キチン・キトサン分子に対する 細胞応答と情報伝達

我々が日常見かける花から花へ甘い蜜を求めて飛び交うチョウは、植物の受粉を手助けするのみならず、植物の生体防御の賦活、昆虫表皮キチン・キトサン分子による植物間の情報伝達、生態系の保全に深く関与していることが解ってきた。ここでは、植物細胞と動物細胞のキチン・キトサン分子への応答シグナルと情報伝達およびその有効利用を紹介していただいた。

平 野 茂 博

1. 細胞のエリシターと応答シグナル

キチンは N-アセチル- β -D-グルコサミン残基が (1→4)-結合した 明確な化学構造をもつ多糖で、キトサンはキチンの N-脱アセチル化物である (第1図)¹⁻³⁾。キチン・キトサンは、カニやエビなど甲殻類の殻、チョウやカイコなど昆虫類の表皮、キノコや病原菌の細胞壁、オキアミやイカなど軟体動物の殻に分布している。これら多糖は、これら生物の骨格形成、防護、脱皮、鳴き音の振動板や拡声、飛翔の羽などの機能に加えて、マクロファージ活性化、抗腫瘍、血中コレステロール値降下、止血、創傷治癒促進、リポタンパクリパーゼ賦活などの機能を果している。キチン・キトサンはキチナーゼ (EC 3.2.1.14)、リゾチーム (EC 3.2.1.17)、キトサナーゼなどで加水分解される (第2図)。キチナーゼは、昆虫や微生物をはじめ、キチン・キトサンを構成成分としない植物の組織や種子など、とりわけ外皮組織に局在する。リゾチームは動物の血液や涙など体液や皮膚など組織中に広く分布している。

第1図 キチンとキトサンの化学構造の繰り返し単位

昆虫が植物組織に接触すると、昆虫表皮のキチン・キトサンが植物キチナーゼで溶解される^{4,5)}。それと共に、生成したキチン・キトサンオリゴ糖がエリシター (酵素などタンパク質の合成を高める誘導物質) となり、植物細胞を活性化してファイトアレキシン (抗菌物質)、キチナーゼやフェニルアラニンアンモニアリアーゼ (EC 4.3.1.5) などの一連の抗菌タンパク質 (pathogenic resistant protein) の生成をうながす⁶⁻⁸⁾。その結果、病原菌の感染が阻害され、害虫も寄生しにくくなる⁹⁾。動物細胞においても、キチン・キトサンはリゾチーム活性を賦活する¹⁰⁾。これら生化学反応は、生物の本来備える外敵に対する生体防御機能である。このように、キチンやキトサンに対する細胞の応答シグナルとして、植物細胞

第2図 キチン・キトサンを加水分解する酵素群
キトサナーゼと D-グルコサミダーゼの EC 番号は、未だ付
けられていない。

Cellular Response to Chitin and Chitosan Molecules, and its Informational Transmission
Shigehiro HIRANO (Department of Agricultural Biochemistry and Biotechnology, Tottori University)

にてキチナーゼとフェニルアラニンアンモニリアーゼ活性を、動物細胞にてリゾチーム活性をそれぞれ用いることができる。

2. 植物細胞の応答

1) キチナーゼの活性賦活とキチナーゼアイソザイム誘導

植物キチナーゼの遺伝子の塩基配列から解析されたアミノ酸配列は、キチナーゼに少なくとも3種のアイソザイムが存在する¹¹⁾。クラスIキチナーゼアイソザイムは細胞内の液胞内に存在し塩基性で、システインに富むドメイン (Hevein ドメインとも呼ばれる) と触媒ドメインからなる。クラスIIキチナーゼアイソザイムは細胞外に存在し酸性で、システインに富むドメインを欠き、クラスIキチナーゼアイソザイムと相同性なアミノ酸配列を示す触媒ドメインをもつ。クラスIIIキチナーゼアイソザイムは細胞外に存在し、そのアミノ酸配列はクラスIとIIキチナーゼアイソザイムと相同性をもたない¹¹⁾。

