのことから、0.1 M 酢酸 (pH 2.8) が、キチンカラムから Chia を完全に解離するのに十分であることが示された。これらの結果は、キチンカラムからの Chia の溶出が、酸変性ではなく、酢酸による競合である可能性を示唆した。

Chia がキチンカラムから溶出することが、GlcNAc と酢酸イオンの競合によると推測した。この可能性を検証するため、pH 4.0 および 5.5 の 0.1 M 酢酸 Na による溶出を試みた。図 6-1B, D に示すように、タンパク質は 0.1 M 酢酸 Na では溶出されなかった。これに対し、Chia は、そのキチンカラムから、pH 2.8 の 0.1 M 酢酸で溶出された。これらの結果は、GlcNAc が、酢酸イオンではなく、酢酸と競合することによって、Chia が溶出されることを示唆した。

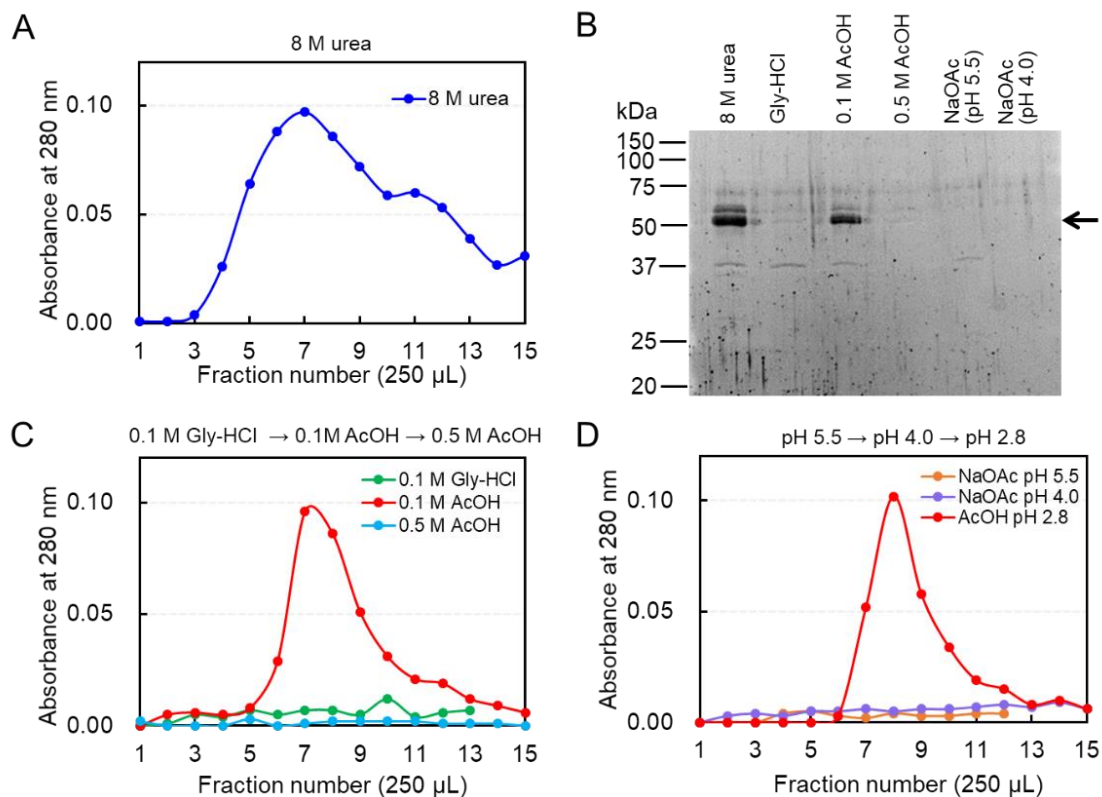


図 6-1. 0.1 M 酢酸によるニワトリ Chia-キチンの特異的解離

(A) 8M 尿素によるキチンカラムからのニワトリ Chia の溶出プロファイル。ニワトリ腺胃の可溶性画分をカラムに供した。キチンカラムに結合した Chia は、8 M 尿素で溶出された。(B) タンパク質画分の SDS-PAGE 分析。矢印は Chia タンパク質の位置を示した。(C) 0.1 M Gly-HCl (pH 2.5) または 0.1 M 酢酸 (pH 2.8) を用いたキチンカラムから Chia の溶出プロファイル。カラムをさらに 0.5 M 酢酸で溶出した。(D) 0.1 M 酢酸 Na (pH 4.0 または pH 5.5) による結合 Chia の溶出。結合した Chia は最終的に 0.1 M 酢酸 (pH 2.8) によってキチンカラムから溶出された。

キチンカラムから溶出したニワトリ Chia の評価

酢酸による Chia-キチン複合体の解離のメカニズムを，酵素およびキチンの構造変化の観点から検討した (図 6-2A, B)。タンパク質の安定性の変化に依存したタンパク質の融解温度 (T_m) をモニターするため，示差走査蛍光定量法 (DSF) [154] 解析を行った。熱転移の数値である T_m は，0.1 M Gly-HCl (pH 2.5), 0.1 M 酢酸 (pH 2.8), 0.1 M 酢酸 Na (pH 4.0 または pH 5.5) の存在下では，それぞれ，70.9, 76.7, 80.0, 74.1°C であった。これに対し，4 M 尿素は，タンパク質の安定性を減少させ， T_m は 56.5°C であった (図 6-2A)。これらの結果は，Chia が，Gly-HCl および酢酸 Na と同様に，酢酸によっても変性しないことを示した。

次に，緩衝液で処理したキチンの変化をフーリエ変換赤外分光法 (FT-IR) によって分析した。Gly-HCl，酢酸または尿素で処理された α -キチンのスペクトルバンドは，水で処理されたキチンのスペクトルバンドと同様であった (図 6-2B)。4 つの赤外スペクトルは，キチン分子の特徴的なバンドを示した：OH 伸縮 (3450 cm^{-1})，NH 伸縮 (3270 cm^{-1})，アミド I (1654 および 1624 cm^{-1})，およびアミド II (1560 cm^{-1}) [3]。従って，これらのスペクトルは，酢酸，Gly-HCl ならびに尿素がキチンの構造を変化させないことを示している。

さらに Chia-キチン複合体の酢酸による解離のメカニズムを検討するため，酢酸と似た官能基をもつ有機酸である，ギ酸，シュウ酸，クエン酸，プロピオン酸を用いて，キチンカラムからの Chia の溶出を試みた。ギ酸とクエン酸はタンパク質が溶出されなかったが，Chia は，シュウ酸とプロピオン酸によってわずかに溶出された (図 6-2C, D)。しかし，酢酸は，これら二つの有機酸よりも，カラムから Chia を溶出させるのに優れていた (図 6-2C, D)。

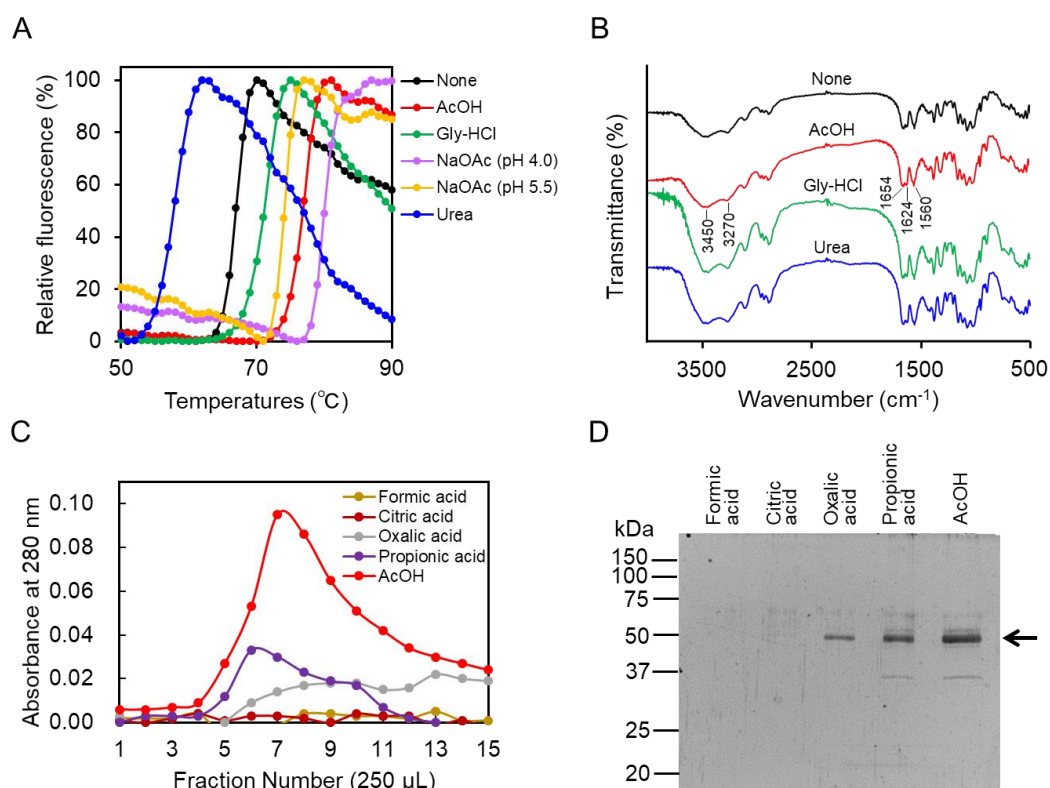


図 6-2. Gly-HCl 緩衝液，酢酸，酢酸 Na，尿素の影響による Chia-キチン解離の評価，および酵素とキチン構造に対するそれらの影響

(A) 0.1 M Gly-HCl, 0.1 M 酢酸, 0.1 M 酢酸 Na (pH 4.0 あるいは pH 5.5) および 4 M 尿素の存在下での Chia の DSF 分析結果。(B) 水 (なし), 酢酸 (AcOH), Gly-HCl および尿素で処理した後のキチンの FT-IR スペクトル。(C) 0.1 M ギ酸 (pH 2.5), 0.1 M クエン酸 (pH 2.5), 0.1 M シュウ酸 (pH 2.5), 0.1 M プロピオン酸 (pH 2.5), または 0.1 M 酢酸 (pH 2.8) によるキチンカラムからの Chia の溶出プロファイル。(D) タンパク質画分の SDS-PAGE 分析。矢印は Chia タンパク質の位置を示した。

酢酸のニワトリ Chia によるキチン分解への影響

人工基質および天然基質を用いて、Chia によるキチン分解反応における、酢酸とキチンの競合を検討した。初めに、4-NP-(GlcNAc)₂ とニワトリ Chia を、pH 2.8 の 0.1 M Gly-HCl または 0.1 M 酢酸溶液中で反応させた。キチナーゼ活性は、0.1 M 酢酸溶液中の方が、0.1 M Gly-HCl 中よりもわずかに低かった (図 6-3A)。

同様に、キチンにおける酢酸の影響を解析した。キチンビーズを、Chia 存在または非存在下で、0.1 M 酢酸 (pH 2.8) または 0.1 M Tris-HCl (pH 7.6) で反応させた。反応中にキチンビーズから生成した単糖またはオリゴ糖を、FACE 法によって解析した。ニワトリ Chia によって、キチンビーズのキチンは、GlcNAc 二量体と、GlcNAc オリゴ糖へと分解されたが、Chia 非存在下の反応溶液中では、特異的なバンドは見られなかった (図 6-3B)。これらの結果から、キチンは 0.1 M 酢酸 (pH 2.8) または 0.1 M Tris-HCl (pH 7.6) の溶液中では加水分解されず、両 pH 条件下で Chia によって分解されることが分かった (図 6-3B)。また、これらの結果は、キチンカラムから Chia が溶出されるのは、酵素の酸変性ではなく、酢酸との競合によって起こる可能性を示唆した。

天然キチン基質の分解における酢酸の影響を解析するために、コロイダルおよび結晶性キチンを、0.1 M Gly-HCl (pH 2.8) または 0.1 M 酢酸 (pH 2.8) 下で、Chia と反応した。人工基質とは対照的に、天然キチン基質では、緩衝液間に大きな差は見られなかった。Chia は両基質を分解し、主に (GlcNAc)₂ を同程度の割合で生成した (図 6-3C, D)。これらの結果は、酢酸は、Chia-キチン複合体を解離させるが、その加水分解活動を阻害しないことを示唆した。

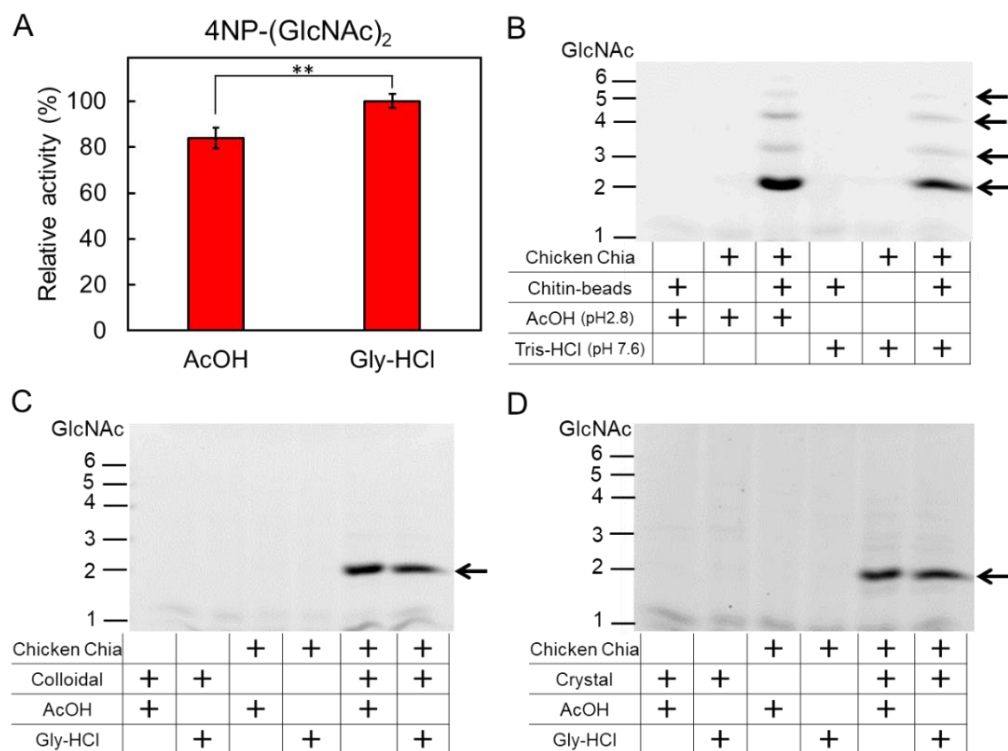


図 6-3. キチン分解に対する酢酸の影響

(A) 0.1 M Gly-HCl (pH 2.8) または 0.1 M 酢酸 (pH 2.8) 中の Chia のキチン分解活性は、4-NP-(GlcNAc)₂ を用いて分析した。** $p < 0.01$ 。P 値は、Student's-t 検定を使用して決定した。(B) 0.1 M 酢酸 (pH 2.8) または 0.1 M Tris-HCl (pH 7.6) 条件下での精製ニワトリ Chia によるキチンビーズの分解。生成したオリゴ糖を FACE 法で分析した。矢印は、(GlcNAc)₂, (GlcNAc)₃, (GlcNAc)₄, (GlcNAc)₅ の位置を示す。0.1 M Gly-HCl または 0.1 M 酢酸 (pH 2.8) 条件下での (C) コロイダルキチンまたは (D) 結晶性キチンとニワトリ Chia との反応後に生成された産物を FACE 法で分析した。矢印は (GlcNAc)₂ の位置を示す。

ニワトリ Chia の CatD および CBD のキチンカラム結合性

ニワトリ Chia の触媒ドメイン (CatD) またはキチン結合ドメイン (CBD) の、キチンカラムへの親和性を決めるため、全長 Chia, CatD, CBD を *Staphylococcus aureus* の Protein A の切断型と V5-His tag よりなる融合タンパク質として、大腸菌で発現させた。これらの組換えタンパク質の構造の模式図を図 6-4A に示した。

組換えタンパク質が、キチンを認識し、結合するかどうかを明らかにするため、キチンビーズカラムを用いた結合実験を行った。実験材料と方法に記載したように、Protein A-Chia-V5-His (PA-Chia), Protein A-CatD-V5-His (PA-CatD), Protein A-CBD-V5-His (PA-CBD), Protein A-V5-His (PA) を pH 7.6 の条件下で混合し、カラムに供した。キチンに結合するタンパク質は、8 M 尿素でカラムから溶出した (図 6-4B, 上パネル)。PA-Chia, PA-CatD, PA-CBD はキチンカラムに結合し、PA のみが素通り画分で検出された (図 6-4B, 上パネル)。これらの結果は、マウス Chia での結果と一致していた [44]。

