

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2009

課題番号：19370102

研究課題名（和文） 霊長類の採食戦略に適応した胃内消化酵素ペプシンの分子機能とゲノム進化

研究課題名（英文） Primate pepsins: evolution, function, and adaptation to feeding strategy

研究代表者

景山 節（KAGEYAMA TAKASHI）

京都大学・霊長類研究所・教授

研究者番号：20027501

研究成果の概要（和文）：

本研究では霊長類の胃内消化酵素ペプシンについて、少数のアミノ酸の特異的な置換がおこったときに酵素の機能が大きく変わることを明らかにした。ペプシンの活性中心に位置する S1 と S1' の役割が大きいと考えられることから、ヒトペプシンを主体に、S1' について集中的な解析を進め、Tyr189 と Met289 が活性の制御に極めて重要なアミノ酸であることを明らかにした。またオランウータンではペプシノゲン遺伝子の重複が急速におこったことを明らかにし、類人猿に特徴的な遺伝子進化について明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Pepsins are gastric digestive proteinases in vertebrates, including man. There are five forms, i. e., pepsins A, B, and F, gastricsin, and chymosin, which have evolved from a common ancestral aspartic proteinase. The specificity is well explained with the very hydrophobic nature of the S1' subsite, consisting of Tyr¹⁸⁹, Ile²¹³, Ile³⁰⁰, Met²⁸⁹, Val/Leu²⁹¹, and Leu²⁹⁸. The first three residues are well conserved in pepsin family enzymes. Fourteen different pepsinogen-A cDNAs and one pepsinogen-C cDNA have been cloned from gastric mucosa of the orangutan, *Pongo pygmaeus*. The extreme multiplication in the orangutan might be advantageous for the digestion of herbaceous foods due to the increase in the level of enzymes in stomach and the diversification of enzyme specificity.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	6,250,000	1,875,000	8,125,000
2008年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2009年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
年度			
年度			
総計	13,250,000	3,975,000	17,225,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：人類学・人類学

キーワード：霊長類, 採食戦略, ペプシン, 胃, 消化酵素

1. 研究開始当初の背景

動物の食性は植物食、雑食、肉食に大別される。哺乳類での食性は食肉目、反芻亜目など「目」レベルの大きな分類群で概ね一致しているが、系統的に近縁な動物でも大きな違いが見られることも多い。霊長目でも多くは植物食を基本としながらも、反芻動物に近い完全な植物食から、小型のサル類が肉食（昆虫食）を高い比率で取り入れていること、チンパンジーなど他の霊長類でも肉食を積極的に取り入れているなど、食性の多様化が見られる。これらのことは食物に対する採食戦略は生存環境への適応進化により近縁の動物種でも大きく異なること、すなわち多様化することを示している。

2. 研究の目的

霊長類の食性の多様化は、哺乳類全体で起こったことを縮図としたような形で進行している。また霊長類の各分類群でも同様なことがおこっている。これは近縁種が同一区域で生存していくためニッチを分け合うことに主たる要因があり、多様な採食戦略が必要になったと推測される。この結果、採食戦略は種の消化管から歯、頬袋などの形態に様々な違いをもたらしているほか生態、社会、繁殖などに大きな影響を与えている。また類人猿では脳の発達には効率よい消化による栄養素の供給を必要とし、採食戦略がヒトへの進化につながる要素を含んでいる。これらのことから霊長類の食性の多様化とその要因を分子レベルから明らかにしていくことはヒトへの進化、ヒトのゆえんを明らかにしていくためにも極めて重要な課題である。

3. 研究の方法

1) 霊長類種の新規胃内消化酵素の検索とcDNAクローニング・構造決定

これまでの霊長類や他の哺乳類での研究から、ペプシンには多数の分子種があり発現量や分子構成の調節により動物種の異なる食性に対して巧みに適応してきたと推測される。これまでの霊長類種での解析が植物食/雑食を中心とする種を主体としていることから、霊長類全体で食性との相関を明らかにしていくには、植物食性の極にあるコロブスなど葉食霊長類での解析と、肉食（昆虫食）の割合が高くなったコモナーモセットなど新世界ザル、原猿での解析が不可欠である。

解析手法はニホンザルでの研究を通して既に確立されている。コロブス類など葉食

の比重が大きいサルでの消化阻害物質に対する耐性型ペプシン、マーモセットなど昆虫食のサルにおけるコラーゲンなど特殊なタンパク質分解のための肉食適応型ペプシンなど新奇の酵素が予想される。活性測定は蛍光基質を用いる高感度な方法を用いておこない、多様化した霊長類ペプシンの全体像を明らかにする。