エリシターとしてキチン誘導体の溶液をイネカルス (細胞集合体) に添加して細胞応答をキチナーゼ活性で追跡すると、12 時間以内にキチナーゼの活性が高まり、アイソザイムの誘導がはじまり、高い酵素活性が3日間後も続いている (第3図)。このキチナーゼ誘導は、溶媒のみの添加 (コントロール) で発現しない。このキチナーゼ誘導は、カルスに添加するエリシターの化学構造に依存するようである。また、添加量を高めるとキチナーゼ活性が高く誘導され、リグニン合成が高まり硬い組織が生成する (フェニルアラニンアンモニリアーゼの活性賦活の項参照)。エリシターに応答して、キチナーゼ活性の上昇と共にアイソザイムのタンパク質の質的变化が起こる。イネカルスから抽出したキチナーゼのアイソザイムは DEAE-セルロフフィンカラムで、塩基性アイソザイム群 (カラムに未吸着) と酸性アイソザイム群 (カ

第3図 イネカルスの細胞応答としてのキチナーゼとフェニルアラニンアンモニリアーゼ活性¹⁴⁾

キチナーゼ活性 (左) とフェニルアラニンアンモニリアーゼ活性を示す。●: O-カルボキシメチルキチン処理, ○: 対照

第4図 イネカルスキチナーゼの DEAE-セルロフフィンカラムクロマトグラフィー¹²⁾

○: 未処理; ●: O-カルボキシメチルキチンで処理して3日後でアイソザイム I (塩基性) と共にアイソザイム III が新しく誘導される。カラム: 1.5×14cm

ラムに吸着) に分画される。未添加処理カルスからはアイソザイム I (塩基性) とアイソザイム II (酸性) が検出される。O-カルボキシメチルキチンを添加したイネカルスからアイソザイム I と II に加えて新しいアイソザイム III (酸性) が検出される (第4図)¹²⁾。一方、ナンシ黒斑病菌の細胞壁を添加したイネカルスから、アイソザイム I, II, III に加えて新しいアイソザイム IV (酸性) が検出される¹³⁾。

2) フェニルアラニンアンモニリアーゼの活性賦活

エリシターとして O-カルボキシメチルキチンを添加してイネカルスを培養すると、添加後 24 時間以内にキチナーゼ活性の誘導と共にファイトアレキシン (抗菌物質) やリグニンの生合成に関与するフェニルアラニンを *trans*-桂皮酸とアンモニアにするフェニルアラニンアンモニリアーゼが誘導する (第3図)¹⁴⁾。フェニルアラニンアンモニリアーゼ活性の誘導は、O-カルボキシメチルキチン > O-グリコールキチン > キトサン > キチンの順である。高分子でカルボキシル基の導入で高い誘導を示すエリシターとなり¹⁵⁾、そのエリシター活性は化学構造に依存することが解る (第1表)。

第1表 キチン、関連化合物および細菌細胞壁の懸濁液の添加によるイネカルスのフェニルアラニンアンモニリアーゼの活性誘導¹⁴⁾

添加誘導体	フェニルアラニンアンモニリアーゼ活性 (×10 ⁻⁴) (U/mg タンパク)
O-カルボキシメチルキチン	5.33
<i>Micrococcus lysodeikticus</i> 菌体	5.17
O-グリコールキチン	4.36
キトサン	4.24
キチン	3.46
コントロール	3.36

第2表 ウサギにおけるキトサンオリゴ糖の静脈注射による血清リゾチーム活性の賦活¹⁰⁾

添 加 誘 導 体	血清リゾチーム活性 (U/ml 血清)				
	注射後の日数				
	1	3	5	7	60
キトサンオリゴ糖	9.2	7.7	6.9	3.7	4.7
キチンオリゴ糖	4.4	3.7	n. d. ^{a)}	n. d.	n. d.
(1→4)- α -D-ガラクトサミンオリゴ糖	4.5	4.4	n. d.	n. d.	n. d.
コントロール (生理食塩水)	4.4	4.4	n. d.	n. d.	4.3

^a n. d., 未測定

3. 動物細胞の応答

ウサギにキトサンオリゴ糖 (一日当たり 7.1~8.6 mg/kg 体重) を 5 日間連続静脈注射すると, 血清リゾチーム活性が約 2 倍に賦活する。しかし, キチンやガラクトサミンオリゴ糖の静脈注射しても, この酵素活性は賦活しない (第2表)¹⁰⁾。静脈注射したキトサンオリゴ糖は約 5 日間血液中に滞留する。キチンおよび関連化合物を添加した培地上にてニワトリ胎児細胞の *in vitro* 培養すると, 細胞外リゾチーム活性が賦活される (第5図)。その賦活は 粉末キチン > *Micrococcus lysodeikticus* 菌体 > キチンオリゴ糖 > キトサン・キトサンオリゴ糖の順である。植物細胞におけるのと異なり, 動物においては細胞の種類やエリシターの化学構造により, 細胞応答に多様性が見られる。

