

# 博士学位論文要旨

## キチンオリゴマー蛍光標識法の改良と 酸性ほ乳類キチナーゼの機能に 関する研究

工学研究科 化学応用学専攻 博士後期課程  
生命工学研究室

学籍番号      bd15003

氏名            脇田 悟誌

指導教員      小山 文隆    教授

## 目次

### 第 I 章 序論

#### 第 1 節 キチンとキチナーゼ

#### 第 2 節 ほ乳類キチナーゼ

#### 第 3 節 研究目的

### 第 II 章 キチンオリゴマー蛍光標識法の改良:

生体内組織 pH 条件下における酸性ほ乳類キチナーゼの加水分解特性

### 第 III 章 生体内 pH 条件下におけるマウス酸性ほ乳類キチナーゼの糖転移活性

### 第 IV 章 総合考察

### 第 V 章 結論

## 第 I 章 序論

### 第 1 節 キチンとキチナーゼ

キチンは *N*-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc) が  $\beta$ -1,4 結合した重合体で、ほとんどの溶媒に不溶である。キチンは、甲殻類および昆虫の外骨格、寄生線虫の鞘および真菌細胞壁の主要成分である。キチナーゼは、キチンの  $\beta$ -1,4 グリコシド結合を加水分解する。細菌類、真菌類、植物、線虫と節足動物など様々な生物は、キチナーゼを合成している。これらのキチナーゼは、キチンを分解することで、自身の防御あるいは炭素およびエネルギー源として利用することに重要であると考えられている。

### 第 2 節 ほ乳類キチナーゼ

ほ乳類はキチンを合成しない。しかし、マウスとヒトは、キトトリオシダーゼ (chitotriosidase, Chit1) と酸性ほ乳動物キチナーゼ (acidic mammalian chitinase, AMCCase) とよばれる二種の活性を持つキチナーゼを発現する。Chit1 は最初にクローニング、精製されたほ乳類キチナーゼである。AMCCase は、Chit1 に次いで発見されたほ乳類キチナーゼで、その酸性領域での等電点により命名された。

Chit1 と AMCCase は、GH18 に属している。GH18 酵素は、保存されている触媒ドメインのアミノ酸配列に類似性が有り、 $(\beta/\alpha)_8$ -TIM バレルの基本構造を持つ一群のグループで、細菌類キチナーゼと高い配列相同性を示す。このファミリーには、キチナーゼに構造が似ているがキチナーゼ活性を欠損しているキチナーゼ様タンパク質 (chitinase-like proteins) も含まれている。

AMCCase は、喘息モデルマウスおよびアレルギー性肺炎誘導モデルマウスにおいて発現が顕著に増加し、さらに、免疫応答に関連する特定の病理学的条件下で発現が増加することから注目を集めている。

AMCCase mRNA はマウスの胃において高いレベルで発現されている。AMCCase の発現レベルは、胃液の主要な消化酵素であるペプシンの前駆体であるペプシノーゲンに匹敵することから、この酵素の消化における役割が示された。最近、当研究室の大野らは、AMCCase が、マウス消化系で、プロテアーゼ耐性の主要な糖質分解酵素であることを報告した。

当研究室の報告で、AMCCase mRNA が、胃の他に、顎下腺と肺で高度に発現することが示されている。さらに、組換え AMCCase およびその触媒ドメインは、pH 2.0 で高い活性を示し、主に  $(\text{GlcNAc})_2$  を生成し、弱酸性から中性の pH (pH 5.0-7.0) でも、低いながらもキチナーゼ活性を示した。しかし、AMCCase をめぐる研究では中性領域でのキチナーゼ活性は十分調べられていない。

### 第 3 節 研究目的

前述の通り、AMCase は、生体内において食物消化や特定の疾患と関与していると考えられている。しかし、AMCase の増加や生理作用のメカニズムについていまだ不明な点が多い。そこで私は、特定の病理学的条件下で過剰発現された AMCase が、特異的分解産物を生成し得ると仮定した。しかし、生体内での AMCase とキチンオリゴマーの生成について十分調べられていない。