次に、PA-Chia, PA-CatD, PA-CBD におけるキチン親和性の違いを検討した。図 6-4B に示すように、PA-CBD は 25 mM 酢酸で溶出されたが、PA-Chia と PA-CatD は 50 mM 酢酸によって溶出した (図 6-4B, 下パネル)。これらの結果は、Chia の CatD が、CBD よりもキチンカラムに親和性をもつことを示した。

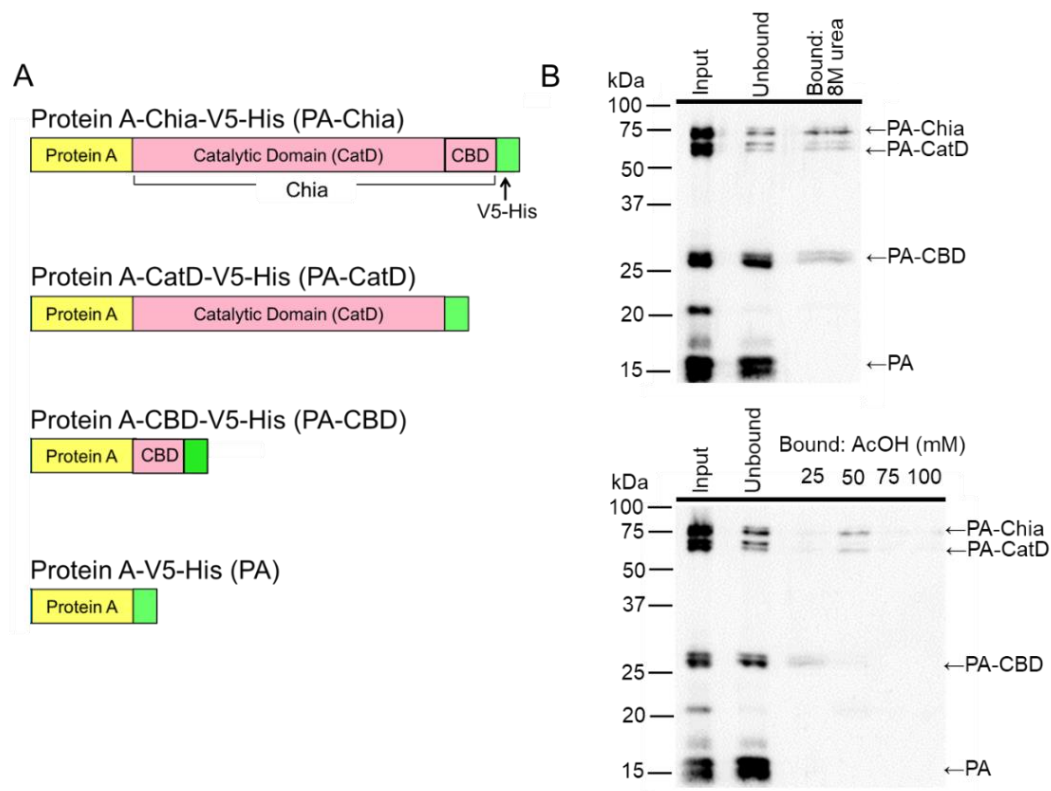


図 6-4. 組換えニワトリの全長 Chia とその CatD および CBD の結合は酢酸によって解離する

(A) 組換えニワトリ Chia 融合タンパク質の模式図。(B) V5 抗体を用いた組換えタンパク質のウェスタンブロット分析。上パネル、組換えタンパク質の混合物を単一のキチンカラムにロードした。結合したタンパク質を 8 M 尿素でカラムから溶出した。下パネル、組換えタンパク質のウェスタンブロット分析。結合したタンパク質は、25, 50, 75, および 100 mM 酢酸でカラムから溶出した (段階的溶出)。矢印は、各融合タンパク質の泳動位置を示した。

キチンカラムと酢酸を用いた胃組織からブタ Chia の精製

最後に、上記の方法を適用し、ブタの胃組織から Chia を調製した。ニワトリ Chia と同様に (図 6-1), ブタ Chia は、キチンカラムから 0.1 M 酢酸によって、54 kDa の単一のバンドで溶出され (図 6-5A, B), これは、キチンカラムと 8 M 尿素を用いた以前の報告と一致した [100]。

ブタの酢酸-Chia と 8 M 尿素-Chia のキチナーゼ活性を比較するために、高分子キチンを分解し、産物を FACE で解析した。pH 2.0 および 7.6 下で、コロイダルキチンから (GlcNAc)₂ を検出し、ブタ Chia が、酸だけでなく、中性条件下でも機能することを示した (図 6-5C)。

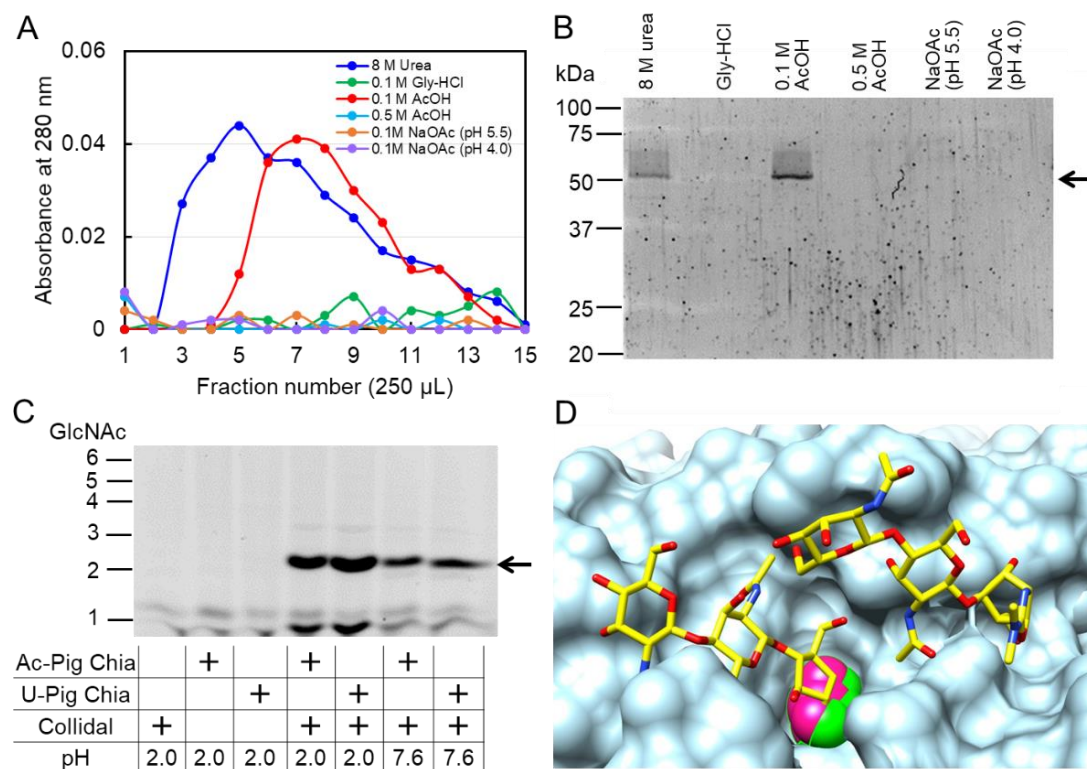


図 6-5. 天然型 Chia は、キチンカラムと酢酸を使用してブタの胃組織から精製できる

ブタの胃の可溶性画分をカラムに供した。結合した Chia は、図 6-1 に示すように、カラムから溶出された。(A) キチンカラムからのブタ Chia の溶出プロファイル。(B) タンパク質画分の SDS-PAGE 分析。矢印は Chia タンパク質の位置を示した。(C) 酢酸-Chia と 8 M 尿素-Chia の間のキチン分解特性の比較。コロイダルキチンおよび結晶性のキチン基質を Chia で消化し、得られた生成物を FACE 法で分析した。矢印は (GlcNAc)₂ の位置を示した。(D) キチナーゼ阻害剤アロサミジン (PDB ID : 1HKK, 球棒モデル) を重ね合わせたキチナーゼ (PDB ID : 3N12) の複合表面の模式図。3N12 (ピンク) と 4NZC (緑) の酢酸分子は、ファンデルワールス半径で示されている。

2. Chia によるキチンオリゴ糖の作製

Pepsin 標品によるキトサンの分解

市販のブタ pepsin 標品は、キトサンをキトオリゴ糖に分解することが示されている [145, 148-150]。これらの結果は、pepsin がキトサン分解活性を有し得ることを示唆している。しかし、これは pepsin がプロテアーゼ活性とキチナーゼ活性を有することを示すため、pepsin 標品によるキトサン分解メカニズムを詳細に検討した。

Pepsin 標品中のキトサン分解活性を評価するために、キトサン (脱アセチル化度, DD 80%), ならびに α - または β -結晶性キチン (それぞれ DD 2%, 10%) を pepsin 標品 (P7012, Sigma-Aldrich 社) または精製 pepsin A (Worthington 社) を pH 2.0 または pH 4.0 条件下で作用させた。

Pepsin 標品はキトサンを分解し、(GlcNAc)₆ よりも長いキトオリゴ糖を生成した (図 7-1A)。予想外にも、pepsin は α -キチンを分解して (GlcNAc)₂ を生成した (図 7-1A)。さらに、pepsin 標品は、 β -キチンを分解し、(GlcNAc)₂ および (GlcNAc)₃₋₆ を生成した (図 7-1A)。いずれの場合も、pH 2.0 と 4.0 の間で分解生成物パターンに有意差はなかった。

一方、精製 pepsin A はいずれの基質もほとんど分解しなかった (図 7-1B)。これらの結果は、pepsin 標品がキトサン分解活性とキチン分解活性を有し得ることを示していた。さらに、この結果は、pepsin 標品中のこれらの分解活性が、pepsin 分子によるものではなく、他の分子に起因する可能性を示唆していた。

次に、4NP-(GlcNAc)₂ を用いて pepsin 標品中に観察されたキチン分解活性の性質を明らかにした。Pepsin 標品中のキチン分解活性は、0.1 M Gly-HCl (pH 1.0-3.0) または McIlvaine (pH 2.0-8.0) 緩衝液中で、異なる pH で検討した。最も高いキチナーゼ活性は 0.1 M Gly-HCl (pH 2.0) で検出された。McIlvaine 緩衝液では、pH 2.0 と pH 4.0 に活性のピークを持ち、pH 2.0-5.0 で高い酵素活性が観察された (図 7-1C)。2 つの至適 pH が認められたことは、ブタ Chia のキチン分解活性の特徴として第 2 章に示した結果と一致していた [100]。

酵素活性に対する温度の影響を、同じ基質を用いて 30 分間、0.1 M Gly-HCl (pH 2.0), および 30-64°C の範囲で検討した。Pepsin 標品中の触媒反応は、温度の上昇と共に徐々に増加し、58°C で最大レベルに達し、その後急激に低下した (図 7-1D)。これらの性質は、第 2 章で示したブタ Chia に見られるプロファイルと一致した [100]。

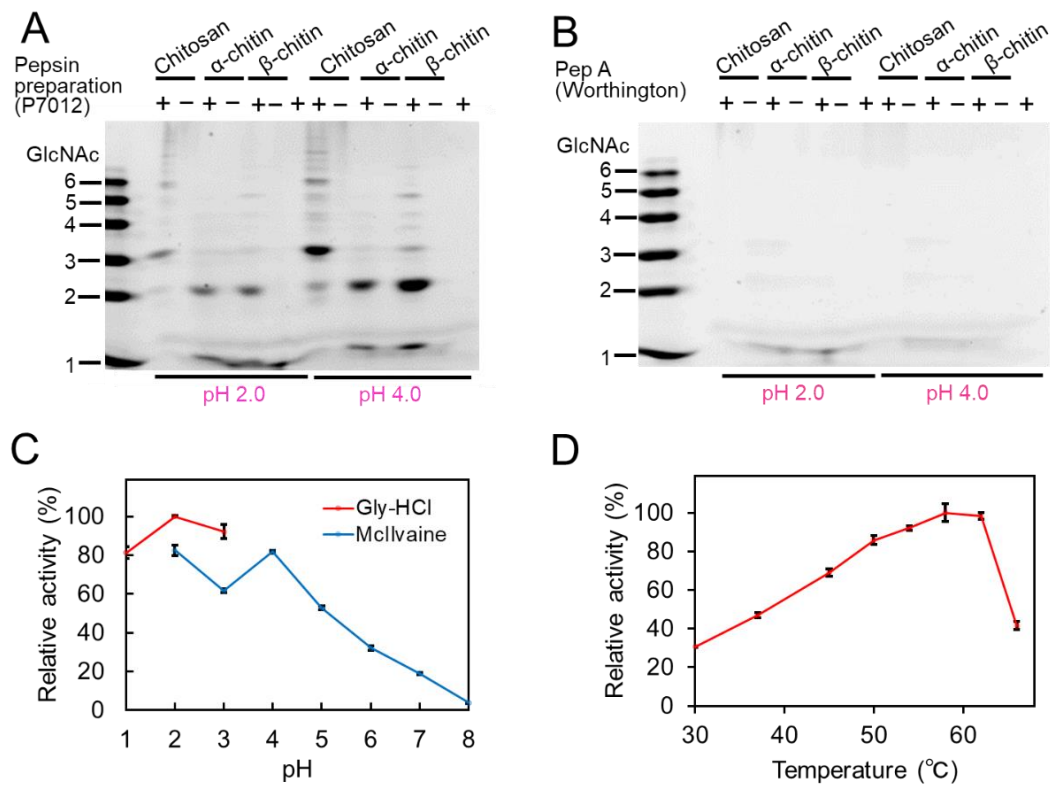


図 7-1. Pepsin 標品はキトサン分解活性とキチン分解活性を持つ

80% DD キトサン, α - または β -キチンを (A) pepsin 標品 (P7012) または (B) Pep A と共に pH 2.0 または pH 4.0 下で反応後, 分解産物を FACE 法で解析した。Pepsin 標品中のキチナーゼ活性の (C) 至適 pH または (D) 至適温度は 4-NP-(GlcNAc)₂ を用いて測定した。

Pepsin 標品中のプロテアーゼ耐性の切断型ブタ Chia の検出

第2章で示したように、ブタ Chia は胃で高く発現され、そして pepsin に対して抵抗性を持ち、pH 2.0-4.0 および 58°C において最も高い活性を有する [100]。このことから、pepsin 標品中のキトサナーゼ活性が、残存する Chia に起因すると推定した。この仮定を検証するために、pepsin 標品を trypsin および chymotrypsin と共に pH 7.6 で 10 分間インキュベートし、SDS-PAGE、続いて CBB 染色またはウェスタンブロットにより分析した。予想通り、pepsin はこの処理で分解された (図 7-2A, B)。これに対し、Chia への免疫反応性は、trypsin と chymotrypsin 処理後も検出可能であった (図 7-2C)。Pepsin 標品中のキチナーゼ活性をさらに明らかにするため、pepsin 標品を、Chia の N 末端に対する抗体を用いてウェスタンブロットに供し、Chia の存在を検討した (図 7-2C, レーン 1)。

Trypsin と chymotrypsin 処理の影響を調べるため、pepsin 標品中のタンパク質分解活性およびキチン分解活性を pH 2.0 で測定した。両方の活性が処理前の pepsin 標品で検出されたが、処理後にはキチン分解活性のみが残った (図 7-2D)。これらの結果は、pepsin 標品中のキトサナーゼ活性が切断型ブタ Chia に起因することを示唆していた。

