



# 不活性化酵素, 偽遺伝子からの活性化酵素の作成

## —酸性キチナーゼの構造, 活性と進化—

### 1. 研究の目的

キチンは、N1-アセチル-D-グルコサミン (GlcNAc) の重合体で、昆虫、カニなどの甲殻類、真菌類などの多様な生物 (これらをキチン含有生物と呼ぶ) の主要な構成成分である。これらキチン含有生物は広く生息するので、キチンは、セルロースの次に豊富に存在するバイオマスである。

昆虫は、良質なタンパク質、脂質、糖質、そして様々なミネラルに富むので、高栄養価である。そのため、世界的に「昆虫の飼料化」が注目されてきた。しかし、昆虫の主要な構成成分のキチンが、動物体内で、難消化性の食物繊維である、と長い間考えられてきたことにより、キチン含有生物を家畜飼料として利用する試みは進んでいない。

ヒトとマウスは内在性のキチンを持たないが、キチンを加水分解する酸性キチナーゼ (acidic chitinase, Chia; 別名称 acidic mammalian chitinase, AMCCase) を発現している。

最近、申請者らは、マウス、ニワトリ、ブタ、マーモセット (雑食性動物) の胃で、Chia タンパク質が多量に発現し、胃や腸の条件下で、プロテアーゼ耐性の主要な糖質分解酵素として機能し、キチンを、炭素、窒素そしてエネルギー源である (GlcNAc)<sub>2</sub> へと分解することを報告した (Ohno et al., 2016; Tabata et al., 2017, 2019)。

これに対し、イヌ、ウシなどの肉食性と草食性動物の Chia は、雑食性動物と比べ、キチンの分解能力がとて低かった (Tabata et al., 2018)。さらに、肉食性動物のネコ、トラ、ピューマでは Chia 遺伝子は偽遺伝子化していた (Tabata et al., 未発表データ)。

これまでの研究で提示された問題点は以下の 2 点である。

- (1) ①イヌ (肉食性)、②ウシ (草食性動物) の Chia のキチナーゼ活性は、なぜ低いのか?
- (2) Chia の偽遺伝子化の意義はなにか?

申請者らの研究で提示された問題は、「肉食性と草食性動物における Chia の不活性化と偽遺伝子化」である。本研究では、肉食性と草食性動物の不活性化メカニズムの解明と偽遺伝子からの活性化 Chia を作製することを目指す。そして、Chia の不活性化、偽遺伝子化のメカニズムおよび進化的意義を解明する。以下の 2項目 を研究する。

- (1) キチナーゼ活性の低い ①イヌ (肉食性動物) あるいは ②ウシ (草食性動物) の Chia の活性化を行い、不活性化に関わる原因を明らかにする。
- (2) 活性の高い Chia の遺伝情報を参考に、偽遺伝子から活性化キチナーゼを作製し、偽遺伝子化に至る Chia の構造変化を明らかにする。

### 2. 研究の計画

- (1) マウス (雑食性)、イヌ (肉食性)、ウシ (草食性動物) の Chia の一次構造は、同一性が 79-80%で、良く似ている。しかし、ウシ、イヌ Chia のキチナーゼ活性は、マウスより低く、不活性化している。そこで、活性の高いマウス Chia と活性の低い ①イヌ あるいは ②ウシ Chia 間でキメラ体を作製し、酵素活性低下に関わる領域を絞る。次に、アミノ酸置換体を導入することで活性低下に関わる原因アミノ酸を同定する。そして、肉食性動物、草食性動物全体で、Chia 遺伝子におけるそのアミノ酸の保存性を検討する。
- (2) 活性が高い動物種の Chia の遺伝情報を参考に、肉食性動物のネコ、トラ、ピューマの Chia 偽遺伝子から活性化 Chia 酵素の作成を試みる。

### 3. 研究の成果

- (1) キチナーゼ活性の低い ①イヌ (肉食性動物) あるいは ②ウシ (草食性動物) の Chia の活性化を行い、不活性化に関わる原因を明らかにする

①-1 肉食性動物のイヌ Chia は 2 アミノ酸置換で不活性化していた

マウスとイヌ Chia でキメラ体を作製し、さらに 40 種類以上の変異体を作製し、キチナーゼ活性との関係を調べた。特定の 2 アミノ酸をイヌとマウス Chia 間で置換した結果、イヌ Chia は活性化し、マウス Chia は失活した。イヌ Chia の不活性化の原因は、2 アミノ酸置換であった (図 1)。

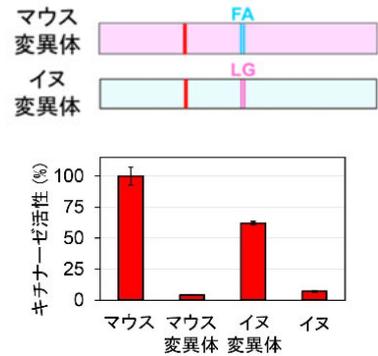


図 1. マウスとイヌの 2 アミノ酸置換のキチナーゼ活性. (上) 変異体の模式図 (右) 縦軸は、マウス Chia の活性を 100% とした、相対活性レベル

①-2 イヌ科以外の肉食性動物の Chia は偽遺伝子化していた

2 アミノ酸置換の進化的意義を解明するため、主に肉食性動物が属している、食肉目 40 種の動物の Chia 遺伝子を塩基配列レベルで解析した。驚いたことに、イヌで同定した 2 アミノ酸は、イヌ科でのみ特異的に保存され、他の大多数の肉食性動物の Chia は偽遺伝子化していた (機能喪失型 Chia)。

