

I. 序 論

ペプシノゲンはタンパク質の消化酵素として知られるペプシンの前駆体である。哺乳類の成体における主な成分はペプシノゲンAとペプシノゲンCの2タイプであることが知られている(Foltmann, 1981; Kageyama et al., 1990)。

これら2成分の構成比については哺乳類間で異なることが知られている。霊長目のヒト(Tang, 1970)やマカカ属のサル(Kageyama, 1994), 偶蹄目のウシ(Chow and Kassell, 1968; Martin et al., 1982)やブタ(Ryle, 1970)の胃粘膜中ではA, C両成分を発現しており, A成分の割合の方がC成分よりも高くなっている。ウサギ目のアナウサギ(Kageyama and Takahashi, 1984)や食肉目のツキノワグマ(Kageyama et al., 1983)ではこの傾向が極端になり, C成分がほとんど発現されず, 組成がA成分に大きく偏っている。また, これとは逆に, ハツカネズミ(Esumi et al., 1978), ドブネズミ(Furihata et al., 1980), テンジクネズミ(Kageyama et al., 1992)などのゲツ歯目の動物では, A成分が全く発現せずC成分だけが合成されている。一方で, 胃粘膜中のペプシノゲン含有量が動物の食性と相関しているということも示唆されている(Suzuki et al., 1999)。

しかし, これまでに解析が行われた哺乳類の種類は限られており, 食物条件などによる個体差や哺乳類全体における多様性について把握するためにはさらに多くの哺乳動物種について解析を行うことが必須であると考えられた。

そこで本研究では, 肉食に適応していると考えられる食肉類, 反芻胃という特殊な器官を持つことにより草食に適応した反芻類, 反芻類とは異なった方法で草食に適応をしている奇蹄類, 魚食性である鯨類, 昆虫食性である食虫類と翼手類, 特殊な腸管の形態をとり草食に適応したゲツ歯類, 多様な食性に適応して肉食をも行うものも含む類人猿, および哺乳類の原始的なペプシノゲン構成を維持している可能性のある有袋類について, 胃内におけるペプシノゲンA, Cの成分構成比およびペプシノゲン含有量について解析を行った。

II. 材料および方法

食肉目のニホンイタチ (*Mustela itatsi*) 3個体, イヌ (*Canis familiaris*) 2個体, イエネコ (*Felis catus*) 1個体, 偶蹄目のヤギ (*Capra hircus*) 3個体, ウシ (*Bos taurus*) 2個体, 有袋目のハイイロジネズミオポッサム (*Monodelphis domestica*) 1個体, 奇蹄目のウマ (*Equus caballus*) 3個体, 鯨目のイシイルカ (*Phocoenoides dalli*) 3個体, 食虫目のジャコウネズミ (*Suncus murinus*) 2個体, コウベモグラ (*Mogera kobae*) 1個体, ヒミズ (*Urotricus talpoides*) 1個体, ヨツユビハリネズミ (*Atelerix albiventris*) 1個体, 翼手目のキクガシラコウモリ (*Rhinolophus ferrumequinum*) 1個体, げっ歯目のヌートリア (*Myocastor coypus*) 2個体, ハタネズミ (*Microtus montebelli*) 1個体, 霊長目のチンパンジー (*Pan troglodytes*), ゴリラ (*Gorilla gorilla*), オランウータン (*Pongo pygmaeus*) およびシロテテナガザル (*Hylobates lar*) 各一個体を用い, 死後できるだけ速やかに胃を摘出

した。なお、本研究にはすべて成体を用いた。

酵素活性の測定はAnson and Mirsky (1932)に従って行った。タンパク質の定量、胃粘膜抽出液の調製、および陰イオン交換クロマトグラフィーについては以前の報告(Narita et al., 1997)と同様の方法を用いて行った。胃粘膜抽出液中に含まれる成分の同定はProtoBlot II AP System (Promega, WI)を用いて行った。また一次抗体として用いた抗ペプシノゲンA抗体は愛知県心身障害者コロニーの米澤敏先生に、抗ペプシノゲンC抗体は名古屋市立大学の森山昭彦先生にそれぞれ分与していただいた。

