

博士学位論文

氏名(本籍)	大川 一明 (東京都)
学位の種類	博士 (工学)
学位記番号	博甲 第 143 号
学位授与年月日	平成 29 年 3 月 31 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項
学位論文題目	ヒト酸性ほ乳類キチナーゼの活性喪失と復活 に関する研究

論文審査委員

主査 小山 文隆 教授

副査 今村 保忠 教授

// 南雲 紳史 教授

// 澤村 直哉 早稲田大学准教授

工学院大学大学院

博士学位論文

ヒト酸性ほ乳類キチナーゼの
活性喪失と復活に関する研究

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 bd14001

氏名 大川 一明

指導教員 小山 文隆 教授

目次

第 I 章 研究の背景.....	4
第 1 節 キチン	4
第 2 節 キチナーゼ	5
第 3 節 ほ乳類キチナーゼ	5
第 4 節 AMCCase の生物・医学的役割	6
第 5 節 研究目的	7
第 II 章 ヒト AMCCase の活性の喪失	8
第 1 節 序論	8
第 2 節 実験方法	9
マウス AMCCase の発現ベクターの構築.....	9
ヒト AMCCase の発現ベクターの構築.....	9
PCR を用いた部位特異的変異の導入	13
キメラタンパク質発現ベクターの作製.....	13
融合タンパク質の大腸菌での発現と精製.....	20
SDS ポリアクリルゲル電気泳動とウェスタンブロット	20
キチナーゼ活性の測定.....	20
コロイダルキチンの分解.....	21
第 3 節 実験結果および考察	22
ヒト AMCCase のキチナーゼ活性はマウス AMCCase よりも非常に低い ...	22
ヒト AMCCase の N 末端領域がキチナーゼ活性を低下させる.....	28
第 III 章 Nonsynonymous SNPs を利用した AMCCase の活性の復活	34
第 1 節 序論	34
第 2 節 実験方法	38
ヒト AMCCase variants A, B, C/B の作製	38
マウス AMCCase mutants の作製.....	43
SDS ポリアクリルゲル電気泳動とウェスタンブロット	44
キチナーゼ活性の測定.....	44

コロイダルキチンの分解.....	44
第 3 節 実験結果および考察	47
ヒト AMCCase のキチナーゼ活性はアミノ酸置換によってコントロールされている.....	47
M61R の変異導入はマウス AMCCase への変異導入はキチナーゼ活性を喪失させる.....	53
第 IV 章 AMCCase の進化的解析.....	59
第 1 節 序論	59
第 2 節 実験方法	59
系統樹の作製.....	59
マウス AMCCase mutants の作製.....	59
SDS ポリアクリルゲル電気泳動とウェスタンブロット	60
キチナーゼ活性の測定.....	60
コロイダルキチンの分解.....	60
DNA 配列の比較	60
dN/dS (ω) の算出	60
第 3 節 実験結果および考察	62
M61 は強いキチナーゼ活性にとって大事なアミノ酸残基である	62
ヒト上科における AMCCase の進化的解析.....	70
第 V 章 総合考察	74
第 VI 章 結論.....	78
参考文献.....	79
謝辞.....	84

第 I 章 研究の背景

第 1 節 キチン

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 (図 1) である。キチンの構造は、セルロースと類似の構造であるが、2 位炭素の水酸基がアセトアミド基になっている。キチンは、甲殻類や昆虫の外骨格、寄生虫や真菌類の細胞壁の主要構成成分で、外敵からの防御として機能する [1, 2]。節足動物は自然界に膨大に存在しているので、その外骨格の主要な構成成分であるキチンはセルロースに次いで二番目に豊富に存在するバイオマスである。

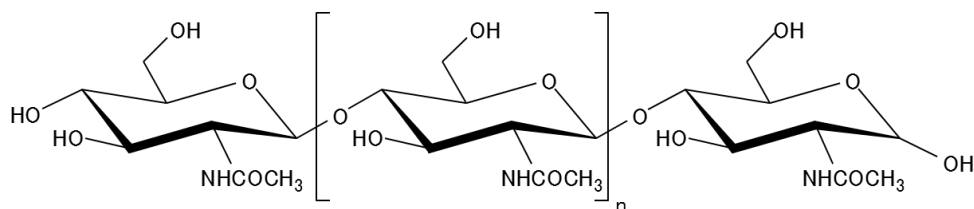


図 1. キチンの構造

キチンの分子間あるいは分子内で形成される水素結合により不溶性となる。

キチンは、3 つの異なる結晶形態をとる。それらは、 α -、 β -、 γ -キチンとよばれている。 α -キチンは、最も一般的なキチン鎖の形状である。キチン鎖は、逆平行配列で配置されており、キチン鎖の分子間及び分子内の水素結合が密に形成されている。これにより、 α -キチンは、強固な構造をとり、水中で膨潤することがない [3-5]。

β -キチンは、キチン鎖が並列に形成されている。これにより、 β -キチンは、疎性充填された分子となり、小分子を組み込むことで、様々な結晶性複合体を形成する [6]。 β -キチンは、高い水和度と還元された強固な分子密度は柔軟性の高いキチン質となる [7]。そして、 γ -キチンは、平行鎖と逆平行鎖が混合した構造となっており、 β -キチンと同様に柔軟性の高いキチン質となる。

このように、キチンは、3 種類の異なる構造をとる。 α -キチンは甲殻類、 β - および γ -キチンは無脊椎動物で多く見られる [8]。

キチンは、化学的あるいは酵素的に脱アセチル化するとキトサンへと変換される。キトサンは、キチン骨格中の 2 位の炭素上のアセトアミド基を脱アセチル化することにより、第一級アミノ基に変換されている。キトサンは、工業的には、カニやエビなどの甲殻類の外骨格から得られるキチンを、濃アルカリ中での煮沸処理等により脱

アセチル化して得る。

キチンとキトサンは、生体適合性、生分解性、非毒性、フィルム形成能力等の化学的特性を有している [9]。

第 2 節 キチナーゼ

キチナーゼは、キチンの β -1,4 グリコシド結合を加水分解する酵素である。キチナーゼは、キチン鎖を内部または非還元末端からオリゴ糖に分解する [10]。

すべてのキチン含有生物は、キチンのリモデリングを可能にするためにキチナーゼを発現している [11, 12]。他方、キチンを有していない生物においてもキチナーゼが報告されている [13, 14]。そのため、キチナーゼは細菌類、真菌類、線虫、節足動物など様々な生物が合成している。

キチナーゼは、キチン鎖のリモデリングに加え、他の目的のためにも利用されている。例えば、いくつかの細菌種はエネルギー源として使用できる GlcNAc モノマーを最終的に遊離するためにキチナーゼを合成している [10]。また、植物は、キチンを生産しないがキチナーゼを産生する [15, 16]。植物は、キチン含有病原体に対する防御としてのキチナーゼを合成していると考えられている。

第 3 節 ほ乳類キチナーゼ

ほ乳類は、キチンを合成しないにもかかわらず、キチナーゼを合成している。マウスとヒトでは、活性を持つキチナーゼとしてキトトリオシダーゼ (chitotriosidase, Chit1) と酸性ほ乳類キチナーゼ (acidic mammalian chitinase, AMCCase) が同定されている [17-20]。本学位論文では、これら 2 種類のキチナーゼをほ乳類キチナーゼとよぶ。

Chit1 は、ほ乳類で最初に発見されたキチナーゼである [17, 21]。Chit1 のキチナーゼ活性は、常染色体劣性遺伝のリソソーム蓄積症であるゴーシェ病患者由来の血漿検体に関する生化学的研究で発見された [21]。その後、Chit1 は、ゴーシェ病患者の脾臓から精製され [17]、その cDNA がクローニングされた [22]。また、血漿中の Chit1 は、ゴーシェ病患者のマクロファージが由来となっていることが明らかになっている [18]。血漿中の Chit1 のキチナーゼ活性は、症候性ゴーシェ病患者では有意に増加するが、無症候性患者では増加しない [21]。臨床的知見として、ゴーシェ病患者のグルコセレブロシダーゼの補充療法で、血漿中の Chit1 のキチナーゼ活性が劇的に低下する [21]。このことから、Chit1 のキチナーゼ活性は、治療マーカーとして広く利用されている [11]。

Chit1 は、分子量 50 kDa の完全長とプロテアーゼ処理で生成される 39 kDa の 2 種類の形態が存在する。Chit1 は、N 末端側の 39 kDa からなる触媒ドメイン (catalytic domain, CatD) と C 末端側にキチン結合ドメイン (chitin-binding domain, CBD) から構成される。常染色体劣性遺伝性の Chit1 の欠損は、白人 (コーカサス人) で一般的に認められる [23]。Chit1 の生理的役割は不明だが、キチン含有生物からの生体防御と考えられている [23]。

常染色体劣性遺伝性の Chit1 欠損の白人でキチナーゼ活性が検出されたことをきっかけに、もう一つのほ乳類キチナーゼである AMCCase 発見された [18]。この酵素は、その酸性の等電点から、酸性ほ乳類キチナーゼ (acidic mammalian chitinase, AMCCase) と命名された [18]。この経緯から、AMCCase は Chit1 の代償的役割があると考えられている。

Chit1 と AMCCase は、キチン分解活性を有し、主に GlcNAc ダイマー [(GlcNAc)₂] を生成する。そして、これらの酵素质分子は、キチナーゼの阻害剤であるアロサミジンへの感受性が報告されている [24]。AMCCase と Chit1 の配列類似性は高いが、AMCCase は特徴的な pH 活性プロファイルを示し、強酸性の pH 2 でキチン分解活性が最も高い。他方、Chit1 は、pH 5 付近に至適を有し、pH 2 ではキチナーゼ活性を示さない [17, 25, 26]。

Chit1 と AMCCase は、糖質加水分解酵素ファミリー 18 に属しており [The carbohydrate active enzymes (CAZy) database, <http://www.cazy.org/>], ファミリー18 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、(β/α)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 [15]。

第 4 節 AMCCase の生物・医学的役割

AMCCase は、特定の病態下で発現が変動することから特に注目されている [27]。AMCCase mRNA とタンパク質レベルの上昇は喘息モデルマウス、抗原誘導性のアレルギー性肺炎マウスモデルで見られている。ヒトにおいて、AMCCase はアレルギーを暴露された喘息患者の肺、および致死的喘息患者の肺胞マクロファージで増加する [27]。また、ヒト AMCCase では、一塩基多型 (single nucleotide polymorphism, SNPs) に基づく AMCCase variants が同定されている [13, 14]。ヒトでは、AMCCase の特定の多型と気管支喘息との連関が報告されている [28]。

AMCCase は、マウスの組織では胃で最も多く発現している。また、AMCCase は、上述のように pH 2.0 で強力なキチナーゼ活性を示し、胃内容物中のキチン含有病原体に対する宿主防御の一部として、さらに、キチンを分解する消化酵素として機能し得

ることを示唆している [18, 29-31]。ごく最近, AMCase は, マウスの消化器系でキチンを分解する消化酵素であることが報告された [32]。

第 5 節 研究目的

ヒト AMCase は, マウス AMCase とアミノ酸配列の相同性が 90% でよく似ている。しかし, ヒトとマウスの AMCase では, その性質がかなり異なる。加えて, ヒト AMCase には, 第 4 節で述べたように, アミノ酸置換を伴う一塩基多型 [nonsynonymous SNPs (nsSNPs)] が存在する。ヒト AMCase variants のアミノ酸配列をマウス AMCase と比較すると, ヒト AMCase でのアミノ酸置換は, マウス AMCase のアミノ酸と一致している場合と, 一致していない場合があった。しかし, ヒトにおける AMCase のキチナーゼ活性の遺伝的制御に関する知見, 生体内での生物・医学的役割に関する知見は共に限られている。

本研究において, 大腸菌の系を用いて発現したヒトとマウス AMCase について, その酵素機能の比較とヒト AMCase で自然に生じた nsSNPs にコードされた AMCase variants によるキチナーゼ活性の変化について詳細に検討した。

第 II 章 ヒト AMCCase の活性の喪失

第 1 節 序論

ヒト AMCCase とマウス AMCCase のアミノ酸配列は、同一性 82%、類似性 86% で、両分子は非常に似ている [18]。しかし、ヒト AMCCase のキチナーゼ活性の至適 pH が pH 4 であるのに対し、マウス AMCCase は pH 2 であるなど、報告されている生化学的な性質は異なる [18, 30, 33]。

ヒトとマウスの AMCCase のキチナーゼ活性の詳細な比較には、精製したタンパク質が必要である。これまで、AMCCase の生化学的解析には、ほ乳類と昆虫の培養細胞を用いた発現系と大腸菌を用いた発現系が用いられてきた [18, 24, 27, 28, 33-37]。

私は、すでに大腸菌で N 末端側に Protein A, C 末端側に V5 エピトープと (His)₆ タグ配列を融合し、活性のある AMCCase (Protein A-AMCCase-V5-His) をペリプラズム空間に生産を可能にする大腸菌発現系を確立した [31, 38]。マウス AMCCase の cDNA を、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) 由来 Protein A プロモーター、Protein A のシグナル配列と短縮型 Protein A 持つ発現ベクターである pEZZ18 に組み込み、発現を試みた。そして、ペリプラズム画分に最も多く Protein A-AMCCase-V5-His が存在することを明らかにした [38]。ペリプラズム画分の Protein A-AMCCase-V5-His を IgG セファロースを用いて精製した。この大腸菌組換え AMCCase のキチナーゼ活性は、CHO 細胞で発現した AMCCase-V5-His のキチナーゼ活性に匹敵した。さらに、組換え AMCCase はキチンビーズに結合し、コロイダルキチンを分解し、主に (GlcNAc)₂ を遊離することを示した。このように、大腸菌で発現した Protein A-mouse AMCCase-V5-His は、CHO 細胞で発現した AMCCase に相当する機能を有していた [38]。したがって、この大腸菌組換えタンパク質は、ヒトとマウス AMCCase の生化学的機能を詳細に解析する実験に用いることが出来る。

本研究において、ヒトとマウス AMCCase を N 末端に Protein A, C 末端に V5 エピトープと (His)₆ を付加した融合タンパク質 (ProteinA-AMCCase-V5-His) として発現し、そのキチナーゼ活性を比較した。また、ヒト AMCCase のキチン分解活性の減少の原因となる領域の決定するため、ヒトとマウス AMCCase 間でキメラタンパク質を発現した。

第 2 節 実験方法

マウス AMCase の発現ベクターの構築

マウストータル RNA マスターパネル (Clontech) から得た胃の total RNA を用い、逆転写酵素 (Invitrogen) で RNA を cDNA に逆転写した。マウス AMCase cDNA を KOD Plus DNA polymerase (Toyobo) と EcoRI と XhoI の制限酵素部位を付加したオリゴヌクレオチドプライマー (Sigma-Aldrich Life Science Japan) (塩基配列は、表 1 を参照のこと) を用いて PCR で増幅した。PCR 産物は Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) を用いて精製し、EcoRI と XhoI で切断した。その後、1.5% アガロースゲル電気泳動で DNA 断片を分離し、Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System で精製し、pcDNA3.1/V5-His C ベクター (Invitrogen) に導入した。リバープライマーは C 末端に pcDNA3.1/V5-His C ベクター由来の V5-His が付加するように設計した。作製した pcDNA3.1/pre-mouse AMCase-V5-His が、マウス AMCase precursor-V5-His (pre-mouse AMCase-V5-His) の塩基配列を有していることを、ABI PRISM Big-Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit と 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いて確認した。

シグナル配列が除去された成熟マウス AMCase-V5-His の cDNA は、pcDNA3.1/pre-mouse AMCase-V5-His を鋳型に、EcoRI と SalI の制限酵素部位を付加したプライマーと KOD Plus DNA polymerase を用いた PCR で増幅して取得した。PCR 産物を EcoRI と SalI で切断し、同じ制限酵素で切断した pEZZ18 (GE Healthcare) に導入した (図 2)。cDNA のインサートが含まれているプラスミドを選択し、上記と同様の方法で配列決定を行った。このように作製したプラスミド DNA (pEZZ18/pre-Protein A-mouse AMCase-V5-His) を *E. coli* BL21 (DE3) (Novagen) に導入した。

ヒト AMCase の発現ベクターの構築

ヒト AMCase cDNA をヒトの胃より調製した total RNA を鋳型にして逆転写酵素で cDNA に逆転写した。シグナル配列が除去された成熟ヒト AMCase-V5-His の cDNA は、pcDNA3.1/pre-human AMCase-V5-His を EcoRI と XhoI の制限酵素部位を付加したプライマー (表 2) と KOD Plus DNA polymerase を用いた PCR で増幅した。この PCR 産物を、EcoRI と XhoI で切断した。pEZZ18/pre-Protein A-AMCase-V5-His (mouse version) を EcoRI と XhoI で切断し、mouse AMCase cDNA を除き、human AMCase cDNA を導入した。cDNA のインサートが含まれているプラスミドを選択し、上記と同様の方法で配列決定を確認した (図 2 と図 3)。このように構築した大腸菌発現プラスミド DNA (pEZZ18/pre-Protein A-human AMCase-V5-His) で *E. coli* BL21 (DE3) に形質転換した。

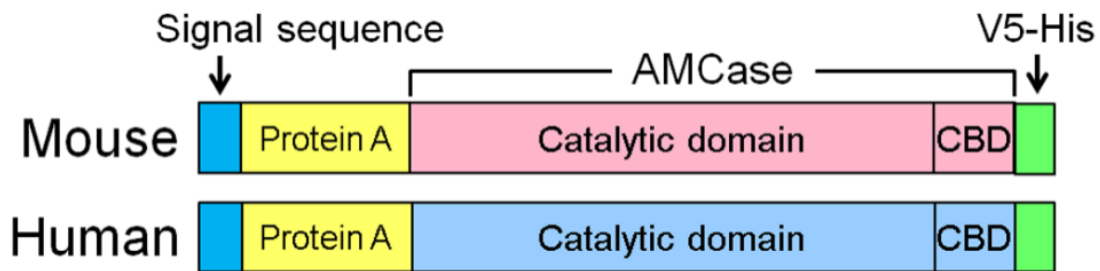


図 2. 大腸菌で発現したヒトとマウス AMCase の融合タンパク質の模式図

ヒトとマウス AMCase は、分子量約 50 kDa の分泌タンパク質で、N 末領域の catalytic domain (CatD) と C 末領域の chitin binding domain (CBD) より構成されている。発現した組換えタンパク質は、pre-Protein A-AMCase-V5-His の構成である。組換えタンパク質は N 末端に Protein A を付加しているため、IgG セファロースに親和性がある。C 末端に V5-His が付加されているため、V5 抗体を用いた検出が可能であり、Ni セファロースに親和性がある。図中のそれぞれの色は、青色がシグナル配列、黄色は Protein A、ピンクはマウス AMCase、水色はヒト AMCase、緑色は V5 エピトープと (His)₆ を示す。

A. Pre Protein A-human AMCase (wild type)-V5-His

648 amino acids 71,408 dalton

MKKKNIYSIRKLGVGIA SVTLG TLLISGGVTPAANA AQHDEAVDNKFNKEQ
QNAFYEILHLPNLNEEQRNAFIQSLKDDPSQSANLLAEAKKLND AQAPKVD
NKFNKEQQNAFYEILHLPNLNEEQRNAFIQSLKDDPSQSANLLAEAKKLND
AQAPKVDANSYQLTCYFTNWAQYRPGLGRFMPDNIDPCLCTHLYAFAGR
QNEITTIEWNDVTLYQAFNGLKNKNSQLKTLLAIGGWNFGTAPFTAMVST
PENRQTFITSVIKFLRQYEFDGLDFDWEYPGSRGSPQDKHLFTVLVQEMR
EAFEQEAKQINKPRLMVTA AVAAGISNIQSGYEIPQLSQYLDYIHVM TYDLH
GSWEGYTGENSPLYKYPTDTGSNAYLNVDYVMNYWKDNGAPA EKLIVGFP
TYGHNFILSNPSNTGIGAPTS GAGPAGPYAKESGIWAYYEICTFLKNGATQG
WDAPQEV PYAYQGNVWVG YDNIKSF DIKAQWLKHNKFGGAMVWAIDLDD
FTGTFCNQGKFPLISTLKKALGLQSASCTAPAQPIEPITAAPSGSGNGSGSSSS
GGSSGGSGFCAVRANGLYPVANNR NAFWHCVNGV TYQQNCQAGLVFDTSC
DCCNWA ARGHPFEGKPIP NLLGLDSTRTGHHHHHH

