

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、*N*-アセチル-D-グルコサミン (GlcNAc) の重合体で、カニなどの甲殻類、昆虫、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。このため、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。

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, AMCase)** を発現している。

最近、研究代表者らは、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)₂ へと分解することを報告した [Ohno et al., (2016) *Sci Rep.* 6, 37756; Tabata et al., (2017) *Sci Rep.* 7, 6662; Tabata et al., (2017) *Sci Rep.* 7, 12963]。

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) *Sci Rep.* 8, 1461]。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) イヌ (肉食性)、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) 肉食性動物のネコ科で見つかった Chia の偽遺伝子化の意義はなにか?

研究代表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。

本研究は、肉食性と草食性動物の不活性化 Chia と偽遺伝子から活性化 Chia を作製する。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) 活性の高いマウス Chia の遺伝子情報を参考に、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) 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 イヌ: 2019、2020 年度の研究結果で学術論文を投稿し、Editor と Reviewers の全てのコメントに応えるべく追加実験と論文修正をし、受理されることを目指した。

② ウシ: 草食性動物で、活性の低いウシ Chia の活性化を行い、不活性化に関わる原因を明らかにした。2019、2020 年度に行ったイヌ Chia の活性化の研究計画と同様に、ウシとマウス Chia キメラタンパク質の作成と解析を行った。マウス vs. ウシ Chia のキメラタンパク質を 6 種作製し、ウシ Chia の活性化を試みた。そして、ウシ Chia の不活性化に関わるアミノ酸を同定することを試みた。

- (2) 活性の高いマウス Chia の遺伝子情報を参考に、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

2020 年度の研究で、肉食性動物のネコ Chia 偽遺伝子から変異 Chia を大腸菌で発現できた。しかし、その活性は、認められなかった。2021 年度は、肉食性動物で、アミノ酸配列がよく似ていて、キチナーゼ活性が高いミーアキャット Chia のアミノ酸配列と比較し、その活性化を試みる。

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イヌを含めた肉食性動物における Chia の分子進化の解明：キチン分解能の低いイヌ Chia および肉食性動物全体に焦点を当て、なぜその機能が失われたのかについて論文をまとめた。Molecular Biology and Evolution 誌で、Editor と Reviewers から 28 ものコメントをもらい、追加実験も行い、新規データも加え、すべてに答え、論文をブラッシュアップした。その結果、生化学、分子生物学的な結果に加え、分子進化学の観点からイヌ Chia の不活性化の原因を明らかにし、受理された (Tabata et al., *Mol Biol Evol.* 39, msab331, 2022)。

②ウシにおける Chia の不活性化について：雑食性動物であるマウスの Chia は強力なキチナーゼ活性を有するのに対し、草食性動物のウシ Chia のキチナーゼ活性はマウス Chia の約 1/10 程度である。イヌの場合と同様に、マウスとウシの Chia cDNA を組換えてキメラ体を構築し(図 1 上)、ウシ Chia が不活性化した原因領域を特定した。6 種類のキメラタンパク質の中で、N 末領域 (exons 3-5) をマウス Chia と置換したウシキメラ体は活性が上昇し、逆に、ウシ Chia の同じ領域で置換したマウスキメラ体は活性が低下した(図 1 下)。以上のことから、ウシの exons 3-5 がコードする領域に活性低下の原因が存在することが示唆された(図 2)。次に、N 末領域をさらに細分化したキメラ体を作製し、上記と同様に解析を行なった。その結果、マウスの exons 3-4 及び exon 3 領域を導入したウシ Chia キメラ体は、活性の上昇が認められなかった(図 3)。このことから、ウシ Chia の活性低下の原因は、exon 5 がコードする領域に存在することが分かった。さらに、アミノ酸の絞り込みを行った結果、3 アミノ酸まで狭めることができた。