①-3 イヌに近種の昆虫を食餌とする動物の Chia は活性型だった

イヌ科以外の食肉目動物で、完全長 Chia を保持していたのは、現代でも昆虫を食餌とするミーアキャットとスカンクのみであった。さらに、ミーアキャット、スカンク Chia は、イヌよりも高いキチナーゼ活性を発現した (図 2)。

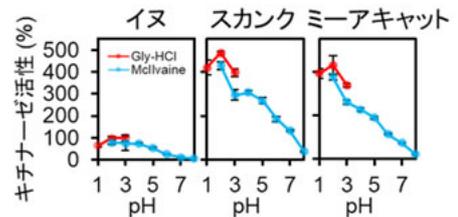


図 2. スカンク、ミーアキャット Chia のキチナーゼ活性はイヌより高かった. 縦軸はイヌ Chia の最大活性を 100% とした相対活性

(2) 活性化 Chia の遺伝情報を参考に、Chia の偽遺伝子からキチナーゼを設計し、活性化酵素の作成を試みる

ネコ Chia 偽遺伝子の活性化を試みた。ネコ Chia 偽遺伝子は、タンパク質の読み枠の回復では活性化しなかった (Cre-ネコ Chia、図 3)。さらに、Cys 残基を修正したが活性化しなかった (Cys-ネコ Chia、図 3)。以上の結果から、Chia は、多数の変異の蓄積によって機能喪失していることがわかった。

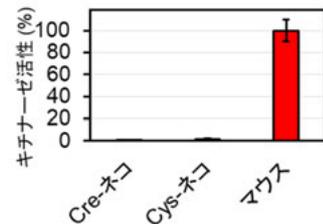


図 3. ネコ Chia 偽遺伝子のキチナーゼ活性測定. 縦軸は、マウス Chia の活性 100% とした相対活性

4. 研究の反省・考察

(1)-①について:

太古のほ乳類祖先は、小型で食虫性であったが、恐竜の絶滅後、ほ乳類の食性は多様化したと考えられている(図 4 左)(O'Leary et al., Science 339, 662-667, 2013)。

- 肉食性動物のイヌ Chia は 2 アミノ酸置換で不活性化していた (不活性化型 Chia)。そのマウス Chia のアミノ酸に置換すると活性化することを明らかにした (図 1、図 4 右上)。
- イヌで同定した 2 アミノ酸は、イヌ科でのみ特異的に保存され、他の大多数の肉食性動物の Chia は偽遺伝子化 (機能喪失型 Chia) していた (図 4 右中)。
- 現代でも昆虫を食餌とするミーアキャットとスカンクの Chia は、イヌよりも高いキチナーゼ活性を発現した (活性型 Chia)(図 2、図 4 右下)。

不活性化 Chia の活性化によって、肉食動物が非食虫性食餌に適応したことによる Chia の構造と活性変化を明らかにした (図 4)。

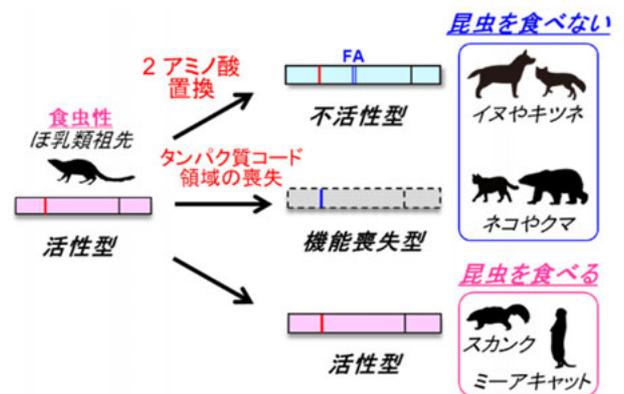


図 4. 食肉目動物における Chia 遺伝子の進化過程の概念図

2021 年度は、②ウシについて、イヌと同様の手法で研究を進める。

**(2)について**：偽遺伝子から作製したネコ Chia の活性化を試みた。ネコ Chia では、保存されている Cys の位置が変化し、数が増加していた。そこで、Cys の数と位置を修正し、上記のように大腸菌で発現した (Cys-Chia とよぶ)。しかし、Cys-ネコ Chia は、活性が認められなかった (図 3)。これらの結果から、ネコ Chia の偽遺伝子は、遺伝子全体に不活性化の原因が存在すると考えられた。今後、活性の高かったミーアキヤットとのキメラ体および変異体を作製し、ネコ Chia の活性化を試みる。

2021 年度は、引き続き、ネコ Chia 偽遺伝子の活性化を目指す。

## 5. 研究発表

### (1) 学会誌等

- ① Kimura, M., Watanabe, T., Sekine, K., Ishizuka, H., Ikejiri, A., **Sakaguchi, M.**, Kamaya, M., Yamanaka, D., Matoska, V., Bauer, P. O. and **Oyama, F.** (2020) Comparative functional analysis between human and mouse chitotriosidase: Substitution at amino acid 218 modulates the chitinolytic and transglycosylation activity, *Int J Biol Macromol.* **164**, 2895-2902.
- ② Kimura, M., Umeyama, T., Wakita, S., Okawa, K., **Sakaguchi, M.**, Matoska, V., Bauer, P. O. and **Oyama, F.** (2020) Quantification of chitooligosaccharides by FACE method: determination of combinatory effects of mouse chitinases, *MethodsX.* **7**, 100881.

### (2) 口頭発表

なし

### (3) 出版物

なし