

論文内容の要旨

氏名：西野 亮

博士の専攻分野の名称：博士（生物資源科学）

論文題目：イカ類におけるキチナーゼの分布・種類および構造に関する研究

キチンは *N*-アセチル-D-グルコサミン (GlcNAc) が β -1,4 グリコシド結合で重合した多糖であり、節足動物の外骨格、イカ類の甲および真菌類の細胞壁などの構成成分として地球上に広く分布し、セルロースに次いで豊富なバイオマスである。

キチンを分解するキチン分解酵素は分解様式の違いによりエンド型およびエキソ型に分類される。前者はキチナーゼ (EC 3.2.1.14) と呼ばれ、キチンの β -1,4 グリコシド結合をランダムに加水分解し、種々の生理機能を示す *N*-アセチルキトオリゴ糖((GlcNAc)_n)を生成する。後者は β -*N*-アセチルヘキソサミニダーゼ(Hex) (EC 3.2.1.52) と呼ばれ、(GlcNAc)_n を非還元末端より分解し、GlcNAc を生成する。キチナーゼは動物、植物、微生物などに広く分布し、消化、成長時の形態形成、攻撃、防御などの重要な生理的役割に関与すると示唆されている。例えば、魚類の胃で発現する酸性魚類キチナーゼは餌料に含まれるキチン質の消化に関与し、哺乳類のマクロファージが産生するキチナーゼは病原体に対する生体防御の役割を持つと考えられている。また、キチナーゼは活性ドメインのアミノ酸配列の相同性および触媒機構に基づいて、糖質加水分解酵素 (GH) ファミリー18 および 19 に分類される。GH ファミリー18 キチナーゼは微生物、動物および植物に広く分布し、GH ファミリー19 キチナーゼは主に植物に分布している。

イカ類は軟体動物門頭足綱十腕形上目に位置し、成長が著しく早く、1年で成体に達する。これに関連して餌料の消化能力も高いことが知られている。また、イカ類はカニやエビなどのキチン質を含む外骨格を有する甲殻類を餌料とし、肝臓で生成した消化酵素を胃に分泌することで餌料を消化する。これらのことより、イカ類では肝臓のキチナーゼが研究対象とされてきた。しかしながら、これまでにコウイカ *Sepia esculenta* 肝臓から 1 種およびスルメイカ *Todarodes pacificus* 肝臓から 2 種のキチナーゼの精製・性状が、スルメイカ肝臓より 1 種の遺伝子配列が、ヤリイカ *Heterololigo bleekeri* 肝臓から EST 解析により 2 種のキチナーゼ遺伝子の存在が報告されているにすぎない。

本研究では、情報の少ないイカ類におけるキチナーゼの分布、種類および構造に関する知見を得るため、コウイカ目のコウイカとツツイカ目のアオリイカ *Sepioteuthis lessoniana* およびヤリイカにおけるキチン分解酵素の体内分布測定と、コウイカ肝臓におけるキチナーゼアイソザイムの分離を実施した。さらに、イカ類肝臓キチナーゼの全長遺伝子の取得、ならびにドメイン構造比較、器官発現解析および系統解析を実施し、魚類および軟体動物のキチナーゼと比較検討した。

1. コウイカ目コウイカにおけるキチナーゼの分布・種類および構造

1-1. キチン分解酵素活性の体内分布および最適 pH

コウイカ体内におけるキチナーゼおよび Hex 活性の測定をするため、コウイカの 8 器官より粗酵素液を調製した。キチナーゼ活性測定には $pNP-(GlcNAc)_n$ ($n=2, 3$) を、Hex 活性測定には $pNP-(GlcNAc)$ を基質として用いた。キチナーゼ活性は、肝臓、後部唾液腺および胃で高い値が検出され、両基質の内、 $pNP-(GlcNAc)_2$ に対する活性が $pNP-(GlcNAc)_3$ より高い傾向が観察された。Hex 活性は鰓および筋肉での値は低いが、その他の 6 器官においては高い値が検出された。 $pNP-(GlcNAc)_n$ ($n=2, 3$) に対する肝臓および後部唾液腺キチナーゼ活性の最適 pH は、いずれも 5.0-6.0 に認められたが、後部唾液腺の方が中性域での活性が高かった。また Hex 活性の最適 pH は、肝臓では 4.0、後部唾液腺では 5.0 に認められた。