第5図 ニワトリ胎児細胞から生産されるリゾチーム活性の時間経過¹⁰⁾

リゾチーム活性は *Micrococcus lysodeikticus* 菌体を基質として反応3分間における濁度変化で測定した。

●: キチン (10mg/培養シャーレ) を添加した培地
▲: 未添加培地 (対照)

第3表 キトサンおよび関連化合物の二, 三の植物病原菌の生育阻害¹⁸⁾

病 原 菌		成育直径 (コントロールに対する%) ^a			
		キトサン		キトサンオリゴ糖	ペクチン酸
		400, 000 ^b	3, 000 ^b	300~1, 000 ^b	30, 000 ^b
サツマイモ軟腐病菌	<i>Rhizopus nigricans</i>	84±4	62±6	80±5	—
リンゴ腐乱病菌	<i>Valsa mali</i>	79±5	54±4	108±7	94±3
イチゴ灰色かび病菌	<i>Botrytis cinerea</i>	81±7	91±4	90±4	95±2
イネ紋枯病菌	<i>Rhizoctonia solani</i>	73±8	87±4	93±8	109±5
イチゴ根腐病菌	<i>Ceratobasidium fragariae</i>	79±6	66±6	93±4	94±5
イネごまはがれ病菌	<i>Helminthosporium oryzae</i>	45±9	93±4	88±5	84±4
ナシ胴枯病菌	<i>Phomopsis fukushi</i>	83±9	83±5	102±7	77±10
メロン蔓割病菌	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>melonis</i>	56±9	86±3	82±4	84±2
トマト萎凋病菌	<i>Fusarium oxysporum</i> F. sp. <i>lycopersici</i>	51±9	69±2	85±5	86±6
腐生菌	<i>Alternaria alternata</i>	69±7	86±2	94±3	85±3
リンゴ斑点落葉病菌	<i>Alternaria alternata</i> apple pathotype	74±10	102±4	104±4	99±2
梨黒斑病菌	<i>Alternaria alternata</i> Japanese pear pathotype	66±3	95±4	92±11	91±3
こうじかび	<i>Aspergillus niger</i> (IAM 3001)	—	107±7	116±8	—
キウリ黒星病菌	<i>Cladosporium cucumerinum</i>	72±11	97±7	114±10	76±5
リンゴ炭そ病菌	<i>Glomerella cingulata</i>	92±4	94±4	94±4	90±5
イネいもち病菌	<i>Pyricularia oryzae</i>	93±5	91±5	98±10	68±3
腐生菌 (青かび)	<i>Penicillium citrinum</i> (ATCC 9849)	—	107±9	93±10	—

^a 1.0 mg/ml; ^b 分子量

第4表 キトサンとその誘導体による未熟エンドウさやにおけるピサチン誘導と
フザリウム菌の生育阻害¹⁹⁾

キトサンとその誘導体	フザリウム菌の生育阻害される 最低濃度 ($\mu\text{g/ml}$)		ピサチン誘導 ^a
	<i>Fusarium solani pisi</i>	<i>Fusarium solani phaseoli</i>	
キトサン	8	4	++++
10 間加水分解物 ^a	8	4	++++
七糖	8	4	++++
七糖	63	16	+++
五糖	250	250	++
四糖	500	250	++
三糖	効果なし ^b	効果なし	+
二糖	効果なし	効果なし	-
D-グルコサミン・HCl	効果なし	効果なし	-
<i>F. solani</i> f. sp. <i>phaseoli</i> (10^6 孢子 ml)			++++
<i>F. solani</i> f. sp. <i>pisii</i> (10^6 孢子 ml)			++++
水 (コントロール)			-

^a ピサチンの誘導度合を示す。(一) 誘導しない, (+) わずかに誘導する, (++) 中低度に誘導する, (+++) 誘導する, (+++++) 強く誘導する