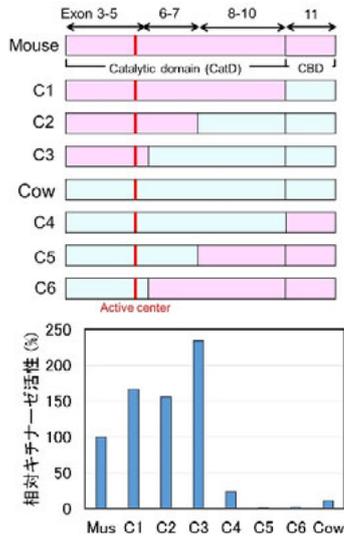


図 1. マウスとウシ Chia 間でのキメラ体の作製 (上)とそのキチナーゼ活性測定結果 (下)。

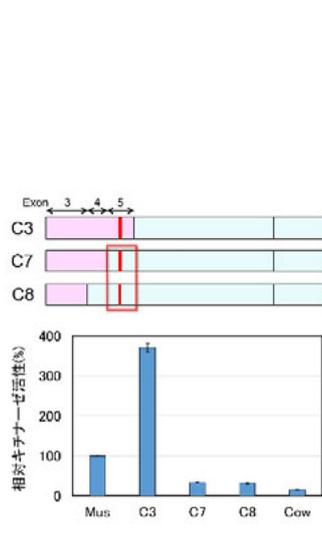


図 2. ウシ Chia の不活性化の原因領域の絞り込みのキメラ (上)とそのキチナーゼ活性測定結果 (下)。

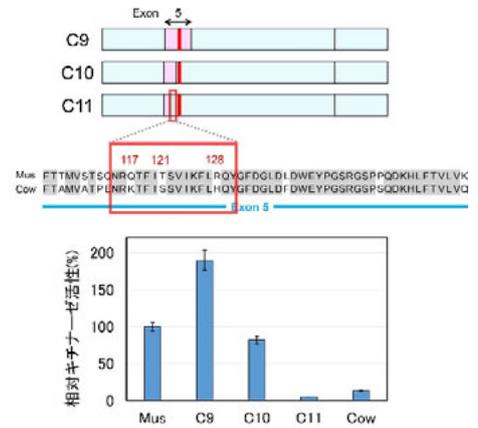


図 3. ウシ Chia exon 5 の不活性化の原因領域の絞り込みのキメラ (上)と候補のアミノ酸のアライメント (中)とそのキチナーゼ活性測定結果 (下)。

(2) 活性の高いマウス、ミーアキャット Chia の遺伝子情報を参考に、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

肉食性動物のネコの Chia 遺伝子は偽遺伝子化していた。本研究ではネコ Chia の偽遺伝子から活性化酵素を作製し、この分子が、酵素活性を失うように進化した道筋とその意義を解明することを目的とした。まず、活性の高いマウス Chia の遺伝情報を参考に、肉食性動物のネコ Chia 偽遺伝子から活性を有するネコ Chia (Cre-Cat Chia) を作製した。しかし、Cre-Cat Chia には活性が認められなかった(図 4 左)。次に、Chia 分子の Cys 残基の保存性に注目し、Cys を修正した変異体 (Cys-Cat Chia) を作製したが、不活性のままだった(図 4 中)。この結果は、ジスルフィド結合を含む Cys 残基だけでなく、タンパク質の構造と機能に関与するいくつかのアミノ酸置換が存在することを示唆していた。そこで、

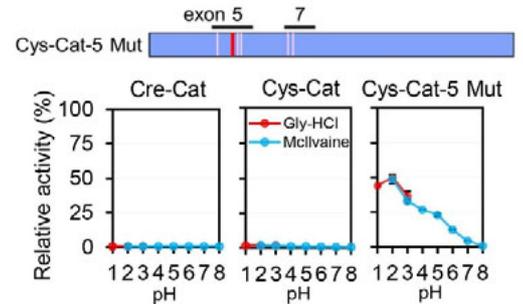


図 4. Exon 5 と 7 に存在する 5 アミノ酸置換の導入 (上)とそのキチナーゼ活性測定結果 (下)。Cys-Cat-5 Mu は活性化した。

キチナーゼ活性が強いミーアキャット Chia との間でキメラ体を作製し、Cys-Cat Chia のキチン分解活性の喪失の原因となる領域を特定した。ミーアキャットの exon 5 と 7 領域がネコ Chia を活性化させ、さらに 5 つのアミノ酸置を導入した Cys-Cat-5 Mu は活性化した (図 4 右)。以上の結果は、ネコ Chia 偽遺伝子は、ORF 破壊後に、タンパク質の構造と機能に関与するアミノ酸に変異が導入され、偽遺伝子化した可能性を強く示唆した (図 5)。

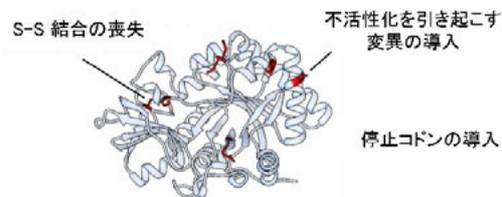


図 5. ネコ Chia 偽遺伝子は、ORF 破壊、タンパク質の構造と機能に関与するアミノ酸に変異が導入され、偽遺伝子化した可能性が高い。

4. 研究の反省・考察

(1) イヌ (肉食性)、ウシ (草食性動物) の Chia のキチナーゼ活性は、なぜ低いのか？

① イヌを含めた肉食性動物における Chia の分子進化の解明

イヌを研究対象にした 3 年間の研究で、肉食性動物全般について、食性と Chia 遺伝子の関係を明確にでき、High-Impact Journal に学術論文として報告できた (Tabata et al., *Mol Biol Evol.* 39, msab331, 2022)。