Ⅲ. 結果及び考察

胃内ペプシノゲン構成

各動物種の胃粘膜抽出液中に含まれるペプシノゲン成分をDEAE-Sephacelクロマトグラフィーにより分画した結果を図1に示した。まず複数個体について解析を行なうことができたニホンイタチ、イヌ、ヤギ、ウシ、ウマ、イシイルカ、ジャコウネズミ、ヌートリアのそれぞれにおいて、個体間でクロマトグラフィー像の違いはほとんど見られなかった。これまでの報告でも、マカカ属のサルでは成体どうしであれば成分構成に個体差はないことが報告されており(Kageyama, 1994)、今回の結果と考え合わせると、一般に同種の成体間には胃内ペプシノゲン構成に大きな差はなく、さらに食物条件等によっても大きな成分構成の変化は起こらないものと推測された。

陰イオン交換クロマトグラフィーの結果、ニホンイタチから2つ、イヌから3つ、イエネコから3つ、ヤギから2-3つ、ウシから3つ、ハイイロジネズミオポッサムから2つ、ウマから4つ、イシイルカから2つ、ジャコウネズミから2つ、コウベモグラから3つ、キクガシラコウモリから3つ、ヌートリアから4つ、チンパンジーから3つ、ゴリラから3つ、オランウータンから4つおよびテナガザルから4つ、といずれの動物種からも複数の活性ピークを得ることができた。

これらのうちヤギ(Suzuki et al., 1999)、ジャコウネズミ(Narita et al., 1997)、キクガシラコウモリ(Narita et al., 2000a)、および類人猿4種(Narita et al., 2000b)については既に詳細なペプシノゲンの成分分析を報告しており、いずれもペプシノゲンA、Cを両方持つタイプであることが明らかになっている。

これら以外の動物種について抗ペプシノゲンAおよびC抗体を用いて、胃粘膜抽出液中に含まれる成分の同定を行った(図2)。その結果、ヌートリアとハタネズミ以外の動物の胃粘膜抽出液は抗A、抗Cのどちらの抗体を用いた場合にもシグナルが観察された。そのため、これらの動物はペプシノゲンAとCを両方合成しているものと考えられた。このことから、哺乳類としてはA、C両成分を発現しているタイプが有袋類をも含めて一般的であり、原始哺乳類のペプシノゲン構成もこのタイプであったと推測できる。A成分に大きく偏った構成を持つウサギ類や食肉類、逆にC成分だけしか発現していないげっ歯類は、それぞれの系統において派生的に極端な構成比へと遺伝子発現が変化していったものと考えられる。

げっ歯目のヌートリアとハタネズミの胃粘膜抽出液は抗ペプシノゲンA抗体にはほとんど反応せず、抗ペプシノゲンC抗体を用いた場合のみシグナルが検出された。このため、これらの動物においてはペプシノゲンAが合成されていないものと考えられた。げっ歯類については、これまでもハツカネズミ(Esumi et al., 1978)、ドブネズミ(Furihata et al., 1980)、テンジクネズミ(Kageyama et al., 1992)がペプシノゲンAを全く発現していない事が報告されており、ペプシノゲンAを合成できない事はげっ歯類全体に共通する特徴であり、げっ歯類の共通祖先の段階でペプシノゲンA遺伝子そのものの不活性化が起こったのではないかと考えられる。