B. Mature Protein A-human AMCase (wild type)-V5-His

612 amino acids 67,782 dalton

AQHDEAVDNKFNKEQQNAFYEILHLPNLNEEQRNAFIQSLKDDPSQSANLL
AEAKKLND AQAPKVDNKFNKEQQNAFYEILHLPNLNEEQRNAFIQSLKDD
PSQSANLLAEAKKLND AQAPKVDANSYQLTCYFTNWAQYRPGLGRFMPDN
IDPCLCTHLYAFAGRQNEITTIEWNDVTLYQAFNGLKNKNSQLKTLLAIG
GNWFGTAPFTAMVSTPENRQTFITSVIKFLRQYEFDGLDFDWEYPGSRGSP
PQDKHLFTVLVQEMREAFEQEAKQINKPRLMVTA AVAAGISNIQSGYEIPQL
SQYLDYIHVM TYDLHGSWEGYTGENSPLYKYPTDTGSNAYLNVDYVMNY
WKDNGAPA EKLIVGFPTYGHNFILSNPSNTGIGAPTS GAGPAGPYAKESGIW
AYYEICTFLKNGATQGW DAPQEV PYAYQGNVWVG YDNIKSF DIKAQWLKH
NKFGGAMVWAIDLDDFTGTFCNQGKFPLISTLKKALGLQSASCTAPAQPIE
PITAAPSGSGNGSGSSSSGGSSGGSGFCAVRANGLYPVANNR NAFWHCVNGV
TYQQNCQAGLVFDTSCDCCNWA ARGHPFEGKPIP NLLGLDSTRTGHHHH
HH

図 3. 大腸菌で発現した組換えヒト AMCase の推定アミノ酸配列と分子量

それぞれの色は、青色がシグナル配列、黄色は Protein A、水色はヒト AMCase、緑色は V5 エピトープと (His)₆ を示す。

表 1. マウス AMCase 発現ベクターの構築に用いたプライマー

Primer name	Sequence
Eco mature mouse AMCase Fw	5'-CATGGAATTCGTACAATCTGATATGCTATTTACC -3'
XhoI mouse AMCase Rv	5'-GTGACCTCGAGCTGGCCAGTTGCAGCAATTACAGC-3'

表 2. ヒト AMCase 発現ベクターの構築に用いたプライマー

Primer name	Sequence
Eco mature human AMCase Fw	5'-CATGGAATTCGTACCAGCTGACATGCTACTTCACC -3'
XhoI human AMCase Rv	5'-GTGACCTCGAGCTGCCAGTTGCAGCAATCACAGC -3'

PCR を用いた部位特異的変異の導入

本実験では、PCR を用いた突然変異導入法を用いて、キメラ体と変異体タンパク質の発現ベクターを構築した (図 4 参照) [39]。初めに、最終 PCR 産物の 5' および 3' PCR 部位からなる 2 つの PCR 断片を増幅した。通常、この場合の PCR では標的の配列に対して相補的な 5' 末端 (primer A) および 3' 末端 (primer D) と、約 20-25 塩基の相補的な末端を有する 2 つの内部プライマー (primer B, C) を用いる。この内部プライマーが変異を含み、かつ、内部プライマー同士でハイブリダイズできるように設計した (図 4)。得られた PCR 断片をそれぞれアガロースゲル電気泳動で分離し、精製し、5' および 3' プライマー (primer A および D) を用いて 2 回目の PCR を行った。上記のように DNA 断片を調製し、pEZZ18 ベクターに導入した。

キメラタンパク質発現ベクターの作製

キメラタンパク質は、ヒトとマウス AMCase cDNA から作製した。両分子は、塩基配列レベルで類似のエキソン構造を有するので、キメラタンパク質はヒトとマウス AMCase のそれぞれの exon 同士を結合することで作製した。作製したキメラタンパク質は、ヒトとマウス AMCase の exons 6-7, 8-9, 11-12 間で連結されている (図 5, 6, 7; 表 3 と 4)。

キメラ C1, C2, C3 の構築は以下のように行った。C1, C2, C3 の 5' PCR 産物は、pEZZ18/pre-Protein A-AMCase-V5-His (マウス) を鋳型 DNA に使用し、プライマーに EcoRI_mature_mouse_AMCase_Fw80-103 (共通) とそれぞれ Rv_mouse 1178-1195/human_1283-1295 (C1), Mouse Rv731-762 (human_Rv818-849) (C2), Mouse Rv495-512 (human Rv582-599) (C3) を用いて作製した。3' PCR 産物は pEZZ18/pre-Protein A-AMCase-V5-His (ヒト) を鋳型 DNA に使用し、プライマーにそれぞれ Fw_human_1283-1295/mouse_1178-1195 (C1), Mouse Fw731-762 (human Fw818-849) (C2), Mouse Fw495-512 (human Fw582-599) (C3) と SalI_BGH_Rv (共通) を使用して作製した。それぞれの PCR 断片は精製した後、それぞれの組み合わせの鋳型として EcoRI_mature_mouse_AMCase_Fw80-103 と SalI_BGH_Rv をプライマーに用い、PCR で増幅した。増幅した cDNA を EcoRI と XhoI で制限酵素処理を行い、pEZZ18 ベクターに導入し、pEZZ18/pre-Protein A-AMCase Chimera-V5-His を作製した。

キメラ C4, C5, C6 の構築は以下のように行った。C4, C5, C6 の 5' PCR 産物は、pEZZ18/pre-Protein A-AMCase-V5-His (ヒト) を鋳型に使用し、プライマーに EcoRI_mature_human_AMCase_Fw167-190 (共通) とそれぞれ Rv mouse_1196-1213/human_1266-1282 (C4), Mouse Rv731-762 (human Rv818-849) (C5), Mouse Rv495-512 (human Rv582-599) (C6) を用いて作製した。3' PCR 産物

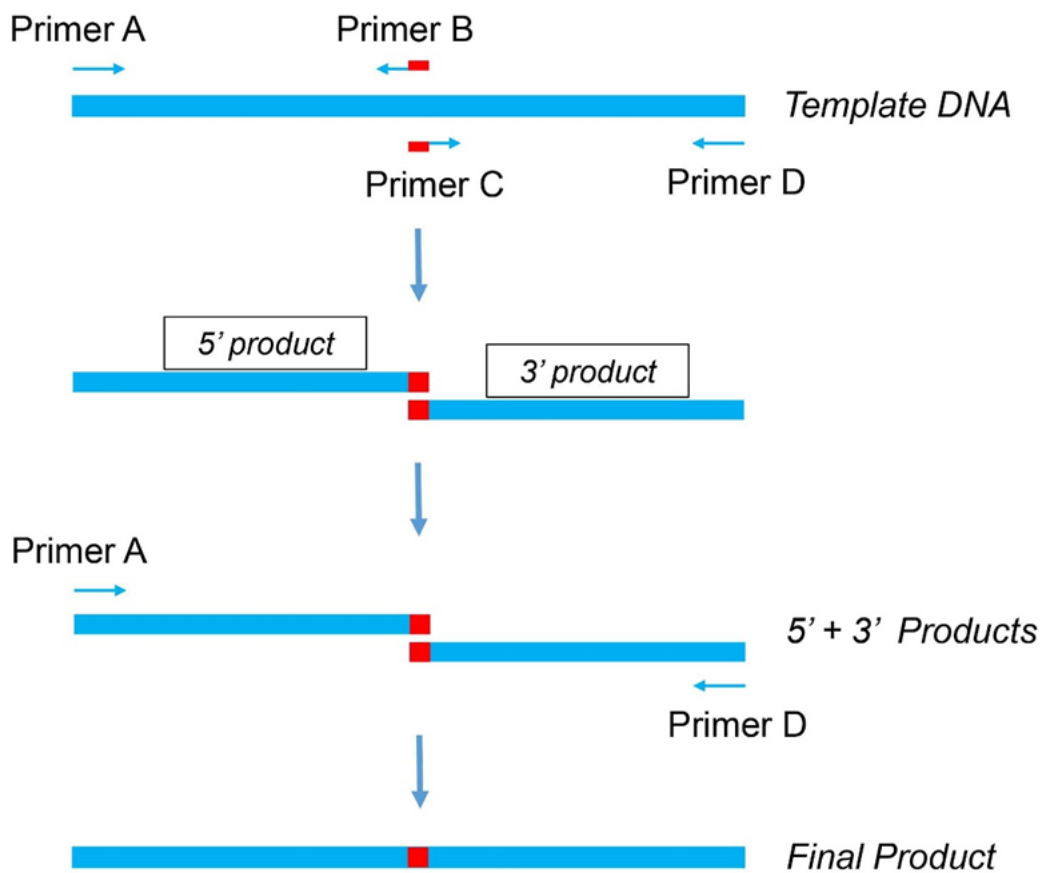


図 4. PCR を利用した変異導入の模式図

得られた PCR 断片をそれぞれアガロースゲルで精製し、5' および 3' プライマー (primer A および D) を用いて 2 回目の PCR を行った。上記のように DNA 断片を調製し、pEZZ18 ベクターに導入した。

表 3. AMCase キメラ体 1-3 の構築に用いたプライマー

Product name	Primer type	Template	Primer name	Sequence
AMCase chimera 1	A	Mouse AMCase	EcoRI_mature_mouse_ AMCase_Fw80-103	5'-CATGGAATTCGTACAATCTGA TATGCTATTTACC -3'
	B		Rv_mouse 1178-1195/ human_1283-1295	5'-CTGGAGCCGTGCAACCTTCA GTGGATATGCC-3'
	C	Human AMCase	Fw_human_1283-1295/ mouse_1178-1195	5'-GGCATATCCACTGAAGGTTGC ACGGCTCCAG-3
	D		SalI_BGH_Rv	5'-AGGGGTCGACTAGAAGGCAC AGTCGAGGCTGATCA -3'
AMCase chimera 2	A	Mouse AMCase	EcoRI_mature_mouse_ AMCase_Fw80-103	5'-CATGGAATTCGTACAATCTGA TATGCTATTTACC -3'
	B		Mouse Rv731-762 (human_Rv818-849)	5'-TAGTTCATGACATAATCCACA TTGAGGTAGGC-3'
	C	Human AMCase	Mouse Fw731-762 (human Fw818-849)	5'-GCCTACCTCAATGTGGATTAT GTCATGAACTA-3'
	D		SalI_BGH_Rv	5'-AGGGGTCGACTAGAAGGCAC AGTCGAGGCTGATCA -3'
AMCase chimera 3	A	Mouse AMCase	EcoRI_mature_mouse_ AMCase_Fw80-103	5'-CATGGAATTCGTACAATCTGA TATGCTATTTACC -3'
	B		Mouse Rv495-512 (human Rv582-599)	5'-AAGCTTCACGCATTTCCCT -3'
	C	Human AMCase	Mouse Fw495-512 (human Fw582-599)	5'-AGGAAATGCGTGAAGCTT-3'
	D		SalI_BGH_Rv	5'-AGGGGTCGACTAGAAGGCAC AGTCGAGGCTGATCA -3'

表 4. AMCase キメラ体 4-6 の構築に用いたプライマー

Product name	Primer type	Template	Primer name	Sequence
AMCase chimera 4	A	House AMCase	EcoRI_mature_human_AMCase_Fw167-190	5'-CATGGAATTCGTACAATCTGATATGCTATTTACC -3'
	B		Rv mouse_1196-1213/human_1266-1282	5'-CACGTCAGGAGCTGTGCAACTTGCACTCTGCAGGC-3'
	C	Mouse AMCase	Fw human_1266-1282/mouse 1196-1213	5'-GCCTGCAGAGTGCAAGTTGCACAGCTCCTGACGTG -3'
	D		SalI_BGH_Rv	5'-AGGGGTCGACTAGAAAGGCACAGTCGAGGCTGATCA -3'
AMCase chimera 5	A	House AMCase	EcoRI_mature_human_AMCase_Fw167-190	5'-CATGGAATTCGTACAATCTGATATGCTATTTACC -3'
	B		Mouse Rv731-762 (human Rv818-849)	5'-TAGTTCATGACATAATCCACATTGAGGTAGGC-3'
	C	Mouse AMCase	Mouse Fw731-762 (human Fw818-849)	5'-GCCTACCTCAATGTGGATTATGTCATGAACTA-3'
	D		SalI_BGH_Rv	5'-AGGGGTCGACTAGAAAGGCACAGTCGAGGCTGATCA -3'
AMCase chimera 6	A	House AMCase	EcoRI_mature_human_AMCase_Fw167-190	5'-CATGGAATTCGTACAATCTGATATGCTATTTACC -3'
	B		Mouse Rv495-512 (human Rv582-599)	5'-AAGCTTCACGCATTTCCCT -3'
	C	Mouse AMCase	Mouse Fw495-512 (human Fw582-599)	5'-AGGAAATGCGTGAAGCTT-3'
	D		SalI_BGH_Rv	5'-AGGGGTCGACTAGAAAGGCACAGTCGAGGCTGATCA -3'

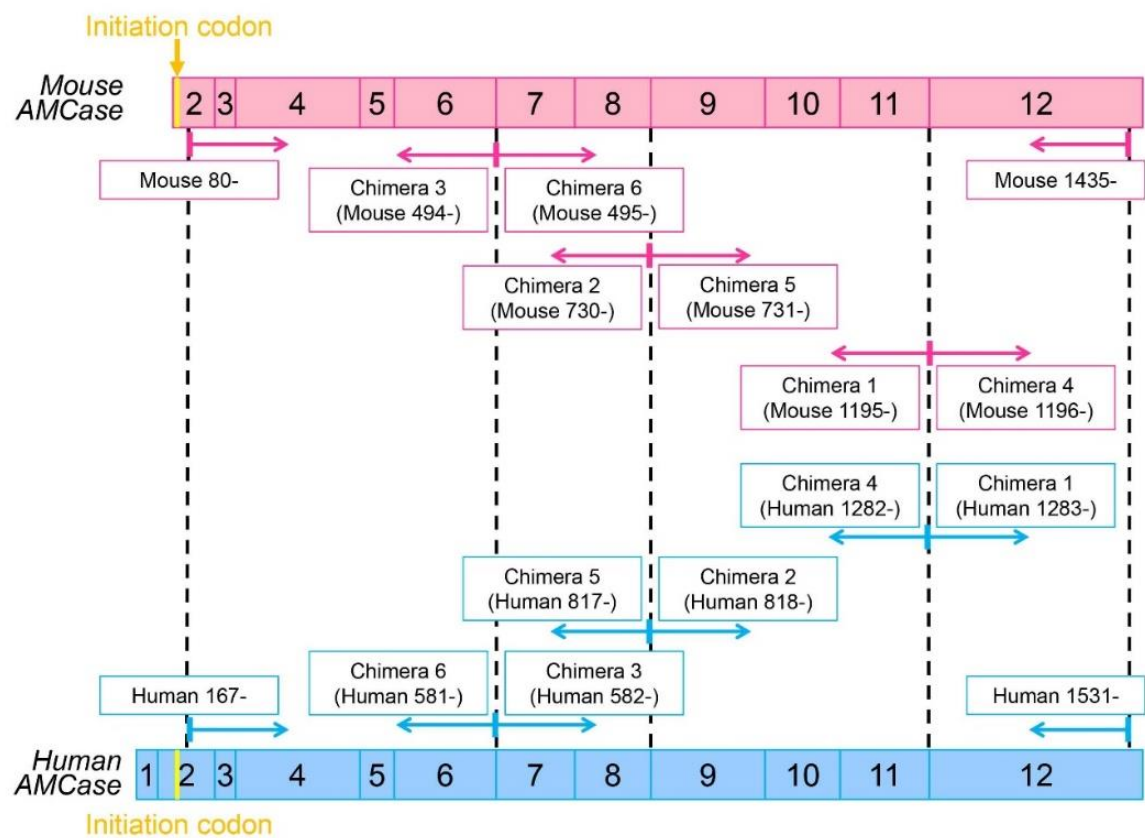


図 5. キメラタンパク質の作製の概要

各キメラ体の使用した AMCase cDNA の部位を示す。図中のそれぞれの色は、ピンクがマウス AMCase、水色はヒト AMCase に関連していることを示す。マウス AMCase cDNA は 80-1435 bp が使用され、ヒト AMCase cDNA は 167-1531 bp が使用されている。

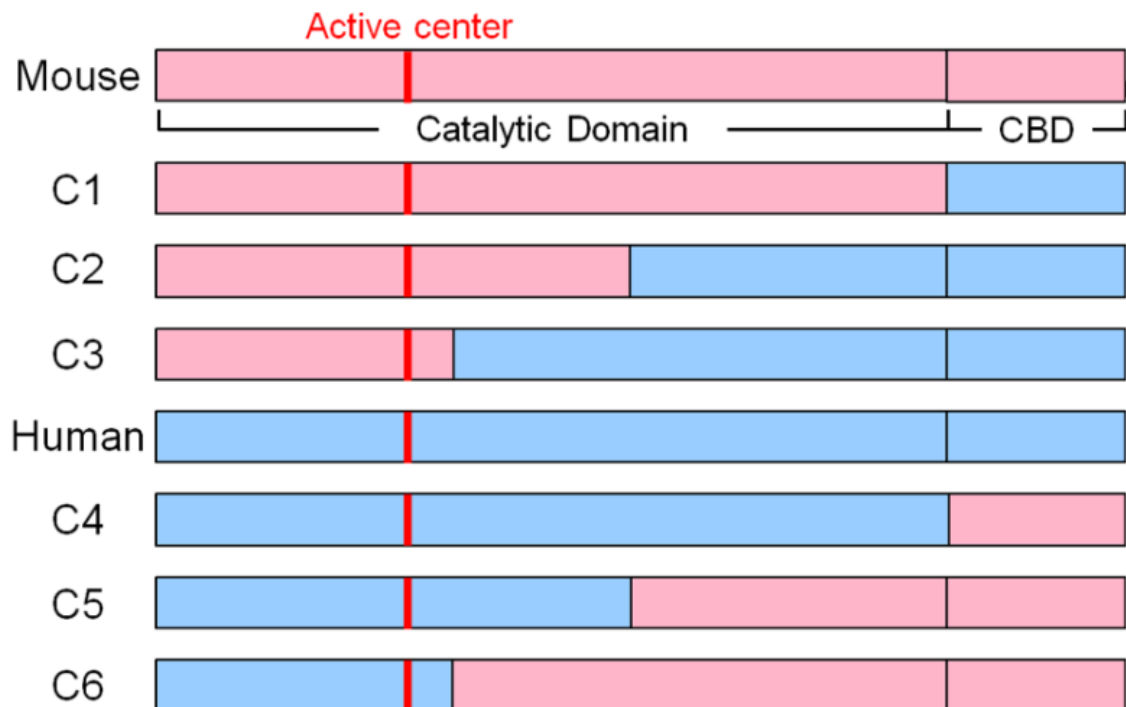


図 6. ヒトとマウス AMCCase から作製した AMCCase キメラ体の模式図

図中のそれぞれの色は、ピンクはマウス AMCCase 由来、水色はヒト AMCCase 由来であることを示す。

Chimera 1

YNLICFTNWAQYRPLGLGSEFKPDDINPCLCTHLYAFAGM^QNEIT^TIEWNDVTLYKAFNDLKN
RNSK^LKTLLAIGGWNFGTAPFTTMVSTSQNRQ^TFITSVIKFLRQYGF^DGLDLDWEY^PGSRGSP
QDKHLFTVLVKEMREAFEQE^AIESNRPRLMVTA^AVAGGISNIQAGYEIPELSKYLD^FIHVMTYD
LHGSWEGY^TTGENSPLYKYPTETG^SNAYLNVDYVMNYWK^NNGAPA^EKLIVGFPEYGH^TFILRNPS
DNGIGAPTSGDGPAGPYTRQAGFWAYYEICTFLRSGATEVWDASQ^EVPYAYKANEWLGYDNIKS
FSVKAQWLKQ^NNFGGAMIWAIDLDDFTGSFC^DQ^GKFPLTSTLNKALGISTEGCTAP^AQPIEPIT
AAPSGSGNGSGSSSSGGSSGGSGFC^AVRANGLYPVANNRNAFWHC^VNGV^TYQ^QNCQAGLVFDTS
CDCCNWA