② ウシにおける Chia の不活性化について

ここまでの研究で、ウシ Chia の活性低下の原因は、exon 5 がコードする領域に存在することがわかり、さらに、アミノ酸の絞り込みを行った結果、3 アミノ酸まで狭めることができた。今後、(1)-①のイヌと同様のアプローチで原因アミノ酸を絞り込み、草食性動物における食性と Chia 遺伝子の関係を明確にする予定である。

(2) 活性の高いマウス Chia の遺伝子情報を参考に、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。

この項目の研究内容は、前述の論文 (Tabata et al., *Mol Biol Evol.* 39, msab331, 2022) で報告することができた。

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、現在、世界的に「昆虫の飼料化」が注目されている。しかし、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。これは、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る。

肉食性動物における昆虫の分解に関わる Chia の活性化は、動物に昆虫を投与するための契機となり得る。3年間の研究では、ウシをはじめとする草食性動物の Chia の不活性化原因の解明まではたどり着けなかったが、イヌで確立した実験手法で、今後さらに実験を行い、ウシをはじめとした草食性動物でも同様のレベルの解明を進め、論文をまとめたい。その結果、昆虫の家畜飼料化に道筋をつけることができると考えられる。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Tabata, E., Itoigawa, A., Koinuma, T., Tayama, H., Kashimura, A., **Sakaguchi, M.**, Matoska, V., Bauer, P.O., **Oyama, F.** (2022) Noninsect-Based Diet Leads to Structural and Functional Changes of Acidic Chitinase in Carnivora, *Mol Biol Evol.* 39, msab331. [Impact factor 16.240]
- ② Uehara, M., Takasaki, C., Wakita, S., Sugahara, Y., Tabata, E., Matoska, V., Bauer, P.O. and **Oyama, F.** (2022) Crab-eating monkey acidic chitinase (CHIA) efficiently degrades chitin and chitosan under acidic and high-temperature conditions. *Molecules* 27. 409. [Impact factor 4.412]
- ③ Wakita, S., Sugahara, Y., Nakamura, M., Kobayashi, S., Matsuda, K., Takasaki, C., Kimura, M., Kida, Y., Uehara, M., Tabata, E., Hiraoka, K., Seki, S., Matoska, V., Bauer, P. O. and **Oyama, F.** (2021) Mouse acidic chitinase effectively degrades random-type chitosan to chitoooligosaccharides of variable lengths under stomach and lung tissue pH conditions. *Molecules* 26. 6706. [Impact factor 4.412]
- ④ Uehara, M., Tabata, E., Okuda, M., Maruyama, Y., Matoska, V., Bauer, P. O. and **Oyama, F.**

(2021) Robust chitinolytic activity of crab-eating monkey (*Macaca fascicularis*) acidic chitinase under a broad pH and temperature range, *Sci Rep.* **11.** 15470. [Impact Factor 4.379]

(2) 口頭発表

- ① 田畑 絵理、鯉沼 拓海、田山 拓史、樫村 明德、坂口 政吉、小山 文隆、日本農芸化学会 **2022 年度大会**、口頭発表、2022年3月17日、非昆虫ベースの食餌は、肉食性動物の酸性キチナーゼの構造と機能を変化させる
- ② 小山文隆、鯉沼拓海、田山拓史、樫村昭徳、坂口政吉、田畑絵理、日本農芸化学会 **2022 年度大会**、口頭発表、2022年3月17日、ネコ酸性キチナーゼ偽遺伝子の活性化
- ③ 小山文隆、鯉沼拓海、田山拓史、樫村昭徳、坂口政吉、田畑絵理、**第 35 回日本キチン・キトサン学会大会**、口頭発表、2021年8月26日、キメラ体を利用したイヌの酸性キチナーゼの活性化
- ④ 田畑絵理、鯉沼拓海、田山拓史、樫村昭徳、坂口政吉、小山文隆、**第 35 回日本キチン・キトサン学会大会**、口頭発表、2021年8月26日、食肉目動物の食性と酸性キチナーゼの機能に関する研究

(3) 出版物

なし