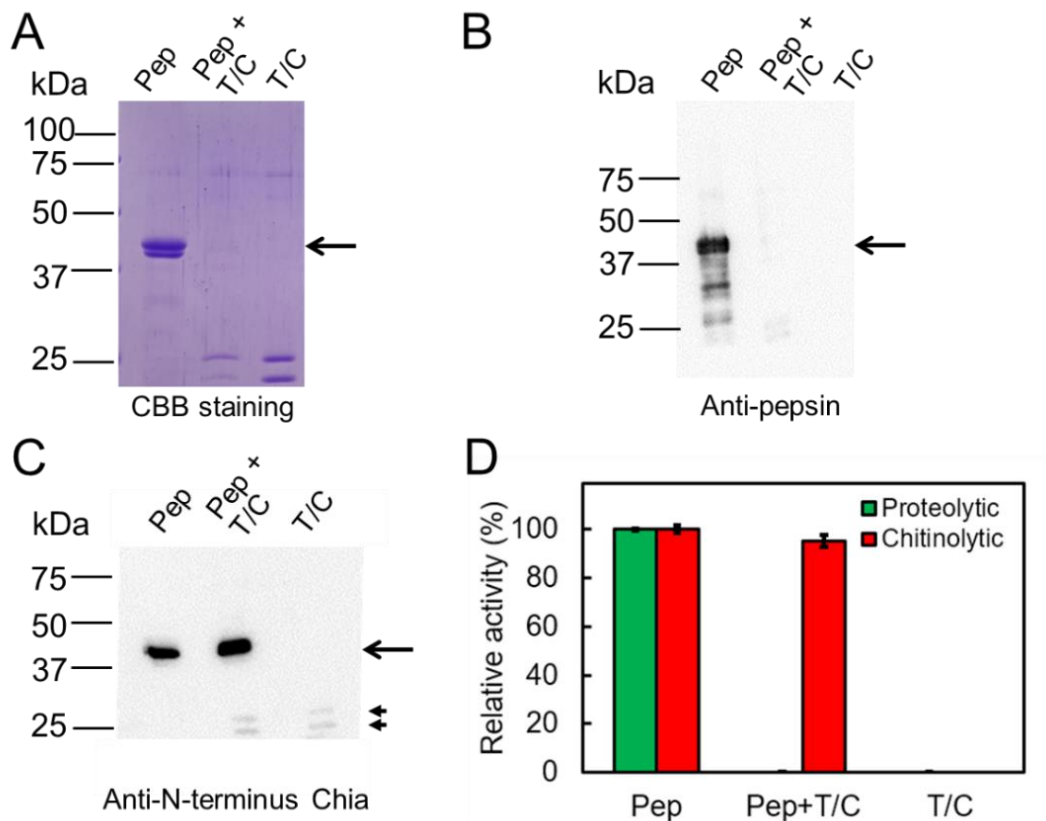


図 7-2. 切断されたブタ Chia の検出とそのキチン分解活性

ブタ pepsin 標品 [P7012 (Pep)] は trypsin/chymotrypsin (T/C) と共に、pH 7.6 で 37°C で 10 分間反応した。(A) CBB 染色による全タンパク質の解析、(B) ブタ pepsin 抗体または (C) ブタ N 末 Chia 抗体を用いたウエスタンブロット。特定のバンド (矢印で表示) は、trypsin/chymotrypsin と抗体の交差反応である可能性を示す。(D) pepsin 標品中における trypsin/chymotrypsin 処理の有無におけるキチナーゼ活性は pH 2.0 で測定した。

キトサンの分解効率は、ブタの pepsin 標品によって異なる

Pepsin 標品中の切断型ブタ Chia のキチン分解活性をより詳細に評価するため、5 つのブタ pepsin 標品 ; Sigma-Aldrich 社の [P7012 (S1) および P7125 (S2)], Tokyo Chemical Industry 社 (T), Promega 社 (P), FUJIFILM-Wako Pure Chemical 社 (F) と, Worthington (W) 社の精製ブタ pepsin A を用い, 基質に 4-NP-(GlcNAc)₂ を用いてキチナーゼ活性を測定した (図 7-3A)。高いキチン分解活性が S1, S2 および T の調製物において観察された (図 7-3A)。他方, 他の 2 つの標品 (P および F) からわずかな活性が検出され, 精製 pepsin A からはキチナーゼ活性は検出されなかった (図 7-3A)。

次に, 5 つの pepsin 標品および精製 pepsin A を trypsin と chymotrypsin で処理し, SDS-PAGE 後, ブタ pepsin またはブタ Chia 抗体を用いたウェスタンブロットで分析した (図 7-3B)。Pepsin への免疫反応性は, trypsin と chymotrypsin 処理で失われた (図 7-3B)。他方, プロテアーゼ処理の有無にかかわらず, S1, S2 および T の pepsin 標品において, 45 および 40 kDa の Chia に対する免疫反応性は認められた (図 7-3B)。

5 つのブタ pepsin 標品または精製ブタ pepsin A を, 0.5 mg/mL のキトサン (DD 80%) と共に, pH 4.0 でインキュベートし, 分解生成物を FACE 法 [84, 85] によって分析した。S2 および T の標品から FACE 陽性のオリゴ糖が検出されたため, 実験方法に記載のように, これらの pepsin 標品の前処理を行い, オリゴ糖を除去した。

S1, S2, T および F の標品は, キトサンを分解し, (GlcNAc)₆ よりも長鎖のキトオリゴ糖を生成した (図 7-3C)。他方, P および W の標品はここで用いた基質を分解しなかった (図 7-3C)。以上の結果は, 各 pepsin 標品のキチン分解/キトサン分解活性は, 切断型ブタ Chia の存在に応じて変動したことを示唆した。

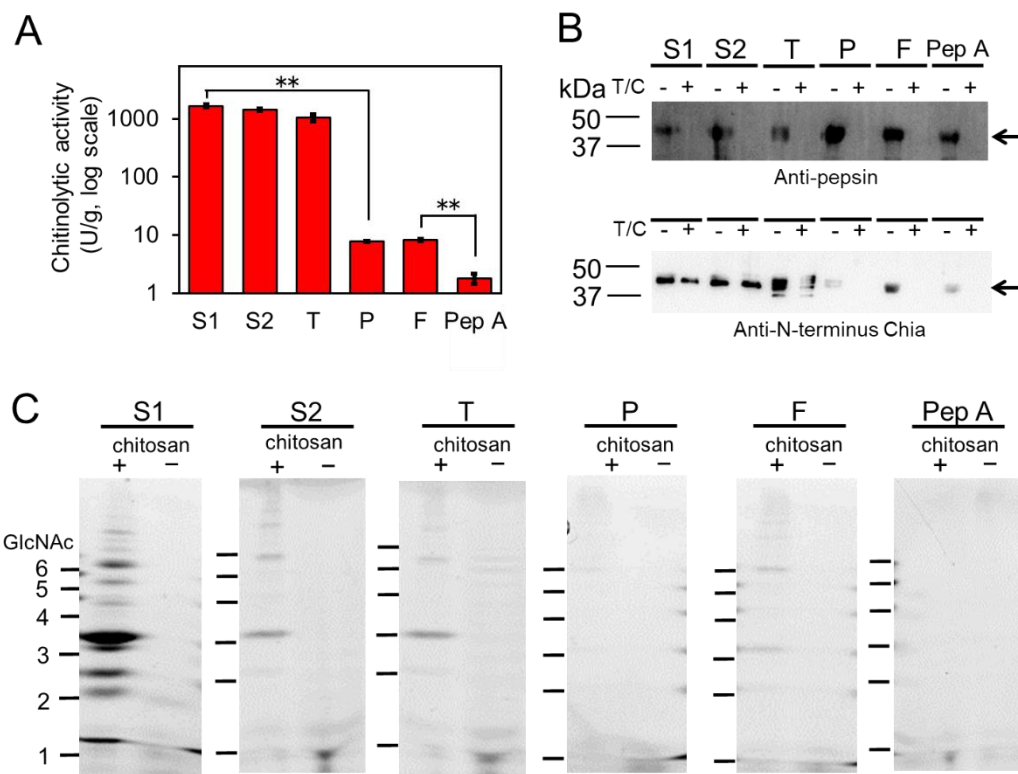


図 7-3. 6 種類のブタ pepsin 標品におけるキチン分解活性およびキトサン分解活性

(A) 5 つのブタ pepsin 標品 [P7012 (S1), P7125 (S2), T, P, F] あるいは Pep A のキチナーゼ活性の検出。(B) ブタ pepsin 抗体 (上) およびブタ N 末 Chia 抗体 (下) を用いたウエスタンブロット。(C) 80% DD キトサンを 5 つの pepsin 標品と Pep A により, pH 4.0 条件下で反応し, 生成した産物を FACE 法で解析した。

ブタ Chia は、pepsin によって生理的に切断型 Chia へと短縮される

Chia は、触媒ドメイン (CatD) とキチン結合ドメイン (CBD) からなる 50 kDa のタンパク質である [44, 155]。マウスおよびニワトリの CatD は、キチン分解活性およびキチン結合活性を示す。CatD がブタの胃の条件下で生成され得るかどうかを調べるため、精製ブタ Chia を精製 pepsin A と共に 1:20 の比 (胃における Chia と pepsin A の mRNA レベルの発現比 [100, 155]) でインキュベートした。pH 2.0, 37°C の条件下、最大 6 時間のインキュベーションを行った。

N 末端ブタ Chia 抗体を用いたウエスタンブロットによって、1 時間のインキュベーション後、直ちに全長 Chia (52 kDa) は、40 および 45 kDa のバンドになったことが示された。6 時間のインキュベーション後、全長 Chia タンパク質は検出されなくなった (図 7-4A)。マウス Chia の C 末端抗体は、全長タンパク質のみを検出し、インキュベーション時間の増加と共にシグナルが減少したことを示した (図 7-4B)。これらの結果は、40 および 45 kDa のバンドは、それぞれ、短縮型 CatD と CatD であり、ともに pepsin 耐性を示したが、CBD は pepsin A によって完全に分解されたことを示す。

切断型 Chia は trypsin と chymotrypsin 消化に対しても安定であった。Chia を pepsin A と共に pH 2.0 で 6 時間インキュベートし、続いて trypsin と chymotrypsin と共に pH 7.6 の条件下で 10 分間インキュベートした。切断型 Chia は Chia の N 末端領域抗体によって検出され (図 7-3A, B)、全長 Chia に匹敵するキチン分解活性を有していた (図 7-4C)。

Pepsin 標品中の Chia 免疫反応性は、C 末端切断型のブタ Chia とサイズが類似していた (図 7-4D)。これらの結果は、ブタ Chia が C 末端で pepsin により切断されたことを示している。CatD タンパク質は依然として優れたプロテアーゼ耐性を有し、pepsin 標品中でキチン分解活性を有していた (図 7-4C)。

以前 Fu らはブタ pepsin 標品から分子量 40-47 kDa のキトサナーゼのバリエーションを 3 種を精製できたことを報告した [148]。本研究で、pepsin 標品中で Chia 抗体によって検出されたタンパク質が、C 末側が切断されたブタ Chia のサイズと一致したことを示した (図 7-4D)。さらに、この切断型 Chia はプロテアーゼ耐性を持ち、pepsin 標品中でキチナーゼ活性を保持していた (図 7-4C)。これらの結果から、pepsin 標品から単離されたキトサナーゼバリエーションは、Chia の切断型である可能性が示唆された。

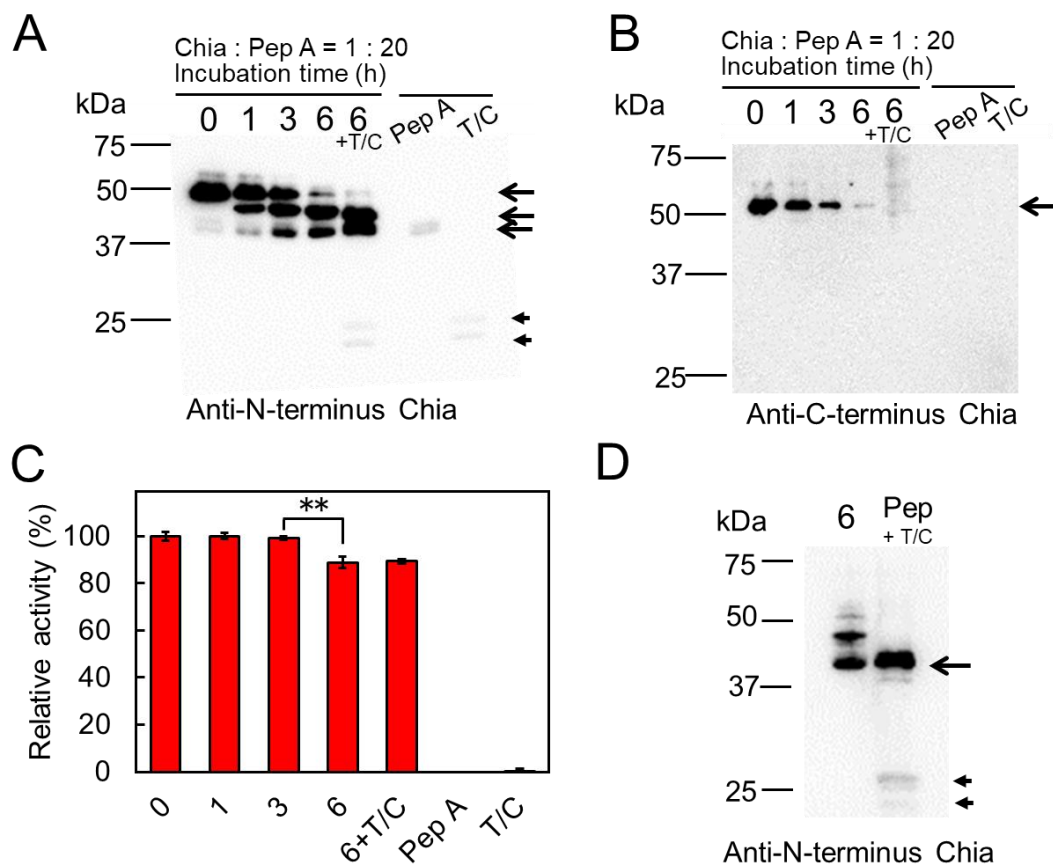


図 7-4. ブタ Chia は pepsin によって生理的に切断される

ブタの胃組織から精製した Chia タンパク質は, Pep A とともに, pH 2.0, 37°C で 0, 1, 3, 6 時間反応させた。6 時間の反応後, サンプルは trypsin/chymotrypsin (T/C) と共にさらに pH 7.6 で 10 分間処理した。(A) ブタ Chia N 末抗体または (B) マウス Chia C 末抗体を用いたウエスタンブロット。(C) trypsin/chymotrypsin 処理の有無における Chia のキチナーゼ活性への影響は pH 2.0 で測定した。(D) ブタ Chia N 末抗体を用いたウエスタンブロット。

切断型 Chia の特徴

切断型ブタ Chia のサイズとキチンおよびキトサンに対する分解活性との関係を調べた。ExPASy Peptide Cutter によるブタ Chia の pepsin 切断部位の予測に従って、組換え切断型ブタ Chia タンパク質を作製した (図 7-5A)。CatD (pEZZ18/PA/-CatD) または切断型の CatD (pEZZ18/PA-CatD Δ 21), (pEZZ18/PA-CatD Δ 46) を構築した。これらは、それぞれ図 7-4A および D において検出された 40 および 45 kDa のバンドに対応した。

全長 Chia, CatD, CatD Δ 21 および CatD Δ 46 を、大腸菌中で Protein A (PA) および V5-His (図 7-5A) との組換え融合タンパク質として発現させ、そして実験材料および方法に記載の通りに精製した。組換えタンパク質を最初に α -キチンとインキュベートし、分解産物を FACE 法で分析した。全長 Chia, CatD および CatD Δ 21 は α -キチンを分解し、(GlcNAc)₂ を生成した (図 7-5B)。結晶性 β -キチンに関しては、全長 Chia, CatD および CatD Δ 21 は分解し、(GlcNAc)₂ および (GlcNAc)₃₋₆ を生成した (図 7-5C)。また、全長 Chia, CatD および CatD Δ 21 はキトサンを分解し、(GlcNAc)_{>6} のキトオリゴ糖を生成した (図 7-5D)。CatD Δ 46 はいずれの基質にも影響を及ぼさなかった。これらの結果は、Chia における CBD の欠如はキチンおよびキトサン基質に対するキチン分解特異性に影響を及ぼさなかったが、CatD の C 末端からの 46 アミノ酸のさらなる欠失はキチン分解活性の喪失を引き起こすことを示している。