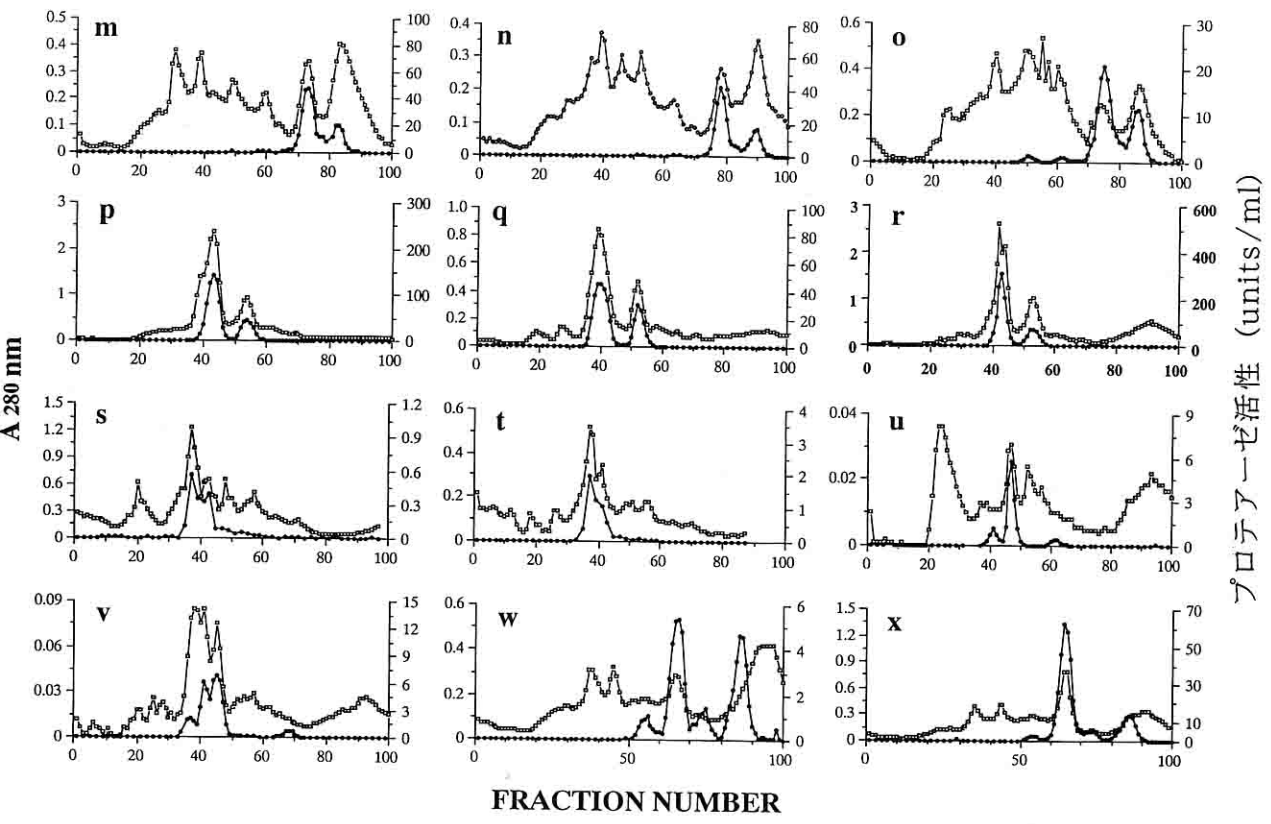
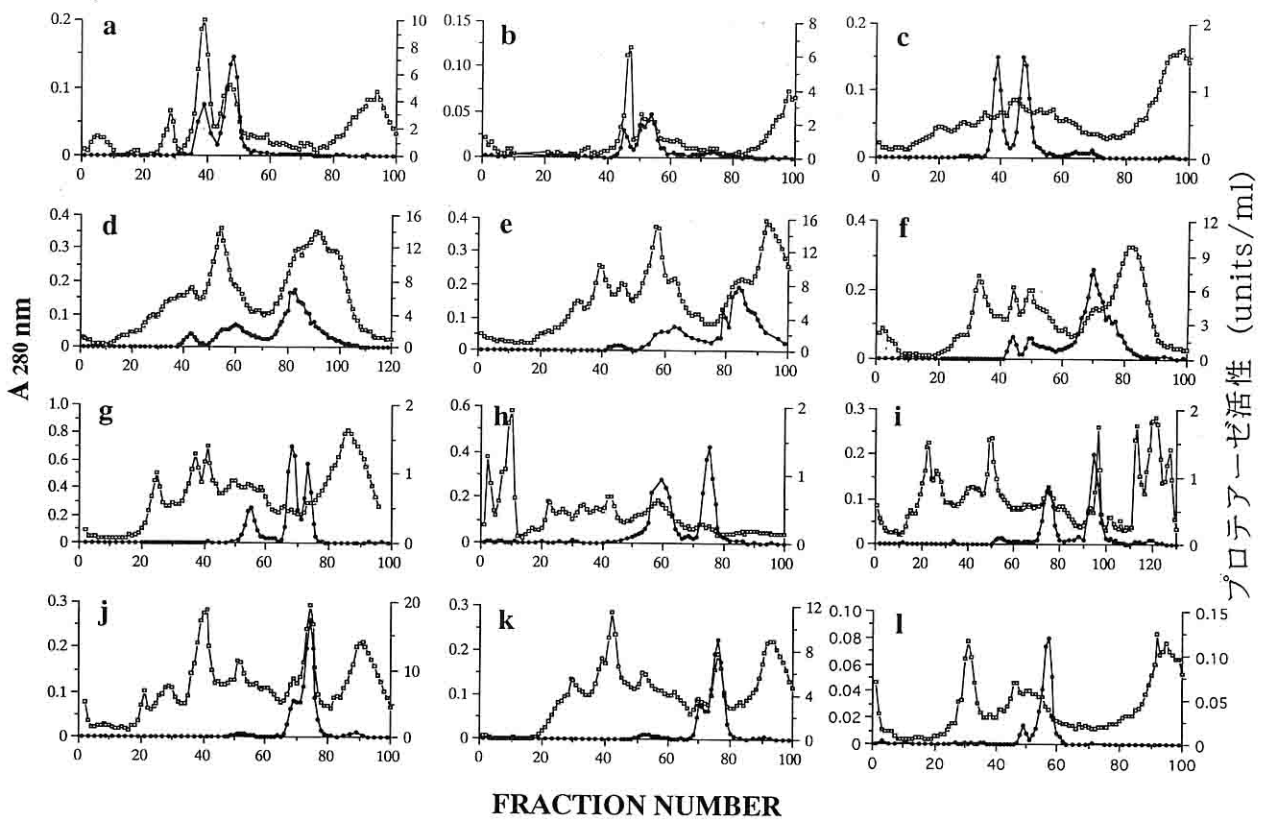


