シンポジウム記録 水圏生物タンパク質科学の新展開

Ⅲ-1. キチナーゼ

松宮政弘

日本大学生物資源科学部海洋生物資源科学科

Ⅲ-1. Chitinase

MASAHIRO MATSUMIYA

College of Bioresource Sciences, Nihon University, Fujisawa, Kanagawa 252-0880, Japan

キチンは *N*-アセチル-D-グルコサミン (GlcNAc) が β -1,4 結合した多糖で、甲殻類の甲羅、真菌類の細胞壁などに存在し、地球上ではセルロースに次いで 2 番目に豊富なバイオマスである。キチナーゼはキチンをエンド型で加水分解し、キチンオリゴ糖 (GlcNAc)_n を生成する酵素で、生体内では消化、脱皮、防御、攻撃などの様々な生理的役割を果たしている。近年、(GlcNAc)_n は免疫賦活作用、GlcNAc は変形性関節症改善や乾燥肌改善作用を示すことが報告され、それらの酵素的生産に必須なキチナーゼは産業上も重要な酵素である。キチナーゼに関する研究は微生物を対象とした報告が多く、動物由来の酵素に関しては未だ少ない。そこで海洋生物のキチナーゼについて、我々の研究成果を中心に紹介する。^{1,2)}

1. 魚類キチナーゼの分布・精製・性状

魚類体内におけるキチナーゼおよびエキソ型キチン分解酵素の β -*N*-アセチルヘキソサミニダーゼ (Hex) の分布を調べた結果、キチナーゼは胃で、Hex は幽門垂または腸で高い活性を観察した。これより、魚類は餌として摂取したキチン質をまず胃のエンド型キチン分解酵素で分解し、次いで幽門垂または腸のエキソ型キチン分解酵素で GlcNAc に分解していると考えられた。また、生息環境や食性の異なる 7 魚種の胃よりキチンアフィニティーカラム、イオン交換カラムなどを用いてキチナーゼを精製した。底生性で比較的大型の甲殻類を捕食するカサゴ、アイナメよ 3 種のキチナーゼアイソザイム (46–62 kDa) が、シログチ、イサキ、マイワシ、マサバ、シーラカンスより 1–2 種のキチナーゼアイソザイム (38–60 kDa) が精製された。それらの N-末端アミノ酸配列は、16–19 残基が GAGK または PPTI 何れかの 2 グループに分類され、低分子量のアイソザイムは GAGK の配列であった。何れの酵素も pH 2–5 付近の酸性域に最適 pH を示し、また酸性域で安定であった。さらにシログチ胃キチナーゼアイソザイムは何れも、海水の塩分濃度に相当する 0.5M NaCl の存在下で、カニ・エビ殻の α 結晶性キチン分解能が約 1.5–1.8

倍に上昇した。

2. 魚類胃キチナーゼの基質特異性

可溶性低分子基質を用いて各キチナーゼアイソザイムの基質分解様式を調べた。その結果、GAGK の配列を持つ低分子量のキチナーゼアイソザイムは (GlcNAc)₅ の非還元末端より 2 番目のグリコシド結合を、PPTI の配列を持つ高分子量のそれは 3 番目のグリコシド結合を主に分解することが判明した。また、魚類胃キチナーゼアイソザイムは微生物由来のそれと比較し、カニ・エビなどの強固な α 結晶性キチン分解能が高いことが明らかとなった。さらに、キチンナノファイバーに対しては、粉碎状態のカニ殻 α -キチンより 13–36 倍高い比活性が観察された。また、魚類は β -キチンを持つゴカイなどの多毛類も食物とするため、いずれのキチナーゼアイソザイムもイカ軟甲 β -キチン分解能を示した。以上に示すように、食性に対応した結晶質キチン分解活性を持つことも、魚類胃のキチナーゼの特徴の一つと考えられた。

3. 魚類胃キチナーゼの構造

各キチナーゼアイソザイムの全長 cDNA を得、その演繹アミノ酸配列を解析した結果、いずれも N-末端よりシグナルペプチド、糖質加水分解酵素ファミリー 18 活性ドメイン、リンカー、キチン結合ドメインにより構成されていた。系統解析により、N-末端に GAGK または PPTI の配列を持つ 2 グループは、脊椎動物間でそれぞれ魚類独自の酸性魚類キチナーゼ-1 (acidic fish chitinase-1: AFCCase-1) および酸性魚類キチナーゼ-2 (acidic fish chitinase-2: AFCCase-2) のグループを形成することが明らかになった。また、両遺伝子は胃で強く発現していた。なお、一部の魚種では生殖腺においても発現が見られたことより、表皮にキチン質を有する線虫類に対する防御の役割も果たしていると考えられた

4. その他海洋生物のキチナーゼ

スルメイカ、コウイカ肝臓より消化の役割を果たす 38–62 kDa、マダコ唾液腺より攻撃のための 57 kDa、アメフラシ生殖腺より防御のための 37 kDa の各キチナーゼを精製し、性状を明らかにした。cDNA クローニングにより、それらの一次構造解析を進めている。

文 献

- Ikeda M, Kakizaki H, Matsumiya M. Biochemistry of fish stomach chitinase (Review). *Int. J. Biol. Macromol.* (in press).
- 松宮政弘, 柿崎博美, 池田 愛. 魚類の繁栄戦略とキチナーゼ (総説), キチン・キトサン研究 2017; **23**: 4–16.