1-2. コウイカ肝臓キチナーゼアイソザイムの分離

ツツイカ目のスルメイカ肝臓およびヤリイカ肝臓より、それぞれ 2 種のキチナーゼアイソザイムの存在が報告されている。一方、コウイカ目のコウイカ肝臓より 1 種のキチナーゼ (SeChi, 62 kDa) がすでに当研究室で精製されている。そこで、コウイカ肝臓よりキチナーゼアイソザイムの分離を試みた。コウイカ肝臓より粗酵素液を調製し、硫酸分画後、キチンアフィニティークラムに添加し、キチン吸着タンパク質を 0.1 M 酢酸にて溶出した。SDS-PAGE により、キチン吸着タンパク質画分には 2 種のタンパク質が含まれていることが明らかになり、分子量はそれぞれ 52 kDa (CBP-A) と 62 kDa (CBP-B) と推定された。CBP-B の分子量 62 kDa は以前精製された SeChi の分子量と一致していた。そこで 52 kDa の CBP-A の分離を目的として、この画分を陰イオン交換および疎水性カラムクロマトグラフィーを用いてさらなる分離を試みた。その結果、SDS-PAGE において SeChi に相当する 62 kDa のタンパク質は検出されが、CBP-A と一致する 52 kDa のタンパク質は検出されなかった。そのため CBP-A は不安定な酵素である可能性が示唆された。

1-3. コウイカ肝臓キチナーゼの cDNA クローニングおよび系統解析

コウイカ肝臓より total RNA を抽出し、RT-PCR 法ならびに 5' および 3' RACE 法を用いてキチナーゼ遺伝子を増幅した。さらに校正活性を持つ酵素を用いて全長塩基配列を増幅、決定した。

コウイカ肝臓より 2 種のキチナーゼ遺伝子 (SeChi-1 および SeChi-2) を得た。SeChi-1 は 459 のアミノ酸をコードする 1,377 bp の ORF を含む全長 1,484 bp であり、SeChi-2 は 552 のアミノ酸をコードする 1,656 bp の ORF を含む全長 1,748 bp であった。SeChi-1 および SeChi-2 の演繹アミノ酸配列 (SeChi-1, SeChi-2) は N 末端側よりシグナルペプチド、GH 18 触媒ドメイン、SeChi-1 は 1 つのキチン結合ドメイン (CBD)、SeChi-2 は 2 つの CBD で構成されていた。SeChi-1 および SeChi-2 の推定分子量はそれぞれ 51.2 kDa および 61.0 kDa であり、推定等電点はそれぞれ 8.87 および 8.79 であった。魚類胃キチナーゼアイソザイムは、いずれも 1 つの CBD を有するのに対し、コウイカ肝臓には、CBD の数が異なる 2 種のキチナーゼアイソザイムが存在することが明

らかとなった。系統解析の結果、**SeChi-2** は既報のイカ類キチナーゼとグループを形成したが、**SeChi-1** はいずれの軟体動物キチナーゼともグループを形成しなかった。

1-4. コウイカ肝臓キチナーゼアイソザイムのアミノ酸配列解析

コウイカ肝臓より得られた **CBP-A** および **CBP-B** をトリプシン処理によりペプチド断片化し、プロテオーム解析により **SeChi-1** および **SeChi-2** のアミノ酸配列と比較した。**CBP-A** のペプチド断片から得られた配列は **SeChi-1** のアミノ酸配列と 125 残基一致した。**CBP-B** のペプチド断片から得られた配列は **SeChi-2** のアミノ酸配列と 116 残基一致した。これらの結果より、**SeChi-1** および **SeChi-2** はそれぞれ **CBP-A** および **CBP-B** に相当することが明らかとなった。

1-5. 2種のキチナーゼアイソザイムの器官発現解析

コウイカの 8 器官より total RNA を抽出し、cDNA を合成した。それらと *SeChi-1* および *SeChi-2* の特異的プライマーを用いて 8 器官における発現量を半定量 PCR により解析した。その結果、*SeChi-1* および *SeChi-2* いずれの遺伝子も肝臓でのみ発現していた。この結果より、両キチナーゼは摂取した餌料のキチン質を消化する役割を果たしていると考えられた。一方、体内分布で高い値のキチナーゼ活性が検出された後部唾液腺では、*SeChi-1* および *SeChi-2* どちらの遺伝子も発現が検出されなかった。この結果より、コウイカ後部唾液腺にはさらなるキチナーゼアイソザイムの存在が示唆された。