図1(次頁に続く)

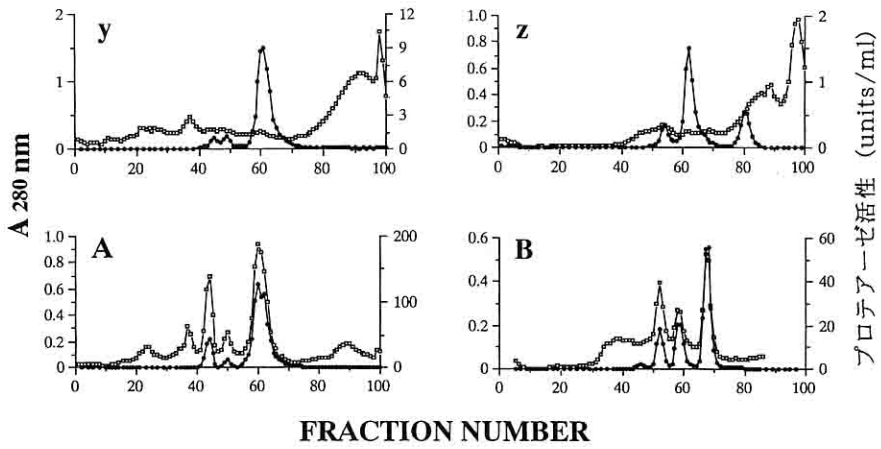


図1 各哺乳動物の胃粘膜抽出液の陰イオンクロマトグラフィー像

DEAE-Sephacelを充填したカラム (1.5 cm×30 cm) を0.01Mリン酸ナトリウムバッファーpH 7.0で平衡化し, NaClの直線濃度勾配 (0 - 0.5 M) によりタンパク質を溶出させた. 溶出液は10 mlずつのフラクションに分けてとり, 各フラクションのプロテアーゼ活性 (●), および280 nmでの吸光度 (○) を測定した. プロテアーゼ活性量は1分間に280nmでの吸光度を1上げることできる量を1 unitとした.