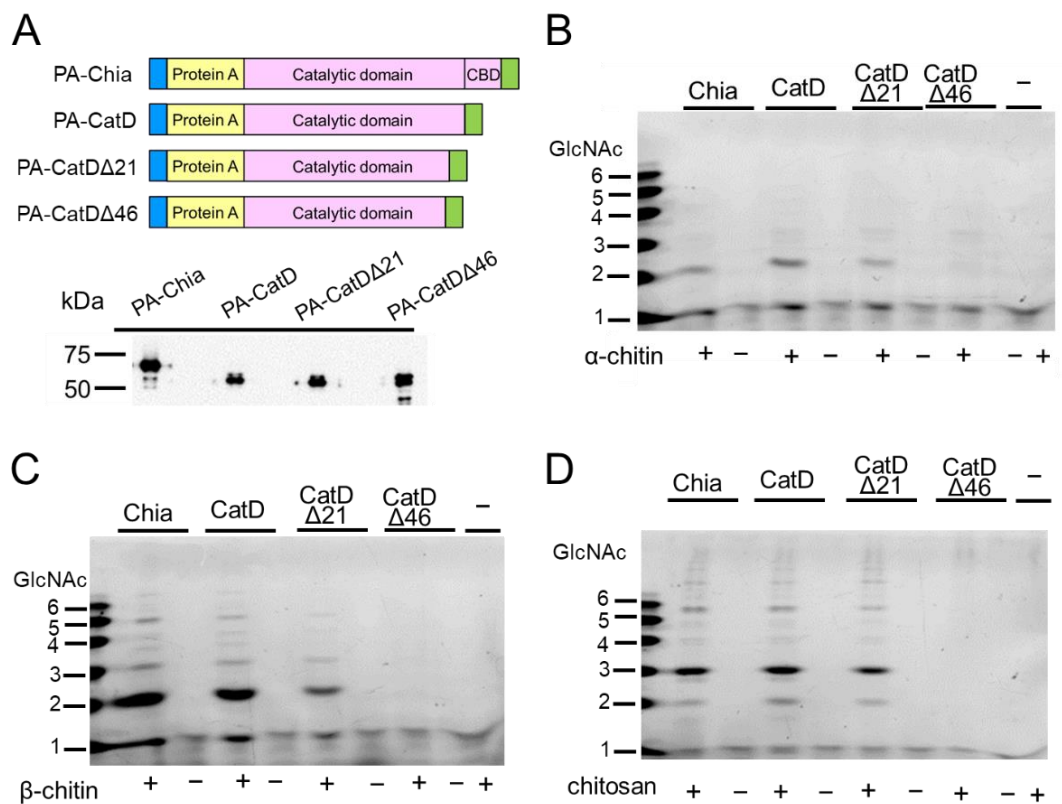


図 7-5. Chia の完全長とその切断型は、同等のキチンおよびキトサン分解能力を持つ

(A) 完全長 Chia またはその切断型の Protein A と V5-His との融合タンパク質の模式図 (上) および V5 抗体を用いた組換えタンパク質のウェスタンブロット解析 (下)。(B) α-キチン, (C) β-キチン, (D) キトサンを上記タンパク質と作用させた後, 分解産物を FACE 法で解析した。

ブタ Chia, 切断型 Chia, pepsin 標品は同等のキトオリゴ糖を生成する

組換えまたは天然の Chia タンパク質によるキトサンからの分解産物を pepsin 標品と比較した。DD が異なるいくつかのキトサン基質 (DD 69%, 73%, 84% および 95 %) を, ブタ Chia, その切断型 Chia, PA-Chia, PA-CatD または pepsin 標品と共にインキュベートし, 上述と同様に FACE 法で分析した。

DD 69%, 73%, 84% キトサンは, (GlcNAc)₁₋₂₀ まで分解された。分解産物のパターンは, すべての酵素で一致していた (図 7-6)。分解効率はキトサンの DD が増加するにつれて減少し, DD 95% に対する分解性はほとんど見られなかった (図 7-6)。これらの結果から, pepsin 標品のキトサン分解活性は, キトサンを分解することができる切断型 Chia のキチナーゼ活性によるものであることが示唆された。

また, DD 69-84% キトサンから, (GlcNAc)₁₋₆ 標準物質とは異なる移動度の分解産物が検出され, GlcNAc と GlcN を含むヘテロなキトオリゴ糖が存在することが示唆された。そこで, DD 69% キトサンとブタ Chia または pepsin 標品との反応後の産物を, (GlcN)₁₋₆ 標準物質とともに, FACE 法によって解析した (図 7-7)。(GlcN)₁₋₆ と完全に一致する産物が見られなかったこと, (GlcN)₁₋₆ にのみ二重のバンドが見られることから, DD 69% キトサンの分解で得られた産物は, ヘテロなキトオリゴ糖であることが示唆された。

さらにブタ Chia と pepsin 標品のキトサンに対する分解活性を検討するため, (GlcNAc)₅, (GlcN)₅ および (GlcN)₆ に作用させた。GlcN 基質はいずれも分解されなかったが, (GlcNAc)₅ は完全に (GlcNAc)₂ と GlcNAc モノマーへと分解された (図 7-8)。これらの結果から, ブタ Chia および pepsin 標品のキトサン分解活性は GlcN-GlcN 結合への作用が無いことから, キトサナーゼ活性ではなく, キチナーゼ活性が関係していることが分かった。

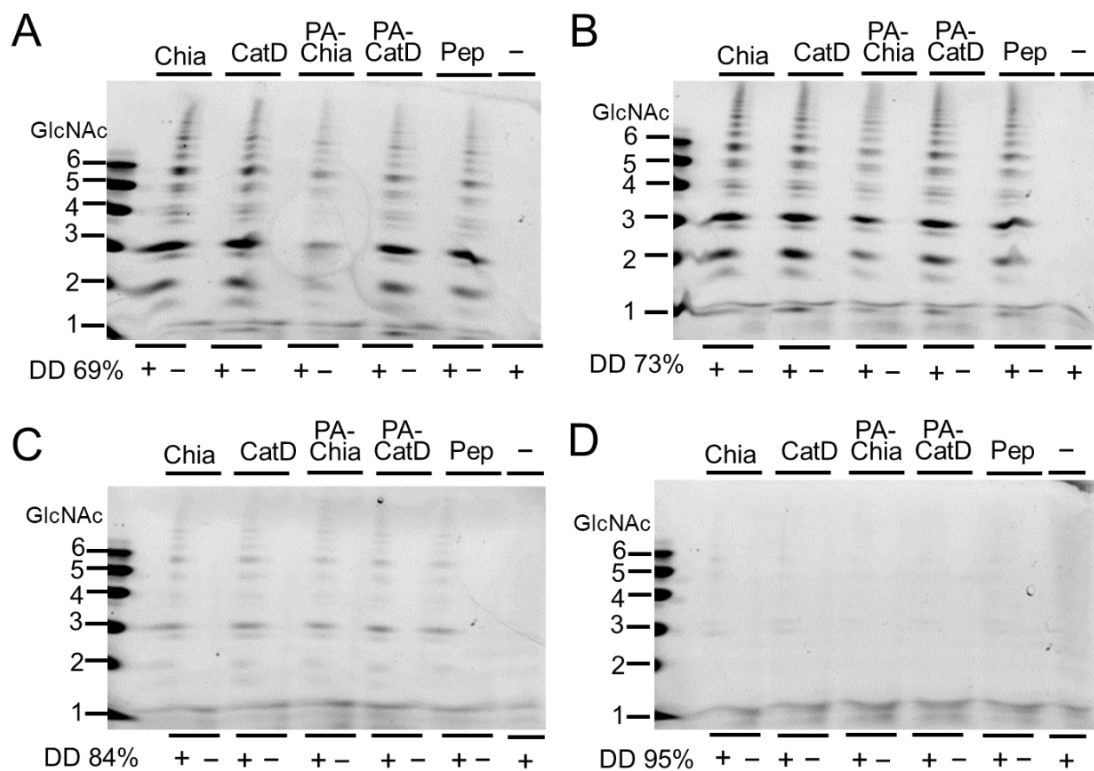


図 7-6. Chia の完全長とその切断型および pepsin 標品は、同等のキトオリゴ糖を生成する

様々な DD のキトサン [(A) 69%, (B) 73%, (C) 84% および (D) 95%] は、完全長 Chia (Chia), 切断型 Chia (CatD), PA-Chia, PA-CatD または pepsin 標品 (Pep) と共に、pH 4.0 で反応させ、分解産物は FACE 法によって解析した。

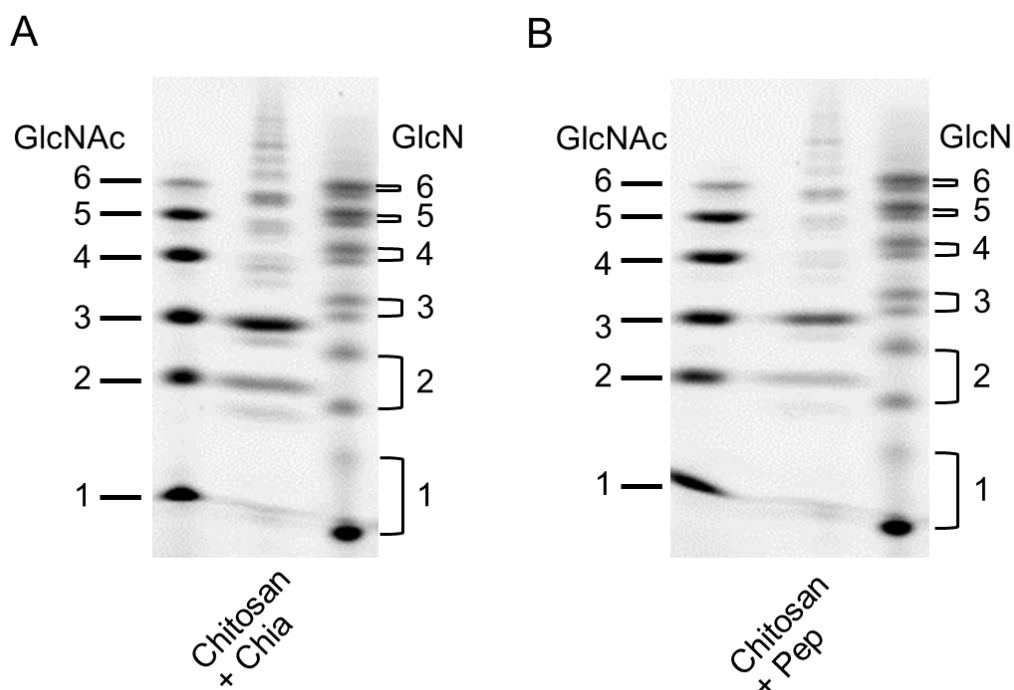


図 7-7. DD 69% キトサンの分解産物の解析

DD 69% キトサンと (A) ブタ Chia または (B) pepsin 標品を, pH 4.0, 16 時間反応させ, 分解産物を FACE 法によって解析した。(GlcN)₁₋₆ (左端) および (GlcNAc)₁₋₆ (右端) を標準物質として用いた。グルコサミン (GlcN, Tokyo Chemical Industry 社) および GlcN オリゴ糖 [(GlcN)₂₋₆, Seikagaku Corporation] を GlcN オリゴ糖マーカーとして用いた。

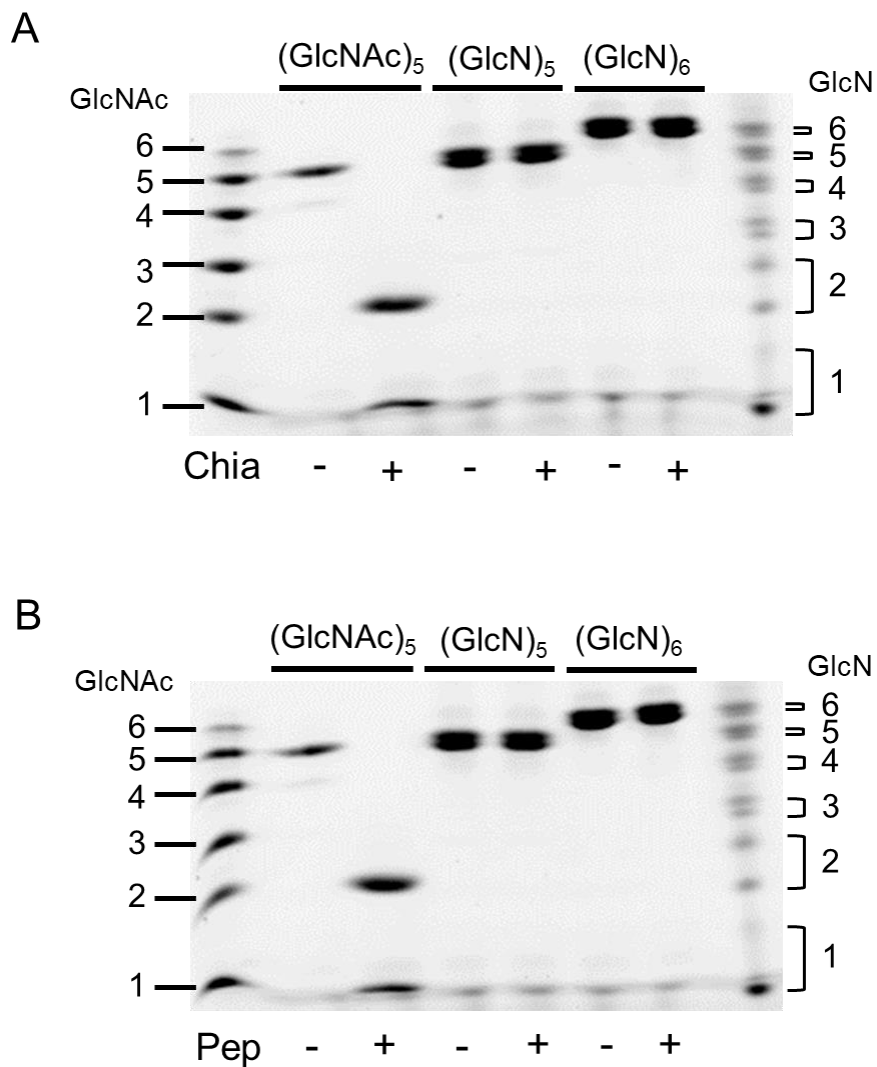


図 7-8. (GlcN)₅ および (GlcN)₆ を用いたブタ Chia および pepsin 標品中のキトサン分解活性の検討

200 μ M の (GlcNAc)₅, (GlcN)₅ または (GlcN)₆ は (A) ブタ Chia または (B) pepsin 標品とともに, pH 4.0, 16 時間反応させた。分解産物を FACE 法によって解析した。

第4節 考察

本章で、キチンカラムと酢酸を用いた、天然の Chia の精製に適した方法を示した。一方で、Chia-キチン結合が、酸変性ではなく、キチンと酢酸の競合によって解離するという、新規の概念を提示した。酢酸-Chia は、農学や医学的に有望な応用性を有する。

以前の報告では、組換え Chia タンパク質 (Protein A-mouse Chia-V5-His) を、IgG セファロースから 0.1 M Gly-HCl (pH 2.5), Ni セファロースカラムから変性を起こす 8 M 尿素によって溶出できることが示されている [42, 44, 99, 100]。本章では、同様の緩衝液を、キチンカラムから天然 Chia を調製するために用いた。Chia は、キチンカラムから 8 M 尿素によって効率的に溶出するが、Gly-HCl (pH 2.5) では溶出しなかったことから、Chia はこの緩衝液では変性せず、キチンカラムに残っていることを示唆した。

キチナーキチナーゼの相互作用は、様々な生物のキチナーゼの精製に用いられてきた [131]。それらの中には、キチナーゼが不可逆的にキチン基質に結合し、非変性条件下では溶出しない場合もある。実際に、Chit1 の CBD ドメインは、キチンビーズから溶出するために、1% SDS または 50% アセトニトリルのような、厳しい条件を必要とする [156]。これに対し、いくつかのキチナーゼは、キチンカラムから、酢酸や酢酸 Na によって溶出できることが示されてきた。しかし、その溶出メカニズムを検討した例は見当たらない。多様な pH の酢酸緩衝液が、キチンカラムからキチナーゼの溶出に用いられてきた [132-136, 157]。本研究では初めに 0.1 M Gly-HCl (pH 2.5) あるいは酢酸 (pH 2.8) と酢酸 Na (pH 4.0 と 5.5) を Chia の溶出に用いた。Gly-HCl と酢酸 Na は効果が無かったが、Chia は、0.1 M 酢酸によってキチンカラムから溶出された。また、酢酸と類似の構造を持っているシュウ酸とプロピオン酸は、Chia をキチンカラムから溶出したが、酢酸と比べると、溶出の効率性が低かった。これらの結果は、Chia とキチンとの相互作用が、酢酸のカルボキシル基またはメチル基によって特に影響され、キチン-酢酸の競合を示唆した。

Chia と Chit1 は、細菌キチナーゼと配列相同性を示し、GH18 ファミリーに属している [33, 35, 156]。Chia 全体の結晶構造は明らかになっていないが、本研究結果は、関連した GH18 酵素に適応することができる。図 6-5D に示すように、いくつかのキチナーゼの結晶構造中で、基質の結合サイトが、酢酸分子によって占有されている可能性が示唆された [158-160]。したがって、酢酸分子がこの位置に収容できる可能性があり、キチンと Chia の結合に干渉しうることが示唆された。

8 M 尿素により調製したニワトリとブタの Chia は、酸安定性とプロテアーゼ耐性をもち、キチンを、GIT 条件下で (GlcNAc)₂ に分解することができる

[99, 100]。Chia は、調製時に尿素によって変性するにも関わらず、脱塩後、依然として優れたキチン分解性を保持していた (尿素-Chia)。酢酸によって調製した天然 Chia 酵素 (酢酸-Chia) もまた、尿素-Chia と類似のキチナーゼ活性を示した (図 6-5C)。このことは、Chia が、強酸、プロテアーゼ、変性剤に対して、並外れた安定性をもつことを意味する。このように、酢酸は、キチンカラムを用いた天然 Chia 酵素の調製のための代替的な精製法として利用できる。