Chimera 2

YNLICFTNWAQYRPLGLGSEFKPDDINPCLCTHLYAFAGM^QNEIT^TIEWNDVTLYKAFNDLKN
RNSK^LKTLLAIGGWNFGTAPFTTMVSTSQNRQ^TFITSVIKFLRQYGF^DGLDLDWEY^PGSRGSP
QDKHLFTVLVKEMREAFEQE^AIESNRPRLMVTA^AVAGGISNIQAGYEIPELSKYLD^FIHVMTYD
LHGSWEGY^TTGENSPLYKYPTETG^SNAYLNVDYVMNYWK^NNGAPA^EKLIVGFPTYGH^NFILSNPS
NTGIGAPTSGAGPAGPYAKESGIWAYYEICTFLKNGATQ^GWDAPQ^EVPYAYQGNVWVGYDNIKS
FDIKAQWLKHNK^FGGAMVWAIDLDDFTGTFC^NQ^GKFPLISTLKKALGLQ^SASCTAP^AQPIEPIT
AAPSGSGNGSGSSSSGGSSGGSGFC^AVRANGLYPVANNRNAFWHC^VNGV^TYQ^QNCQAGLVFDTS
CDCCNWA

Chimera 3

YNLICFTNWAQYRPLGLGSEFKPDDINPCLCTHLYAFAGM^QNEIT^TIEWNDVTLYKAFNDLKN
RNSK^LKTLLAIGGWNFGTAPFTTMVSTSQNRQ^TFITSVIKFLRQYGF^DGLDLDWEY^PGSRGSP
QDKHLFTVLVKEMREAFEQE^AKQINKPRLMVTA^AVAGGISNIQSGYEIPOLSOYLD^IIHVMTYD
LHGSWEGY^TTGENSPLYKYPTD^TG^SNAYLNVDYVMNYWK^NNGAPA^EKLIVGFPTYGH^NFILSNPS
NTGIGAPTSGAGPAGPYAKESGIWAYYEICTFLKNGATQ^GWDAPQ^EVPYAYQGNVWVGYDNIKS
FDIKAQWLKHNK^FGGAMVWAIDLDDFTGTFC^NQ^GKFPLISTLKKALGLQ^SASCTAP^AQPIEPIT
AAPSGSGNGSGSSSSGGSSGGSGFC^AVRANGLYPVANNRNAFWHC^VNGV^TYQ^QNCQAGLVFDTS
CDCCNWA

Chimera 4

YQLTCYFTNWAQYRPLGLGFMPDNIDPCLCTHLYAFAGR^QNEIT^TIEWNDVTLYQAFNGLKN
KNSQLKTLLAIGGWNFGTAPFTAMVSTPENRQ^TFITSVIKFLRQYEF^DGLDFDWEY^PGSRGSP
QDKHLFTVLVQEMREAFEQE^AKQINKPRLMVTA^AVAGGISNIQSGYEIPOLSOYLD^IIHVMTYD
LHGSWEGY^TTGENSPLYKYPTD^TG^SNAYLNVDYVMNYWK^NNGAPA^EKLIVGFPTYGH^NFILSNPS
NTGIGAPTSGAGPAGPYAKESGIWAYYEICTFLKNGATQ^GWDAPQ^EVPYAYQGNVWVGYDNIKS
FDIKAQWLKHNK^FGGAMVWAIDLDDFTGTFC^NQ^GKFPLISTLKKALGLQ^SASCTAP^DVPSEPV^T
TPPGSGSGGGSSGGSSGGSGFCADKADGLYPVADDRNAFWQ^CINGITYQ^QHCQAGLVFDTS^CNC
CNWP

Chimera 5

YQLTCYFTNWAQYRPLGLGFMPDNIDPCLCTHLYAFAGR^QNEIT^TIEWNDVTLYQAFNGLKN
KNSQLKTLLAIGGWNFGTAPFTAMVSTPENRQ^TFITSVIKFLRQYEF^DGLDFDWEY^PGSRGSP
QDKHLFTVLVQEMREAFEQE^AKQINKPRLMVTA^AVAGGISNIQSGYEIPOLSOYLD^IIHVMTYD
LHGSWEGY^TTGENSPLYKYPTD^TG^SNAYLNVDYVMNYWK^NNGAPA^EKLIVGFPEYGH^TFILRNPS
DNGIGAPTSGDGPAGPYTRQAGFWAYYEICTFLRSGATEVWDASQ^EVPYAYKANEWLGYDNIKS
FSVKAQWLKQ^NNFGGAMIWAIDLDDFTGSFC^DQ^GKFPLTSTLNKALGISTEGCTAP^DVPSEPV^T
TPPGSGSGGGSSGGSSGGSGFCADKADGLYPVADDRNAFWQ^CINGITYQ^QHCQAGLVFDTS^CNC
CNWP

Chimera 6

YQLTCYFTNWAQYRPLGLGFMPDNIDPCLCTHLYAFAGR^QNEIT^TIEWNDVTLYQAFNGLKN
KNSQLKTLLAIGGWNFGTAPFTAMVSTPENRQ^TFITSVIKFLRQYEF^DGLDFDWEY^PGSRGSP
QDKHLFTVLVQEMREAFEQE^AIESNRPRLMVTA^AVAGGISNIQAGYEIPELSKYLD^FIHVMTYD
LHGSWEGY^TTGENSPLYKYPTETG^SNAYLNVDYVMNYWK^NNGAPA^EKLIVGFPEYGH^TFILRNPS
DNGIGAPTSGDGPAGPYTRQAGFWAYYEICTFLRSGATEVWDASQ^EVPYAYKANEWLGYDNIKS
FSVKAQWLKQ^NNFGGAMIWAIDLDDFTGSFC^DQ^GKFPLTSTLNKALGISTEGCTAP^DVPSEPV^T
TPPGSGSGGGSSGGSSGGSGFCADKADGLYPVADDRNAFWQ^CINGITYQ^QHCQAGLVFDTS^CNC
CNWP

図 7. AMCcase キメラ体の推定アミノ酸配列

図中のそれぞれの色は、水色はヒト AMCcase, ピンクはマウス AMCcase 由来であることを示す。

は、pEZZ18/pre-Protein A-AMCase-V5-His (マウス) を鋳型に使用し、プライマーにそれぞれ Fw human_1266-1282/mouse 1196-1213 (C4), Mouse Fw731-762 (human Fw818-849) (C5), Mouse Fw495-512 (human Fw582-599) (C6) と SalI_BGH_Rv (共通) を使用して作製した。それぞれの PCR 断片は精製後、それぞれの組み合わせ鋳型とし、EcoRI_mature_human_AMCase_Fw167-190 と SalI_BGH_Rv をプライマーに用いた PCR で増幅した。増幅した cDNA 断片を EcoRI と XhoI で切断し、pEZZ18 ベクターに導入し、pEZZ18/pre-Protein A-AMCase Chimera-V5-His を作製し、*E. coli* BL21 (DE3) に導入した。

融合タンパク質の大腸菌での発現と精製

形質転換した大腸菌を、100 µg/mL のアンピシリンが含まれた LB 培地で 37°C, 18 時間培養した。培養液を 5,000 x g, 20 分間, 4°C で遠心分離し、菌体を回収した。次に、菌体に 30 mL の 20 mM Tris-HCl (pH 7.6), 20% スクロース (w/v), 0.5 mM EDTA, プロテアーゼ阻害剤 (Complete, Roche) を含む溶液で懸濁し、30 分間インキュベートし、15,000 x g, 15 分, 4°C で遠心分離を行い、上清 ① と菌体を回収した。その後、菌体に 120 mL のプロテアーゼ阻害剤を含む 20 mM Tris-HCl (pH 7.6) 溶液を加え、懸濁し、30 分間インキュベートし、5,000 x g, 15 分, 4°C で遠心分離を行い、上清 ② と菌体を回収した。この上清 ① と ② に終濃度が 150 mM になるように NaCl を加えた。この画分を、プロテアーゼ阻害剤を含む TS 緩衝液 [20 mM Tris-HCl (pH 7.6), 150 mM NaCl] で平衡化した IgG セファロースカラムに供した。カラムを TS 緩衝液で洗浄後、結合した融合タンパク質を 0.1 M Gly-HCl (pH 2.5) で溶出し、1 M Tris-HCl (pH 7.6) で中和した。280 nm の吸光度を測定し、ピーク画分を集め、PD MidiTrap G-25 (GE Healthcare) で脱塩し、TS 緩衝液に置換した。得られた精製酵素は、凍結融解による失活を防ぐため、一定量ごとに分注し、-80°C で保存した。

SDS ポリアクリルゲル電気泳動とウェスタンブロット

上記のように発現、精製した組換え融合タンパク質を SDS ポリアクリルゲル電気泳動を行い、抗 V5-HRP (Invitrogen) を用いたウェスタンブロット法で解析した。ウェスタンブロットの分析と定量には Luminescent Image Analyzer (ImageQuant LAS 4000, GE Healthcare) を用いた。

キチナーゼ活性の測定

キチナーゼ活性の測定は、蛍光基質である 4-methylumbelliferyl β-D- N, N'-diacetylchitobioside hydrate (4-MU chitobioside, Sigma-Aldrich) を用い、McIlvaine 緩衝液 (pH 2.0 から pH 8.0) または 0.1 M Gly-HCl 緩衝液 (pH 1.0 から pH 3.0) 中で全量 50 µL, 37°C, 30 分間で行った。それぞれの反応は 3 回以上行った。遊離した蛍光物質 (4-MU) の測定は RF-5300PC (Shimadzu) を用い、励起波長 360 nm, 蛍光

波長 450 nm で行った。遊離した蛍光物質量は、標準物質である 4-methylumbelliferone (Sigma-Aldrich) の標準曲線から算出した。

コロイダルキチンの分解

エビの殻より調製されたキチン (Sigma-Aldrich) からコロイダルキチンを調製し、キチナーゼ活性測定の基質とした [38]。全ての酵素反応は、コロイダルキチン (終濃度 1 mg/mL) を基質とし、McIlvaine 緩衝液 (pH 2.0) で全量 50 μ L で行った。反応は、37°C, 16 時間行った。Jackson によって報告された方法に従い [40], 組換え AMCase が生成したキチン断片の還元末端基を fluorophore 8-aminonaphthalene-1,3,6-trisulphonic acid (ANTS, Sigma-Aldrich) で標識し、生成した蛍光誘導体を 40% ポリアクリルアミドゲルを用いて分離して分析した。標準物質として *N*-acetyl chitoooligoaccharides (Seikagaku Corporation) を用いた。

第 3 節 実験結果および考察

ヒト AMCCase のキチナーゼ活性はマウス AMCCase よりも非常に低い

本実験において、マウスとヒト AMCCase を大腸菌のペリプラズム空間に *Staphylococcus aureus* 由来の Protein A と V5-His タグを含んだ融合タンパク質として発現した (図 2) [38]。抗 V5 エピトープ抗体を用いたウェスタンブロットで解析すると、大腸菌で発現させた Protein A-human AMCCase-V5-His は、Protein A-mouse AMCCase-V5-His と同様に分子量約 68 kDa だった (図 8)。これらのことから、ヒトとマウスの AMCCase を大腸菌で発現できたと考えた。

これらの組換えタンパク質のキチン分解活性を 4-MU-*N,N'*-diacetyl- β -D-chitobioside を基質とし、測定し、マウスとヒトで比較した。組換えマウス AMCCase の最大活性は、以前の報告と同様に、pH 2.0 だった (図 9) [18, 38]。他方、組換えヒト AMCCase は、以前された研究報告と同じように最大活性が pH 4.0-5.0 だった [28, 33, 37]。ヒト AMCCase のキチナーゼ活性は、pH 2.0-4.0 において、マウス AMCCase のそれぞれ約 1/75-1/11 だった (図 9; 表 5 と 6)。

次に、組換えマウス、ヒト AMCCase のキチン分解活性を、高分子量キチン基質であるコロイダルキチンを用いて比較した。ヒト AMCCase は、マウス AMCCase と同様に、pH 2.0 でコロイダルキチンを分解し、(GlcNAc)₂ を生成した (図 9)。しかし、ヒト AMCCase のキチン分解活性はマウス AMCCase の活性よりも著しく低かった (図 9; 表 7)。

これらのことから、ヒト AMCCase のキチナーゼ活性は、マウス AMCCase にくらべ、著しく低いことが分かった。

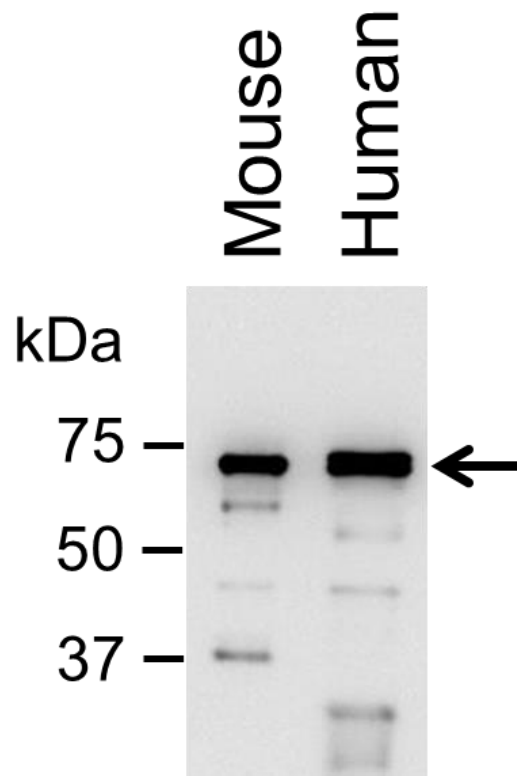


図 8. ウェスタンブロットを用いたマウスとヒト AMCase の組換えタンパク質の発現確認

左側の数字は、分子量、矢印は融合タンパク質 (Protein A-AMCase-V5-His) の位置を示している。

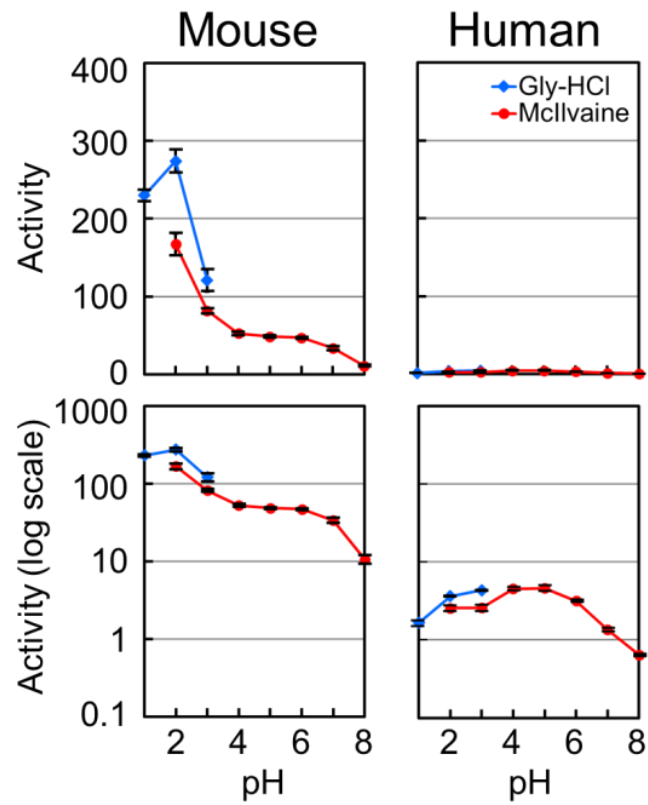


図 9. 人工基質を用いたマウスとヒト AMCase のキチナーゼ活性の比較

縦軸の値は、実数値（上図）と対数値（下図）で表記されている。エラーバーは、同一の実験を 3 回行って算出した標準偏差を示す。

表 5. 図 8 のタンパク質の定量結果

組換えタンパク質を SDS-PAGE で分離し，ウェスタンブロットによって検出した (図 8)。シグナルの検出法は，第 II 章 第 2 節を参照のこと。相対活性 (Relative activity) は，マウス AMCase のキチナーゼ活性を 100% として算出した。

Sample	Protein level	Activity (pH 2.0)	Activity / Protein level	Relative activity (%)
Mouse	1.36 ± 0.70	167.19 ± 14.21	122.62 ± 10.42	100.00 ± 8.50
Human	1.54 ± 0.85	2.56 ± 0.23	1.66 ± 0.15	23.60 ± 0.12

表 6. 図 9 の定量結果

AMCase は，マウス AMCase よりも著しくキチナーゼ活性が低い。

Buffer (pH)	Mouse	Human	Mouse / Human
Gly-HCl (pH 1.0)	230.13 ± 7.24	1.66 ± 0.14	138.72
Gly-HCl (pH 2.0)	274.31 ± 14.58	3.64 ± 0.07	75.32
Gly-HCl (pH 3.0)	120.88 ± 14.21	4.33 ± 0.06	27.95
Mcllvaine (pH 2.0)	167.19 ± 14.21	2.56 ± 0.23	65.29
Mcllvaine (pH 3.0)	81.85 ± 3.28	2.58 ± 0.24	31.76
Mcllvaine (pH 4.0)	52.47 ± 2.04	4.54 ± 0.25	11.55
Mcllvaine (pH 5.0)	48.41 ± 1.23	4.60 ± 0.40	10.51
Mcllvaine (pH 6.0)	47.00 ± 1.12	3.17 ± 0.08	14.85
Mcllvaine (pH 7.0)	33.72 ± 2.57	1.36 ± 0.07	24.84
Mcllvaine (pH 8.0)	10.66 ± 1.35	0.64 ± 0.02	16.59