^b 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 濃度で効果なし

4. 微生物細胞の応答

キトサンや部分的 N-脱アセチル化キチンは限定された菌の増殖を阻害する。キチンの 80% N-脱アセチル化物 (分子量 80,000) や N-トリメチル化誘導体は, *Candida albicans*, *Bacillus subtilis* など病原菌の増殖を阻害する¹⁶⁾。キトサンは, 0.02% 以上の濃度で大腸菌の生育を抑制する¹⁷⁾。キトサンはフザリウム菌など植物病原菌の生育を抑制する。リンゴ腐乱病菌, トマト萎凋病菌などの生育を抑制する。この生育抑制は, 低分子キトサンより高分子キトサンにて顕著である (第3表)¹⁸⁾。フザリウム菌の生育にて, 単糖と二糖はほとんど生育抑制しないが 6 糖以上は高い生育抑制を示す。この生育抑制はファイトアレキシンであるピサチン生成に比例している (第4表)¹⁹⁾。すなわち, キトサン鎖上に分布するカチオンに荷電したアミノ基が, 病原菌の細胞壁上のアニオン基にて高分子電解質複合体を形成して菌の動きを止め, 加えてファイトアレキシンの生成を高め, 菌の生育が阻害されていると推定される。

5. 植物細胞のキチン・キトサン分子への の応答と情報伝達の推定分子機構

情報の引金となるエリシター分子がキチン, キトサンおよび関連誘導体で, 植物の細胞応答シグナルがキチナーゼやフェニルアラニンアンモニアリアーゼなどの酵素活性である。キチン・キトサン分子が植物細胞壁のレセプター部位に結合すると, その部位で細胞外に分泌されているクラス II キチナーゼにより加水分解され, 病原菌の細胞壁 (キチンと 1,3- β -D-グルカン) や昆虫の表皮

(キチン) から²⁰⁾, オリゴ糖を含む低分子キチンが微量生成する。これが細胞質内に入り, 核の DNA まで移動し, このエリシターがインジューサーとなり, 植物細胞の DNA 上のレプレッサー (抑制栓) と結合して, これを脱離させ, 新しい mRNA の転写がはじまる。メロン苗の子葉表皮内に一連のキチンオリゴ糖を注入して 24 時間後のキチナーゼ活性は 6~5 糖で高い誘導を示すことから支持される²¹⁾。クラス III キチナーゼ, キチナーゼ, 1,3- β -D-グルカナーゼ, フィトアレキシン (抗菌物質) やリグニン合成に関与するフェニルアラニンアンモニアリアーゼなど抗菌タンパク質への翻訳がはじまる。キチン質が細胞壁または細胞膜のレセプターへ結合してから

第6図 キチン・キトサン分子に対する細胞応答と
情報伝達の推定モデル (詳細は本文参照)

2～3時間以内に細胞外へキチナーゼの分泌がはじまる。それと共に、リグニン、ファイトアレキシンなどの合成が行われる(第6図)。

キチン・キトサンへの結合する病原菌の細胞壁または細胞膜上のレセプター構造、キチン・キトサンオリゴ糖の細胞質内でのDNA鎖までの移動とDNA上のレプレッサータンパク質との脱離機構やその複合体の構造、昆虫を媒介としたキチン・キトサン分子による植物間の情報伝達などは全く不明である。

6. キチン・キトサンへの細胞の応答と情報伝達の有効利用

キチン・キトサンへの細胞応答と情報伝達は生物の備えた生体活性化の機能で²²⁾、この生物機能を人為的に高めるのは応用開発の観点から意義深い。キチンやキトサンは夏期に砂丘地で40日以内、一般畑で30日以内に分解される²³⁾。キチン・キトサンを土壌中に施用すると、キチナーゼを分泌する土壌の有用微生物である放線菌の増殖が賦活され、キチンと1,3-β-D-グルカンからなる細胞壁をもつ土壌病原菌(糸状菌、例えばフザリウム菌やリゾクトニア菌)の増殖が抑制され、土壌菌叢が改善される。地球上の土壌圏、水圏、生物圏にて、年間推定一千億トンに及ぶ量のキチン・キトサンが生合成され、同時に生分解され残留しない。この毎年繰り返されるキチン・キトサンの生合成と生分解による循環が地球環境と生態系を保全している。キトサンによる種子被覆²⁴⁾や葉面散布、これらの飼料²⁵⁾や食品への添加で細胞が賦活され、病害感染が予防でき、動植物の生物生産が向上する^{26,27)}。これまで、農薬の過剰な使用で有用昆虫が減少し、死骸キチン質の土壌圏への還元が少なくなった。そのため、土壌中の菌叢が乱れ、連作障害、松がれ病をはじめとする生物生産に被害をもたらしている。一日も早くもとの生態系を快復することが必要である。