2) ペプシンの分子機能解析

ペプシノゲンをペプシンに変換し各成分の様々な酵素機能を比較解析し、酵素多様化の実体を明らかにする。始めに、タンパク質分解酵素であることから、ヘモグロビン、アルブミン、ゲラチンなどの分解活性を比較検討する。これらは消化のモデルとなる代表的な基質であり、前2者が細胞成分を代表するものである。またゲラチンはコラーゲンやエラスチンなど結合組織を代表するものである。後者は特に肉食の時に分解対象となるものであり、肉食特異的ペプシンを検出するのに必要である。各成分の分解特異性は、消化切断されたペプチド断片をHPLCにより分離同定、N端とC端の配列を決定することによりおこなう。このことから切断マップを作成し、分解特性を明らかにしていく。さらに様々なペプチド基質を用いて酵素化学的解析をおこない理想的基質を見だしていく。これらのことからペプシン各成分の特異性について比較検討し、それぞれの成分の胃内消化における生理的な役割分担を明らかにする。

3) 霊長類種におけるペプシン遺伝子の多様化とゲノム解析

ペプシンには食性に対応した幾つかの成分があるとともに、各々の成分は遺伝子重複などを繰り返し絶えず変化してきている。これはペプシン遺伝子が極めて適応力に富むことを示しており、食性の多様化に迅速に対応する機構を持っていると考えられる。ペプシン成分間のアミノ酸配列を比較すると、酵素間の分岐が古いほど相同率は低下し、最も遠いペプシンA型とペプシンB型で50%以下である。アミノ酸総数は320残基越えていることから、進化の過程で160残基くらいが置換していることになる。この置換は活性の変化に決定的な影響を及ぼしたものから、ほとんど影響を与えなかったものを含んでいる。配列比較の分子進化的解析から、各アミノ酸にどのような選択圧がかかったのか、中立的かあるいはダーウィンの正の選択がおこなわれたのか、などについて明らかにする。

哺乳類ではペプシン遺伝子は採食戦略により、各アイソザイムの構成を変えてきた。また食性の特殊化に伴い特定のアイソザイムについて重複により遺伝子数を増やし、

胃での生産量を増やすなどの対応をとってきたと考えられる。このため食性への適応過程の一つとして重複・欠失などの各遺伝子の構成を明らかにすることが必要である。ヒトゲノムではペプシン A 遺伝子は第 1 染色体に分布している。さらにペプシン遺伝子は、重複で数を増やしたものの、生理的に不必要になったことにより、また染色体の転座や欠失などにより不活性化がおこったものなど大きな変化を経たことが示唆されている。代表的な霊長類種について、ゲノム PCR によりペプシン遺伝子群を増幅単離し、遺伝子の並びや構成を明らかにする。さらに蛍光 in situ hybridization により染色体局在を解析し、遺伝子の重複、不活性化、さらに染色体の転座などを明らかにしていくことで、採食戦略への適応とゲノム構成の変化を明らかにする。

4. 研究成果

ペプシン A 成分には遺伝子の重複が頻繁に見られる。現在遺伝子の解析がすすんだ哺乳類でその変化を見てみると、この A 成分は祖先哺乳類では 1 遺伝子だったと考えられる。イヌのゲノムでは今でもその状態が続いている。霊長類の祖先でも同様に 1 遺伝子で、この状態は新世界ザルまで続いていると考えられる。3000 万年くらい前にニホンザルなど旧世界ザルが分岐したが、それ以降、急にペプシン遺伝子増幅がおこった。この傾向は今でも進行中で、オランウータンでは遺伝子重複で数が非常に増えている。このことは、霊長類が植物食を採用して来たことと関係があると思われる。胃のタンパク質消化にとって障害物の多い植物を食べるにはどうしても酵素の量を増やす必要性があった。また、特にヒト化に向かう過程で数を増やして来たことは脳の発達と無関係ではなく、体が大型になりさらに急速に大きくなった脳の機能を維持するには、神経伝達物質や機能ペプチドの要素としてのアミノ酸の供給が必須となり、消化効率を上げることが必要だったとも考えらる。

哺乳類での A 成分はゲノムの解析でその重複や欠損の変化を追うことができる。哺乳類ゲノムには A 遺伝子の近傍に F 遺伝子がありますが、これは A 遺伝子が重複したことによってできたもので、ウシ、ネズミ、イヌなどで発現している。イヌでは A、F 遺伝子が並んで配置している。しかしアカゲザルでは F 遺伝子の一部が欠損して働かなくなり、類人猿やヒトでは完全に消失した。

他のペプシン成分でも同じような遺伝子の消長が見られる。これらのことは、ペプシン遺伝子の変化、あるいはゲノムの変化は哺乳類のいろいろな種で、食性に対応してダイナミックに変化してきたと推測される。

動物が環境に適應するために新たな食性を採用したときは、ペプシンはそれに対応して機能を変えることが生存に有利である。

5 つのペプシン成分遺伝子が重複を繰り返して進化したことは実際にこのような環境適應の結果とも言える。重複した直後ではペプシンの機能は全く同じである。特殊な消化に適應するような機能の進化はどのようにして起こるのか、ペプシン成分の構造解析をして調べた。ペプシン A は大抵のタンパク質に広く作用します。胃での消化には都合がいいと言える。これに対して B 成分はほとんどのものに作用せず、コラーゲンを強く分解した。生肉には、いわゆるすじ肉といわれる、コラーゲンに富む組織がある。グリシン、プロリンなどのアミノ酸が多く非常に分解されにくいのが、ペプシン B は分解できる。ペプシン B が生肉を食べる肉食動物に特徴的に発現しているのは、食性への適應と言える。