本研究では、pH 2.0-8.0 のキチン基質と酵素をインキュベートした後、オリゴマーの還元末端を蛍光物質で標識する方法 (Jackson, 1990) に基づく、Fluorophore-Assisted Carbohydrate Electrophoresis (以下、FACE と略) を用いて AMCase のキチナーゼ活性を分析した。FACE は、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) や核磁気共鳴 (NMR) と比較しても、非常に高感度であり、微量のオリゴマーも検出できる。

この研究で、生体内条件下における AMCase によるキチンの主な分解産物の解析を行った。

## 第 II 章 キチンオリゴマー蛍光標識法の改良：生体内組織 pH 条件下における酸性ほ乳類キチナーゼの加水分解特性

本研究において、オリゴ糖分析のために確立された fluorophore 修飾糖電気泳動法を用いて、弱酸性から中性条件下における AMCase によるキチン分解産物を分析した。私は、キチンオリゴ糖マーカで定義される生成物より移動度の遅い特異的断片反である反応副産物が pH 5.0-8.0 で、生成されることを見出した。そして、オリゴ糖の蛍光標識混合液を事前に濃酢酸で酸性化することによって、この副反応を抑制するキチンオリゴ糖分析の改良方法を確立した。この改良法は、キチンオリゴ糖を特異的に検出し、最大 50 nmol までのキチンオリゴ糖の定量が可能であった。この方法を用いることで、AMCase が、強酸性から中性の条件下で、*N*-アセチル-D-グルコサミン(GlcNAc) の二量体 [(GlcNAc)<sub>2</sub>] を生成することを見出した。さらに、AMCase が生理学的条件下で (GlcNAc)<sub>2</sub> と (GlcNAc)<sub>3</sub> を生成することも見出した。

## 第 III 章 生体内 pH 条件下におけるマウス酸性ほ乳類キチナーゼの糖転移活性

AMCase はキチンを分解する酵素であり、pH 2.0 で最も高く、pH 8.0 までその活性を有する。第 II 章で、AMCase が生理学的条件下で (GlcNAc)<sub>3</sub> が生成することを報告したが、なぜ (GlcNAc)<sub>3</sub> が生成したのか不明であった。そこで、本章ではその解析を行った。

天然および人工キチン基質を AMCase と pH 2.0 または pH 7.0 の条件下で反応し、その産物を改良 FACE 法を用いて解析した。マウス AMCase はすべての pH におい

て、主に (GlcNAc)<sub>2</sub> を生成し、pH 2.0 と比較して pH 7.0 でより多くの (GlcNAc)<sub>3</sub> を生成した。また人工基質を用いた実験において糖転移活性を示す結果を得た。この結果は AMCCase が、加水分解活性と同様に糖転移活性を有し、生体内条件下や肺なので特定の組織のいて新しい役割があると考えられる。

#### 第 IV 章 考察

AMCCase は、活性の至適が pH 2.0 である。これまでの研究で、天然のキチン基質を用い、AMCCase は pH 2.0 で主に (GlcNAc)<sub>2</sub> を生成すると報告されている。

AMCCase は、マウスの胃で大量に合成され、マウスの胃と腸の条件下で、消化酵素として機能することが示されている。これまでの遺伝子発現解析により、AMCCase mRNA は唾液腺および肺組織においても高レベルで発現されることが報告されている。また最近、マウス AMCCase とそのホモログであるニワトリ Chia は、消化管で消化酵素として機能することが示された。

AMCCase は、誘発された喘息マウスモデルおよびアレルギー性肺炎の抗原誘発マウスモデルにおけるような、免疫応答に関連する特定の病理学的条件下での発現の増加が示されている。最近、AMCCase ノックイン/ノックアウトレポーターマウスを用いて、肺上皮細胞に発現する AMCCase は、キチンオリゴマーを除去し、加齢に関連した肺の線維化を防止すると報告されている。その為、AMCCase は、消化および生体防御において重要な生理学的役割を果たすと考えられている。

