

令和元年5月20日現在

機関番号：32613

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07699

研究課題名(和文) 酸性ほ乳類キチナーゼはマウスとブタの消化器系において糖質分解酵素か？

研究課題名(英文) Is acidic mammalian chitinase a major glycosidase in the stomachs of mouse and porcine?

研究代表者

小山 文隆 (Oyama, Fumitaka)

工学院大学・先進工学部・教授

研究者番号：40194641

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：キチンは、N-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc) の重合体で、昆虫の主要な構成成分である。昆虫はタンパク質に富み、飼料転換効率が高い。我々は、マウス、ブタ、ニワトリ、カニクイザル、マーモセットが、ペプシン、トリプシン、キモトリプシン耐性の酸性ほ乳類キチナーゼ (AMCase, acidic mammalian chitinase; 別名称 Chia) を、胃で多量に発現し、それら動物の消化器系条件下で、キチンとミールワームの殻を (GlcNAc)₂ へと分解することを示した。以上の結果から、AMCase は、家畜を含む動物の胃で消化酵素として働き得ることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

AMCase が、マウス、ブタ、ニワトリ、カニクイザル、コモンマーモセット(雑食性)で消化酵素として働き、イヌ(肉食性)とウシ(草食性)ではそのような働きが認められなかったため、食性とその発現レベルに影響し、特定の動物におけるキチンの消化性を決めることを明らかにした。本研究成果は、昆虫などのキチン含有生物を、ほ乳類、鳥類の飼料として丸ごと利用する科学的根拠となり得る。従って、本研究は、「キチン、キチン含有生物を用いた効率的で持続的な家畜生産、世界の食糧供給」に大きく貢献する。

研究成果の概要(英文)：Chitin is a polymer of N-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc) and a main constituent of insects' exoskeleton. Insects are rich in protein with high energy conversion efficiency. We show that mouse, pig, chicken, crab-eating monkey and common marmoset highly express pepsin-, trypsin- and chymotrypsin-resistant AMCase in the stomachs. We also showed that AMCase is most active at pH 2.0-4.0 and degrades chitin and mealworm shells into GlcNAc dimers under gastrointestinal conditions. Thus, AMCase act as digestive enzymes in mouse, pig, chicken, crab-eating monkey and common marmoset.

研究分野：応用生物化学

キーワード：酸性ほ乳類キチナーゼ キチン キチン含有生物 糖質分解酵素 プロテアーゼ耐性 昆虫 家畜飼料

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

昆虫は地球上に広く生息しており、代表的なキチン含有生物である。キチンはその主要な構成成分で、*N*-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc) が β -1,4 結合した高分子化合物である。昆虫などのキチン含有生物は、タンパク質に富み、高い飼料転換効率が可能である。このことから、バイオマスとして自然界に膨大に存在するキチン、キチン含有生物は、家畜飼料として注目されている。しかし、これらの利点にも関わらず、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、家畜体内において、難消化性の食物繊維 (dietary fiber) であると、長い間考えられてきたことによる。

2. 研究の目的

我々は、酸性ほ乳類キチナーゼ (AMCase, acidic mammalian chitinase; 別名称 Chia, chitinase acidic) が、マウスの胃で、消化酵素の pepsin の前駆体である pepsinogen に匹敵するレベルで発現していることを報告した。さらに、AMCase の至適 pH が pH 2.0 の強酸性であり、その条件下で安定であることも示した。これら応募者らの結果は、AMCase がマウスの胃で消化酵素として機能している可能性を強く示唆する。本研究で、応募者は、「マウスとブタにおいて、AMCase がキチン分解に関わる消化酵素として機能している」ことを証明することを試みた。

3. 研究の方法

AMCase について、以下の三点を明らかにした。

各種動物組織におけるキチナーゼと対照遺伝子の遺伝子発現解析

胃の条件 (pH 2.0) と腸の条件下 (pH 7.6 付近) での pepsin, trypsin, chymotrypsin 分解に対する抵抗性の検討

各種動物の AMCase によるキチンおよびミールワーム幼虫の殻のキチン分解産物の解析

4. 研究成果

AMCase が、マウス、ブタ、ニワトリ (雑食性動物) の胃で大量に合成され、プロテアーゼに耐性の消化酵素としてキチンを分解し、炭素、窒素、エネルギー源となる (GlcNAc)₂ を生成することを示した。これらの結果から、キチンおよびキチン含有生物の飼料化が可能ではないかと考えた。他方、ウシやイヌなどの草食性と肉食性動物は、雑食性動物と比べ、キチンの消化能力が低く、動物の食性 (何を食べるか) とキチンの分解性に関係があることも報告した

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 11 件)