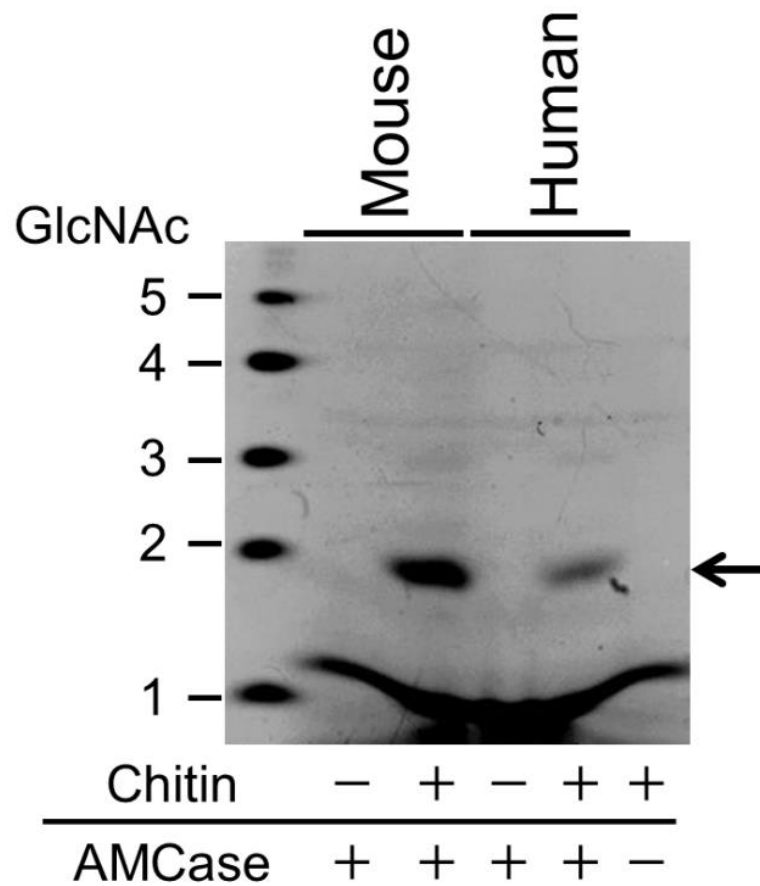


図 10. コロイダルキチンに対するマウスとヒト AMCase のキチン分解活性の比較
 組換えタンパク質により遊離したキチン断片を蛍光標識し、糖電気泳動によって分析した。GlcNAc オリゴマーマーカーの位置を左側に数字で示した。それぞれの組換えタンパク質は、主に (GlcNAc)₂ を遊離した (矢印)。

表 7. 図 10 における (GlcNAc)₂ の定量

図 10 の組換え AMCase によりコロイダルキチンから遊離した (GlcNAc)₂ 断片を定量した。シグナルの検出法は, 第 II 章 第 2 節を参照。Relative (GlcNAc)₂ level は, マウス AMCase を 100% として算出した。

Sample	(GlcNAc) ₂ level	(GlcNAc) ₂ level / Protein level	Relative (GlcNAc) ₂ level (%)
Mouse	239.91 ± 68.35	175.96 ± 50.13	100.00 ± 28.49
Human	64.07 ± 39.74	41.52 ± 25.75	23.60 ± 14.64

ヒト AMCase の N 末端領域がキチナーゼ活性を低下させる

ヒト AMCase とマウス AMCase のアミノ酸配列は、同一性 82%、類似性 86% で、両分子は非常に似ている [18]。しかし、ヒトとマウスの AMCase の生化学的な性質は、両分子で異なる [18, 30, 33]。さらに、ヒト AMCase のキチナーゼ活性は、マウスに比べて著しく低かった (図 8 と 10)。そこで、ヒト AMCase において、キチナーゼ活性の低下に関わる領域の同定を試みた。そのため、ヒトとマウス AMCase 間でキメラタンパク質を作製し、大腸菌で発現し、その生化学的な性質を調べた。

抗 V5 エピトープ抗体を用いたウェスタンブロットの結果から、大腸菌で発現した Protein A-AMCase chimera-V5-His の分子は、Protein A-mouse AMCase-V5-His と同様に、分子量約 68 kDa だった (図 11)。このことから、マウス-ヒトキメラ AMCase の大腸菌での発現ができたと考えた。

次に、これらキメラ体のキチナーゼ活性を人工基質の 4-MU chitobioside を用いて比較した。マウス AMCase の活性中心を含む N 末端領域を有したキメラ体は、キチナーゼ活性が低いヒト AMCase の部分を有しているにもかかわらず、蛍光基質に対して強いキチナーゼ活性を示した (図 12; 表 8)。これに対し、ヒト AMCase の活性中心を含む N 末端領域を有したキメラ体は、キチナーゼ活性がマウス AMCase と比べてかなり低く、ヒト AMCase と同程度だった (図 12; 表 8)。

さらに高分子量キチン基質であるコロイダルキチンに対するキチン分解活性を調べた。それぞれのキメラタンパク質は、pH 2.0 で主にコロイダルキチンから (GlcNAc)₂ を遊離した (図 13)。マウス AMCase の活性中心を含む N 末端領域を有したキメラ体 (キメラ C1, C2, C3) は、マウス AMCase と同様に、高いレベルで (GlcNAc)₂ を生成した (図 13; 表 9)。これに対し、ヒト AMCase の活性中心を含む N 末端領域を有したキメラ体 (キメラ C4, C5, C6) とヒト AMCase は、とても低いレベルで (GlcNAc)₂ を生成した (図 13; 表 9)。

以上の結果から、ヒト AMCase の N 末端領域が、キチン分解活性を著しく低下させていることが明らかになった。

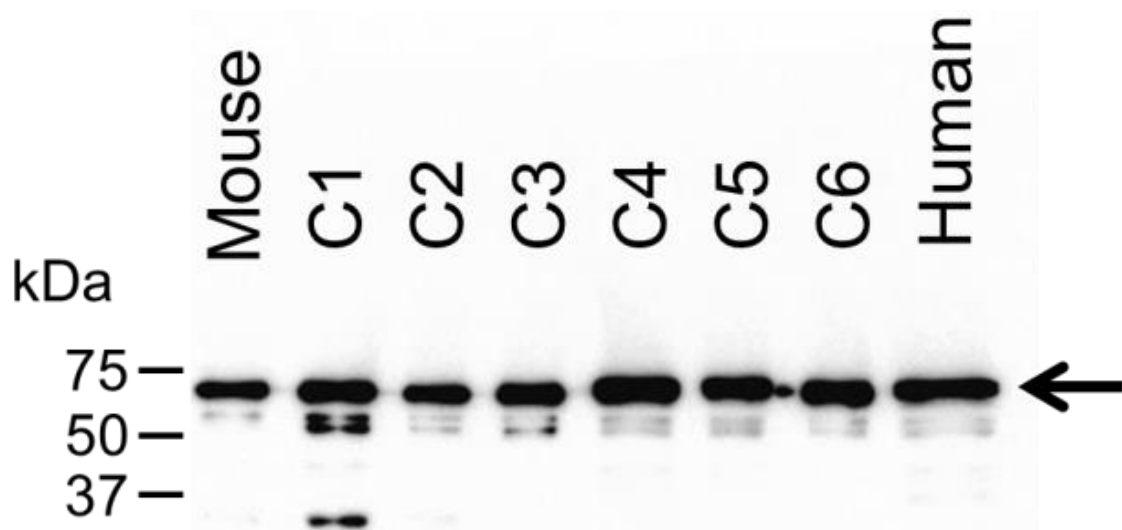


図 11. ウェスタンブロットを用いた AMCCase キメラ体の組換えタンパク質の発現確認

左側の数字は分子量，矢印はキメラタンパク質の位置を示している。

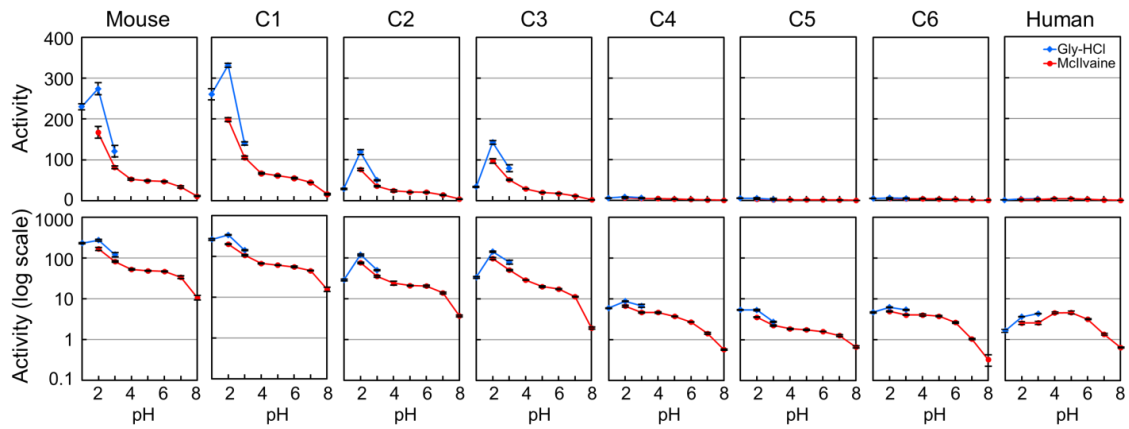


図 12. 人工基質を用いた AMCCase キメラ体のキチナーゼ活性の比較

縦軸の値は、実数値（上図）と対数値（下図）で表記されている。エラーバーは、同一の実験を 3 回行って算出した標準偏差を示す。

表 8. 図 11 からタンパク質定量した図 12 のキチナーゼ活性

組換えタンパク質を SDS-PAGE で分離し，ウェスタンブロットによって解析した (図 5)。シグナルの検出法は，第 II 章 第 2 節を参照のこと。Relative activity は，マウス AMCase の活性を 100% として算出した。

Sample	Protein level	Activity (pH 2.0)	Activity / Protein level	Relative activity (%)
Mouse	1.08 ± 0.65	167.19 ± 14.21	155.15 ± 13.19	100.00 ± 8.50
Chimera 1	1.32 ± 0.32	198.46 ± 4.77	150.66 ± 3.62	96.92 ± 2.33
Chimera 2	0.94 ± 0.28	76.03 ± 2.70	80.66 ± 2.86	51.99 ± 1.84
Chimera 3	0.97 ± 0.24	96.96 ± 5.82	100.45 ± 6.03	64.74 ± 3.89
Chimera 4	1.43 ± 0.10	6.66 ± 0.30	4.65 ± 0.21	2.99 ± 0.13
Chimera 5	1.09 ± 0.31	3.56 ± 0.05	3.27 ± 0.04	2.11 ± 0.03
Chimera 6	1.41 ± 0.55	4.92 ± 0.09	3.48 ± 0.06	2.24 ± 0.04
Human	1.04 ± 0.15	2.56 ± 2.53	2.45 ± 0.22	1.58 ± 0.14

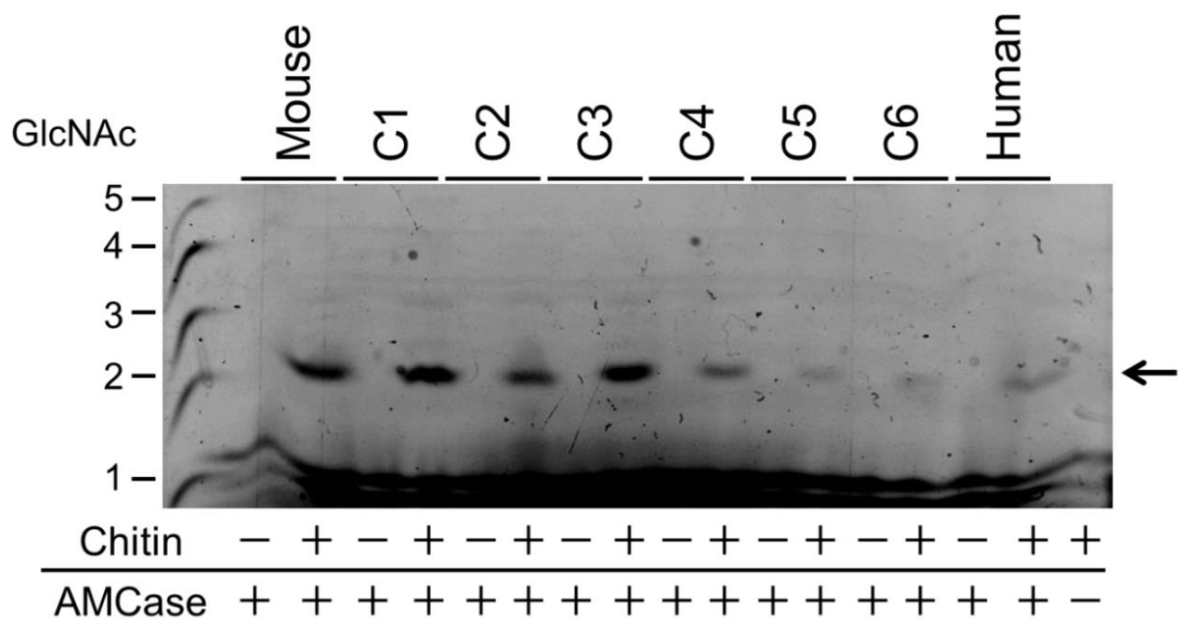


図 13. コロイダルキチンに対する AMCase キメラ体の活性の比較

組換えタンパク質により遊離したキチン断片を蛍光標識し、糖電気泳動によって分析した。GlcNAc オリゴマーマーカーの位置を左側に数字で示した。それぞれの組換えタンパク質は主に (GlcNAc)₂ を遊離した (矢印)。

表 9. 図 13 における (GlcNAc)₂ の定量

図 13 の組換え AMCase によりコロイダルキチンから遊離した (GlcNAc)₂ 断片を定量した。シグナルの検出法は, 第 II 章 第 2 節を参照。Relative (GlcNAc)₂ level は, マウス AMCase を 100% として算出した。

Sample	(GlcNAc) ₂ level	(GlcNAc) ₂ level / Protein level	Relative (GlcNAc) ₂ level (%)
Mouse	152.47 ± 32.83	141.49 ± 30.47	100.00 ± 21.53
Chimera 1	142.16 ± 46.22	107.72 ± 35.02	76.13 ± 24.75
Chimera 2	72.41 ± 30.66	76.81 ± 32.52	54.28 ± 22.99
Chimera 3	112.00 ± 14.87	116.03 ± 15.40	82.01 ± 10.89
Chimera 4	9.69 ± 5.39	6.76 ± 3.76	4.78 ± 2.66
Chimera 5	4.22 ± 2.96	3.88 ± 2.72	2.74 ± 1.92
Chimera 6	3.71 ± 2.27	2.63 ± 1.61	1.86 ± 1.14
Human	23.02 ± 11.54	22.05 ± 11.06	15.59 ± 7.81

第 III 章 Nonsynonymous SNPs を利用した AMCCase の活性の復活

第 1 節 序論

ヒト AMCCase には SNPs の存在が知られている。Seibold らは、活性中心付近に存在する 3 つの主要なアミノ酸置換を含む 8 つの nonsynonymous SNPs (nsSNPs) を同定している [28]。ヒト AMCCase のキチナーゼ活性に関わる触媒ドメインとヒンジ領域に存在する nsSNPs の影響を調べるため、3 種類の天然型のヒト AMCCase variants (A-C) と 1 種類の人工的な variant (C/B) を作製した。

ここで使用したヒト AMCCase variants には nsSNPs によるアミノ酸置換が 6 種類存在している。使用したヒト AMCCase の nsSNPs は、N 末端領域側に 3 つ(N45D, D47N, M61R), C 末端領域側に 3 つ (V339I, F354S, G432V) 存在している。

Variant A は、6 つの nsSNPs 全てのアミノ酸置換がマウス AMCCase とは異なる (図 14, 15, 16) [28]。

Variant B は、これまでの研究で報告されてきた野生型 (wild-type, WT) ヒト AMCCase に相当する [18, 28, 33]。Variant B は、C 末端領域側の触媒ドメインにある 2 つの nsSNPs がマウス AMCCase と一致していた (図 14, 15, 16)。

Variant A と variant B に対し、variant C の N 末端領域側の 3 つの nsSNPs は、マウス AMCCase のそれらと一致しており、C 末端領域側の 3 つの nsSNPs は、一致していない (図 14, 15, 16)。さらに、variant C の N 末端領域側と、variant B の C 末端領域側を結合した variants C/B を作製した。この variant C/B は、N 末端領域側の 3 つの nsSNPs, C 末端領域側のは 3 つの nsSNPs のうち 2 つはマウスと一致していた (図 14, 15, 16)。

さらに、キメラタンパク質の結果から、ヒト AMCCase の N 末領領域の 3 アミノ酸置換 (N45D, D47N, R61M) が重要であると考えた。この N 末領領域の 3 アミノ酸置換が、マウス AMCCase の酵素活性に影響を与えるかどうかを調べるため、それぞれのマウス AMCCase mutant を作製し、大腸菌で発現した (図 16)。

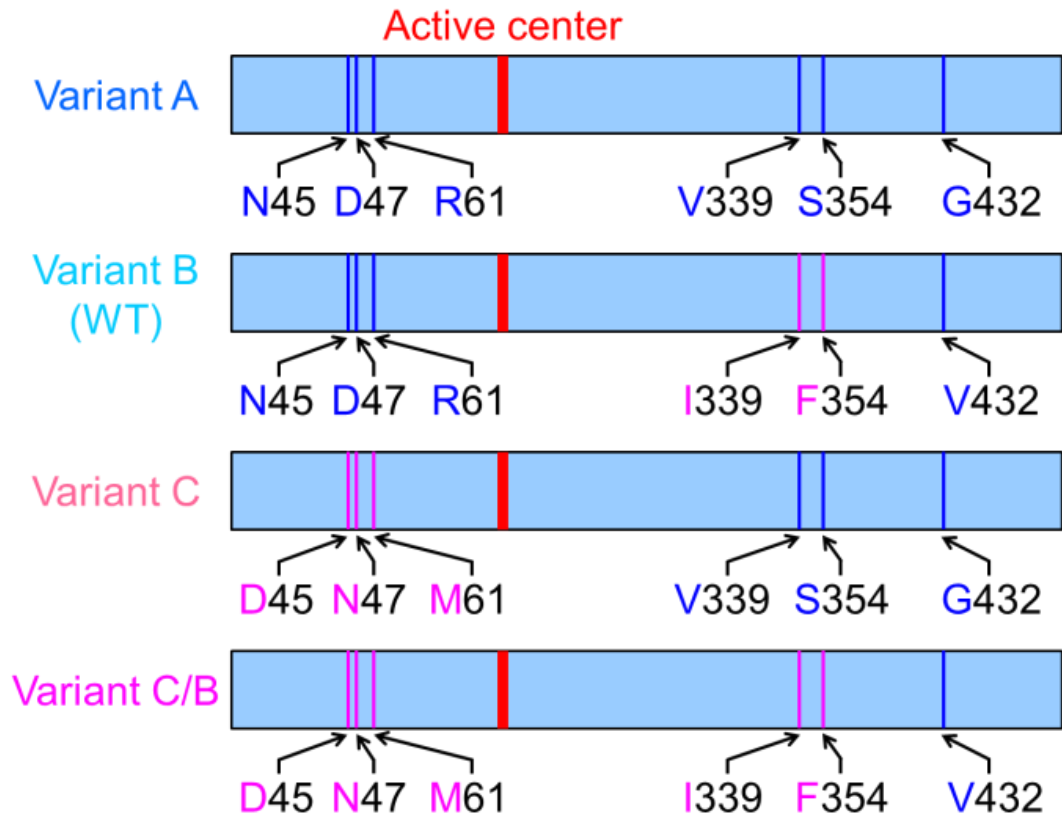


図 14. ヒト AMCcase variants の模式図

Human AMCase variants

Variant A

YQLTCYFTNWAQYRPGLGRFMPDNI DPCLCTHLYAFAGRONNEITTTIEWNDVTLYQAF
NGLKNKNSOLKTLAIGGWNFGTAPFTAMVSTPENRQTFITSVIKFLROYEFDGLDFDW
EYPGSRGSPQDKHLFTVLVQEMREAFEQEAKQINKPRLMVTAAVAAGISNIQSGYEIP
OLSOYLDYIHVMTYDLHGSEWEGYTGENSEPLYKYPTDTGSNAYLNVDYVMNYWKDNGAPA
EKLI VGFPTYGHNFILSNPSNTGIGAPTSAGAPGYPYAKESGIWAYYEICTFLKNGATQ
GWDAPQEVPIYAYOGNVWVGVDN VKSFDIKAOWLKHNKSGGAMVWAIDLDDFTGTFCNOG
KFPLISTLKKALGLQSASCTAPAQPIEPITAAPSGSGNGSGSSSSGGSSGGSGFCAGRA
NGLYPVANNRRAFVHCVNGVTYQQNCQAGLVFDTSCDCCNWA