a-c: ニホンイタチ, d, e: イヌ, f: イエネコ, g-i: ヤギ, j, k: ウシ, l: ハイイロジネズミオポッサム, m-o: ウマ, p-r: イルカ, s, t: ジャコウネズミ, u: コウベモグラ, v: キクガシラコウモリ, w, x: ヌートリア, y: チンパンジー, z: ゴリラ, A: オランウータン, B: シロテテナガザル

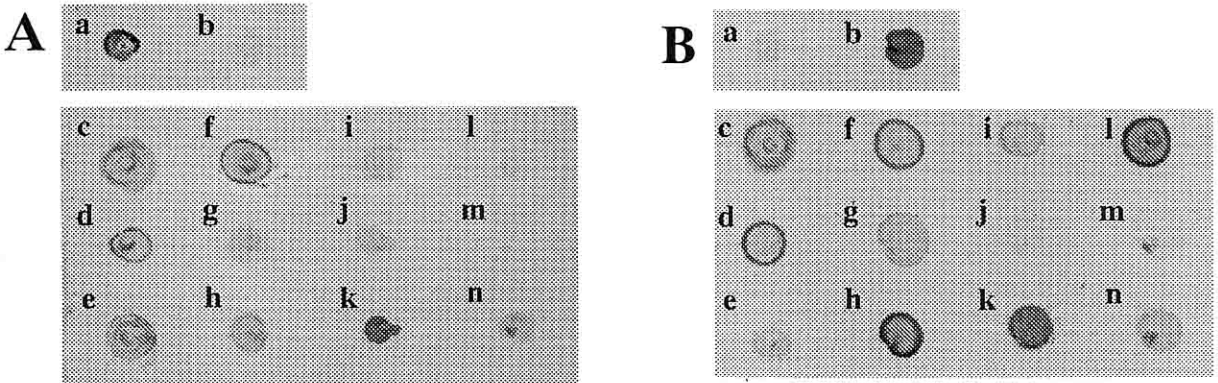


図2 胃粘膜抽出液に含まれるペプシノゲン成分の同定

A: 抗ペプシノゲンA抗体による染色, B: 抗ペプシノゲンC抗体による染色

各プロットには0.1μgのペプシノゲンを含む量の胃粘膜抽出液を用いている.

a: コントロールペプシノゲンA (キクガシラコウモリから単離されたペプシノゲンA)

b: コントロールペプシノゲンC (キクガシラコウモリから単離されたペプシノゲンC)

c: ニホンイタチ, d: イヌ, e: イエネコ, f: ウシ, g: ウマ, h: イルカ, i: コウベモグラ,

j: ヒミズ, k: ヨツユビハリネズミ, l: ヌートリア, m: ハタネズミ, n: ハイイロジネズミオポッサム

胃粘膜中のペプシノゲン含有量

各哺乳類それぞれの胃粘膜抽出液について総ペプシノゲン活性量, および可溶性タンパク量を決定し, 相対ペプシノゲン活性量 (unit/mg protein: 胃内総活性量/胃内可溶性タンパク量) を算出し, これまでに報告のある動物種のものに合わせて図3に示した.

その結果, 哺乳類の胃粘膜中の相対ペプシノゲン活性量はその動物の食性と相関があり, 植物食 (反芻類以外) > 昆虫食, 魚食, 雑食 > 肉食, 植物食 (反芻類) という傾向が見出された.

