

内受21-37

早稲田大学大学院理工学研究科

博士論文概要

論文題目

両生類消化器官に存在する
キチン分解酵素に関する研究

(Biochemical and molecular biological studies
of amphibian chitinases)

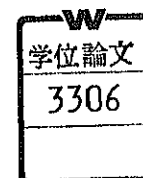
申請者

大島 裕之

Hiroyuki Oshima

物理学及应用物理学専攻 内分泌学研究

2001 年 12 月



理 2677 (3306)

ヒキガエル下垂体原基を抗原としてモノクローナル抗体を作製したところ、得られた抗体の一つは下垂体だけでなく嗅覚系、膵臓とも反応した。そこでヒキガエル成体膵臓よりこの抗体の抗原分子を単離したところ、その N 末端側のアミノ酸配列がキチナーゼファミリータンパク質のそれと高い相同性を示した。

キチンは N-アセチル-D-グルコサミンのポリマーであり、節足動物、軟体動物の外骨格、外肛動物、線形動物の外皮、および菌類、藻類等下等植物の細胞壁の構成成分として自然界ではセルロースに次ぎ多く存在する構造多糖類である。キチンを加水分解するキチナーゼは、1911年にランの球根から発見されて以来、生物の防御、攻撃、消化、脱皮等の役割を担う酵素として動植物を問わず数多くの生物でその存在が報告されてきた。またその精製、アミノ酸一次構造の決定および cDNA クローニングもなされてきた。脊椎動物においては血清および膵臓や胃についてキチナーゼ活性の存在が報告されて以来、その活性の有無を問わず、構造的に類似したキチナーゼ様タンパク質の存在が報告されている。下等脊椎動物の両生類はキチン質で覆われた節足動物を日常的に捕食することから膵臓や胃におけるキチナーゼの存在が推定されていたにもかかわらず、両生類におけるキチナーゼ分子の単離同定はなされずに現在に至った。また、脊椎動物全体においても膵臓由来のキチナーゼの同定はこれまでなされておらず、本研究で精製したキチナーゼ活性を有するタンパク質が初の脊椎動物膵臓キチナーゼと考えられる。更に申請者は同種の動物の胃に膵臓キチナーゼとは異なるキチナーゼの存在を示した。

第 1 章では、脊椎動物のキチナーゼに関するこれまでの研究について概説している。さらに本研究を発足させるきっかけとなった研究の経緯と本研究の目的についても述べている。すなわち、両生類が節足動物などのキチン質で覆われた小動物を捕食するという現象について着目し、キチナーゼの存在を証明しその単離、生物活性、および遺伝子発現について明らかにすることである。

第 2 章では、無尾両生類であるヒキガエル (*Bufo japonicus*) の膵臓由来キチナーゼの精製とその性質について述べている。カニ甲羅由来のキチン粉末を基質としてキチナーゼ活性を測定し、活性画分を分取した。その結果、ヒキガエル成体膵臓の抽出物を出発材料として、硫酸塩析、ゲル濾過クロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィー、FPLC システムによるゲル濾過クロマトグラフィーにより、高度に精製されたキチナーゼ活性を持つ画分を得ることができた。このタンパク質は天然のキチンを分解したことから消化酵素として働い

ていると考えられる。この酵素の至適 pH を検討した結果、pH 6 付近で最も活性が高く、強酸性条件では活性がほとんどなかった。電気泳動により、本酵素の分子量は約 60 kDa であることが分かった。精製品を逆相 HPLC にかけたところ、先に述べたモノクローナル抗体の抗原分子と溶出時間が一致し、さらに N 末端側のアミノ酸配列もまた抗原分子のそれと完全に一致した。さらに精製品を臭化シアンにより限定分解し、生じた反応物の内二つの断片についてもアミノ酸配列情報を得ることができた。