食品加工産業において、ニワトリ由来の卵白リゾチームは、その抗菌活性を利用した天然の保存剤として用いられている [161]。第 2 章において、ニワトリとブタ Chia 酵素が、GIT 条件下でキチン含有生物を分解し得ることを示した [99, 100]。さらに、Chia mRNA の発現レベルが、ウシ (草食性) とイヌ (肉食性) の胃では、マウス、ブタ、ニワトリ (雑食性) と比べて著しく低いことを示した。このように、酢酸- および尿素-Chia は、キチン含有生物の消化性を向上させ、ウシやイヌなどの草食性、肉食性動物から、キチン過剰摂取による弊害を防ぐことのできる、理想的な添加物である。

最近、Chia は生物医学的な利用のための分子として注目されている。Chia 欠損マウスでは、環境中のキチンポリマーが肺気道に蓄積し、肺線維症サイトカインの発現が誘導される [63]。これらのマウスは、自然発生的に肺線維症になり、それは、遺伝的あるいは治療による肺におけるキチナーゼ活性の復活によって緩和される。しかし、ヒト CHIA の発現および活性レベルは、マウスと比較して極めて低い [53-57]。さらに、Chia の mRNA とタンパク質レベルは、特定の病態で低下することが知られている [53-57]。ブタは、解剖学的、消化システム、代謝などのいくつかの点において、ヒトと類似しており、生物・医学領域において一般的なモデル動物である。さらに、ブタの酵素はヒトの疾患において補充療法に用いられている。例えば、ブタインシュリンは、ヒト糖尿病の治療に用いられてきた [162]。このような Chia mRNA あるいはタンパク質が減少する疾患は、日常的に人間に食されているブタ (やニワトリ) 由来の Chia タンパク質を、酵素補充治療として用いることで部分的に改善されるかもしれない。精製した天然酵素は、タグ付けされた組換えタンパク質のように、人工的な配列を持っていない。このように、酢酸- および尿素-Chia 酵素は、有望な治療用酵素としての潜在性を有している。

また、本章では、酢酸-Chia 酵素が、様々な生理活性を有するキトオリゴ糖の製造に利用できることを示した。キトサナーゼ活性が報告されてきた pepsin 標品から、キトサン分解活性を示す切断型 Chia を検出した。さらに、全長または切断型、天然または組換え型の Chia タンパク質は、キトサン基質を分解し、pepsin 標品によって得られたものと同様の分子量を有するキトオリゴ糖を生成した。これらの結果から、pepsin 標品中のキトサン分解活性の本体がブタ

Chia の切断型であることを示した。

組換え体マウス CatD の機能特性は、その完全長 Chia と同等である [44]。精製 pepsin との反応によって得られた天然型ブタ CatD は、その完全長酵素と、キチンとキトサンに対して同等の分解活性を示した。この活性は、CatD からさらに 24 アミノ酸削っても存在していたが、46 アミノ酸削ると活性を失った。これらの結果は、触媒ドメインに保存されている 6 つのシステイン [156] のうち、少なくとも 5 つがキチンまたはキトサン基質の分解活性のための 3 次構造を維持するために必須であることが示された。

ブタ Chia と pepsin 標品は DD 69-84% のキトサンを分解した。しかし、分解効率は、DD が上昇するにつれて減少し、DD 95% キトサンに対する分解性は限定的であり、Chia に“キトサナーゼ活性”が存在しないことを示した。

ブタ Chia によるキトサン分解メカニズムを検討するため、(GlcNAc)₅, (GlcN)₅, (GlcN)₆ に酵素を作用させた (図 7-7)。(GlcNAc)₅ が完全に (GlcNAc)₂ および GlcNAc モノマーへと分解されたのに対し、GlcN 基質は分解されずに存在したままであった (図 7-7)。これらの結果から、ブタ Chia はキトサナーゼ [163] のように GlcN-GlcN 結合を加水分解することは出来ず、pepsin 標品中のキトサン分解活性は、キチナーゼ活性によることが示された。

ブタ Chia は、キチンと (GlcNAc)₅ を分解し、主に (GlcNAc)₂ (図 7-1A), (GlcNAc)₂ および GlcNAc モノマーをそれぞれ生成した (図 7-7)。キトサンをブタ Chia または pepsin 標品に作用させた場合、(GlcNAc)₃ に移動度が類似の主生成物が検出された (図 7-1A, 図 7-3C, 図 7-5D, 図 7-6A-C)。直観的に、(GlcNAc)₃ が (GlcNAc)₂ および GlcNAc モノマーへの加水分解が予想された。この場合、主生成物の安定性を説明するのは難しいが、次のことが考えられる。例えば、*Serratia marcescens* や *Streptomyces coelicolor* のキチナーゼはキトサンを分解し、経時的に GlcN-GlcNAc-GlcNAc や GlcNAc-GlcN-GlcNAc などのヘテロキトオリゴ糖を生成し得ることが核磁気共鳴分光法 (NMR) によって明らかにされた [109, 164-167]。類似の結果は、ヒト CHIT1 による分解でも得られた [111]。このように、ブタ Chia または pepsin 標品によるキトサンの主分解産物にはヘテロキトオリゴ糖が含まれていることが予想される。さらに、主生成物の下にマイナーなバンドが検出された (図 7-1A, 図 7-3C, 図 7-5D, 図 7-6A-C) が、少なくとも 1 つのヘテロキトオリゴ糖が 3 量体産物に存在することを示唆している。重要なことに、(GlcN)₁₋₆ の各スタンダードからも、2 本のバンド (図 7-8, 左矢印) を改良 FACE 法 [85] によって検出した。キトサンと GlcN オリゴ糖の分子量マーカー中の複数のバンドの存在は以前報告されている [99]。したがって、この現象の解明には、さらなる研究が必要である。

ヘテロな産物の存在は、ここで用いたキトサンの構造によって説明できるかもしれない。今回用いた基質は、結晶領域と比べて非結晶領域でより脱アセチル化されており [168], 結晶領域から (GlcNAc)₂ または (GlcNAc/GlcN)₃ が生成し, (GlcNAc/GlcN)_{>6} のような長鎖断片が非結晶領域から生成したことが考えられる。主要なバンドがヘテロキトリマーのみで構成されるという仮説は、ヘテロキトリマーのスタンダードが得られることによって解決するであろう。ブタ Chia によるキトサン由来のオリゴ糖産物の特異性、この酵素の分解メカニズムや結合サイトの選択性に関するさらなる研究が、キトオリゴ糖の生産への実用化には必要である。

キトサン分解活性は植物由来のパパイン [169] や細菌由来のプロナーゼ [146] でも見つかっている。本章で示したデータは、このようなキトサン分解活性は、各プロテアーゼの固有の特性によるものではなく、プロテアーゼ耐性のキトサン分解酵素が標品中に“コンタミネーション”したことに起因する可能性があることを示唆している。植物はキチン含有病原体への防御のために、様々なタイプのキチナーゼを合成することが知られている。キトサン分解活性が報告されたパパインやプロナーゼ標品のさらなる生化学的特性の評価は、キチナーゼまたは類似の活性を有する他の酵素の新規発見につながる可能性がある。

精製キトサナーゼは高価であるため、オリジナルの特異性とは異なる多くの酵素がキトサンの加水分解能力を評価されてきた [169-171]。私たちが知る限り、ほ乳類酵素がキトサンを分解した例はほとんど見当たらない。このように、天然型ブタ Chia またはキトサン分解活性が存在する pepsin 標品は、生物医学的または食品産業での利用可能なキトオリゴ糖の効率的な生産に応用できる。

第5章 総合考察

本研究は、昆虫の家畜飼料利用のための科学的知見を得ることを目的に、家畜動物を含めた幅広い動物種の *Chia* の解析を行った。第2章では、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。雑食・食虫性動物が、摂取した昆虫のキチンを、胃で発現した *Chia* によって $(\text{GlcNAc})_2$ へと分解することを明らかにした。しかし、 $(\text{GlcNAc})_2$ が腸内で GlcNAc に分解され、さらに代謝されるかどうかはまだよく分かっていない。最近、Ohno らはマウスの *chitobiase* がマウスの胃などをはじめとする様々な組織で発現し、キトオリゴ糖、 $(\text{GlcNAc})_2$ を GlcNAc へと分解することを示した [172]。また、腸内細菌がキチンを代謝し、栄養源として利用している可能性が考えられる。健康なヒトの大腸で最も多く存在する細菌の1つ、*Faecalibacterium prausnitzii* は、 GlcNAc の消費菌として知られており、グルコースよりも GlcNAc 含有の培地で良好に増殖する [173, 174]。さらに、計算モデリング、*in vitro* 実験、メタボロミクス、ゲノム解析によって推定された *F. prausnitzii* の代謝経路によると、 GlcNAc は、細菌で見いだされる糖のリン酸化反応系兼膜輸送系 (carbohydrate phosphotransferase system, PTS) で取り込まれる可能性が示された [175]。最近では、食用昆虫の人体への影響に関する研究が行われ、食用コオロギを摂取した健常成人の腸内細菌叢は、プロバイオティクス細菌、ビフィズス菌の増加が見られたことに加えて、炎症を軽減する血漿 $\text{TNF-}\alpha$ の減少が見られた [176]。これらの結果は、昆虫由来のキチンが、腸内細菌叢にとっての栄養源となり、腸の健康を改善し、全身の炎症を軽減する可能性があることを示唆している。

第4章で示したように、*Chia* はキチンのみならず、脱アセチル化されたキチン (キトサン) を分解し、様々な生理活性が報告されているキトオリゴ糖を生産できる。実際に、自然界のキチンは、部分的に脱アセチル化された状態、すなわちキトサンとしても存在している。ミールワーム幼虫の殻またはショウジョウバエの翅を *Chia* と作用させた分解産物からは、 $(\text{GlcNAc})_2$ に加えて、長鎖のキトオリゴ糖が検出されることを第2章で示した。これらの結果は、先行研究で示された昆虫の摂取による生体への好影響の一部が、キチンやキトサンの分解産物であるキトオリゴ糖による効果かもしれない。これら *Chia* をめぐるキチン、キトサン、キトオリゴ糖の根底にあるメカニズムを理解するためには、昆虫の栄養価、消化性、これらのキチン含有生物のもつ副作用の潜在性について、さらなる研究が必要である。

すべての胎盤ほ乳類の祖先は、恐竜の絶滅直後に進化した小さな昆虫を食べ

る生物であったと考えられている [119]。第3章では Chia の遺伝子とその機能と食性の関係を食肉目で検討した。そして、現代でも昆虫を食べる種の Chia はキチン分解活性が高く、他方、昆虫を食べない種では Chia が機能レベルで不活性化分子へと進化したことを明らかにした。この新規の概念は、ほ乳類の進化の過程をより深く理解する上で重要な情報である。そして、これらの結果から、現代でも Chia が活性型酵素として機能している動物種 (ニワトリ、ブタ、コモンマーモセットなど) は、太古の食虫性の祖先が有していた昆虫のキチンの消化能力を継承している、と考えることもできる。つまり、活性型の Chia を保持する動物に対して、昆虫を投与することは、差しさわりないと言えるだろう。

最近のゲノム進化学的研究により、昆虫の消費量と Chia のパラログ遺伝子数が比例することが報告された。中でも、ツパイ (*Tupaia chinensis*) やフィリピンメガネザル (*Carlito syrichta*) は、食虫性であったほ乳類の祖先の特徴をよく残した形質を有しており、昆虫を主食とし、Chia 遺伝子パラログをそれぞれ 5 種類保持している [95]。これらのほ乳類祖先に近く、食虫性動物種の Chia の遺伝子構造と機能、そして食性との関係を解析することで、ほ乳類における Chia の分子進化が明らかとなり、現代の家畜動物種のキチン分解能を評価する指標となることが期待できる。

特定の食餌や環境の変化に関連して遺伝子を喪失した例は多数報告されている。しかし、これらの遺伝子が機能を失った理由を理解するために、その機能を回復させようとした研究はほとんどなかった。本研究では、雑食性で活性の高いマウスと、肉食性で活性の低いイヌ Chia 間でキメラタンパク質、変異体を作製し、解析した。そして、マウス Chia で保存される 2 アミノ酸との置換により、イヌ Chia を活性化できた。さらに、食肉目における食性と Chia の遺伝子構造と機能の関係から、イヌ Chia で見られたアミノ酸置換は、イヌ科に特異的であり、ORF の喪失をもたらす変異が蓄積していた他の食肉目とは異なる分子進化が起こっていたことを明らかにした。これらの結果から、不活性化型または機能喪失型分子が、多様な表現型を形成する遺伝的变化に関する広汎な情報源となり得ることを示した。

イヌやウシによる昆虫の摂取は珍しいことではない。そこで、これら肉食性、草食性動物において、少量のキチン含有生物の摂取は許容される範囲内であろう。しかし、キチンは不溶性で、難消化性の多糖なので、過剰な摂取によって健康被害は起こり得る。そこで、イヌやウシの“キチンの過剰摂取”において、キチン分解酵素剤 (組換え体あるいはブタやニワトリ由来の天然 Chia 酵素) の混合、または、キチナーゼを生産する微生物による生菌治療 [177, 178] は、有効な治療法となり得る。すなわち、活性型のキチナーゼの補充によ

り、草食性、肉食性動物においても、キチン含有生物を飼料として投与できる可能性がある。

キチンは、昆虫や甲殻類に加えて、カビやダニなどの構成成分として地球上に豊富に存在している。特に、Chia 欠損マウスの肺では、環境由来のキチンが蓄積し、肺線維症を引き起こす [63]。そして、欠損マウスにおける Chia の過剰発現がその症状を改善させるので、活性型 Chia は肺の機能維持にとっても重要である。最近の研究で、不活性型のヒト CHIA から、ランダム変異 PCR 法により活性型ヒト CHIA の作製が報告された [179]。疾患の予防、治療の目的から、活性型酵素の作製、投与が注目されている。第 2 章、第 4 章では、キチンカラムと尿素または酢酸を用い、ニワトリとブタの胃組織から、Chia 酵素を精製できることを示した。加えて、第 3 章では、キメラタンパク質、変異体作製により、不活性型酵素から活性型酵素を作製できた。これらの活性型 Chia 酵素によりキチンの分解性の向上が期待でき、農業や医療分野での応用が見込める。

第6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 が原因であることを明らかにした。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、本研究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 の応用利用についての重要な基礎的データとなる。

参考文献

1. Wysokowski, M., Petrenko, I., Stelling, A. L., Stawski, D., Jesionowski, T. & Ehrlich, H. (2015) Poriferan chitin as a versatile template for extreme biomimetics, *Polymers*. **7**, 235-265.
2. Neville, A. C., Parry, D. A. & Woodhead-Galloway, J. (1976) The chitin crystallite in arthropod cuticle, *J Cell Sci*. **21**, 73-82.
3. Liu, S., Sun, J., Yu, L., Zhang, C., Bi, J., Zhu, F., Qu, M., Jiang, C. & Yang, Q. (2012) Extraction and characterization of chitin from the beetle *Holotrichia parallela* Motschulsky, *Molecules*. **17**, 4604-11.
4. Merzendorfer, H. (2006) Insect chitin synthases: a review, *J Comp Physiol B*. **176**, 1-15.
5. Kaya, M., Seyyar, O., Baran, T., Erdogan, S. & Kar, M. (2014) A physicochemical characterization of fully acetylated chitin structure isolated from two spider species: with new surface morphology, *Int J Biol Macromol*. **65**, 553-8.
6. Garcia Mendoza, C. & Novaes Ledieu, M. (1968) Chitin in the new wall of regenerating protoplasts of *Candida utilis*, *Nature*. **220**, 1035.
7. Blumenthal, H. J. & Roseman, S. (1957) Quantitative estimation of chitin in fungi, *J Bacteriol*. **74**, 222-4.
8. Elorza, M. V., Rico, H. & Sentandreu, R. (1983) Calcofluor white alters the assembly of chitin fibrils in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans* cells, *J Gen Microbiol*. **129**, 1577-82.
9. 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.
10. Das, S. & Gillin, F. D. (1991) Chitin synthase in encysting *Entamoeba invadens*, *Biochem J*. **280** (Pt 3), 641-7.
11. Campos-Gongora, E., Ebert, F., Willhoeft, U., Said-Fernandez, S. & Tannich, E. (2004) Characterization of chitin synthases from *Entamoeba*, *Protist*. **155**, 323-30.
12. Richards, A. G. (1949) Studies on Arthropod Cuticle. III. The Chitin of *Limulus*, *Science*. **109**, 591-2.
13. Giraud-Guille, M. M. (1984) Fine structure of the chitin-protein system in the crab cuticle, *Tissue Cell*. **16**, 75-92.
14. Ando, Y., Fukada, E. & Glimicher, M. J. (1977) Piezoelectricity of chitin in lobster shell and apodeme, *Biorheology*. **14**, 175-9.