A と B を詳細に比べてみた。実際に酵素の機能を比べるには、活性中心と呼ばれる触媒機能の中心部の比較、特にその立体構造の比較が重要である。ペプシンの活性中心を構成するのは 30-40 くらいのアミノ酸で、全体の約 1 割である。機能に関係した重要な変化は殆どこの部分でおこることになる。B に特徴的な 2 つのアミノ酸があった。189 番目の Tyr と 219 番目の Phe である。これらのアミノ酸は側鎖が非常に大きいことが特徴である。B 成分の立体構造を見ると、活性中心の真ん中にチロシンがこぶのように飛び出ているのが分かる。この立体制約が小さい側鎖のアミノ酸、すなわちグリシンを受け入れることになり特異的な性質を生みだしていると予想される。この仮説を証明するには、2 つの大きなアミノ酸、フェニルアラニンとチロシンを A 成分に見られる小さいアミノ酸に変換してやればいいのか、実際にそうすれば B 成分の機能は A 成分に殆どおなじになった。いつごろこのような決定的なアミノ酸変異がいつ起こったのか断定できないが、有袋類のオポッサムではまだ 2 個のアミノ酸のうち的一方しか変わっていないので、真獣類の肉食類になって 2 つの変異が起こり、特徴的な機能が確立したものと思われる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

① Narita, Y., Oda, S., Takenaka, O., & Kageyama, T. (2010) Lineage-specific duplication and loss of pepsinogen genes in hominoid evolution. 査読有、Journal of Molecular Evolution 70:313-324.

② Deshapriya, R. M., Yuhashi, S., Usui, M., Kageyama, T., & Yamamoto, Y. (2010) Identification of essential residues of CTLA-2alpha for inhibitory potency. Journal of Biochemistry 査読有、147:393-404.

③ Kageyama, H., Ueda, H., Tezuka, T., Ogasawara, A., Narita, Y., Kageyama, T., & Ichinose, M. (2010) Differences in the P1' substrate specificities of pepsin A and chymosin. *Journal of Biochemistry* 査読有、147:167-174.

④ Tanji, M., Yakabe, E., Kubota, K., Kageyama, T., Ichinose, M., Miki, K., Ito, H., & Takahashi, K. (2009) Structural and phylogenetic comparison of three pepsinogens from Pacific bluefin tuna: molecular evolution of fish pepsinogens. *Comparative Biochemistry and Physiology, part B, Biochemistry and Molecular Biology* 査読有、152: 9-19.

⑤ Kang, K-H., Higashino, A., Kim, H-S., Lee, Y-T. & Kageyama, T. (2009) Molecular cloning, gene expression, and tissue distribution of adiponectin and its receptors in the Japanese monkey, *Macaca fuscata*. *Journal of Medical Primatology* 査読有、38: 77-85.

⑥ Higashino, A., Kageyama, T. (2008) Development-dependent expression of calreticulin in the brain and other tissues of the Japanese monkey, *Macaca fuscata*. *Journal of Medical Primatology* 査読有、37:303-310.

⑦ Yonezawa, S., Hanai, A., Mutoh, N., Moriyama, A., & Kageyama, T. (2008) Redox-dependent structural ambivalence of the cytoplasmic domain in the inner ear-specific cadherin 23 isoform. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 査読有、366: 92-97.

⑧ Higashino, A., Yonezawa, S. & Kageyama, T. (2008) Establishment of an ELISA system for the determination of Japanese monkey calreticulin and its application to plasma samples in macaques. *Journal of Medical Primatology* 査読有、37: 340-346.

⑨ Fujita, S. & Kageyama, T. (2007) Polymerase chain reaction detection of *Clostridium perfringens* in feces from captive and wild chimpanzees, *Pan troglodytes*. *Journal of Medical Primatology* 査読有、36:25-32

⑩ Tanji, M., Yakabe, E., Kageyama, T., Yokobori, S., Ichinose, M., Miki, K., Ito, H. & Takahashi K. (2007) Purification and characterization of pepsinogens from the gastric mucosa of African coelacanth, *Latimeria chalumnae*, and properties of the major pepsins. *Comparative Biochemistry*

and Physiology part B, Biochemistry and Molecular Biology 査読有、146: 412-420.

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

景山 節 (KAGEYAMA TAKASHI)
京都大学・霊長類研究所・教授
研究者番号：20027501

(2)研究分担者

宮部貴子 (MIYABE TAKAKO)
京都大学・霊長類研究所・助教
研究者番号：10437288

成田裕一 (NARITA YUICHI)
独立法人理化学研究所
再生科学総合研究センター・研究員
研究者番号：40360614