キチンは生体内において酵素の働きにより分解されるが、その分解産物により異なる活性を有することが報告されている。しかしながら、キチンは基本的に生体内においてアレルギー反応を起こさない物質であると報告されている。キチンは AMCCase が消化酵素として報告されるまで、基本的に分解されない食物繊維であると考えられてきた。

キチン・キトサンオリゴマーは、ほ乳動物細胞において、様々な生理活性を有することが知られている。キチンとキトサンの両方のオリゴマーには抗癌および抗炎症特性が報告されている。しかしながら、AMCCase の分解産物である (GlcNAc)<sub>2</sub> や GlcNAc には明瞭な生理活性の報告はない。

以上の結果は、キチンの分解において AMCCase が種々の生理活性を有するオリゴマーを生産せずに (GlcNAc)<sub>2</sub> を生成していると考えられ、その結果は酵素学的な性質と一致する。その結果、現在に至るまで AMCCase がなぜ特定の病理学的条件下で発現量を増加しているのかわかっていない。そのため私は、特定の病理学的条件下で過剰発現された AMCCase が、特異的分解産物を生成し得ると仮定した。しかし、生体内でのキチンオリゴマーの生成については不明な点が多い。

そこで、私は、糖の還元末端の蛍光標識と続く高分離能 PAGE を基にした方法 (Jackson, 1990) を用いて AMCCase の特性解析を行った。この方法は非常に高感度で

あり、微量の糖の検出にも優れており、上記の条件の検出に適していると考えた。

私の研究において、AMCase は酸性から中性条件下において加水分解活性と糖転移活性を有することを報告した。pH 2.0 では、この酵素は糖転移酵素として作用するのではなく、加水分解酵素として作用するようである。たとえ糖転移反応が酸性環境で起こるとしても、加水分解活性は糖転移活性よりも優位である。これに対し、中性条件下では、マウス AMCase は、酸性条件と比較し高い糖転移活性および弱い加水分解活性を示した。

今回の研究において AMCase の直接的なキチン・キトサンオリゴマーの生成を確認することはできなかった。しかし、AMCase が生体内条件下や肺なので特定の組織のいて新しい役割を有する可能性を強く示唆した。

## 第 V 章 結論

本研究では、AMCase は、喘息、アレルギー性炎症および食物消化を含む様々な病態生理学的状態に関与している。AMCase は pH 2.0 で最も高いキチナーゼ活性があり、その活性は pH が上昇するにしたがって低下し、pH 8.0 まで認められる。本学位論文では、まず、Jackson によって、オリゴ糖分析のために開発された FACE 法を用いて、弱酸性から中性条件下における AMCase によるキチン分解産物を分析した。その過程で、キチンオリゴ糖マーカの移動度よりも遅い特異的反応副産物が pH 5.0-8.0 で、生成されることを見出した。この問題を回避するため、事前に酸性化することによって、この副反応を抑制するキチンオリゴ糖分析の改良 FACE 法を確立した。この改良法は、キチンオリゴ糖を特異的に検出し、0.1-50 nmol の範囲で定量が可能であった。

次に、この方法を用いて、AMCase が強酸性から中性の条件下で、(GlcNAc)<sub>2</sub> を生成することを見出した。さらに、我々は、AMCase が生理学的条件下で (GlcNAc)<sub>2</sub> と (GlcNAc)<sub>3</sub> を生成することを見出した。

つぎに、(GlcNAc)<sub>3</sub> の生成メカニズムを各種キチン基質と改良 FACE 法を用いて詳細に解析した。マウス AMCase はすべての pH において主に (GlcNAc)<sub>2</sub> を生成し、pH 2.0 と比較して pH 7.0 でより多くの (GlcNAc)<sub>3</sub> を生成した。この生成物は、糖転移反応によるものであることを示した。

以上の結果は、マウス AMCase が、キチンの加水分解活性と同様に糖転移活性を有し、生体内条件下で新しい役割を有する可能性を強く示唆した。