15. Horst, M. N. (1981) The biosynthesis of crustacean chitin by a microsomal enzyme from larval brine shrimp, *J Biol Chem.* **256**, 1412-9.
16. Rodde, R., Einbu, A. & Vårum, K. M. (2008) A seasonal study of the chemical composition and chitin quality of shrimp shells obtained from northern shrimp (*Pandalus borealis*). *Carbohydr Polym* **71**, 388–393.
17. Bo, M., Bavestrello, G., Kurek, D., Paasch, S., Brunner, E., Born, R., Galli, R., Stelling, A. L., Sivkov, V. N., Petrova, O. V., Vyalikh, D., Kummer, K., Molodtsov, S. L., Nowak, D., Nowak, J. & Ehrlich, H. (2012) Isolation and identification of chitin in the black coral *Parantipathes larix* (Anthozoa: Cnidaria), *Int J Biol Macromol.* **51**, 129-37.
18. Weiss, I. M. & Schonitzer, V. (2006) The distribution of chitin in larval shells of the bivalve mollusk *Mytilus galloprovincialis*, *J Struct Biol.* **153**, 264-77.
19. Weiss, I. M., Schonitzer, V., Eichner, N. & Sumper, M. (2006) The chitin synthase involved in marine bivalve mollusk shell formation contains a myosin domain, *FEBS Lett.* **580**, 1846-52.
20. Gaill, F., Shillito, B., Lechaire, J. P., Chanzy, H. & Goffinet, G. (1992) The chitin secreting system from deep sea hydrothermal vent worms, *Biol Cell.* **76**, 201–204.
21. Durkin, C. A., Mock, T. & Armbrust, E. V. (2009) Chitin in diatoms and its association with the cell wall, *Eukaryot Cell.* **8**, 1038-50.
22. Brunner, E., Richthammer, P., Ehrlich, H., Paasch, S., Simon, P., Ueberlein, S. & van Pée, K.-H. (2009) Chitin-based organic networks: An integral part of cell wall biosilica in the diatom *Thalassiosira pseudonana*, *Angew Chem Int Ed.* **48**, 9724–9727.
23. Ehrlich, H., Krautter, M., Hanke, T., Simon, P., Knieb, C., Heinemann, S. & Worch, H. (2007) First evidence of the presence of chitin in skeletons of marine sponges. Part II. Glass sponges (Hexactinellida: Porifera), *J Exp Zool B Mol Dev Evol.* **308**, 473-83.
24. Ehrlich, H., Kaluzhnaya, O. V., Brunner, E., Tsurkan, M. V., Ereskovsky, A., Ilan, M., Tabachnick, K. R., Bazhenov, V. V., Paasch, S., Kammer, M., Born, R., Stelling, A., Galli, R., Belikov, S., Petrova, O. V., Sivkov, V. V., Vyalikh, D., Hunoldt, S. & Worheide, G. (2013) Identification and first insights into the structure and biosynthesis of chitin from the freshwater sponge *Spongilla lacustris*, *J Struct Biol.* **183**, 474-483.
25. Wysokowski, M., Bazhenov, V. V., Tsurkan, M. V., Galli, R., Stelling, A. L., Stocker, H., Kaiser, S., Niederschlag, E., Gartner, G., Behm, T., Ilan, M., Petrenko, A. Y., Jesionowski, T. & Ehrlich, H. (2013) Isolation and identification of chitin in three-dimensional skeleton of *Aplysina fistularis* marine sponge, *Int J Biol Macromol.* **62**, 94-100.
26. Khoushab, F. & Yamabhai, M. (2010) Chitin research revisited, *Mar Drugs.* **8**, 1988-2012.
27. Bueter, C. L., Specht, C. A. & Levitz, S. M. (2013) Innate sensing of chitin and

chitosan, *PLoS Pathog.* **9**, e1003080.

28. Calström, D. (1957) The crystal structure of α -chitin (poly-N-acetyl-D-glucosamine), *J Biophys Biochem Cytol.* **3**, 669–683.
29. Sikorski, P., Hori, R. & Wada, M. (2009) Revisit of alpha-chitin crystal structure using high resolution X-ray diffraction data, *Biomacromolecules.* **10**, 1100-5.
30. Minke, R. & Blackwell, J. (1978) The structure of alpha-chitin, *J Mol Biol.* **120**, 167-81.
31. Rudall, K. & Kenchington, W. (1973) The chitin system, *Biol Rev.* **49**, 597–636.
32. Kaya, M., Mujtaba, M., Ehrlich, H., Salaberria, A. M., Baran, T., Amemiya, C. T., Galli, R., Akyuz, L., Sargin, I. & Labidi, J. (2017) On chemistry of gamma-chitin, *Carbohydr Polym.* **176**, 177-186.
33. Lee, C. G., Da Silva, C. A., Dela Cruz, C. S., Ahangari, F., Ma, B., Kang, M. J., He, C. H., Takyar, S. & Elias, J. A. (2011) Role of chitin and chitinase/chitinase-like proteins in inflammation, tissue remodeling, and injury, *Annu Rev Physiol.* **73**, 479-501.
34. Koch, B. E., Stougaard, J. & Spaink, H. P. (2015) Keeping track of the growing number of biological functions of chitin and its interaction partners in biomedical research, *Glycobiology.* **25**, 469-82.
35. Bussink, A. P., Speijer, D., Aerts, J. M. & Boot, R. G. (2007) Evolution of mammalian chitinase(-like) members of family 18 glycosyl hydrolases, *Genetics.* **177**, 959-70.
36. Hollak, C. E., van Weely, S., van Oers, M. H. & Aerts, J. M. (1994) Marked elevation of plasma chitotriosidase activity. A novel hallmark of Gaucher disease, *J Clin Invest.* **93**, 1288-92.
37. Renkema, G. H., Boot, R. G., Muijsers, A. O., Donker-Koopman, W. E. & Aerts, J. M. (1995) Purification and characterization of human chitotriosidase, a novel member of the chitinase family of proteins, *J Biol Chem.* **270**, 2198-202.
38. Boot, R. G., Renkema, G. H., Strijland, A., van Zonneveld, A. J. & Aerts, J. M. (1995) Cloning of a cDNA encoding chitotriosidase, a human chitinase produced by macrophages, *J Biol Chem.* **270**, 26252-6.
39. Boot, R. G., Blommaart, E. F., Swart, E., Ghauharali-van der Vlugt, K., Bijl, N., Moe, C., Place, A. & Aerts, J. M. (2001) Identification of a novel acidic mammalian chitinase distinct from chitotriosidase, *J Biol Chem.* **276**, 6770-8.
40. Boot, R. G., Bussink, A. P., Verhoek, M., de Boer, P. A., Moorman, A. F. & Aerts, J. M. (2005) Marked differences in tissue-specific expression of chitinases in mouse and man, *J Histochem Cytochem.* **53**, 1283-92.
41. Ohno, M., Tsuda, K., Sakaguchi, M., Sugahara, Y. & Oyama, F. (2012) Chitinase mRNA levels by quantitative PCR using the single standard DNA: acidic mammalian chitinase is a major transcript in the mouse stomach, *PLoS One.* **7**, e50381.

42. Kashimura, A., Okawa, K., Ishikawa, K., Kida, Y., Iwabuchi, K., Matsushima, Y., Sakaguchi, M., Sugahara, Y. & Oyama, F. (2013) Protein A-mouse acidic mammalian chitinase-V5-His expressed in periplasmic space of *Escherichia coli* possesses chitinase functions comparable to CHO-expressed protein, *PLoS One*. **8**, e78669.
43. Ohno, M., Togashi, Y., Tsuda, K., Okawa, K., Kamaya, M., Sakaguchi, M., Sugahara, Y. & Oyama, F. (2013) Quantification of chitinase mRNA levels in human and mouse tissues by real-time PCR: species-specific expression of acidic mammalian chitinase in stomach tissues, *PLoS One*. **8**, e67399.
44. Kashimura, A., Kimura, M., Okawa, K., Suzuki, H., Ukita, A., Wakita, S., Okazaki, K., Ohno, M., Bauer, P. O., Sakaguchi, M., Sugahara, Y. & Oyama, F. (2015) Functional properties of the catalytic domain of mouse acidic mammalian chitinase expressed in *Escherichia coli*, *Int J Mol Sci*. **16**, 4028-42.
45. Letuve, S., Kozhich, A., Humbles, A., Brewah, Y., Dombret, M. C., Grandsaigne, M., Adle, H., Kolbeck, R., Aubier, M., Coyle, A. J. & Pretolani, M. (2010) Lung chitinolytic activity and chitotriosidase are elevated in chronic obstructive pulmonary disease and contribute to lung inflammation, *Am J Pathol*. **176**, 638-49.
46. Watabe-Rudolph, M., Song, Z., Lausser, L., Schnack, C., Begus-Nahrman, Y., Scheithauer, M. O., Rettinger, G., Otto, M., Tumani, H., Thal, D. R., Attems, J., Jellinger, K. A., Kestler, H. A., von Arnim, C. A. & Rudolph, K. L. (2012) Chitinase enzyme activity in CSF is a powerful biomarker of Alzheimer disease, *Neurology*. **78**, 569-77.
47. Artieda, M., Cenarro, A., Ganan, A., Jerico, I., Gonzalvo, C., Casado, J. M., Vitoria, I., Puzo, J., Pocovi, M. & Civeira, F. (2003) Serum chitotriosidase activity is increased in subjects with atherosclerosis disease, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **23**, 1645-52.
48. Sonmez, A., Haymana, C., Tapan, S., Safer, U., Celebi, G., Ozturk, O., Genc, H., Dogru, T., Tasci, I., Erdem, G., Taslipinar, A., Aydogdu, A., Yilmaz, M. I., Kurt, I. & Kutlu, M. (2010) Chitotriosidase activity predicts endothelial dysfunction in type-2 diabetes mellitus, *Endocrine*. **37**, 455-9.
49. Livnat, G., Bar-Yoseph, R., Mory, A., Dagan, E., Elias, N., Gershoni, R. & Bentur, L. (2014) Duplication in CHIT1 gene and the risk for *Aspergillus* lung disease in CF patients, *Pediatr Pulmonol*. **49**, 21-7.
50. Seibold, M. A., Donnelly, S., Solon, M., Innes, A., Woodruff, P. G., Boot, R. G., Burchard, E. G. & Fahy, J. V. (2008) Chitotriosidase is the primary active chitinase in the human lung and is modulated by genotype and smoking habit, *J Allergy Clin Immunol*. **122**, 944-950 e3.
51. Zhu, Z., Zheng, T., Homer, R. J., Kim, Y. K., Chen, N. Y., Cohn, L., Hamid, Q. & Elias, J. A. (2004) Acidic mammalian chitinase in asthmatic Th2 inflammation and IL-13 pathway

activation, *Science*. **304**, 1678-82.

52. Reese, T. A., Liang, H. E., Tager, A. M., Luster, A. D., Van Rooijen, N., Voehringer, D. & Locksley, R. M. (2007) Chitin induces accumulation in tissue of innate immune cells associated with allergy, *Nature*. **447**, 92-6.
53. Bucolo, C., Musumeci, M., Maltese, A., Drago, F. & Musumeci, S. (2008) Effect of chitinase inhibitors on endotoxin-induced uveitis (EIU) in rabbits, *Pharmacol Res*. **57**, 247-52.
54. Musumeci, M., Aragona, P., Bellin, M., Maugeri, F., Rania, L., Bucolo, C. & Musumeci, S. (2009) Acidic mammalian chitinase in dry eye conditions, *Cornea*. **28**, 667-72.
55. Bucolo, C., Musumeci, M., Musumeci, S. & Drago, F. (2011) Acidic mammalian chitinase and the eye: implications for ocular inflammatory diseases, *Front Pharmacol*. **2**, 43.
56. Cozzarini, E., Bellin, M., Norberto, L., Polese, L., Musumeci, S., Lanfranchi, G. & Paoletti, M. G. (2009) CHIT1 and AMCase expression in human gastric mucosa: correlation with inflammation and Helicobacter pylori infection, *Eur J Gastroenterol Hepatol*. **21**, 1119-26.
57. Nookaew, I., Thorell, K., Worah, K., Wang, S., Hibberd, M. L., Sjovall, H., Pettersson, S., Nielsen, J. & Lundin, S. B. (2013) Transcriptome signatures in Helicobacter pylori-infected mucosa identifies acidic mammalian chitinase loss as a corpus atrophy marker, *BMC Med Genomics*. **6**, 41.
58. Okawa, K., Ohno, M., Kashimura, A., Kimura, M., Kobayashi, Y., Sakaguchi, M., Sugahara, Y., Kamaya, M., Kino, Y., Bauer, P. O. & Oyama, F. (2016) Loss and gain of human acidic mammalian chitinase activity by nonsynonymous SNPs, *Mol Biol Evol*. **33**, 3183-3193.
59. Chatterjee, R., Batra, J., Das, S., Sharma, S. K. & Ghosh, B. (2008) Genetic association of acidic mammalian chitinase with atopic asthma and serum total IgE levels, *J Allergy Clin Immunol*. **122**, 202-8, 208 e1-7.
60. Bierbaum, S., Nickel, R., Koch, A., Lau, S., Deichmann, K. A., Wahn, U., Superti-Furga, A. & Heinzmann, A. (2005) Polymorphisms and haplotypes of acid mammalian chitinase are associated with bronchial asthma, *Am J Respir Crit Care Med*. **172**, 1505-9.
61. Seibold, M. A., Reese, T. A., Choudhry, S., Salam, M. T., Beckman, K., Eng, C., Atakilit, A., Meade, K., Lenoir, M., Watson, H. G., Thyne, S., Kumar, R., Weiss, K. B., Grammer, L. C., Avila, P., Schleimer, R. P., Fahy, J. V., Rodriguez-Santana, J., Rodriguez-Cintron, W., Boot, R. G., Sheppard, D., Gilliland, F. D., Locksley, R. M. & Burchard, E. G. (2009) Differential enzymatic activity of common haplotypic versions of the human acidic mammalian chitinase protein, *J Biol Chem*. **284**, 19650-8.

62. Fitz, L. J., DeClercq, C., Brooks, J., Kuang, W., Bates, B., Demers, D., Winkler, A., Nocka, K., Jiao, A., Greco, R. M., Mason, L. E., Fleming, M., Quazi, A., Wright, J., Goldman, S., Hubeau, C. & Williams, C. M. (2012) Acidic mammalian chitinase is not a critical target for allergic airway disease, *Am J Respir Cell Mol Biol.* **46**, 71-9.
63. Van Dyken, S. J., Liang, H. E., Naikawadi, R. P., Woodruff, P. G., Wolters, P. J., Erle, D. J. & Locksley, R. M. (2017) Spontaneous chitin accumulation in airways and age-related fibrotic lung disease, *Cell.* **169**, 497-509 e13.
64. Vannella, K. M., Ramalingam, T. R., Hart, K. M., de Queiroz Prado, R., Sciurba, J., Barron, L., Borthwick, L. A., Smith, A. D., Mentink-Kane, M., White, S., Thompson, R. W., Cheever, A. W., Bock, K., Moore, I., Fitz, L. J., Urban, J. F., Jr. & Wynn, T. A. (2016) Acidic chitinase primes the protective immune response to gastrointestinal nematodes, *Nat Immunol.* **17**, 538-44.
65. Herrero, M. & Thornton, P. K. (2013) Livestock and global change: emerging issues for sustainable food systems, *Proc Natl Acad Sci U S A.* **110**, 20878-81.
66. Kupferschmidt, K. (2015) Buzz food, *Science.* **350**, 267-9.
67. van Huis, A. (2013) Potential of insects as food and feed in assuring food security, *Annu Rev Entomol.* **58**, 563-83.
68. van Huis, A. (2016) Edible insects are the future?, *Proc Nutr Soc.* **75**, 294-305.
69. van Huis, A., Van Itterbeeck, J., Klunder, H., Mertens, E., Halloran, A., Muir, G. & Vantomme, P. (2013) Edible insects: future prospects for food and feed security, *FAO Forestry Paper 171*, 1-201.
70. Bays, H. E., Evans, J. L., Maki, K. C., Evans, M., Maquet, V., Cooper, R. & Anderson, J. W. (2013) Chitin-glucan fiber effects on oxidized low-density lipoprotein: a randomized controlled trial, *Eur J Clin Nutr.* **67**, 2-7.
71. Veldkamp, T. & Bosch, G. (2015) Insects: a protein-rich feed ingredient in pig and poultry diets, *Animal Frontiers.* **5**, 45-50.
72. Ohno, M., Kimura, M., Miyazaki, H., Okawa, K., Onuki, R., Nemoto, C., Tabata, E., Wakita, S., Kashimura, A., Sakaguchi, M., Sugahara, Y., Nukina, N., Bauer, P. O. & Oyama, F. (2016) Acidic mammalian chitinase is a proteases-resistant glycosidase in mouse digestive system, *Sci Rep.* **6**, 37756.
73. Curths, C., Knauf, S. & Kaup, F.-J. (2014) Respiratory Animal Models in the Common Marmoset (*Callithrix jacchus*), *Vet Sci* **1**, 63-76.
74. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature.* **227**, 680-5.
75. Kimura, M., Wakita, S., Ishikawa, K., Sekine, K., Yoshikawa, S., Sato, A., Okawa, K., Kashimura, A., Sakaguchi, M., Sugahara, Y., Yamanaka, D., Ohno, N., Bauer, P. O. &