一般に哺乳類の胃における食物タンパク質の消化は様々な夾雑物の存在下において行われる。そのような夾雑物の中でも特に、植物に含まれるフェノール性物質はペプシノゲン活性に対する阻害効果を持っている事が明らかになっている(景山・手塚, 1995)。植物食や雑食性の動物では肉食の動物に比べて阻害物質を多く含む食物が胃の中に入ってくるので、それらによって阻害されてしまう活性を補うためにペプシノゲンの合成や分泌がより盛んになっていると考える事ができる。一方で典型的な植物食である反芻動物の相対比活性の値は肉食動物と同様かむしろ肉食動物よりも低いくらいの値になっていたが、これは反芻動物の第1胃内に存在する微生物類が植物に含まれている阻害物質を分解してしまう事と、食物中のタンパク質自体もかなり進んだ段階まで分解する事(小宮山ら, 1997)によるものと考えられる。

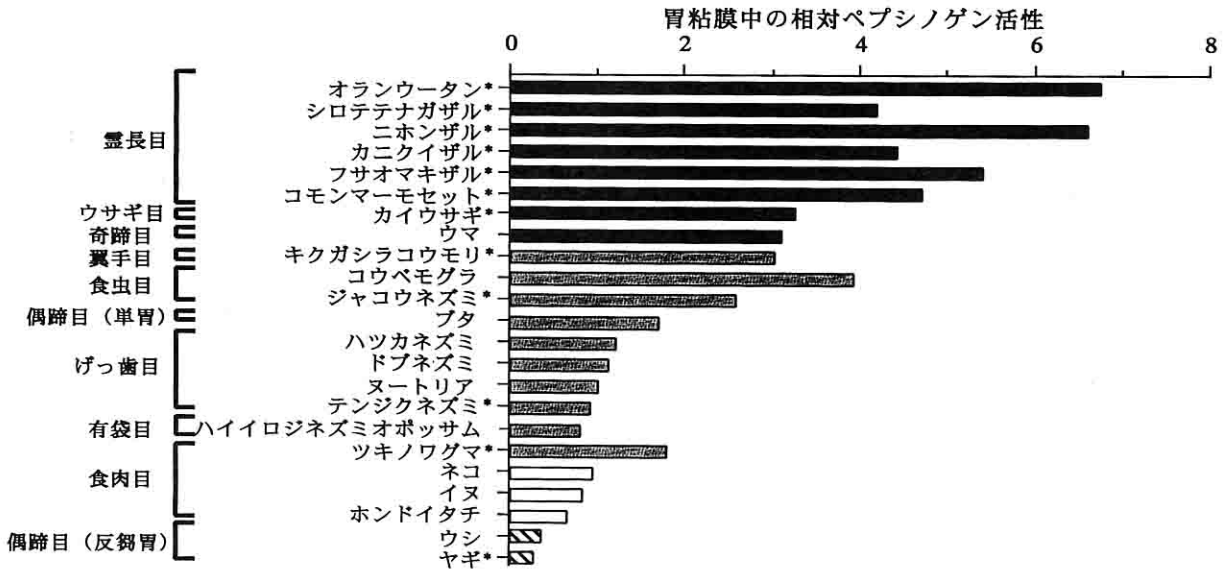


図3 哺乳類の食性と胃内ペプシノゲン含有量の関係

各哺乳類の相対ペプシノゲン活性値 (unit/mg protein: 総ペプシノゲン活性量/可溶性タンパク量) をこれまでに報告のある動物種のもの (*) を加え、分類群ごとに値の高いものから順に示した。

■: 植物食 (単胃), ▨: 雑食, 昆虫食など, □: 肉食, ▩: 草食 (反芻胃)

なお、出典は以下の通りである。オランウータン, シロテテナガザル(Narita *et al.*, 2000); ニホンザル, カニクイザル(Kageyama, 1994); フサオマキザル, コモンマーモセット (Kageyama, 2000); カイウサギ (Kageyama and Takahashi, 1984); キクガシラコウモリ (Narita *et al.*, 2000); ジャコウネズミ (Narita *et al.*, 1997); テンジクネズミ (Kageyama *et al.*, 1992); ツキノワグマ (Kageyama *et al.*, 1983); ヤギ (Suzuki *et al.*, 1999)