第 3 章では、膵臓より単離、精製したキチナーゼの cDNA クローニングについて述べている。前章で述べたアミノ酸部分配列情報を元に、縮重した配列の混合プライマーを作製し、ヒキガエル膵臓組織を用いて RT-PCR を行った。得られた PCR 産物からプローブを作製し、ヒキガエル膵臓 cDNA ライブラリーのスクリーニングを行った。その結果 1561 bp の前章で得られた膵臓由来キチナーゼのアミノ酸配列情報を完全に含む cDNA を得た。この cDNA の翻訳産物は 18 個のシグナルペプチドを含む 488 個のアミノ酸からなることが分かった。またキチナーゼ活性の発現およびキチン結合に必要なアミノ酸配列が完全に保存されていた。現在までに知られている脊椎動物のキチナーゼとしてはヒトのマクロファージから Chitotriosidase が、ヒトとマウスの胃から Acidic Mammalian Chitinase (AMCase) が、ウシの肝細胞から Chitin Binding Protein 04 (CBP04) が同定されているが、この遺伝子産物はこれらのタンパク質とアミノ酸配列で約 50% の相同性を持つことが分かった。またノザン解析によりこのキチナーゼ mRNA は膵臓にのみ発現することを確認した。そこで申請者はこの酵素を toad Pancreatic Chitinase (tPCase) と命名した。tPCase は両生類で同定された初めてのキチナーゼであるばかりでなく、脊椎動物で同定された初めての膵臓由来のキチナーゼである。

第 4 章ではヒキガエル胃由来キチナーゼの同定について述べている。胃抽出物のキチナーゼ活性の pH 依存性を検討した結果、膵臓抽出物および tPCase の至適 pH が 6.0 であるのに対し、pH 3.0 に至適 pH が存在することが分かった。また tPCase は膵臓特異的に発現することから、胃にはその環境に適した tPCase とは別のキチナーゼ分子が存在することが予想された。そこで現在知られている脊椎動物のキチナーゼにおいて保存性の高い部分からプライマーを設計し、ヒキガエル胃 cDNA を鋳型とした RT-PCR を行った結果、tPCase と異なる配列の PCR 産物を得た。得られた PCR 産物からプローブを作製し、ヒキガエル胃 cDNA ライブラリーのスクリーニングを行った結果、

1541 bp の胃キチナーゼと思われる cDNA を得た。この cDNA の翻訳産物は 484 個のアミノ酸からなり、先に述べた AMCCase とアミノ酸配列で約 75% の相同性を持つことが分かった。また tPCase および現在知られている脊椎動物のキチナーゼ同様にキチナーゼ活性中心およびキチン結合部位のアミノ酸配列が完全に保存されており、今回ヒキガエル胃より同定した cDNA の産物が胃キチナーゼの有力な候補として考えられる。さらにノザン解析によりこの mRNA は胃にのみ発現することを確認した。以上の結果から胃と膵臓にそれぞれの器官に特異的なキチナーゼ分子が存在することを確認することができた。

第 5 章では、本研究の要約と今後の展望について述べている。両生類が節足動物などのキチン質で覆われた小動物を捕食するという現象について着目し、ヒキガエル膵臓よりキチナーゼ分子を単離、同定し、その性質を明らかにした。これは脊椎動物膵臓より単離同定された初めてのキチナーゼである。また組織を問わず両生類においては初めて同定されたキチナーゼ分子である。また胃の抽出物のキチナーゼ活性は膵臓のそれとは異なることを明らかとし、その分子の候補として、胃からも膵臓とは異なるキチナーゼと思われる cDNA をクローニングすることができた。ヒキガエルは捕食した小動物のキチンをこれらの酵素によって消化している可能性が高い。今後の課題としては、ヒキガエル胃よりキチナーゼ分子を単離し、今回得られた cDNA より推定される分子との相同性を確認すること、免疫電顕により今回同定したキチナーゼ分子が実際に外分泌顆粒に存在することを確認することなどが挙げられる。また初めに述べた下垂体原基を抗原としたモノクローナル抗体に対して膵臓由来キチナーゼを用いた吸収実験では、膵臓だけでなく、下垂体、嗅覚系の免疫反応性も消失したことから、下垂体、嗅覚系に同様の抗原決定基を持つ物質が存在することが確認されており、今回得られた tPCase の cDNA 配列を利用した下垂体、嗅覚系に存在する抗原分子の同定も可能となると思われる。