1. Tabata, E., Kashimura, A., Uehara, M., Wakita, S., Sakaguchi, M., Sugahara, Y., Yurimoto, T., Sasaki, E., Matoska, V., Bauer, P. O. & **Oyama, F.** (2019) High expression of acidic chitinase and chitin digestibility in the stomach of common marmoset (*Callithrix jacchus*), an insectivorous nonhuman primate, *Sci Rep.* **9**, 159.
2. Uehara, M., Tabata, E., Ishii, K., Sawa, A., Ohno, M., Sakaguchi, M., Matoska, V., Bauer, P. O. & **Oyama, F.** (2018) Chitinase mRNA Levels Determined by QPCR in Crab-Eating Monkey (*Macaca fascicularis*) Tissues: Species-Specific Expression of Acidic Mammalian Chitinase and Chitotriosidase, *Genes (Basel)*. **9**, 244.
3. Tabata, E., Kashimura, A., Wakita, S., Sakaguchi, M., Sugahara, Y., Imamura, Y., Shimizu, H., Matoska, V., Bauer, P. O. & **Oyama, F.** (2018) Acidic chitinase-chitin complex is dissociated in a competitive manner by acetic acid: purification of natural enzyme for supplementation purposes, *Int J Mol Sci.* **19**, 362.
4. Tabata, E., Kashimura, A., Kikuchi, A., Masuda, H., Miyahara, R., Hiruma, Y., Wakita, S., Ohno, M., Sakaguchi, M., Sugahara, Y., Matoska, V., Bauer, P. O. & **Oyama, F.** (2018) Chitin digestibility is dependent on feeding behaviors, which determine acidic chitinase mRNA levels in mammalian and poultry stomachs, *Sci Rep.* **8**, 1461.
5. Wakita, S., Kobayashi, S., Kimura, M., Kashimura, A., Honda, S., Sakaguchi, M., Sugahara, Y., Kamaya, M., Matoska, V., Bauer, P. O. & **Oyama, F.** (2017) Mouse acidic mammalian chitinase exhibits transglycosylation activity at somatic tissue pH, *FEBS Lett.* **591**, 3310-3318.
6. Wakita, S., Kimura, M., Kato, N., Kashimura, A., Kobayashi, S., Kanayama, N., Ohno, M., Honda, S., Sakaguchi, M., Sugahara, Y., Bauer, P. O. & **Oyama, F.** (2017) Improved fluorescent labeling of chitin oligomers: Chitinolytic properties of acidic mammalian chitinase under somatic tissue pH conditions, *Carbohydr Polym.* **164**, 145-153.

7. Tabata, E., Kashimura, A., Wakita, S., Ohno, M., Sakaguchi, M., Sugahara, Y., Imamura, Y., Seki, S., Ueda, H., Matoska, V., Bauer, P. O. & **Oyama, F.** (2017) Protease resistance of porcine acidic mammalian chitinase under gastrointestinal conditions implies that chitin-containing organisms can be sustainable dietary resources, *Sci Rep.* **7**, 12963.
8. Tabata, E., Kashimura, A., Wakita, S., Ohno, M., Sakaguchi, M., Sugahara, Y., Kino, Y., Matoska, V., Bauer, P. O. & **Oyama, F.** (2017) Gastric and intestinal proteases resistance of chicken acidic chitinase nominates chitin-containing organisms for alternative whole edible diets for poultry, *Sci Rep.* **7**, 6662.
9. Okawa, K., Ohno, M., Kashimura, A., Kimura, M., Kobayashi, Y., Sakaguchi, M., Sugahara, Y., Kamaya, M., Kino, Y., Bauer, P. O. & **Oyama, F.** (2016) Loss and gain of human acidic mammalian chitinase activity by nonsynonymous SNPs, *Mol Biol Evol.* **33**, 3183-3193.
10. Kimura, M., Wakita, S., Ishikawa, K., Sekine, K., Yoshikawa, S., Sato, A., Okawa, K., Kashimura, A., Sakaguchi, M., Sugahara, Y., Yamanaka, D., Ohno, N., Bauer, P. O. & **Oyama, F.** (2016) Functional properties of mouse chitotriosidase expressed in the periplasmic space of *Escherichia coli*, *PLoS ONE.* **11**, e0164367.
11. Ohno, M., Kimura, M., Miyazaki, H., Okawa, K., Onuki, R., Nemoto, C., Tabata, E., Wakita, S., Kashimura, A., Sakaguchi, M., Sugahara, Y., Nukina, N., Bauer, P. O. & **Oyama, F.** (2016) Acidic mammalian chitinase is a proteases-resistant glycosidase in mouse digestive system, *Sci Rep.* **6**, 37756.

〔学会発表〕(計 19 件)