参考文献

- Anson, M. L. and Mirsky, A. E. (1932). The estimation of pepsin with hemoglobin. *J. Gen. Physiol.* 16 : 59-63.
- Chow, R. B. and Kassell, B. (1968). Bovine pepsinogen and pepsin. Isolation, purification, and some properties of the pepsinogen. *J. Biol. Chem.* 243 : 1718-1724.
- Esumi, H., Sato, S., Sugimura, T. and Furihata, C. (1978). Purification of mouse pepsinogens by pepstatin-affinity chromatography. *FEBS Lett.* 86 : 33-36.
- Foltmann, B. (1981). Gastric proteinases - structure, function, evolution and mechanism of action. *Essays Biochem.* 17 : 52-84.
- Furihata, C., Saito, D., Fujiki, H., Kanai, Y., Matsushima, T. and Sugimura, T. (1980). Purification and characterization of pepsinogens and a unique pepsin from rat

- stomach. *Eur. J. Biochem.* 105 : 43-50.
- Kageyama, T. (1994). Asian macaque pepsinogens and pepsins. *J. Med. Primatol.* 23 : 375-381.
- Kageyama, T., Ichinose, M., Tsukada, S., Miki, K., Kurokawa, K., Koiwai, O., Tanji, M., Yakabe, E., Athauda, S. B. P. and Takahashi, K. (1992). Gastric procathepsin E and progastricsin from guinea pig. Purification, molecular cloning of cDNAs, and characterization of enzymatic properties, with special reference to procathepsin E. *J. Biol. Chem.* 267 : 16450-16459.
- Kageyama, T., Moriyama, A. and Takahashi, K. (1983). Purification and characterization of pepsinogens and pepsins from Asiatic black bear, and amino acid sequence determination of the NH₂-terminal 60 residues of the major pepsinogen. *J. Biochem.* 94 : 1557-1567.
- Kageyama, T. and Takahashi, K. (1984). Rabbit pepsinogens. Purification, characterization, analysis of the conversion process to pepsin and determination of the NH₂-terminal amino-acid sequences. *Eur. J. Biochem.* 141 : 261-269.
- Kageyama, T., Tanabe, K. and Koiwai, O. (1990). Structure and development of rabbit pepsinogens. Stage-specific zymogens, nucleotide sequences of cDNAs, molecular evolution, and gene expression during development. *J. Biol. Chem.* 265 : 17031-17038.
- Martin, P., Trieu-Cuot, P., Collin, J. C. and B., R. D. (1982). Purification and characterization of bovine gastricsin. *Eur. J. Biochem.* 122 : 31-39.
- Narita, Y., Oda, S., Moriyama, A., Takenaka, O. and Kageyama, T. (1997). Pepsinogens and pepsins from house musk shrew, *Suncus murinus* : purification, characterization, determination of the amino-acid sequences of the activation segments, and analysis of proteolytic specificities. *J. Biochem.* 121 : 1010-1017.
- Narita, Y., Oda, S., Takenaka, O. and Kageyama, T. (2000a). Gastric digestive proteinases of the greater horseshoe bat, *Rhinolophus ferrumequinum*. *Mammal Study* 25(1) : 17-26.
- Narita, Y., Oda, S., Takenaka, O. and Kageyama, T. (2000b). Multiplicities and some enzymatic characteristics of ape pepsinogens and pepsins. *J. Med. Primatol.* 29 : 402-410.
- Ryle, A. P. (1970). The porcine pepsins and pepsinogens. *Methods Enzymol.* 19 : 316-336.
- Suzuki, M., Narita, Y., Oda, S., Moriyama, A., Takenaka, O. and Kageyama, T. (1999). Purification and characterization of goat pepsinogens and pepsins. *Comp. Biochem. Physiol.* B122 : 453-460.
- Tang, J. (1970). Gastricsin and pepsin. *Methods Enzymol.* 19 : 406-421.
- 景山節, 手塚修文 (1995). サル胃の消化酵素ペプシンと植物中の活性阻害物質. *霊長類研究* 11 : 322.
- 小宮山鐵郎, 鈴木慎二郎, 菱沼毅, 森地敏樹 (1997). 畜産総合事典. pp. 138, 朝倉書店, 東京.

(なりた ゆういち、 京都大学霊長類研究所人類進化モデル研究センター)