Variant B

YQLTCYFTNWAQYRPGLGRFMPDNI DPCLCTHLYAFAGRONNEITTTIEWNDVTLYQAF
NGLKNKNSOLKTLAIGGWNFGTAPFTAMVSTPENRQTFITSVIKFLROYEFDGLDFDW
EYPGSRGSPQDKHLFTVLVQEMREAFEQEAKQINKPRLMVTAAVAAGISNIQSGYEIP
OLSOYLDYIHVMTYDLHGSEWEGYTGENSEPLYKYPTDTGSNAYLNVDYVMNYWKDNGAPA
EKLI VGFPTYGHNFILSNPSNTGIGAPTSAGAPGYPYAKESGIWAYYEICTFLKNGATQ
GWDAPQEVPIYAYOGNVWVGVDN IKSFDIKAOWLKHNKFGGAMVWAIDLDDFTGTFCNOG
KFPLISTLKKALGLQSASCTAPAQPIEPITAAPSGSGNGSGSSSSGGSSGGSGFCAVRA
NGLYPVANNRRAFVHCVNGVTYQQNCQAGLVFDTSCDCCNWA

Variant C

YQLTCYFTNWAQYRPGLGRFMPDDINPCLCTHLYAFAGMONNEITTTIEWNDVTLYQAF
NGLKNKNSOLKTLAIGGWNFGTAPFTAMVSTPENRQTFITSVIKFLROYEFDGLDFDW
EYPGSRGSPQDKHLFTVLVQEMREAFEQEAKQINKPRLMVTAAVAAGISNIQSGYEIP
OLSOYLDYIHVMTYDLHGSEWEGYTGENSEPLYKYPTDTGSNAYLNVDYVMNYWKDNGAPA
EKLI VGFPTYGHNFILSNPSNTGIGAPTSAGAPGYPYAKESGIWAYYEICTFLKNGATQ
GWDAPQEVPIYAYOGNVWVGVDN VKSFDIKAOWLKHNKSGGAMVWAIDLDDFTGTFCNOG
KFPLISTLKKALGLQSASCTAPAQPIEPITAAPSGSGNGSGSSSSGGSSGGSGFCAGRA
NGLYPVANNRRAFVHCVNGVTYQQNCQAGLVFDTSCDCCNWA

Variant C/B

YQLTCYFTNWAQYRPGLGRFMPDDINPCLCTHLYAFAGMONNEITTTIEWNDVTLYQAF
NGLKNKNSOLKTLAIGGWNFGTAPFTAMVSTPENRQTFITSVIKFLROYEFDGLDFDW
EYPGSRGSPQDKHLFTVLVQEMREAFEQEAKQINKPRLMVTAAVAAGISNIQSGYEIP
OLSOYLDYIHVMTYDLHGSEWEGYTGENSEPLYKYPTDTGSNAYLNVDYVMNYWKDNGAPA
EKLI VGFPTYGHNFILSNPSNTGIGAPTSAGAPGYPYAKESGIWAYYEICTFLKNGATQ
GWDAPQEVPIYAYOGNVWVGVDN IKSFDIKAOWLKHNKFGGAMVWAIDLDDFTGTFCNOG
KFPLISTLKKALGLQSASCTAPAQPIEPITAAPSGSGNGSGSSSSGGSSGGSGFCAVRA
NGLYPVANNRRAFVHCVNGVTYQQNCQAGLVFDTSCDCCNWA

Mouse AMCase

YNLIC YFTNWAQYRPGLGSFKPDINPCLCTHLYAFAGMONNEITTTIEWNDVTLYKAF
NDLKNRNSKLTLLAIGGWNFGTAPFTTMVSTSONRQTFITSVIKFLROYGFDGLDLDW
EYPGSRGSPQDKHLFTVLVKEMREAFEQEAIENRPRLMVTAAVAGGISNIQAGYEIP
ELSKYLDYIHVMTYDLHGSEWEGYTGENSEPLYKYPTETGSNAYLNVDYVMNYWKDNGAPA
EKLI VGFPEYGHNFILRNPSDNGIGAPTSAGDGPAGPYTRQAGFWAYYEICTFLRSGATE
VWDASQEVPIYAYKANEWLGYDNIKSFSVKAOWLQONNFGGAMIWAIDLDDFTGSFCDOG
KFPLISTLKNALGISTEGCTAPDVPSEPVTPPGSGSGGGSSGGSSGGSGFCADKADGL
YPVADDRNAFWQCINGITYQQHCQAGLVFDTSCNCCNWP

図 15. ヒト AMCase variants の推定アミノ酸配列

マウス AMCase とアミノ酸配列を比較して、ヒト AMCase variant のアミノ酸置換がマウス AMCase と保存されていなければ青色で示し、保存されていれば赤色で示した。

Mouse	MAKLLLVLTGLALLLNAQLGSAYNLI	CYFTNWAQYRPGLGSFKPDDINPCLCTHLIYAFAG	60
Variant A	MTKMILLTGLVLILNLQLGSAYQLT	CYFTNWAQYRPGLGRFMPDNI	60
Variant B	MTKMILLTGLVLILNLQLGSAYQLT	CYFTNWAQYRPGLGRFMPDNI	60
Variant C	MTKMILLTGLVLILNLQLGSAYQLT	CYFTNWAQYRPGLGRFMPDDINPCLCTHLIYAFAG	60
Variant C/B	MTKMILLTGLVLILNLQLGSAYQLT	CYFTNWAQYRPGLGRFMPDDINPCLCTHLIYAFAG	60
Mouse	MQNNEITTI EWNDVTLYKAFNDL	LKNRNSKCLKTLLAIGGWNFGTAPFTTMVSTSQNRQTFI	120
Variant A	RQNNEITTI EWNDVTLYQAFNGL	LKNKNSQLKTLAIGGWNFGTAPFTAMVSTPENRQTFI	120
Variant B	RQNNEITTI EWNDVTLYQAFNGL	LKNKNSQLKTLAIGGWNFGTAPFTAMVSTPENRQTFI	120
Variant C	MQNNEITTI EWNDVTLYQAFNGL	LKNKNSQLKTLAIGGWNFGTAPFTAMVSTPENRQTFI	120
Variant C/B	MQNNEITTI EWNDVTLYQAFNGL	LKNKNSQLKTLAIGGWNFGTAPFTAMVSTPENRQTFI	120
Mouse	TSVIKFLRQYGF DGLDL DWEY	PGSRGSPQDKHLFTVLVQEMREAFEQEAKIESNRPRLMV	180
Variant A	TSVIKFLRQYEF DGLDF DWEY	PGSRGSPQDKHLFTVLVQEMREAFEQEAKQINKPRLMV	180
Variant B	TSVIKFLRQYEF DGLDF DWEY	PGSRGSPQDKHLFTVLVQEMREAFEQEAKQINKPRLMV	180
Variant C	TSVIKFLRQYEF DGLDF DWEY	PGSRGSPQDKHLFTVLVQEMREAFEQEAKQINKPRLMV	180
Variant C/B	TSVIKFLRQYEF DGLDF DWEY	PGSRGSPQDKHLFTVLVQEMREAFEQEAKQINKPRLMV	180
Mouse	TAAVAGGISNIQAGYEIPELSKYLDF	IHVMTYDLHGSGWEGYTGENSPLYKYPTETGSNAY	240
Variant A	TAAVAAGISNIQSGYEIPQLSQYLDY	IHVMTYDLHGSGWEGYTGENSPLYKYPTDTGSNAY	240
Variant B	TAAVAAGISNIQSGYEIPQLSQYLDY	IHVMTYDLHGSGWEGYTGENSPLYKYPTDTGSNAY	240
Variant C	TAAVAAGISNIQSGYEIPQLSQYLDY	IHVMTYDLHGSGWEGYTGENSPLYKYPTDTGSNAY	240
Variant C/B	TAAVAAGISNIQSGYEIPQLSQYLDY	IHVMTYDLHGSGWEGYTGENSPLYKYPTDTGSNAY	240
Mouse	LNVDYVMNYWKNNGAPAEKLI	VGFPETYGHNFILSNPSNTGIGAPTSAGAPAGPYTRQAGF	300
Variant A	LNVDYVMNYWKDNGAPAEKLI	VGFPETYGHNFILSNPSNTGIGAPTSAGAPAGPYAKESGI	300
Variant B	LNVDYVMNYWKDNGAPAEKLI	VGFPETYGHNFILSNPSNTGIGAPTSAGAPAGPYAKESGI	300
Variant C	LNVDYVMNYWKDNGAPAEKLI	VGFPETYGHNFILSNPSNTGIGAPTSAGAPAGPYAKESGI	300
Variant C/B	LNVDYVMNYWKDNGAPAEKLI	VGFPETYGHNFILSNPSNTGIGAPTSAGAPAGPYAKESGI	300
Mouse	WAYYEICTFLRSGATEVWDA	SQEVPPYAYKANEWLGYDNIKSF SVKAQWLKQNNF	360
Variant A	WAYYEICTFLKNGATQGWDA	PQEVPPYAYQGNVWVGYDNIKSF DIKAQWLKHNK	360
Variant B	WAYYEICTFLKNGATQGWDA	PQEVPPYAYQGNVWVGYDNIKSF DIKAQWLKHNK	360
Variant C	WAYYEICTFLKNGATQGWDA	PQEVPPYAYQGNVWVGYDNIKSF DIKAQWLKHNK	360
Variant C/B	WAYYEICTFLKNGATQGWDA	PQEVPPYAYQGNVWVGYDNIKSF DIKAQWLKHNK	360
Mouse	AIDLDDFTGSGFCQGGKFP	LSTLNKALGISTEGCTAPDVPSEPVTTTPP - - GSGSGGSS	417
Variant A	AIDLDDFTGTFCNQGGKFP	LSTLKKALGLQSASCTAPAQPIEPITAAPSGSGNGSGSSSS	420
Variant B	AIDLDDFTGTFCNQGGKFP	LSTLKKALGLQSASCTAPAQPIEPITAAPSGSGNGSGSSSS	420
Variant C	AIDLDDFTGTFCNQGGKFP	LSTLKKALGLQSASCTAPAQPIEPITAAPSGSGNGSGSSSS	420
Variant C/B	AIDLDDFTGTFCNQGGKFP	LSTLKKALGLQSASCTAPAQPIEPITAAPSGSGNGSGSSSS	420
Mouse	GGSSGGSGFCADKADGLYPV	ADDRNAFWQCINGITYQQHCQAGLVFDTSCNCCNWP	473
Variant A	GGSSGGSGFCAGRANGLYPV	ANNRNAFWHCVNGVTYQQNCQAGLVFDTSCDCCNWA	476
Variant B	GGSSGGSGFCAGRANGLYPV	ANNRNAFWHCVNGVTYQQNCQAGLVFDTSCDCCNWA	476
Variant C	GGSSGGSGFCAGRANGLYPV	ANNRNAFWHCVNGVTYQQNCQAGLVFDTSCDCCNWA	476
Variant C/B	GGSSGGSGFCAGRANGLYPV	ANNRNAFWHCVNGVTYQQNCQAGLVFDTSCDCCNWA	476

図 16. ヒト AMCase variants とマウス AMCase の配列比較

ヒト AMCase のアミノ酸配列は水色，マウス AMCase のアミノ酸配列は薄いピンクで示した。アミノ酸置換が起きる箇所をピンクの枠で囲み，キチナーゼ活性中心を赤い枠で囲んだ。

第 2 節 実験方法

ヒト AMCase variants A, B, C/B の作製

本研究で、最初にクローニングしたヒト AMCase cDNA は、variant C に相当する (図 14, 15, 16)。

このヒト AMCase variant C から部位特異的変異導入法を用いて variants A, B, C/B を作製した (第 II 章 第 2 節 実験方法を参照)。Fw および Rv プライマーと使用した鋳型 DNA は表 10, 11, 12 に記載した。

最初にヒト AMCase variant C から variant A を作製した (図 14, 15, 16)。

Variant A cDNA の 5' 末端側の部分は、pEZZ18/human AMCase variant C/V5-His を鋳型として、EcoRI_mature_human_AMCase_Fw167-190 と Human_AMCase_Rv166-200 をプライマーにして増幅した。同様に、3' 末端側の部分は pEZZ18/human AMCase variant C/V5-His を鋳型 DNA として、Human_AMCase_M61R_Fw269-303 と SalI_BGH_Rv をプライマーに使用して増幅した。増幅した DNA 断片はアガロースゲルで精製した。さらに、6つのオリゴヌクレオチド (Human_AMCase_Fw184-217, Human_AMCase_D45N_N47D Fw218-251, Human_AMCase_M61R_Fw252-285, Human_AMCase_Rv166-200, Human_AMCase_Rv201-234, Human_AMCase_D45N_N47D_Rv235-268, Human_AMCase_M61R_Rv269-303) を T4 ポリヌクレオチドキナーゼ (Toyobo) によりリン酸化し、T4 リガーゼ (Promega) により結合した。これらにより形成された DNA 断片を鋳型として EcoRI_mature_human_AMCase_Fw167-190 と SalI_BGH_Rv をプライマーとして PCR 増幅した。増幅された DNA を EcoRI と XhoI で制限酵素処理を行い、pEZZ18 ベクターに導入し、pEZZ18/pre-Protein A-AMCase variant A-V5-His を作製した。

次に、ヒト AMCase variant A cDNA から variant B (WT) を作製した (図 14, 15, 16)。Variant B cDNA の 5' 末端側の部分は pEZZ18/human AMCase variant A/V5-His を鋳型 DNA として、EcoRI_mature_human_AMCase_Fw167-190 と Human_AMCase_V339I_Rv1101-1135 をプライマーに使用して PCR 増幅した。同様に、3' 末端側の部分は、pEZZ18/human AMCase variant A/V5-His を鋳型として、Human V339I Fw1101-1135 と SalI_BGH_Rv をプライマーに使用して増幅した。増幅された DNA 断片をゲルで精製した。2つの DNA 断片を鋳型として、EcoRI_mature_human_AMCase_Fw167-190 と SalI_BGH_Rv をプライマーとして増幅し、variant A V339I (第一段階) を取得した。同様の操作で、5' 末端側の部分は variant A V339I を鋳型として、EcoRI_mature_human_AMCase_Fw167-190 と Human_AMCase_S354F_Rv1147-1181 をプライマーに使用して PCR 増幅した。同様に、3' 末端側の部分は、variant A V339I を鋳型として、Human_AMCase_S354F_Fw1147-1181 と SalI_BGH_Rv をプライマーに使用して PCR 増幅した。増幅した DNA 断片は、アガロースゲルから抽出、精製した。2つ

の DNA 断片を鋳型として、EcoRI_mature_human_AMCase_Fw167-190 と SalI_BGH_Rv をプライマーとして増幅し、variant A V339I S354F（第二段階）を取得した。最後の操作で、5' 末端側の部分は、variant A V339I S354F を鋳型として EcoRI_mature_human_AMCase_Fw167-190 と Human_AMCase_G432V_Rv1385-1415 をプライマーに使用して増幅した。同様に、3' 末端側の部分は variant A V339I S354F を鋳型として、Human_AMCase_G432V_Fw1385-1415 と SalI_BGH_Rv をプライマーに使用して増幅した。増幅した DNA 断片は、ゲル精製を行った。2 つの DNA 断片を混合して鋳型とし、EcoRI_mature_human_AMCase_Fw167-190 と SalI_BGH_Rv をプライマーとして増幅し、variant A V339I S354F G432V（第三段階）を取得した。増幅した cDNA を EcoRI と XhoI で切断し、pEZZ18 ベクターに導入し、pEZZ18/pre-Protein A-AMCase variant B-V5-His を作製した。

最後に、ヒト AMCase variant C/ B cDNA を作製した（図 14, 15, 16）。5' 末端側の部分は variant C を鋳型として、EcoRI_mature_human_AMCase_Fw167-190 と Human_AMCase_V339I_Rv1101-1135 をプライマーに使用して増幅した。同様に、3' 末端側の部分は variant B を鋳型として、Human V339I_Fw1101-1135 と SalI_BGH_Rv をプライマーに使用して増幅した。増幅した DNA 断片は、ゲル精製を行った。2 つの DNA 断片を鋳型として EcoRI_mature_human_AMCase_Fw167-190 と SalI_BGH_Rv をプライマーとして増幅し、variant C/B を取得した。増幅した cDNA を EcoRI と XhoI で制限酵素処理し、pEZZ18 ベクターに導入し、pEZZ18/pre-Protein A-AMCase variant C/B-V5-His を作製した。

これら AMCase variants 発現プラスミドで *E. coli* BL21 (DE3) を形質転換し、大腸菌で発現し、組換えタンパク質を精製した。

表 10. Variant A の構築に用いた プライマー

Product name	Method	Template DNA	Primer name	Sequence
Variant A 5' product	PCR	Human AMCase variant C	EcoRI_mature_human_ AMCase_Fw167-190	5'-CATGGAATTCGTACCAGCTGACA TGCTACTTCACC -3'
			Human_AMCase_Rv166- 200	5'-GGGCCAGTTGGTGAAGTAGCAT GTCAGCTGGTAG -3'
Variant A 184-303	Oligo- nucleotide ligation		Human_AMCase_Fw184- 217	5'-CTCACCAACTGGGCCAGTACC GGCCAGGCCTG -3'
			Human_AMCase_D45N_ N47D Fw218-251	5'-GGGCGCTTCATGCCTGACAACAT CGACCCCTGCC -3
			Human_AMCase_M61R_ Fw252-285	5'-TCTGTACCCACCTGATCTACGCCT TTGCTGGGAG -3'
			Human_AMCase_Rv166- 200	5'-GGGCCAGTTGGTGAAGTAGCAT GTCAGCTGGTAG -3'
			Human_AMCase_Rv201- 234	5'-TCAGGCATGAAGCGCCCCAGGC CTGGCCGGTACT -3'
			Human_AMCase_D45N_ N47D_Rv235-268	5'-GATCAGGTGGGTACAGAGGCAG GGGTGCATGTTG -3'
			Human_AMCase_M61R_ Rv269-303	5'-GTGATCTCGTTGTTCTGCCTCCC AGCAAAGGCGTA -3'
Variant A 3' product	PCR	Human AMCase variant C	Human_AMCase_M61R_ Fw269-303	5'-TACGCCTTTGCTGGGAGGCAGAA CAACGAGATCAC -3'
			SalI_BGH_Rv	5'-AGGGGTCGACTAGAAGGCACAG TCGAGGCTGATCA -3'
↓				
Final product: variant A	PCR	Human AMCase 5' product 184- 303 3' product	EcoRI_mature_human_ AMCase_Fw167-190	5'-CATGGAATTCGTACCAGCTGACA TGCTACTTCACC -3'
			SalI_BGH_Rv	5'-AGGGGTCGACTAGAAGGCACAG TCGAGGCTGATCA -3'