1. **小山文隆**、櫻村昭徳、脇田悟誌、菅原康里、田畑絵理 (2019) ブタ酸性キチナーゼは、消化器系プロテアーゼに耐性で、キチン分解酵素として機能する 日本農芸化学会 2019 年度大会 [東京] 3 月 27 日
2. Uehara, M., Tabata, E., Ohno, M., Sakaguchi, M., **Oyama, F.** Quantification of chitinases mRNA levels by qPCR in crab-eating monkey tissues: Comparison with mouse and human. **The 68th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics (ASHG)** (San Diego) November 18.
3. Tabata, E., Kashimura, A., Uehara, M., Wakita, S., Sakaguchi, M., Sugahara, Y., Yurimoto, T., Sasaki, E., **Oyama, F.** (2018) Gene expression analysis of mammalian chitinases in common marmoset (*Callithrix jacchus*) tissue. **The 68th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics (ASHG)** (San Diego) November 17.
4. **Oyama, F.**, Kashimura, A., Kikuchi, A., Masuda, H., Miyahara, R., Hiruma, Y., Wakita, S., Ohno, M., Sakaguchi, M., Sugahara, Y., Tabata, E. (2018) Feeding behaviors determine acidic chitinase mRNA levels in mammalian and poultry stomachs. **The 68th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics (ASHG)** (San Diego) November 17.
5. Tabata, E., Kashimura, A., Wakita, S., Ohno, M., Sakaguchi, M., Sugahara, Y., **Oyama, F.** (2018) Acidic chitinase mRNA levels and their chitinolytic activity are affected by the feeding behavior, which may determine chitin digestibility in animals. **14th International Chitin and Chitosan Conference (14th ICC)** (Osaka). August 30.
6. Uehara, M., Tabata, E., Ohno, M., Sakaguchi, M., **Oyama, F.** (2018) Gene expression analysis of chitinases in crab-eating monkey: species-specific expression of acidic mammalian chitinase and chitotriosidase. **14th International Chitin and Chitosan Conference (14th ICC)** (Osaka) August 28.
7. **Oyama, F.**, Kimura, M., Okawa, K., Onuki, R., Nemoto, C., Tabata, E., Wakita, S., Kashimura, A., Sakaguchi, M., Sugahara, Y., Ohno, M. (2018) Acidic mammalian chitinase is a major chitinase in stomach resistant to pepsin and trypsin/chymotrypsin digestion. **14th International Chitin and Chitosan Conference (14th ICC)** (Osaka) August 28.
8. 田畑絵理, 櫻村昭徳, 脇田悟誌, 大野美紗, 坂口政吉, 菅原康里, **小山文隆** (2018) ニワトリ酸性キチナーゼの消化酵素としての機能解析 日本農芸化学会 2018 年度大会 [名古屋] 3 月 17 日
9. Tabata, E., Kashimura, A., Wakita, S., Ohno, M., Sakaguchi, M., Sugahara, Y., **Oyama, F.** (2017) Gene expression analysis and enzyme function of pig mammalian chitinase. **The 67th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics (ASHG)** (Orlando)

October 20.

10. Uehara, M., Tabata, E., Ohno, M., Sakaguchi, M., **Oyama, F.** (2017) Chitinases mRNA levels quantified by qPCR in crab-eating monkey tissues. **The 67th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics (ASHG)** (Orlando) October 18.
11. 田畑絵理, 櫻村昭徳, 脇田悟志, 大野美紗, 菅原康里, 坂口政吉, **小山文隆** (2017) ニワトリ酸性キチナーゼの遺伝子発現解析とその酵素機能 **第31回日本キッチン・キトサン学会大会** [宜野湾市] 8月23日
12. 上原麻衣子, 田畑絵理, 大野美紗, 坂口政吉, **小山文隆** (2017) カニクイザルにおけるキチナーゼ遺伝子の発現解析 **第31回日本キッチン・キトサン学会大会** [宜野湾市] 8月23日
13. 脇田悟志, 木村将大, 櫻村明徳, 坂口政吉, 菅原康里, **小山文隆** (2017) キチンオリゴ糖蛍光標識法を用いた酸性ほ乳類キチナーゼの特性解析 **第31回日本キッチン・キトサン学会大会** [宜野湾市] 8月23日
14. 田畑絵理, 櫻村昭徳, 大野美紗, 坂口政吉, **小山文隆** (2017) ニワトリ組織におけるキチナーゼ遺伝子発現レベルとその酵素学的機能の解析 **日本農芸化学会2017年度大会** [京都] 3月18日
15. Wakita, S., Kimura, M., Kashimura, A., Sakaguchi, M., Sugahara, Y., **Oyama, F.** (2016) Functional analysis of acidic mammalian chitinase under physiological conditions. **The 66th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics (ASHG)** (Vancouver) October 21.
16. Tabata, E., Ohno, M., Sakaguchi, M., **Oyama, F.** (2016) Gene expression analysis of mammalian chitinase transcripts in pig tissues. **The 66th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics (ASHG)** (Vancouver) October 20.
17. **小山文隆**, 大野美紗, 木村将大, 大川一明, 田畑絵理, 脇田悟志, 櫻村昭徳, 坂口政吉, 菅原康里 (2016) マウス胃における酸性ほ乳類キチナーゼの発現と生産細胞の同定 **第30回日本キッチン・キトサン学会大会** [川崎市] 8月19日
18. 脇田悟志, 木村将大, 櫻村明徳, 坂口政吉, 菅原康里, **小山文隆** (2016) AMCase による酸性～中性条件キチン分解産物の解析 **第30回日本キッチン・キトサン学会大会** [川崎市] 8月18日
19. 田畑絵理, 大野美紗, 坂口政吉, **小山文隆** (2016) ブタ組織におけるキチナーゼ遺伝子発現レベルの解析 **第30回日本キッチン・キトサン学会大会** [川崎市] 8月18日

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。