- Oyama, F. (2016) Functional properties of mouse chitotriosidase expressed in the periplasmic space of *Escherichia coli*, *PLoS One*. **11**, e0164367.
76. Kania, K., Byrnes, E. A., Beilby, J. P., Webb, S. A. & Strong, K. J. (2010) Urinary proteases degrade albumin: implications for measurement of albuminuria in stored samples, *Ann Clin Biochem*. **47**, 151-7.
77. Kuwabata, S., Kongkanand, A., Oyamatsu, D. & Torimoto, T. (2006) Observation of ionic liquid by scanning electron microscope *Chem Lett*. **35**, 600-601.
78. Suzuki, M., Fujimoto, W., Goto, M., Morimatsu, M., Syuto, B. & Iwanaga, T. (2002) Cellular expression of gut chitinase mRNA in the gastrointestinal tract of mice and chickens, *J Histochem Cytochem*. **50**, 1081-9.
79. Han, B. K., Lee, W. J. & Jo, D. H. (1997) Chitinolytic enzymes from the gizzard and the chyme of the broiler (*Gallus gallus* L.), *Biotechnology Letters*. **19**, 981-984.
80. J F Bohnsack, E. J. B. (1986) The role of the spleen in resistance to infection, *Annu Rev Med* **37**, 49-59.
81. Crevieu-Gabriel, I., Gomez, J., Caffin, J. P. & Carre, B. (1999) Comparison of pig and chicken pepsins for protein hydrolysis, *Reprod Nutr Dev*. **39**, 443-54.
82. Canfield, V. A. & Levenson, R. (1991) Structural organization and transcription of the mouse gastric H⁺, K⁽⁺⁾-ATPase beta subunit gene, *Proc Natl Acad Sci U S A*. **88**, 8247-51.
83. Nygard, A. B., Jorgensen, C. B., Cirera, S. & Fredholm, M. (2007) Selection of reference genes for gene expression studies in pig tissues using SYBR green qPCR, *BMC Mol Biol*. **8**, 67.
84. Jackson, P. (1990) The use of polyacrylamide-gel electrophoresis for the high-resolution separation of reducing saccharides labelled with the fluorophore 8-aminonaphthalene-1,3,6-trisulphonic acid. Detection of picomolar quantities by an imaging system based on a cooled charge-coupled device, *Biochem J*. **270**, 705-13.
85. Wakita, S., Kimura, M., Kato, N., Kashimura, A., Kobayashi, S., Kanayama, N., Ohno, M., Honda, S., Sakaguchi, M., Sugahara, Y., Bauer, P. O. & Oyama, F. (2017) Improved fluorescent labeling of chitin oligomers: Chitinolytic properties of acidic mammalian chitinase under somatic tissue pH conditions, *Carbohydr Polym*. **164**, 145-153.
86. Ramos-Elorduy, J., González, E. A., Hernández, A. R. & Pinoa, J. M. (2002) Use of *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) to recycle organic wastes and as feed for broiler chickens, *Journal of Economic Entomology*. **95**, 214-220.
87. Finke, M. D. (2013) Complete nutrient content of four species of feeder insects, *Zoo Biol*. **32**, 27-36.
88. Yi, L., Lakemond, C. M., Sagis, L. M., Eisner-Schadler, V., van Huis, A. & van Boekel, M. A. (2013) Extraction and characterisation of protein fractions from five insect species,

Food Chem. **141**, 3341-8.

89. Bovera, F., Piccolo, G., Gasco, L., Marono, S., Loponte, R., Vassalotti, G., Mastellone, V., Lombardi, P., Attia, Y. A. & Nizza, A. (2015) Yellow mealworm larvae (*Tenebrio molitor*, L.) as a possible alternative to soybean meal in broiler diets, *Br Poult Sci.* **56**, 569-75.
90. Islam, M. M. & Yang, C. J. (2017) Efficacy of mealworm and super mealworm larvae probiotics as an alternative to antibiotics challenged orally with *Salmonella* and *E. coli* infection in broiler chicks, *Poult Sci.* **96**, 27-34.
91. Hall, A. J., Morroll, S., Tighe, P., Gotz, F. & Falcone, F. H. (2008) Human chitotriosidase is expressed in the eye and lacrimal gland and has an antimicrobial spectrum different from lysozyme, *Microbes Infect.* **10**, 69-78.
92. Mansfield, K. (2003) Marmoset models commonly used in biomedical research, *Comp Med.* **53**, 383-92.
93. Miller, C. T., Freiwald, W. A., Leopold, D. A., Mitchell, J. F., Silva, A. C. & Wang, X. (2016) Marmosets: A Neuroscientific Model of Human Social Behavior, *Neuron.* **90**, 219-33.
94. Kametani, Y., Shiina, T., Suzuki, R., Sasaki, E. & Habu, S. (2018) Comparative immunity of antigen recognition, differentiation, and other functional molecules: similarities and differences among common marmosets, humans, and mice, *Exp Anim.*
95. Janiak, M. C., Chaney, M. E. & Tosi, A. J. (2018) Evolution of acidic mammalian chitinase genes (CHIA) is related to body mass and insectivory in primates, *Mol Biol Evol.* **35**, 607-622.
96. Krykbaev, R., Fitz, L. J., Reddy, P. S., Winkler, A., Xuan, D., Yang, X., Fleming, M. & Wolf, S. F. (2010) Evolutionary and biochemical differences between human and monkey acidic mammalian chitinases, *Gene.* **452**, 63-71.
97. Uehara, M., Tabata, E., Ishii, K., Sawa, A., Ohno, M., Sakaguchi, M., Matoska, V., Bauer, P. O. & Oyama, F. (2018) Chitinase mRNA Levels Determined by QPCR in Crab-Eating Monkey (*Macaca fascicularis*) Tissues: Species-Specific Expression of Acidic Mammalian Chitinase and Chitotriosidase, *Genes (Basel).* **9**.
98. Suzuki, M., Morimatsu, M., Yamashita, T., Iwanaga, T. & Syuto, B. (2001) A novel serum chitinase that is expressed in bovine liver, *FEBS Lett.* **506**, 127-30.
99. Tabata, E., Kashimura, A., Wakita, S., Ohno, M., Sakaguchi, M., Sugahara, Y., Kino, Y., Matoska, V., Bauer, P. O. & Oyama, F. (2017) Gastric and intestinal proteases resistance of chicken acidic chitinase nominates chitin-containing organisms for alternative whole edible diets for poultry, *Sci Rep.* **7**, 6662.
100. Tabata, E., Kashimura, A., Wakita, S., Ohno, M., Sakaguchi, M., Sugahara, Y., Imamura, Y., Seki, S., Ueda, H., Matoska, V., Bauer, P. O. & Oyama, F. (2017) Protease resistance of porcine acidic mammalian chitinase under gastrointestinal conditions implies

- that chitin-containing organisms can be sustainable dietary resources, *Sci Rep.* **7**, 12963.
101. Brulc, J. M., Antonopoulos, D. A., Miller, M. E., Wilson, M. K., Yannarell, A. C., Dinsdale, E. A., Edwards, R. E., Frank, E. D., Emerson, J. B., Wacklin, P., Coutinho, P. M., Henrissat, B., Nelson, K. E. & White, B. A. (2009) Gene-centric metagenomics of the fiber-adherent bovine rumen microbiome reveals forage specific glycoside hydrolases, *Proc Natl Acad Sci U S A.* **106**, 1948-53.
 102. Hess, M., Sczyrba, A., Egan, R., Kim, T. W., Chokhawala, H., Schroth, G., Luo, S., Clark, D. S., Chen, F., Zhang, T., Mackie, R. I., Pennacchio, L. A., Tringe, S. G., Visel, A., Woyke, T., Wang, Z. & Rubin, E. M. (2011) Metagenomic discovery of biomass-degrading genes and genomes from cow rumen, *Science.* **331**, 463-7.
 103. Deusch, S., Camarinha-Silva, A., Conrad, J., Beifuss, U., Rodehutschord, M. & Seifert, J. (2017) A Structural and Functional Elucidation of the Rumen Microbiome Influenced by Various Diets and Microenvironments, *Front Microbiol.* **8**, 1605.
 104. Hibino, S., Kanda, M., Oya, H., Takami, H., Shimizu, D., Nomoto, S., Hishida, M., Niwa, Y., Koike, M., Yamada, S., Nishikawa, Y., Asai, M., Nakayama, G., Fujii, T., Sugimoto, H., Fujiwara, M. & Kodera, Y. (2014) Reduced expression of DENND2D through promoter hypermethylation is an adverse prognostic factor in squamous cell carcinoma of the esophagus, *Oncol Rep.* **31**, 693-700.
 105. Sakha, S., Muramatsu, T., Ueda, K. & Inazawa, J. (2016) Exosomal microRNA miR-1246 induces cell motility and invasion through the regulation of DENND2D in oral squamous cell carcinoma, *Sci Rep.* **6**, 38750.
 106. Kinzel, D., Boldt, K., Davis, E. E., Burtscher, I., Trumbach, D., Diplas, B., Attie-Bitach, T., Wurst, W., Katsanis, N., Ueffing, M. & Lickert, H. (2010) Pitchfork regulates primary cilia disassembly and left-right asymmetry, *Dev Cell.* **19**, 66-77.
 107. Strobel, S., Roswag, A., Becker, N. I., Trenczek, T. E. & Encarnacao, J. A. (2013) Insectivorous bats digest chitin in the stomach using acidic mammalian chitinase, *PLoS One.* **8**, e72770.
 108. Ma, J. E., Li, L. M., Jiang, H. Y., Zhang, X. J., Li, J., Li, G. Y. & Chen, J. P. (2018) Acidic mammalian chitinase gene is highly expressed in the special oxyntic glands of *Manis javanica*, *FEBS Open Bio.* **8**, 1247-1255.
 109. Aam, B. B., Heggset, E. B., Norberg, A. L., Sorlie, M., Varum, K. M. & Eijsink, V. G. (2010) Production of chitooligosaccharides and their potential applications in medicine, *Mar Drugs.* **8**, 1482-517.
 110. Sikorski, P., Sorbotten, A., Horn, S. J., Eijsink, V. G. & Varum, K. M. (2006) *Serratia marcescens* chitinases with tunnel-shaped substrate-binding grooves show endo activity and different degrees of processivity during enzymatic hydrolysis of chitosan, *Biochemistry.*

45, 9566-74.

111. Eide, K. B., Norberg, A. L., Heggset, E. B., Lindbom, A. R., Varum, K. M., Eijsink, V. G. & Sorlie, M. (2012) Human chitotriosidase-catalyzed hydrolysis of chitosan, *Biochemistry* **51**, 487-95.
112. Jin, X. H., Heo, P. S., Hong, J. S., Kim, N. J. & Kim, Y. Y. (2016) Supplementation of Dried Mealworm (*Tenebrio molitor* larva) on Growth Performance, Nutrient Digestibility and Blood Profiles in Weaning Pigs, *Asian-Australas J Anim Sci* **29**, 979-86.
113. Xie, C., Wu, X., Long, C., Wang, Q., Fan, Z., Li, S. & Yin, Y. (2016) Chitosan oligosaccharide affects antioxidant defense capacity and placental amino acids transport of sows, *BMC Vet Res* **12**, 243.
114. Gerstein, M. & Zheng, D. (2006) The real life of pseudogenes, *Sci Am* **295**, 48-55.
115. Dobson, D. E., Prager, E. M. & Wilson, A. C. (1984) Stomach lysozymes of ruminants. I. Distribution and catalytic properties, *J Biol Chem* **259**, 11607-16.
116. Zhao, H., Yang, J. R., Xu, H. & Zhang, J. (2010) Pseudogenization of the umami taste receptor gene *Tas1r1* in the giant panda coincided with its dietary switch to bamboo, *Mol Biol Evol* **27**, 2669-73.
117. Gernat, A. G. (2001) The effect of using different levels of shrimp meal in laying hen diets, *Poult Sci* **80**, 633-6.
118. Awoniyi, T. A. M., Aletor, V. A. A. & Aina, J. M. (2003) Performance of broiler - chickens fed on maggot meal in place of fishmeal, *International Journal of Poultry Science* **2**, 271-274.
119. O'Leary, M. A., Bloch, J. I., Flynn, J. J., Gaudin, T. J., Giallombardo, A., Giannini, N. P., Goldberg, S. L., Kraatz, B. P., Luo, Z. X., Meng, J., Ni, X., Novacek, M. J., Perini, F. A., Randall, Z. S., Rougier, G. W., Sargis, E. J., Silcox, M. T., Simmons, N. B., Spaulding, M., Velazco, P. M., Weksler, M., Wible, J. R. & Cirranello, A. L. (2013) The placental mammal ancestor and the post-K-Pg radiation of placentals, *Science* **339**, 662-7.
120. Axelsson, E., Ratnakumar, A., Arendt, M. L., Maqbool, K., Webster, M. T., Perloski, M., Liberg, O., Arnemo, J. M., Hedhammar, A. & Lindblad-Toh, K. (2013) The genomic signature of dog domestication reveals adaptation to a starch-rich diet, *Nature* **495**, 360-4.
121. Hecker, N., Sharma, V. & Hiller, M. (2019) Convergent gene losses illuminate metabolic and physiological changes in herbivores and carnivores, *Proc Natl Acad Sci U S A* **116**, 3036-3041.
122. Carpenter, D., Mitchell, L. M. & Armour, J. A. (2017) Copy number variation of human *AMY1* is a minor contributor to variation in salivary amylase expression and activity, *Hum Genomics* **11**, 2.
123. Emerling, C. A., Delsuc, F. & Nachman, M. W. (2018) Chitinase genes (CHIAs)

provide genomic footprints of a post-Cretaceous dietary radiation in placental mammals, *Sci Adv*. **4**, eaar6478.