2. ツツイカ目アオリイカにおけるキチナーゼの分布・種類および構造

2-1. キチン分解酵素活性の体内分布および最適 pH

アオリイカ体内におけるキチナーゼおよび Hex 活性を、コウイカと同様の手法で測定した。コウイカでは、肝臓、後部唾液腺および胃でキチナーゼ活性が高かったのに対し、アオリイカでは、キチナーゼおよび Hex 活性は肝臓においてのみ高い値が検出された。一方、コウイカと同様に $pNP-(GlcNAc)_2$ に対する活性が $pNP-(GlcNAc)_3$ より高い傾向が観察されたが、後部唾液腺でのみ $pNP-(GlcNAc)_3$ に対する活性が $pNP-(GlcNAc)_2$ より高かった。 $pNP-(GlcNAc)_n$ ($n=2, 3$) に対する肝臓および後部唾液腺キチナーゼ活性の至適 pH は、それぞれ 5.0 と 4.0 に認められ、コウイカとは異なり肝臓の方が中性域で高い活性を示した。また、Hex 活性の至適 pH は、それぞれ 5.0 と 4.0 に認められ、後部唾液腺の Hex の方がより酸性域で作用した。

2-2. アオリイカ肝臓キチナーゼの cDNA クローニングおよび系統解析

アオリイカ肝臓より total RNA を抽出し、RT-PCR 法ならびに 5'および 3'RACE 法を用いてキチナーゼ遺伝子を増幅し、解析した。

アオリイカ肝臓より 2 種のキチナーゼ遺伝子(*SIChi-1* および *SIChi-2*)を得た。*SIChi-1* は 237 のアミノ酸をコードする部分配列であり、*SeChi-1* と 67%の一致を示した。現在、上流および下流域の増幅を試みている。全長遺伝子の得られた *SIChi-2* は 552 のアミノ酸をコードする 1,656 bp

の ORF を含む全長 1,744 bp であった。*SlChi-2* の演繹アミノ酸配列(*SlChi-2*)は N 末端側よりシグナルペプチド、GH 18 触媒ドメイン、2つの CBD で構成されていた。*SlChi-2* の推定分子量および推定等電点は、それぞれ 60.9 kDa と 8.60 であった。また系統解析の結果、*SlChi-1* は *SeChi-1* と、*SlChi-2* は *SeChi-2* とグループを形成することが明らかとなった。

3. ツツイカ目ヤリイカにおけるキチナーゼの分布・種類および構造

3-1. キチン分解酵素活性の体内分布

ヤリイカ体内におけるキチナーゼおよび Hex 活性を、コウイカと同様の手法で測定を実施した。キチナーゼおよび Hex 活性は、アオリイカと同様に肝臓においてのみ高い値が検出された。先の 2 種と同様に *pNP*-(GlcNAc)₂ に対する活性が *pNP*-(GlcNAc)₃ より高い傾向が観察された。

3-2. ヤリイカ肝臓キチナーゼの cDNA クローニングおよび系統解析

ヤリイカ肝臓より total RNA を抽出し、RT-PCR 法ならびに 5'および 3'RACE 法を用いてキチナーゼ遺伝子を増幅し、解析した。

ヤリイカ肝臓より 2 種のキチナーゼ遺伝子(*HbChi-1* および *HbChi-2*)を得た。全長遺伝子の得られた *HbChi-1* は 459 のアミノ酸をコードする 1,377 bp の ORF を含む全長 1,622 bp であった。一方、*HbChi-2* は終止コドンを含む 420 のアミノ酸をコードする部分配列であり、*SeChi-2* と 86% の一致を示した。*HbChi-1* の演繹アミノ酸配列(*HbChi-1*)は N 末端側よりシグナルペプチド、GH18 触媒ドメイン、1つの CBD で構成されていた。*HbChi-1* の推定分子量および推定等電点は、それぞれ 50.9 kDa と 5.95 であった。また、系統解析の結果、*HbChi-1* は *SeChi-1* と *HbChi-2* は *SeChi-2* とそれぞれグループを形成することが明らかとなった。

4. 総括

本研究より、コウイカ目のコウイカは肝臓を含め体内に広く、ツツイカ目のアオリイカおよびヤリイカは肝臓のみに高いキチナーゼ活性を有していることが明らかとなった。これより、イカ類の肝臓におけるキチナーゼの主要な役割は餌料の消化と考えられた。また、コウイカは肝臓に CBD が 1つと 2つの 2 種のドメイン構造のキチナーゼアイソザイムを有しており、これは CBD が 1つのドメイン構造のキチナーゼしか有していない魚類胃との明確な差異であった。さらに、系統解析より、CBD が 2つの *SeChi-2* は既報のイカ類キチナーゼとグループを形成したが、CBD が 1つの *SeChi-1* は既報の軟体動物キチナーゼのいずれともグループを形成しない新規のキチナーゼであることが明らかとなった。コウイカにおける器官発現解析より、*SeChi-1* および *SeChi-2* は肝臓のみで発現していることが判明した。ツツイカ目のアオリイカ肝臓およびヤリイカ肝臓においても、コウイカ肝臓と同様に 2 種のドメイン構造を有するキチナーゼアイソザイムが存在する可能性が示唆された。