表 11. Variant B の構築に用いたプライマー

Product name	Primer type	Template DNA	Primer name	Sequence
Human AMCase variant A V339I	A	Human AMCase variant A	EcoRI_mature_human_ AMCase_Fw167-190	5'-CATGGAATTCGTACCAGCTG ACATGCTACTTCACC-3'
	B		Human_AMCase_ V339I_Rv1101-1135	5'-AATATCGAAGCTCTTGATGT TGTCATAGCCAACCC-3'
	C		Human_AMCase_ V339I Fw1101-1135	5'-GGGTTGGCTATGACAACATC AAGAGCTTCGATATT-3'
	D		SalI_BGH_Rv	5'-AGGGGTCGACTAGAAGGCA CAGTCGAGGCTGATCA-3'
↓				
Human AMCase variant A 339I, 354F	A	Human AMCase variant A V339I	EcoRI_mature_human_ AMCase_Fw167-190	5'-CATGGAATTCGTACCAGCTG ACATGCTACTTCACC-3'
	B		Human_AMCase_ S354F_Rv1147-1181	5'-AGACCATGGCGCCTCCAAA TTTGTGTGCTTAAGC-3'
	C		Human_AMCase_ S354F_Fw1147-1181	5'-GCTTAAGCACAACAAATTT GGAGGCGCCATGGTCT-3'
	D		SalI_BGH_Rv	5'-AGGGGTCGACTAGAAGGCA CAGTCGAGGCTGATCA-3'
↓				
Human AMCase variant B	A	Human AMCase variant A 339I 354F	EcoRI_mature_human_ AMCase_Fw167-190	5'-CATGGAATTCGTACCAGCTG ACATGCTACTTCACC-3'
	B		Human_AMCase_ G432V_Rv1385-1415	5'-AGAGGCCGTTGGCTCTGAC AGCACAGAATCCACTG-3'
	C		Human_AMCase_ G432V_Fw1385-1415	5'-CAGTGGATTCTGTGCTGTCA GAGCCAACGGCCTCT-3'
	D		SalI_BGH_Rv	5'-AGGGGTCGACTAGAAGGCA CAGTCGAGGCTGATCA-3'

表 12. Variant C/B の構築に用いたプライマー

Product name	Primer type	Template DNA	Primer name	Sequence
Human AMCase variant C/B	A	Human AMCase variant C	EcoRI_mature_human_ AMCase_Fw167-190	5'-CATGGAATTCGTACCAGCTGA CATGCTACTTCACC-3'
	B		Human_AMCase_ V339I_Rv1101-1135	5'-AATATCGAAGCTCTTGATGTT GTCATAGCCAACCC-3'
	C	Human AMCase variant B	Human V339I_ Fw1101-1135	5'-GGGTTGGCTATGACAACATCA AGAGCTTCGATATT-3'
	D		SalI_BGH_Rv	5'-AGGGGTCGACTAGAAGGCAC AGTCGAGGCTGATCA -3'

マウス AMCase mutants の作製

上述の、部位特異的変異導入(第 II 章 第 2 節 実験方法を参照)を利用し、3 種類のマウス AMCase mutants を作製した(図 17)。使用した鋳型 DNA と Fw および Rv プライマーを表 13 に記載した。

マウス AMCase DNM (WT) から、マウス AMCase NDM を作製した。5' 末端側の部分は、pEZZ18/pre-Protein A-AMCase-V5-His (マウス) を鋳型 DNA として、EcoRI_mature_mouse_AMCase_Fw80-103 と Mouse_D45N_N47D_Fw135-169 をプライマーとして PCR 増幅した。同様に、3' 末端側の部分は pEZZ18/pre-Protein A-AMCase-V5-His (マウス) を鋳型とし、Mouse_D45N_N47D_Rv135-169 と SalI_BGH_Rv をプライマーに使用して PCR 増幅した。増幅した DNA 断片は、ゲルで精製した。2 つの DNA 断片を混合して鋳型とし、EcoRI_mature_mouse_AMCase_Fw80-103 と SalI_BGH_Rv をプライマーとして増幅し、マウス AMCase NDM を取得した。この DNA を EcoRI と XhoI で切断し、pEZZ18 ベクターに導入し、pEZZ18/pre-Protein A-mouse AMCase NDM-V5-His を作製した。

マウス AMCase DNR の 5' 末端側の部分は、pEZZ18/pre-Protein A-AMCase-V5-His (マウス) を鋳型として、EcoRI_mature_mouse_AMCase_Fw80-103 と Mouse M61R Rv185-219 をプライマーに使用して PCR 増幅した。同様に、3' 末端側の部分は pEZZ18/pre-Protein A-AMCase-V5-His (マウス) を鋳型として、Mouse M61R Fw185-219 と SalI_BGH_Rv をプライマーに使用して増幅した。増幅した DNA 断片は、ゲル精製を行った。2 つの DNA 断片を混合し、鋳型として EcoRI_mature_mouse_AMCase_Fw80-103 と SalI_BGH_Rv をプライマーとして増幅し、マウス AMCase DNR を取得した。この DNA を EcoRI と XhoI で切断し、pEZZ18 ベクターに導入し、pEZZ18/pre-Protein A-mouse AMCase DNR -V5-His を作製した。

マウス AMCase NDR の 5' 末端側の部分は、pEZZ18/pre-Protein A-AMCase NDM-V5-His (マウス) を鋳型として、EcoRI_mature_mouse_AMCase_Fw80-103 と Mouse M61R Rv185-219 をプライマーにして PCR 増幅した。同様に、3' 末端側の部分は、pEZZ18/pre-Protein A-AMCase NDM-V5-His (マウス) を鋳型として、Mouse M61R Fw185-219 と SalI_BGH_Rv をプライマーに使用して増幅した。増幅した DNA 断片は、ゲルで精製した。2 つの DNA 断片を混合して鋳型とし、EcoRI_mature_mouse_AMCase_Fw80-103 と SalI_BGH_Rv をプライマーとして増幅し、マウス AMCase NDR を取得した。この DNA を EcoRI と XhoI で切断し、pEZZ18 ベクターに導入し、pEZZ18/pre-Protein A-mouse AMCase NDR -V5-His を作製した。

これらマウス AMCase mutants 発現プラスミドで *E. coli* BL21 (DE3) を形質転換し、大腸菌で発現し、組換えタンパク質を精製した。

SDS ポリアクリルゲル電気泳動とウェスタンブロット

第 II 章 第 2 節の実験方法と同様の実験操作を行った。

キチナーゼ活性の測定

第 II 章 第 2 節の実験方法と同条件での反応，測定を行った。

コロイダルキチンの分解

第 II 章 第 2 節の実験方法と同条件での反応，測定を行った。

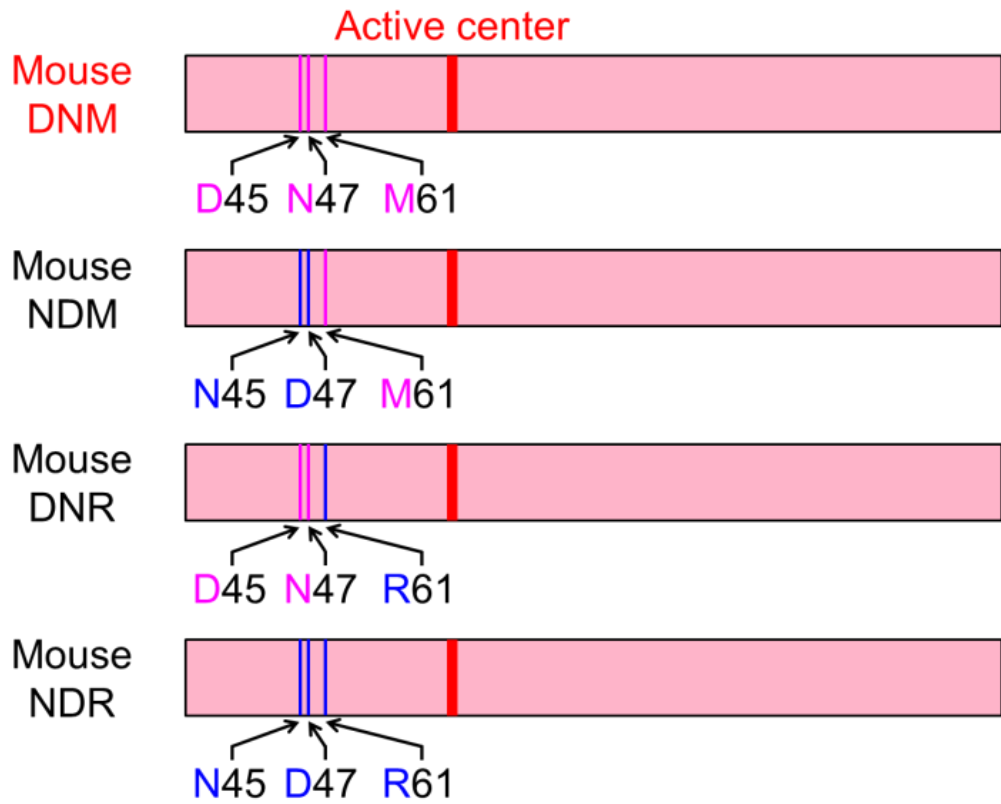


図 17. マウス AMCcase mutants (DNM, NDM, DNR, NDR) の模式図.

表 13. マウス AMCase mutants の構築に用いたプライマー

Product name	Primer type	Template	Primer name	Sequence
Mouse AMCase NDM	A	Mouse AMCase WT (DNM)	EcoRI_mature_mouse_ AMCase_Fw80-103	5'-CATGGAATTCGTACAATCTGA TATGCTATTTACC -3'
	B		Mouse_D45N_N47D_ Rv135-169	5'-ACACAGGCAGGGGTCAATGT TATCAGGCTTGAAGC-3
	C		Mouse_D45N_N47D_ Fw135-169	5'-GCTTCAAGCCTGATAACATTG ACCCCTGCCTGTGT-3'
	D		SalI_BGH_Rv	5'-AGGGGTCGACTAGAAGGCAC AGTCGAGGCTGATCA -3'
Mouse AMCase DNR	A	Mouse AMCase WT (DNM)	EcoRI_mature_mouse_ AMCase_Fw80-103	5'-CATGGAATTCGTACAATCTGA TATGCTATTTACC -3'
	B		Mouse M61R Fw185-219	5'-GCCTTTGCTGGGAGGCAGAA CAATGAGATCACCAC-3'
	C		Mouse M61R Fw185-219	5'-GCCTTTGCTGGGAGGCAGAA CAATGAGATCACCAC-3'
	D		SalI_BGH_Rv	5'-AGGGGTCGACTAGAAGGCAC AGTCGAGGCTGATCA -3'
Mouse AMCase NDR	A	Mouse AMCase NDM	EcoRI_mature_mouse_ AMCase_Fw80-103	5'-CATGGAATTCGTACAATCTGA TATGCTATTTACC -3'
	B		Mouse M61R Fw185-219	5'-GCCTTTGCTGGGAGGCAGAA CAATGAGATCACCAC-3'
	C		Mouse M61R Fw185-219	5'-GCCTTTGCTGGGAGGCAGAA CAATGAGATCACCAC-3'
	D		SalI_BGH_Rv	5'-AGGGGTCGACTAGAAGGCAC AGTCGAGGCTGATCA -3'
Mouse AMCase DNI	A	Mouse AMCase WT (DNM)	EcoRI_mature_mouse_ AMCase_Fw80-103	5'-CATGGAATTCGTACAATCTGA TATGCTATTTACC -3'
	B		Mouse M61I Rv181-216	5'-GTGATCTCATTGTTCTGTATCC CAGCAAAGGCATAG -3'
	C		Mouse M61I Fw181-216	5'-CTATGCCTTTGCTGGGATACA GAACAATGAGATCAC -3'
	D		SalI_BGH_Rv	5'-AGGGGTCGACTAGAAGGCAC AGTCGAGGCTGATCA -3'

第 3 節 実験結果および考察

ヒト AMCase のキチナーゼ活性はアミノ酸置換によってコントロールされている

まず、作製したヒト AMCase variants の大腸菌での発現を試みた。抗 V5 エピトープを用いたウェスタンブロットで、大腸菌で発現した全ての Protein A-human AMCase variant-V5-His は、Protein A-mouse AMCase-V5-His と同様に、分子量が約 68 kDa だった (図 18)。以上の結果から、大腸菌でヒト AMCase variants を発現できたと考えた。

次に、これらヒト AMCase variants のキチナーゼ活性について、人工基質を用いて測定し、variants 間で比較した。発現したヒト AMCase variants は、それぞれ異なる強さのキチナーゼ活性を有した。キチナーゼ活性は、variant A が最も低く、variant B, variant C, variant C/B の順で上昇した (図 19; 表 14)。注目すべきことに、variant C/B のキチナーゼ活性は高く、variant C の 10 倍で、マウス AMCase に匹敵するものであった (図 19; 表 14)。

また、ヒト AMCase のアミノ酸配列がマウス AMCase より離れている variant A と variant B では、至適 pH が pH 4.0-5.0 であったのに対し、マウス AMCase にアミノ酸配列が似ている variant C と variant C/B では、至適 pH が pH 2.0 であった。これらのことから、マウスにアミノ酸置換が近い variant C と variant C/B は、pH 依存性もマウス AMCase に似ていることが分かった。

次に、高分子量のコロイダルキチンを分解について検討した。ここで用いた全てのヒト AMCase variants は、pH 2.0 で、高分子量のコロイダルキチンを分解し、(GlcNAc)₂ を生じた (図 20; 表 15)。次に、(GlcNAc)₂ の生成レベルを検討したところ、variant A は、非常に少ない量の (GlcNAc)₂ を生成したが、variant B, variant C, variant C/B の順で上昇した。特に、variant C/B は、マウス AMCase と同等レベルの産物を生成した (図 20; 表 15)。

キメラタンパク質の結果から、ヒト AMCase の N 末領領域の 3 アミノ酸置換 (N45D, D47N, R61M) が、キチナーゼ活性に重要であることが示唆された (図 11 と 13)。図 19 と 20 の結果から、ヒト AMCase の N 末端領域側の nsSNPs は、キチナーゼ活性に強い影響力を持っていることが分かった。さらに、ヒト AMCase に存在する nsSNPs に、マウス AMCase 中で対応するアミノ酸 (N45D, D47N, R61M) を導入することで、ヒト AMCase を活性化できることが明らかとなった。

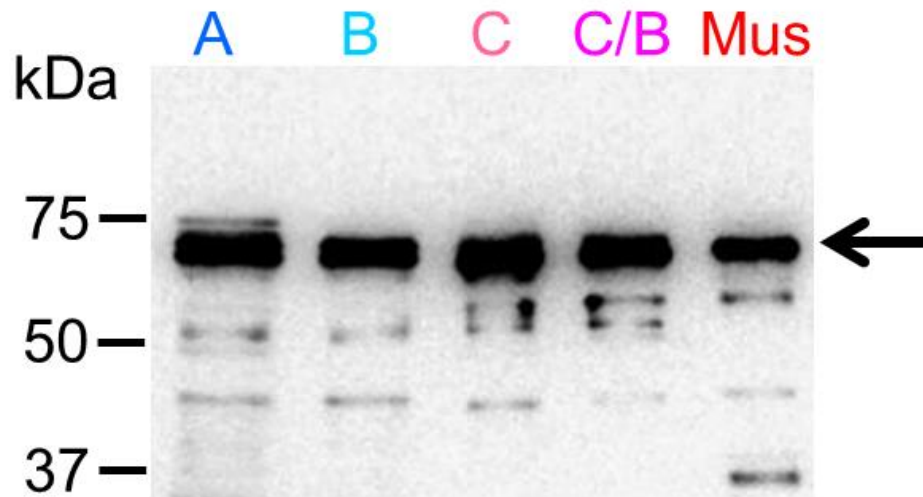


図 18. ウェスタンブロットを用いたヒト AMCase variants の組換えタンパク質の発現確認

左側の数字は分子量，矢印は融合タンパク質 (Protein A-AMCase-V5-His) の位置を示している。

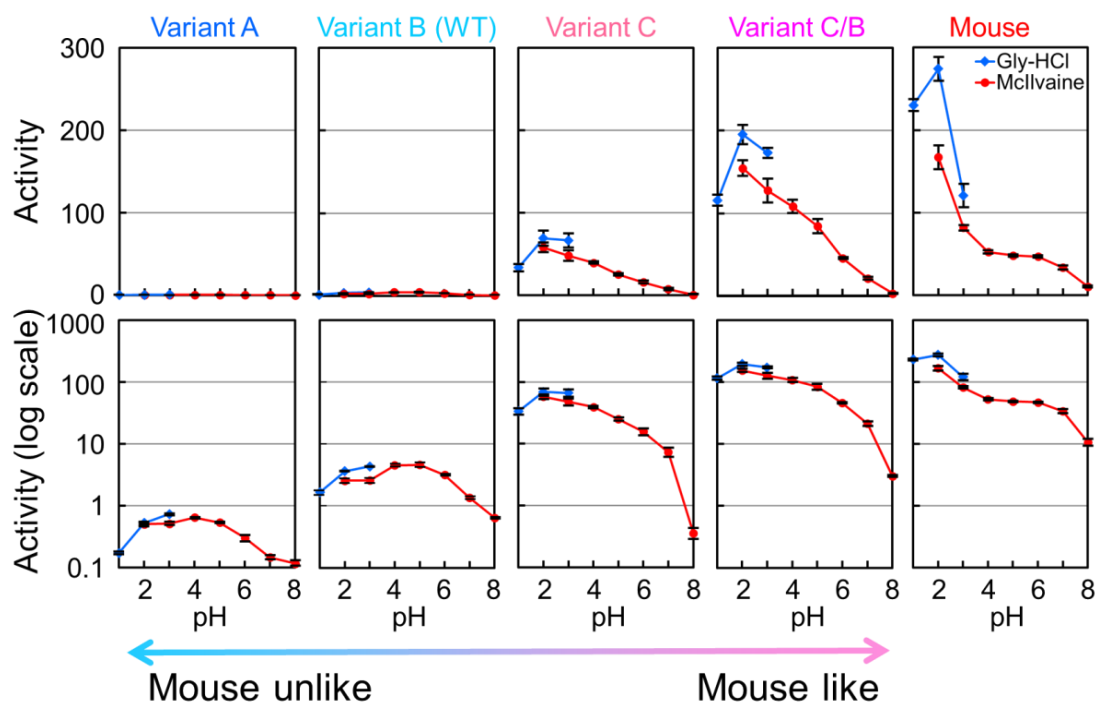


図 19. 人工基質を用いたヒト AMCcase variants のキチナーゼ活性の比較

縦軸の値は、実数値（上図）と対数値（下図）で表記されている。エラーバーは、同一の実験を 3 回行って算出した標準偏差を示す。

表 14. 図 18 のタンパク質定量と図 19 の比活性

組換えタンパク質は、SDS-PAGE によって分離されウェスタンブロットによって検出された (図 5)。シグナルの検出法は、第 II 章 第 2 節を参照。Relative activity は、マウス AMCase の活性を 100% として算出した。

Sample	Protein level	Activity (pH 2.0)	Activity / Protein level	Relative activity (%)
Variant A	1.01 ± 0.34	0.50 ± 0.04	0.50 ± 0.04	0.23 ± 0.02
Variant B	1.01 ± 0.17	2.56 ± 0.23	2.54 ± 0.23	1.16 ± 0.10
Variant C	1.07 ± 0.32	57.85 ± 5.49	54.05 ± 5.13	24.67 ± 2.34
Variant C/B	0.92 ± 0.25	154.71 ± 9.19	167.44 ± 9.95	76.40 ± 4.54
Mouse	0.76 ± 0.24	167.19 ± 14.21	219.15 ± 18.63	100.00 ± 8.50