124. Tabata, E., Kashimura, A., Kikuchi, A., Masuda, H., Miyahara, R., Hiruma, Y., Wakita, S., Ohno, M., Sakaguchi, M., Sugahara, Y., Matoska, V., Bauer, P. O. & Oyama, F. (2018) Chitin digestibility is dependent on feeding behaviors, which determine acidic chitinase mRNA levels in mammalian and poultry stomachs, *Sci Rep*. **8**, 1461.
125. Botigue, L. R., Song, S., Scheu, A., Gopalan, S., Pendleton, A. L., Oetjens, M., Taravella, A. M., Seregely, T., Zeeb-Lanz, A., Arbogast, R. M., Bobo, D., Daly, K., Unterlander, M., Burger, J., Kidd, J. M. & Veeramah, K. R. (2017) Ancient European dog genomes reveal continuity since the Early Neolithic, *Nat Commun*. **8**, 16082.
126. Sinding, M. S., Gopalakrishnan, S., Ramos-Madriral, J., de Manuel, M., Pitulko, V. V., Kuderna, L., Feuerborn, T. R., Frantz, L. A. F., Vieira, F. G., Niemann, J., Samaniego Castruita, J. A., Caroe, C., Andersen-Ranberg, E. U., Jordan, P. D., Pavlova, E. Y., Nikolskiy, P. A., Kasparov, A. K., Ivanova, V. V., Willerslev, E., Skoglund, P., Fredholm, M., Wennerberg, S. E., Heide-Jorgensen, M. P., Dietz, R., Sonne, C., Meldgaard, M., Dalen, L., Larson, G., Petersen, B., Sicheritz-Ponten, T., Bachmann, L., Wiig, O., Marques-Bonet, T., Hansen, A. J. & Gilbert, M. T. P. (2020) Arctic-adapted dogs emerged at the Pleistocene-Holocene transition, *Science*. **368**, 1495-1499.
127. Wayne, B. V. V. a. R. K. Carnivores, *Current Biology*. **20**, R915-9.
128. Davide Risso, M. B., Eduardo Sainz, Wolfgang Meyerhof, and Dennis Drayna (2017) Probing the Evolutionary History of Human Bitter Taste Receptor Pseudogenes by Restoring Their Function, *Mol Biol Evol*. **34**, 1587-1595.
129. Korinna Esfeld, A. E. B., Michel Moser, Eligio Bossolini, Loreta Freitas, Cris Kuhlmeier (2018) Pseudogenization and Resurrection of a Speciation Gene, *Current Biology*. **28**, 3776-3786.
130. Maureen A. O'Leary, 3¶ Jonathan I. Bloch, 2 John J. Flynn, 3 Timothy J. Gaudin, 4 Andres Giallombardo, 3 Norberto P. Giannini, 5* Suzann L. Goldberg, 3 Brian P. Kraatz, 3,6 Zhe-Xi Luo, 7† Jin Meng, 3 Xijun Ni, 3‡ Michael J. Novacek, 3 Fernando A. Perini, 3 | Zachary S. Randall, 2 Guillermo W. Rougier, 8 Eric J. Sargis, 9 Mary T. Silcox, 10 Nancy B. Simmons, 5 Michelle Spaulding, 3, 11 Paúl M. Velazco, 5 Marcelo Weksler, 3§ John R. Wible, 11 Andrea L. Cirranello, 1, 3 (2013) The Placental Mammal Ancestor and the Post-K-Pg Radiation of Placentals, *Science*. **339**, 662-667.
131. Cheba, B. (2015) Microbial chitinases purification: Conventional protocols and affinity based strategies (Review), *World J Fish & Marine Sci*. **7**, 458-461.
132. Ikeda, M., Miyauchi, K. & Matsumiya, M. (2012) Purification and characterization of a 56 kDa chitinase isozyme (PaChiB) from the stomach of the silver croaker, *Pennahia*

- argentatus, *Biosci Biotechnol Biochem.* **76**, 971-9.
133. Taira, T., Ohdomari, A., Nakama, N., Shimoji, M. & Ishihara, M. (2005) Characterization and antifungal activity of gazyumaru (*Ficus microcarpa*) latex chitinases: both the chitin-binding and the antifungal activities of class I chitinase are reinforced with increasing ionic strength, *Biosci Biotechnol Biochem.* **69**, 811-8.
134. Hashimoto, M., Ikegami, T., Seino, S., Ohuchi, N., Fukada, H., Sugiyama, J., Shirakawa, M. & Watanabe, T. (2000) Expression and characterization of the chitin-binding domain of chitinase A1 from *Bacillus circulans* WL-12, *J Bacteriol.* **182**, 3045-54.
135. Lobo, M. D., Silva, F. D., Landim, P. G., da Cruz, P. R., de Brito, T. L., de Medeiros, S. C., Oliveira, J. T., Vasconcelos, I. M., Pereira, H. D. & Grangeiro, T. B. (2013) Expression and efficient secretion of a functional chitinase from *Chromobacterium violaceum* in *Escherichia coli*, *BMC Biotechnol.* **13**, 46.
136. Gupta, R. & Deswal, R. (2014) Refolding of beta-stranded class I chitinases of *Hippophae rhamnoides* enhances the antifreeze activity during cold acclimation, *PLoS One.* **9**, e91723.
137. Chien, R. C., Yen, M. T. & Mau, J. L. (2016) Antimicrobial and antitumor activities of chitosan from shiitake stipes, compared to commercial chitosan from crab shells, *Carbohydr Polym.* **138**, 259-64.
138. Chiu, C. Y., Feng, S. A., Liu, S. H. & Chiang, M. T. (2017) Functional Comparison for Lipid Metabolism and Intestinal and Fecal Microflora Enzyme Activities between Low Molecular Weight Chitosan and Chitosan Oligosaccharide in High-Fat-Diet-Fed Rats, *Mar Drugs.* **15**.
139. Qiao, Y., Bai, X. F. & Du, Y. G. (2011) Chitosan oligosaccharides protect mice from LPS challenge by attenuation of inflammation and oxidative stress, *Int Immunopharmacol.* **11**, 121-7.
140. Shen, K. T., Chen, M. H., Chan, H. Y., Jeng, J. H. & Wang, Y. J. (2009) Inhibitory effects of chitooligosaccharides on tumor growth and metastasis, *Food Chem Toxicol.* **47**, 1864-71.
141. Park, J. H., Saravanakumar, G., Kim, K. & Kwon, I. C. (2010) Targeted delivery of low molecular drugs using chitosan and its derivatives, *Adv Drug Deliv Rev.* **62**, 28-41.
142. Bravo-Osuna, I., Millotti, G., Vauthier, C. & Ponchel, G. (2007) In vitro evaluation of calcium binding capacity of chitosan and thiolated chitosan poly(isobutyl cyanoacrylate) core-shell nanoparticles, *Int J Pharm.* **338**, 284-90.
143. Kazami, N., Sakaguchi, M., Mizutani, D., Masuda, T., Wakita, S., Oyama, F., Kawakita, M. & Sugahara, Y. (2015) A simple procedure for preparing chitin oligomers through acetone precipitation after hydrolysis in concentrated hydrochloric acid, *Carbohydr*

Polym. **132**, 304-10.

144. Cabrera, J. C. & Cutsem, P. V. (2005) Preparation of chitooligosaccharides with degree of polymerization higher than 6 by acid or enzymatic degradation of chitosan., *Biochemical Engineering Journal*. **25**, 165-172.
145. Roncal, T., Oviedo, A., Lopez de Armentia, I., Fernandez, L. & Villaran, M. C. (2007) High yield production of monomer-free chitosan oligosaccharides by pepsin catalyzed hydrolysis of a high deacetylation degree chitosan, *Carbohydr Res.* **342**, 2750-6.
146. Vishu Kumar, A. B., Varadaraj, M. C., Gowda, L. R. & Tharanathan, R. N. (2007) Low molecular weight chitosans--preparation with the aid of pronase, characterization and their bactericidal activity towards *Bacillus cereus* and *Escherichia coli*, *Biochim Biophys Acta*. **1770**, 495-505.
147. Kumar, B. A. & Tharanathan, R. N. (2004) A comparative study on depolymerization of chitosan by proteolytic enzymes. , *Carbohydr Polym.* **58**, 275-283.
148. Fu, J. Y., Wu, S. M., Chang, C. T. & Sung, H. Y. (2003) Characterization of three chitosanase isozymes isolated from a commercial crude porcine pepsin preparation, *J Agric Food Chem.* **51**, 1042-8.
149. Kumar, B. A., Varadaraj, M. C. & Tharanathan, R. N. (2007) Low molecular weight chitosan--preparation with the aid of pepsin, characterization, and its bactericidal activity, *Biomacromolecules*. **8**, 566-72.
150. Gohi, B., Zeng, H. Y. & Pan, A. D. (2016) Optimization and Characterization of Chitosan Enzymolysis by Pepsin, *Bioengineering (Basel)*. **3**.
151. Niesen, F. H., Berglund, H. & Vedadi, M. (2007) The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability, *Nat Protoc.* **2**, 2212-21.
152. Sakaguchi, M., Shimodaira, S., Ishida, S. N., Amemiya, M., Honda, S., Sugahara, Y., Oyama, F. & Kawakita, M. (2015) Identification of GH15 family thermophilic archaeal trehalases That function within a narrow acidic-pH range, *Appl Environ Microbiol.* **81**, 4920-31.
153. Tabata, E., Kashimura, A., Uehara, M., Wakita, S., Sakaguchi, M., Sugahara, Y., Yurimoto, T., Sasaki, E., Matoska, V., Bauer, P. O. & Oyama, F. (2019) High expression of acidic chitinase and chitin digestibility in the stomach of common marmoset (*Callithrix jacchus*), an insectivorous nonhuman primate, *Sci Rep.* **9**, 159.
154. Cheba, B. A., Zaghloul, T. I., EL-Mahdy, A. R. & HishamEL-Massry, M. (2015) Affinity purification and immobilization of chitinase from *Bacillus sp.*R2, *Procedia Technology*. **19**, 958-964.
155. Tabata, E., Kashimura, A., Wakita, S., Sakaguchi, M., Sugahara, Y., Imamura, Y.,

- Shimizu, H., Matoska, V., Bauer, P. O. & Oyama, F. (2018) Acidic chitinase-chitin complex is dissociated in a competitive manner by acetic acid: purification of natural enzyme for supplementation purposes, *Int J Mol Sci.* **19**, 362.
156. Tjoelker, L. W., Gosting, L., Frey, S., Hunter, C. L., Trong, H. L., Steiner, B., Brammer, H. & Gray, P. W. (2000) Structural and functional definition of the human chitinase chitin-binding domain, *J Biol Chem.* **275**, 514-20.
157. Onaga, S. & Taira, T. (2008) A new type of plant chitinase containing LysM domains from a fern (*Pteris ryukyuensis*): roles of LysM domains in chitin binding and antifungal activity, *Glycobiology.* **18**, 414-23.
158. Henrissat, B. (1991) A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities, *Biochem J.* **280 (Pt 2)**, 309-16.
159. Cantarel, B. L., Coutinho, P. M., Rancurel, C., Bernard, T., Lombard, V. & Henrissat, B. (2009) The carbohydrate-active enzymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics, *Nucleic Acids Res.* **37**, D233-8.
160. Hsieh, Y. C., Wu, Y. J., Chiang, T. Y., Kuo, C. Y., Shrestha, K. L., Chao, C. F., Huang, Y. C., Chuankhayan, P., Wu, W. G., Li, Y. K. & Chen, C. J. (2010) Crystal structures of *Bacillus cereus* NCTU2 chitinase complexes with chitooligomers reveal novel substrate binding for catalysis: a chitinase without chitin binding and insertion domains, *J Biol Chem.* **285**, 31603-15.
161. Payne, C. M., Baban, J., Horn, S. J., Backe, P. H., Arvai, A. S., Dalhus, B., Bjoras, M., Eijsink, V. G., Sorlie, M., Beckham, G. T. & Vaaje-Kolstad, G. (2012) Hallmarks of processivity in glycoside hydrolases from crystallographic and computational studies of the *Serratia marcescens* chitinases, *J Biol Chem.* **287**, 36322-30.
162. Pattengale, P. K., Stewart, T. A., Leder, A., Sinn, E., Muller, W., Tepler, I., Schmidt, E. & Leder, P. (1989) Animal models of human disease. Pathology and molecular biology of spontaneous neoplasms occurring in transgenic mice carrying and expressing activated cellular oncogenes, *Am J Pathol.* **135**, 39-61.
163. Fukamizo, T., Ohkawa, T., Ikeda, Y. & Goto, S. (1994) Specificity of chitosanase from *Bacillus pumilus*, *Biochim Biophys Acta.* **1205**, 183-8.
164. Sorbotten, A., Horn, S. J., Eijsink, V. G. & Varum, K. M. (2005) Degradation of chitosans with chitinase B from *Serratia marcescens*. Production of chito-oligosaccharides and insight into enzyme processivity, *FEBS J.* **272**, 538-49.
165. Horn, S. J., Sorbotten, A., Synstad, B., Sikorski, P., Sorlie, M., Varum, K. M. & Eijsink, V. G. (2006) Endo/exo mechanism and processivity of family 18 chitinases produced by *Serratia marcescens*, *FEBS J.* **273**, 491-503.
166. Heggset, E. B., Hoell, I. A., Kristoffersen, M., Eijsink, V. G. & Varum, K. M. (2009)

- Degradation of chitosans with chitinase G from *Streptomyces coelicolor* A3(2): production of chito-oligosaccharides and insight into subsite specificities, *Biomacromolecules*. **10**, 892-9.
167. Heggset, E. B., Dybvik, A. I., Hoell, I. A., Norberg, A. L., Sorlie, M., Eijsink, V. G. & Varum, K. M. (2010) Degradation of chitosans with a family 46 chitosanase from *Streptomyces coelicolor* A3(2), *Biomacromolecules*. **11**, 2487-97.
168. Kurita, K., Sannan, T. & Iwakura, Y. (1977) Studies on chitin, 4. Evidence for formation of block and random copolymers of N-acetyl-D-glucosamine and D-glucosamine by hetero- and homogeneous hydrolyses, *Macromol Chem Phys* **178**, 3197-3202.
169. Terbojevich, M., Cosani, A. & Muzzarellib, R. A. A. (1996) Molecular parameters of chitosans depolymerized with the aid of papain., *Carbohydr Polym*. **29**, 63-68.
170. Sashiwa, H., Fujishima, S., Yamano, N., Kawasaki, N., Nakayama, A., Muraki, E., Sukwattanasinitt, M., Pichyangkura, R. & Aib, S.-i. (2003) Enzymatic production of N-acetyl-d-glucosamine from chitin. Degradation study of N-acetylchitooligosaccharide and the effect of mixing of crude enzymes. , *Carbohydr Polym*. **51**, 391-395.
171. Xie, Y., Wei, Y. & Hu, J. (2010) Depolymerization of chitosan with a crude cellulase preparation from *Aspergillus niger*, *Appl Biochem Biotechnol*. **160**, 1074-83.
172. Ohno, M., Miyazaki, M., Kimura, M., Minowa, Y., Sakaguchi, M., Oyama, F. & Yamashita, T. (2020) Characterization of mouse di-N-acetylchitobiase that can degrade chitin-oligosaccharides, *Biosci Biotechnol Biochem*. **84**, 2499-2507.
173. Hsing-Chen Chen, C.-C. C., Wei-Juin Mau, Lin-Shiun Yen (2002) Evaluation of N-acetylchitooligosaccharides as the main carbon sources for the growth of intestinal bacteria, *FEMS Microbiol Lett* **209**, 53-56.
174. Mireia Lopez-Siles, T. M. K., Sylvia H. Duncan, Hermie J. M. Harmsen, L. Jesús Garcia-Gil, and Harry J. Flint (2012) Cultured Representatives of Two Major Phylogroups of Human Colonic *Faecalibacterium prausnitzii* Can Utilize Pectin, Uronic Acids, and Host-Derived Substrates for Growth, *Appl Environ Microbiol*. **78**, 420–428.
175. Almut Heinken, M. T. K., Giuseppe Paglia, Dmitry A. Rodionov, Hermie J. M. Harmsen, Ines Thiele (2014) Functional Metabolic Map of *Faecalibacterium prausnitzii*, a Beneficial Human Gut Microbe, *J Bacteriol*. **196**, 3289-3302.
176. Valerie J Stull, E. F., Rachel S Bergmans, Hallie P Febvre, Colin Longhurst, Daniel K Manter, Jonathan A Patz, Tiffany L Weir (2018) Impact of Edible Cricket Consumption on Gut Microbiota in Healthy Adults, a Double-blind, Randomized Crossover Trial, *Sci Rep*. **8**, 10762.
177. Manninen, T. J., Rinkinen, M. L., Beasley, S. S. & Saris, P. E. (2006) Alteration of the canine small-intestinal lactic acid bacterium microbiota by feeding of potential probiotics, *Appl Environ Microbiol*. **72**, 6539-43.

178. Uyeno, Y., Shigemori, S. & Shimosato, T. (2015) Effect of Probiotics/Prebiotics on Cattle Health and Productivity, *Microbes Environ.* **30**, 126-32.
179. Barad BA, L. L., Diaz RE, Basilio R, Van Dyken SJ, Locksley RM, Fraser JS. (2020) Differences in the chitinolytic activity of mammalian chitinases on soluble and insoluble substrates., *Protein Sci.* **4**, 966-977.

謝辞

本研究は工学院大学 先進工学部 生命化学科で行われました。指導教員である小山文隆教授に多くのご指導とご鞭撻を賜り、心より感謝申し上げます。

本学位論文の副査を担当していただき、適切なご意見ご助言をいただきました今村保忠教授、南雲紳史教授、早稲田大学澤村直哉教授に深く感謝いたします。

実験に関するご指導、ご助言を何度もいただきました菅原康里准教授、坂口政吉准教授に厚く感謝いたします。

本研究を行うにあたり、多くの方々にお世話になりました。岡山大学上田均教授には、ショウジョウバエの取り扱い、実体顕微鏡の操作のご指導を頂きました。工学院大学環境科学科の関志朗准教授には、ショウジョウバエの翅をSEM 観察する実験技法で大変お世話になりました。実験動物中央研究所の佐々木えりか部長、塚本晃海博士には、コモンマーモセットの生体組織の分与、および数多くのご助言を頂きました。また、ジョーンズ・ホプキンス大学の澤明教授、石井一裕博士には、米国での生活のサポートから実験のご指導、また、研究への深い思想を学ぶ機会を与えてくださりました。深く感謝申し上げます。

私が研究室にいる間、共に実験を行い、助けてくださった研究室の皆様に、この場をお借りしてお礼申し上げます。

最後に、5年間に及ぶ修士課程・博士後期課程の研究生活を可能にし、励ましてくれた家族に心から感謝いたします。ありがとうございました。

2021 年 2 月 10 日

田畑 絵理