(鳥取大学農学部資源利用化学科)

引用文献

- 1) キチン・キトサン研究会(編): 最後のバイオマスキチン・キトサン, 技法堂出版(1988)
- 2) キチン・キトサン研究会(編): キチン・キトサンの応用, 技法堂出版(1990)
- 3) キチン・キトサン研究会(編): キチン・キトサン実験マニュアル, 技法堂出版(1991)
- 4) A. SCHLUMBAUM, F. MAUCH, U. VOGEL, T. BOLLER: *Nature*, **324**, 365 (1986)
- 5) J. G. VERBURG, Q. K. HUYNH, *Plant Physiol.*, **95**, 450 (1991)
- 6) M. H. A. J. JOOSTEN, P. J. G. M. DE WIT: *Plant Physiol.*, **89**, 945 (1989)
- 7) R. KOMBRINK, M. SCHRODER, K. HAHNBROCK: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 782 (1988)
- 8) M. ROUSSEAU-LIMOZIN, B. FRITIG: *Plant Physiol. Biochem.*, **29**, 105 (1991)
- 9) 平野茂博: 蚕糸昆虫研究資料, 11 (1991) 印刷中
- 10) S. HIRANO, H. INUI, M. IWATA, K. YAMANAKA, T. TODA: *5th Asian-Pacific Congress of Clinical Biochemistry*, Kobe, 1991, Sep, 29-Oct. 4
- 11) H. SHINSHI, J.-M. NEUHAUS, J. RUALS, F. MEINS, Jr.: *Plant Mole. Biol.*, **14**, 353 (1990)
- 12) H. INUI, H. KOSAKI, Y. UNO, K. TABATA, S. HIRANO, *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 3107 (1991)
- 13) 宇野喜貴, 乾 博, 平野茂博: 日本農芸化学会1992度大会, 印刷中(1992)
- 14) 野津普也, 乾 博, 平野茂博: 日本農芸化学会1992度大会, 印刷中(1992)
- 15) F. KUROSAKI, N. TASHIRO, A. NISHI: *Plant Cell Physiol.*, **29**, 527 (1988)
- 16) 指輪仁之, 竹内邦雄, 土江和彦, 斉木博之, 重政好弘, 谷川孝彦, 田中吉紀: 第5回キチン・キトサンシンポジウム, 講演要旨, p.12 (1991)
- 17) 内田 泰: フードケミカル, **2**, 22 (1988)
- 18) S. HIRANO, N. NAGAO: *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 3065 (1989)
- 19) C. R. ALAN, L. D. HADWIGER: *Exp. Mycol.*, **3**, 285 (1979)
- 20) F. MAUCH, B. MAOUCH-MANI, T. BOLLER: *Plant Physiol.*, **88**, 936 (1988)
- 21) D. ROBY, A. GADELLE, A. TOPPAN: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **143**, 885 (1987)
- 22) 山田哲治: 生体防御の分子機構, 分子生物学の進歩, **13**, 203 (1990)
- 23) S. HIRANO, Y. KOISHIBARA, S. KITaura, T. TANAKO, H. TSUCHIDA, K. MURAE, T. YAMAMOTO: *Biochem. System. Ecol.*, **19**, 379 (1991)
- 24) S. HIRANO, T. YAMAMOTO, T. NISHIDA, H. INUI: *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 2719 (1990)
- 25) S. HIRANO, C. ITAKURA, H. SEINO, N. KANBARA, Y. AKIYAMA, I. NONAKA, T. KAWAKAMI: *J. Agr. Food Chem.*, **38**, 1314 (1990)
- 26) 平野茂博: 農業技術大系/土壌施肥編追録3号, 印刷中
- 27) S. HIRANO, M. HAYASHI, K. MIURA, H. TSUCHIDA, T. NISHIDA: "Applied Bioactive Polymeric Materials", C. G. GEBELEIN, C. E. CARRAHER, Jr., V. FOSTER (eds.), Plenum Press, New York, p. 45 (1988)