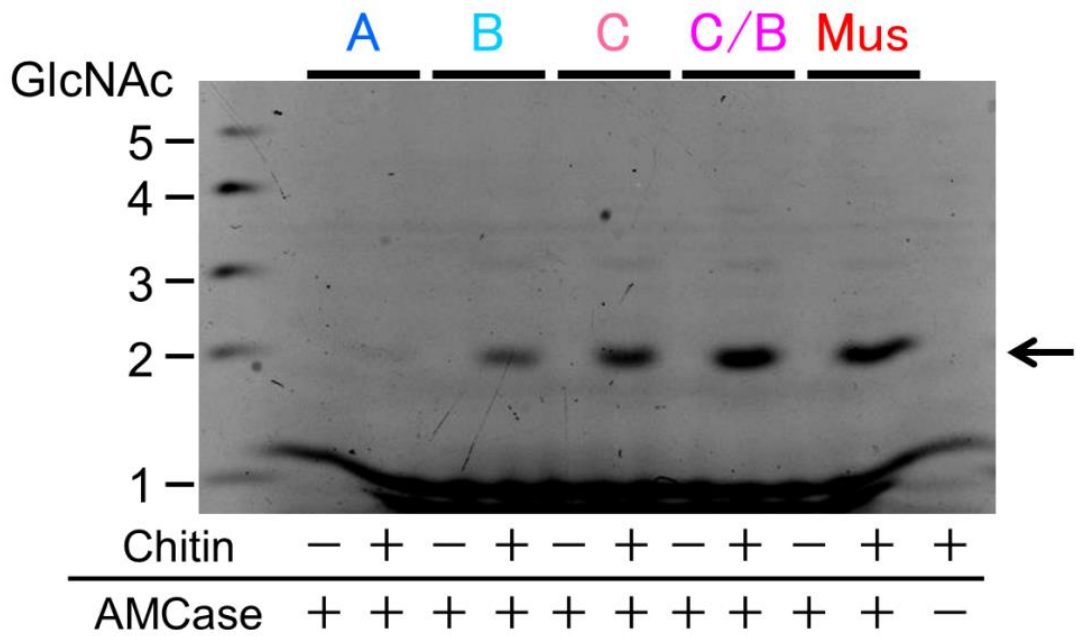


図 20. コロイダルキチンに対するヒト AMCase variants の活性の比較

組換えタンパク質により遊離したキチン断片を蛍光標識し，糖電気泳動によって分析した。GlcNAc オリゴマーマーカーの位置を左側に数字で示した。それぞれの組換えタンパク質は，主に (GlcNAc)₂ を遊離した (矢印)。

表 15. 図 20 における (GlcNAc)₂ の定量

図 20 の組換え AMCase によりコロイダルキチンから遊離した (GlcNAc)₂ 断片を定量した。シグナルの検出法は, 第 II 章 第 2 節を参照。Relative (GlcNAc)₂ level は, マウス AMCase を 100% として算出した。

Sample	(GlcNAc) ₂ level	(GlcNAc) ₂ level / Protein level	Relative (GlcNAc) ₂ level (%)
Variant A	2.16 ± 2.82	2.14 ± 2.79	0.77 ± 1.01
Variant B	45.74 ± 20.89	45.33 ± 20.71	16.36 ± 7.47
Variant C	100.33 ± 38.23	93.75 ± 35.73	33.82 ± 12.89
Variant C/B	201.03 ± 33.78	217.57 ± 36.56	78.49 ± 13.19
Mouse	211.46 ± 48.11	277.18 ± 63.07	100.00 ± 22.75

M61R の変異導入はマウス AMCCase への変異導入はキチナーゼ活性を喪失させる

上の結果から、ヒト AMCCase の N 末領領域の 3 アミノ酸置換 (N45D, D47N, R61M) が、キチナーゼ活性発現に重要であることが分かった。この N 末領領域の 3 アミノ酸置換が、マウス AMCCase の酵素活性に影響を与えるかどうかを調べるため、マウス AMCCase mutants を作製し、性質を調べた。

抗 V5 エピトープ抗体を用いたウェスタンブロットの結果から、大腸菌で発現させた Protein A-mouse AMCCase mutant-V5-His は、Protein A-mouse AMCCase-V5-His と同様に、分子量約 68 kDa だった (図 21)。これらのことから、マウス AMCCase mutants を大腸菌で発現できたと考えた。

次に、マウス AMCCase へのヒト AMCCase に存在するアミノ酸置換の影響について、人工基質を用いて調べた。NDM では、著しいキチナーゼ活性の減少は、認められなかった。つまり、マウス AMCCase に D45N と N47D のどちらの変異を導入してもキチナーゼ活性の減少は、起きなかった (図 22; 表 16)。これに対し、マウス AMCCase に M61R を導入する (DNR および NDR) と、キチナーゼ活性が著しく低下し、ヒト AMCCase (variant B) と同様の活性を示した。

さらに、コロイダルキチンを基質にして検討した。それぞれのマウス AMCCase mutants は、pH 2.0 で、コロイダルキチンを分解し、(GlcNAc)₂ を生成した (図 23)。(GlcNAc)₂ の生成量は、DNR と NDR では低かったのに対し、NDM はマウス WT AMCCase と同様のレベルだった (図 23; 表 17)。

以上の結果から、ヒトにおける M61R 置換は、キチナーゼ活性に強い影響を持っていることが強く示唆された。

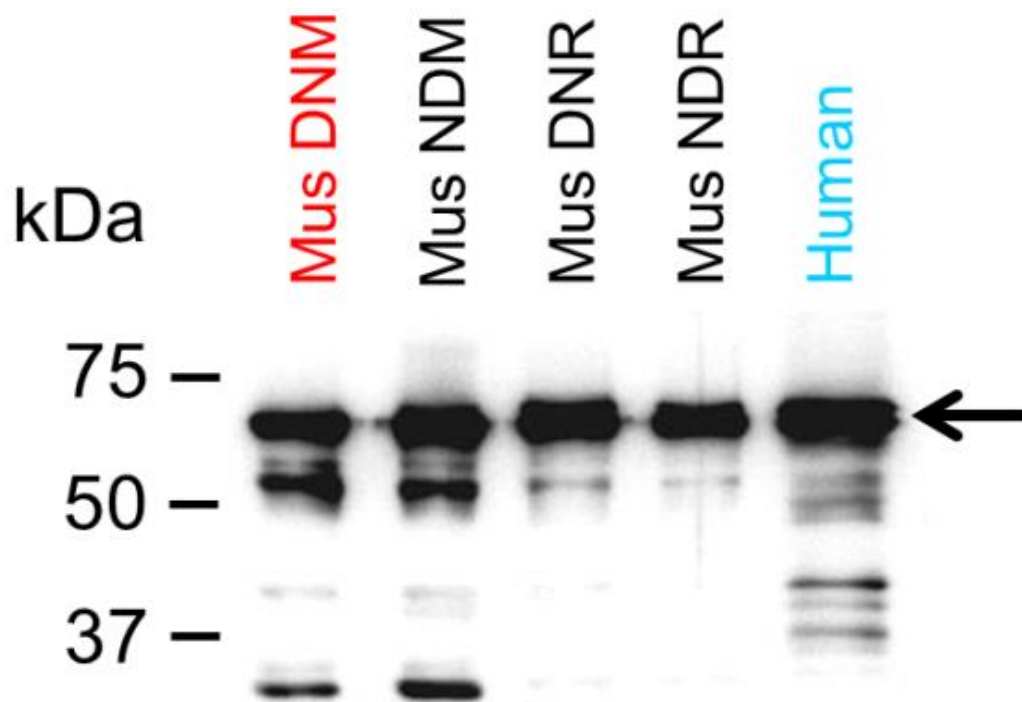


図 21. ウェスタンブロットを用いたマウス AMCase mutants (DNM, NDM, DNR, NDR) の組換えタンパク質の発現確認

左側の数字は分子量，矢印は融合タンパク質 (Protein A-AMCase-V5-His) の位置を示している。

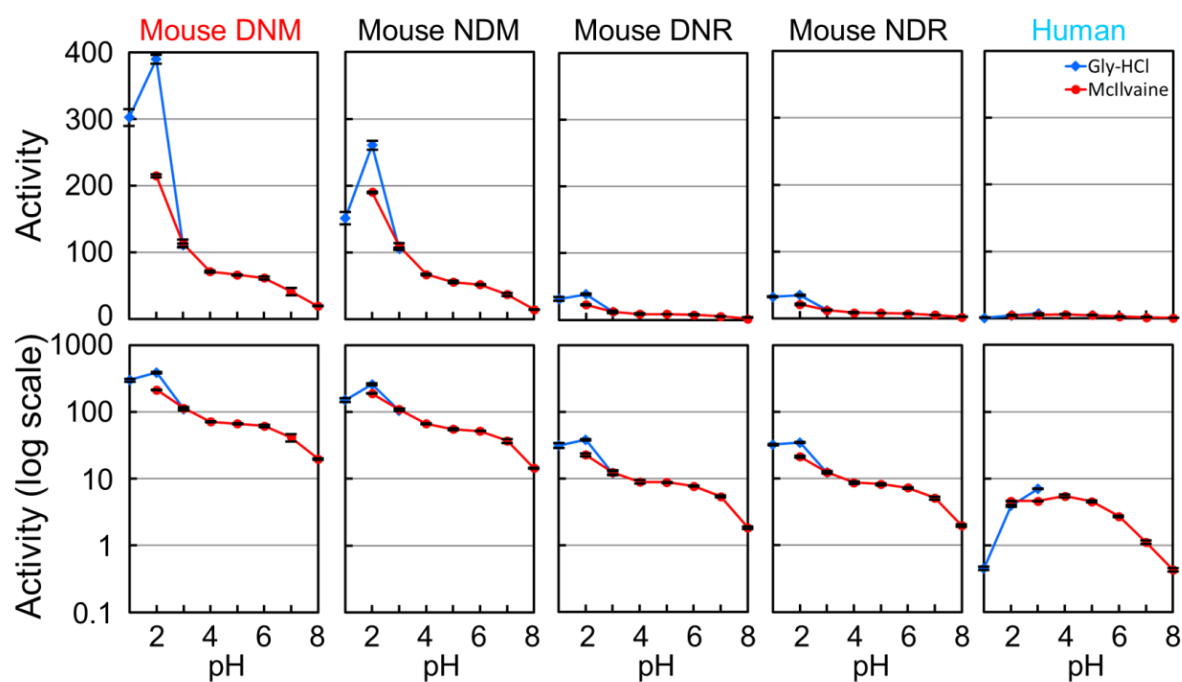


図 22. 人工基質を用いたマウス AMCCase mutants (DNM, NDM, DNR, NDR) のキチナーゼ活性の比較

縦軸の値は、実数値（上図）と対数値（下図）で表記されている。エラーバーは、同一の実験を 3 回行って算出した標準偏差を示す。

表 16. 図 21 のタンパク質定量と図 22 の比活性

組換えタンパク質は SDS-PAGE で分離し，ウェスタンブロットによって検出した (図 5)。シグナルの検出法は，第 II 章 第 2 節を参照。Relative activity は，マウス AMCase の活性を 100% として算出した。

Sample	Protein level	Activity (pH 2.0)	Activity / Protein level	Relative activity (%)
DNM	0.86 ± 0.31	215.18 ± 1.79	250.84 ± 2.09	100.00 ± 0.83
NDM	1.46 ± 0.46	190.36 ± 0.72	130.47 ± 0.49	52.01 ± 0.20
DNR	1.16 ± 0.28	22.80 ± 0.96	19.61 ± 0.82	7.82 ± 0.33
NDR	1.27 ± 0.35	21.28 ± 0.67	16.81 ± 0.53	6.70 ± 0.21
Human	1.35 ± 0.50	4.62 ± 4.62	3.42 ± 0.03	1.36 ± 0.01

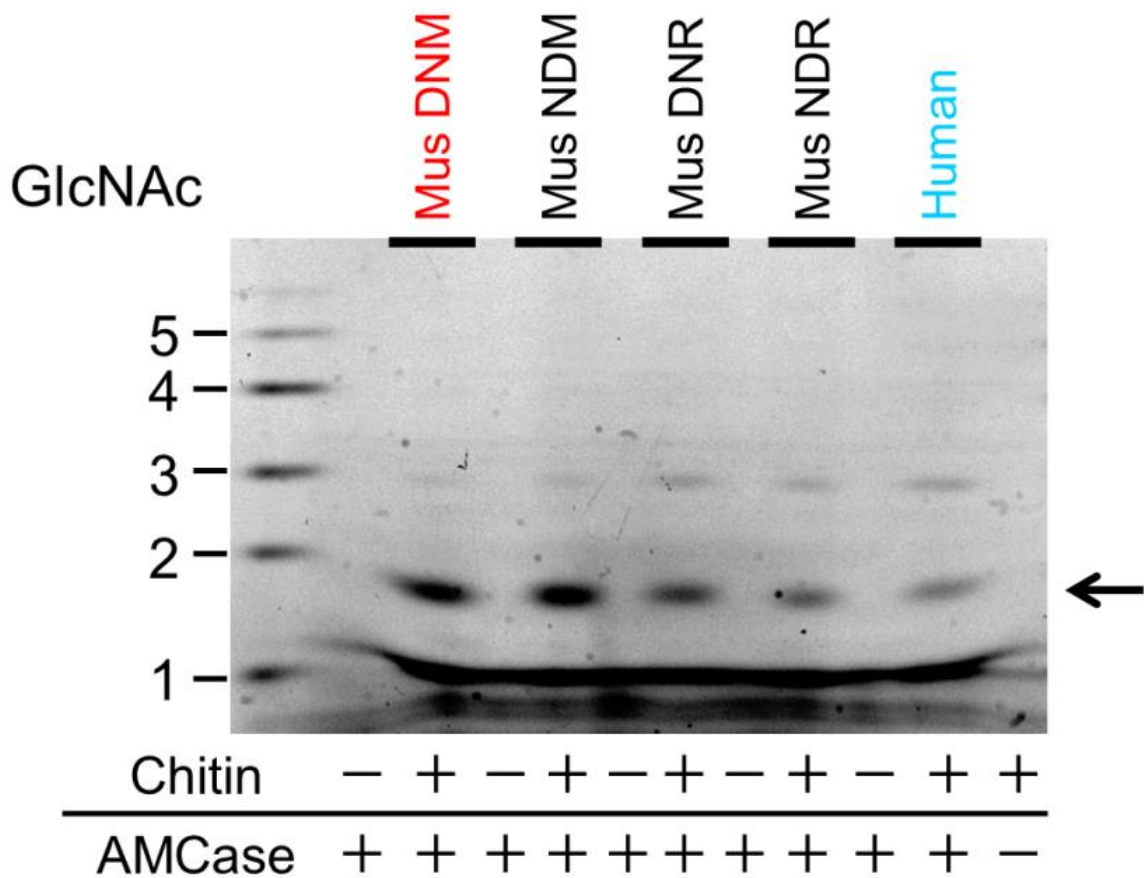


図 23. コロイダルキチンに対する AMCase mutants (DNM, NDM, DNR, NDR) の活性の比較

組換えタンパク質により遊離したキチン断片を蛍光標識し、糖電気泳動によって分析した。GlcNAc オリゴマーマーカールの位置を左側に数字で示した。それぞれの組換えタンパク質は、主に (GlcNAc)₂ を遊離した (矢印)。

表 17. 図 23 における (GlcNAc)₂ の定量

図 22 の組換え AMCcase によりコロイダルキチンから遊離した (GlcNAc)₂ 断片の分析。シグナルの検出法は、第 II 章 第 2 節を参照。Relative (GlcNAc)₂ level は、マウス AMCcase を 100% として算出した。

Sample	(GlcNAc) ₂ level	(GlcNAc) ₂ level / Protein level	Relative (GlcNAc) ₂ level (%)
DNM	410.68 ± 61.49	478.74 ± 71.69	100.00 ± 14.97
NDM	442.16 ± 66.22	303.05 ± 45.38	63.30 ± 9.48
DNR	221.19 ± 56.09	190.19 ± 48.23	39.73 ± 10.08
NDR	124.87 ± 12.89	98.64 ± 10.18	20.60 ± 2.13
Human	115.72 ± 26.21	85.66 ± 19.40	17.89 ± 4.05

第 IV 章 AMCCase の進化的解析

第 1 節 序論

第 III 章の実験によって、AMCCase の 61 番目の M がキチナーゼ活性に大きな影響を与えることが分かった。そこで、このことが、マウスとヒトに限られることかどうか、を明らかにするため、AMCCase を進化的に解析した。

まず、AMCCase の N 末端領域の 61 番目に存在するアミノ酸を、ヒト上科、新世界サル、旧世界サル、遠縁のほ乳類で比較した。次に、61 番目に M, R 以外のアミノ酸が存在する際には、AMCCase のキチナーゼ活性にどのような影響が与えられるかを生化学的に検討した。

さらに、ヒト WT AMCCase が機能を失ったように、進化の過程で遺伝子中の過剰な nsSNPs の存在は、タンパク質の機能的制約を緩和させることが予想される。そこで、10 種のほ乳類の nonsynonymous SNPs と synonymous SNPs の比 (dN/dS) を比較した。

AMCCase は、触媒ドメイン (catalytic domain, CatD) とキチン結合ドメイン (chitin binding domain, CBD) から構成されている。そこで AMCCase の CatD および AMCCase CBD の dN/dS も比較した。

第 2 節 実験方法

系統樹の作製

系統樹はフリーソフトである MEGA7 を用いて UPGMA 法によって作製した (<http://www.megasoftware.net>) [41]。ブートストラップは 1,000 回試行した。進化距離は、Maximum Composite Likelihood 法を用いて計算し、部位当たりの塩基置換の数の単位で表した [42]。

マウス AMCCase mutants の作製

本実験では、部位特異的変異誘発法を利用し、2 つのマウス AMCCase mutants を作製した。マウス AMCCase DNR の作製法は、第 II 章 第 2 節を参照のこと。Fw および Rv プライマーと鋳型 DNA を、表 13 に記載した。

マウス AMCCase DNI の 5' 末端側の部分は、pEZZ18/pre-Protein A-AMCCase NDM-V5-His (マウス) を鋳型として、EcoRI_mature_mouse_AMCCase_Fw80-103 と Mouse M61I Rv181-216 をプライマーに使用し、PCR 増幅した。同様に、3' 末端側の部分は、pEZZ18/pre-Protein A-AMCCase NDM-V5-His (マウス) を鋳型として、Mouse

M6II Fw181-216 と SalI_BGH_Rv をプライマーとして増幅した。増幅した DNA 断片は、ゲル電気泳動で分離し、精製した。2 つの DNA 断片を鋳型とし、EcoRI_mature_mouse_AMCase_Fw80-103 と SalI_BGH_Rv をプライマーとして増幅し、マウス AMCase DNI を調製した。増幅した cDNA を EcoRI と XhoI で切断し、pEZZ18 ベクターに導入し、pEZZ18/pre-Protein A-mouse AMCase DNI -V5-His を作製した。

これらマウス AMCase mutants 発現プラスミドを、*E. coli* BL21 (DE3) に形質転換し、大腸菌で発現し、精製した。

SDS ポリアクリルゲル電気泳動とウェスタンブロット

第 II 章 第 2 節 実験方法と同様の実験操作を行った。

キチナーゼ活性の測定

第 II 章 第 2 節 実験方法と同条件での反応、測定を行った。

コロイダルキチンの分解

第 II 章 第 2 節 実験方法と同条件での反応、測定を行った。

DNA 配列の比較

それぞれの DNA 配列情報は、NCBI データベースよりを取得した (表 18)。それぞれの配列は Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) を使用して比較を行った。

dN/dS (ω) の算出

この計算では、dN/dS (ω) の比率がそれぞれの異なる枝をもつ free ratio model を利用している。

アミノ酸の変化をおこす塩基置換率とアミノ酸の変化をおこさない塩基置換率の割合である dN/dS (ω) は、(<http://services.cbu.uib.no/tools/kaks/docs/kaksfields#phylo>) を参考に Ka/Ks 計算ツール (<http://services.cbu.uib.no/tools/kaks>) で算出した。入力されたヌクレオチド配列は、系統樹解析に使用されたタンパク質をコードする mRNA 領域である。CatD および CBD における dN/dS の算出も同様に行った。Ka/Ks 計算ツールは、dN/dS 算出のために、これらの入力配列から複数の配列アライメントと系統樹を計算し、DNA 配列をタンパク質に翻訳してアライメントを行い、DNA 配列に戻しコドン境界を揃えた。系統樹は、MEGA 7 を用い、構築した。

ドメインごとの dN/dS 算出においては、CatD の C 末端領域に終止コドン挿入し、CBD の開始点に開始コドン挿入した。

表 18. 図 24 のアミノ酸配列比較に用いた AMCase の Accession No.

Common name (Species)	ACCESSION No.
Human (<i>Homo sapiens</i>)	NM_201653.3
Chimpanzee (<i>Pan troglodytes</i>)	XM_009429526.2
Bonobo (<i>Pan paniscus</i>)	XM_003810676.1
Gorilla (<i>Gorilla gorilla</i>)	XM_004026331.1
Orangutan (<i>Pongo abelii</i>)	XM_002810446.2
Gibbon (<i>Nomascus leucogenys</i>)	XM_004089987
Squirrel monkey (<i>Saimiri boliviensis</i>)	XM_003933450.2
Marmoset (<i>Callithrix jacchus</i>)	XM_009001872.1
Angolan Colobus (<i>Colobus angolensis</i>)	XM_011948038.1
Pig-tailed monkey (<i>Macaca nemestrina</i>)	XM_011737112.1
Crab-eating monkey (<i>Macaca fascicularis</i>)	NM_001284548.1
Rhesus monkey (<i>Macaca mulatta</i>)	XM_001104487.1
Tarsiers (<i>Tarsius syrichta</i>)	XM_008068926.1
Greater galago (<i>Otolemur garnettii</i>)	XM_003784030.1
Cattle (<i>Bos taurus</i>)	NM_174699.2
Pig (<i>Sus scrofa</i>)	NM_001258377.1
Dog (<i>Canis familiaris</i>)	XM_537030.5
Bat (<i>Myotis davidii</i>)	XM_006762999.2
Rat (<i>Rattus norvegicus</i>)	NM_207586.2
Mouse (<i>Mus musculus</i>)	AK160173.1

第 3 節 実験結果および考察

M61 は強いキチナーゼ活性にとって大事なアミノ酸残基である

AMCase の N 末端領域の 61 番目に存在するアミノ酸を、ヒト上科, 新世界サル, 旧世界サル, そして遠縁のほ乳類で比較した。61 番目の位置に存在する M は, ヒトとオランウータンを除く全てのほ乳類で保存されていた (図 24)。61 番目の M が, ヒトとオランウータンでは, それぞれ R と I に置換されていた。

次に, マウス WT AMCase への 61 番目の M を I に置換のキチナーゼ活性への影響を検証した。変異型マウス AMCase は, 61I (オランウータン型), 61R (ヒト型) を 61M (マウス WT AMCase) と同様に構築した (図 25)。発現させた組換えタンパク質は, 抗 V5 エピトープ抗体を用いたウェスタンブロットから, 大腸菌で発現した Protein A-mouse AMCase mutant-V5-His は, Protein A-mouse AMCase WT-V5-His と同様に, 分子量が約 68 kDa だった (図 26)。これらのことから, マウス AMCase mutants を大腸菌で発現でき, 取得できたと考えた。

次に, 人工基質を用いてキチナーゼ活性を測定した。61I と 61R のキチナーゼ活性は, マウス WT AMCase と比較して, 著しく活性が減少した (図 27 ; 表 19)。したがって, 61M の I および R への置換はどちらも酵素活性に大きな影響を与えることが分かった。

さらに, コロイダルキチンの分解性を検討した。それぞれのマウス AMCase mutants は, pH 2.0 で, コロイダルキチンを分解し, (GlcNAc)₂ を生成した。しかし, (GlcNAc)₂ の生産量を調べたところ, マウス AMCase mutants である 61I と 61R では, マウス WT AMCase の 61M に比べ, (GlcNAc)₂ の生成量が低かった (図 28 ; 表 20)。

以上の結果から, M61 は, AMCase の強いキチナーゼ活性発現にとって, 非常に大事なアミノ酸残基であることが分かった。

Common name	Family		Sequence	
Human	Hominidae	40	R F M P D N I D P C L C T H L I Y A F A G R Q N N E	65
Chimpanzee	Hominidae	40	R F M P D D I D P C L C T H L I Y A F A G M Q N N E	65
Bonobo	Hominidae	40	R F M P D D I D P C L C T H L I Y A F A G M Q N N E	65
Gorilla	Hominidae	40	R F M P D D I D P C L C T H L I Y A F A G M Q N N E	65
Orangutan	Hominidae	40	R F M P D D I D P C L C T H L I Y A F A G I Q N N E	65
Gibbon	Hylobatidae	40	R F M P D D I D P C L C T H L I Y A F A G M R N N E	65
Squirrel monkey	New world monkey	40	R F K P D D I D P C L C T H L I Y A F A G M R N N E	65
Marmoset	New world monkey	40	R F K P D D I D P C L C T H L I Y A F A G M R N N E	65
Colobus	Old world monkey	40	R F T P D D I D P C L C T H L I Y A F A G M Q N N K	65
Pigtailed monkey	Old world monkey	40	R F T P D D I D P C L C T H L I Y A F A G M Q N N K	65
Crab-eating monkey	Old world monkey	40	R F M P D D I D P C L C T H L I Y A F A G M Q N N K	65
Rhesus monkey	Old world monkey	40	R F M P D D I D P C L C T H L I Y A F A G M Q N N K	65
Tarsier	Tarsiidae	40	R F K P D D I D P C L C T H L I Y A F A G M R N N E	65
Greater galago	Galagidae	40	R F K P D D I D P C L C T H L I Y A F A G M Q N N E	65
Cattle	Bovidae	40	S F K P D N I D P C L C T H L I Y A F A G M S N S E	65
Pig	Suidae	40	S F K P D D I D P C L C T H L V Y A F A G M R D N E	65
Dog	Canidae	40	S F K P D D I D P C L C T H L I Y A F A G M K N N E	65
Bat	Vespertilionidae	40	R F T P D D I D P C L C T H L I Y A F A G M R N N E	65
Rat	Muridae	40	S F K P D D I N P C L C T H L I Y A F A G M Q N N Q	65
Mouse	Muridae	40	S F K P D D I N P C L C T H L I Y A F A G M Q N N E	65

図 24. ほ乳類での AMCcase アミノ酸配列の比較

AMCcase の M61 は、オランウータンとヒト以外の全てのほ乳類において保存されていた。オランウータンは M61I, ヒトは M61R にアミノ酸置換されていた。赤いダイヤモンドマークの下が 61 番目のアミノ酸の位置を示す。

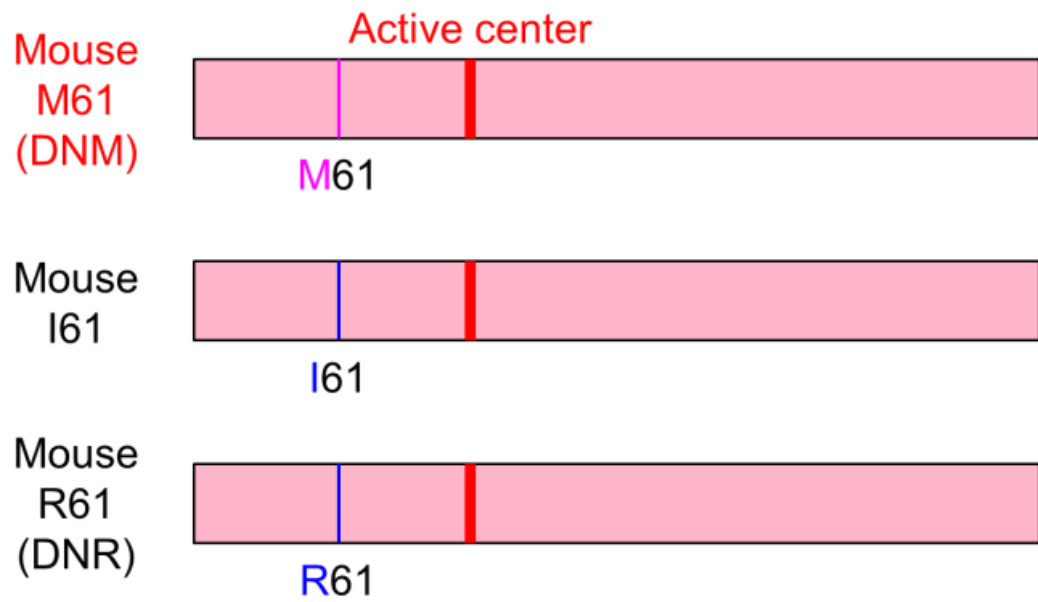


図 25. マウス AMCcase mutants (M61, I61, R61) の模式図

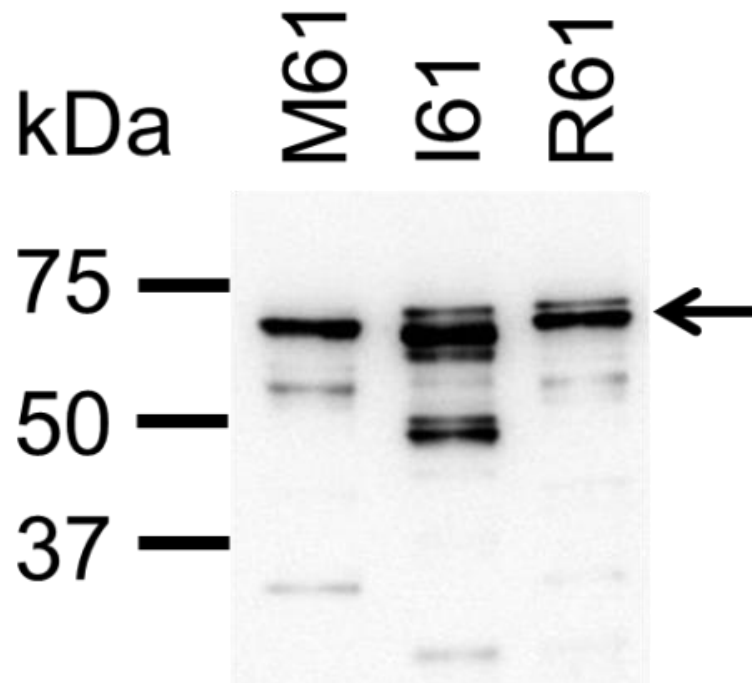


図 26. ウェスタンブロットを用いたマウス AMCase WT と mutants (I61 と R61) の発現確認

左側の数字は分子量，矢印は融合タンパク質 (Protein A-AMCase-V5-His) の位置を示している。

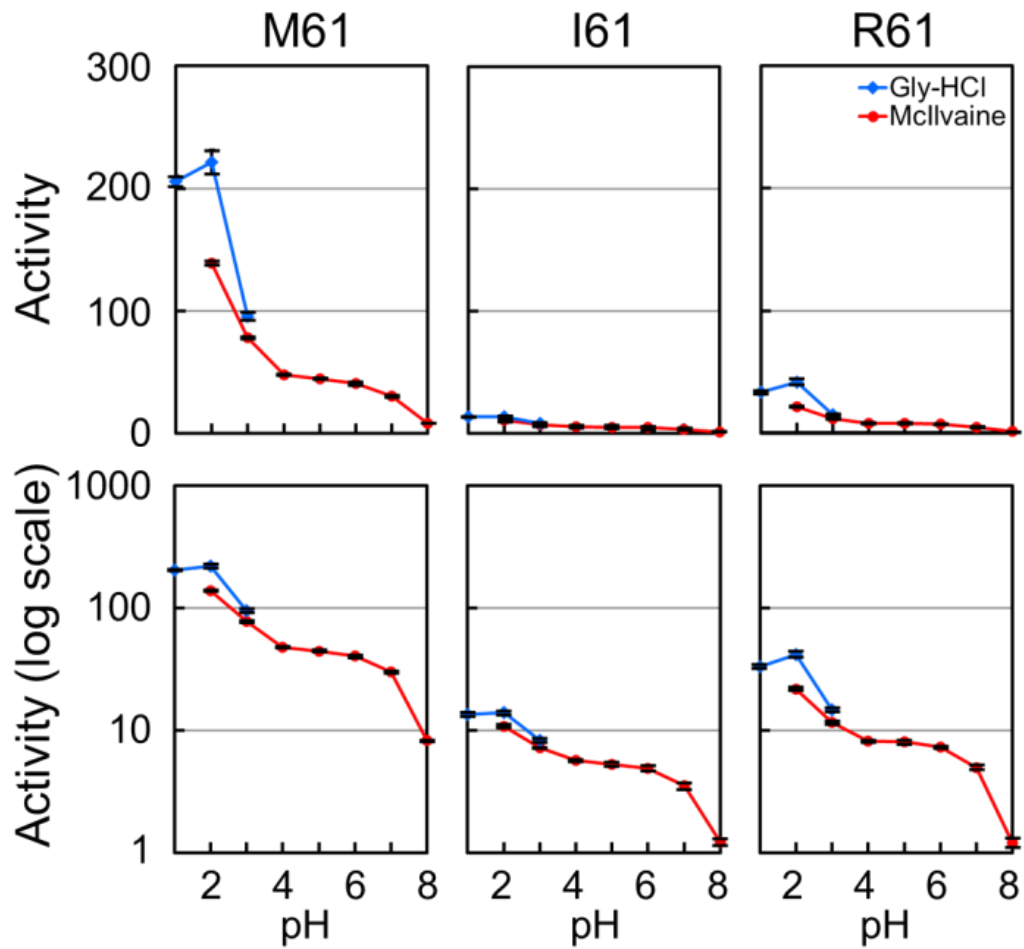


図 27. 人工基質を用いたマウス AMCase WT と mutants (I61 と R61) のキチナーゼ活性の比較

縦軸の値は、実数値（上図）と対数値（下図）で表記されている。エラーバーは、同一の実験を 3 回行って算出した標準偏差を示す。

表 19. 図 26 のタンパク質定量と図 27 の比活性

組換えタンパク質は, SDS-PAGE で分離し, ウェスタブロットで検出した (図 26)。シグナルの検出法は, 第 II 章 第 2 節を参照。Relative activity は, マウス AMCase の活性を 100% として算出した。

Sample	Protein level	Activity (pH 2.0)	Activity / Protein level	Relative activity (%)
M61	0.85 ± 0.18	139.09 ± 1.59	163.71 ± 1.87	100.00 ± 1.14
I61	1.04 ± 0.51	10.78 ± 0.33	10.40 ± 0.32	6.35 ± 0.20
R61	0.84 ± 0.23	21.79 ± 0.62	25.84 ± 0.73	15.78 ± 0.45

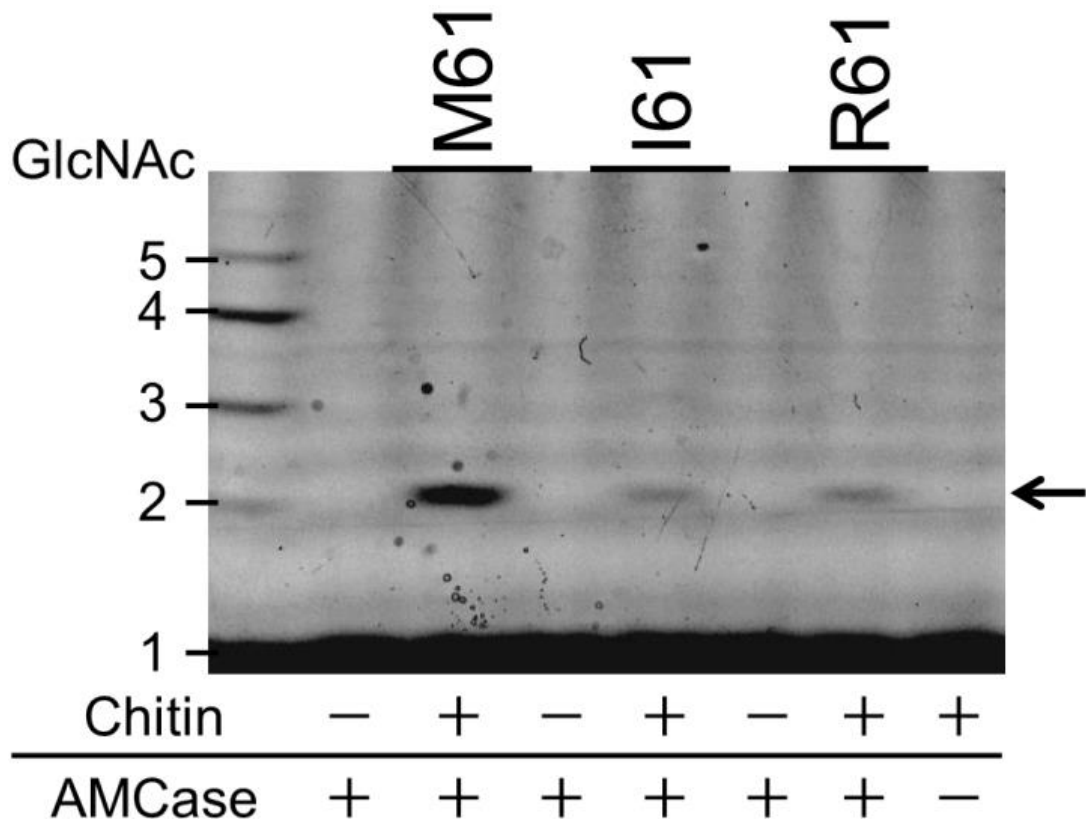


図 28. コロイダルキチンに対するマウス AMCase WT と mutants (I61 と R61) の活性の比較

組換えタンパク質により遊離したキチン断片を蛍光標識し、糖電気泳動によって分析した。GlcNAc オリゴマーマーカーの位置を左側に数字で示した。それぞれの組換えタンパク質は、コロイダルキチンから、主に、 $(\text{GlcNAc})_2$ を生成した (矢印)。

表 20. 図 28 における(GlcNAc)₂ の定量

図 28 の組換え AMCase によりコロイダルキチンから遊離した (GlcNAc)₂ 断片を定量した。シグナルの検出法は, 第 II 章 第 2 節を参照。Relative (GlcNAc)₂ level は, マウス AMCase を 100% として算出した。

Sample	(GlcNAc) ₂ level	(GlcNAc) ₂ level / Protein level	Relative (GlcNAc) ₂ level (%)
M61	195.05 ± 37.73	229.57 ± 44.40	100.00 ± 19.34
I61	20.16 ± 11.71	19.43 ± 11.29	8.46 ± 4.92
R61	38.55 ± 18.29	45.72 ± 21.69	19.91 ± 9.45

ヒト上科における AMCase の進化的解析

dN/dS は、自然選択の選択圧を表す指標となる。 dN/dS は、値により正の自然選択 ($dN/dS > 1$)、中立的な進化状態 ($dN/dS = 1$)、そして負の自然選択 ($dN/dS < 1$) と分けられる。

ヒトを含む霊長類の dN/dS を比べた結果、図 29 に示すように、ヒト以外の霊長類の AMCase では $dN/dS < 1$ の値となり、負の自然選択の状態であった。しかし、ヒト AMCase のみ $dN/dS > 1$ となり、正の自然選択の状態であることが分かった。

次に、CatD と CBD について、同様に、それぞれ進化的に解析した。CatD, CBD の各ドメインでも $dN/dS > 1$ となり、正の自然選択の状態であることが分かった (図 30, 31)。

これらのことは、ヒト AMCase 分子全体が進化の過程で機能的制約が緩和されていることを示す。

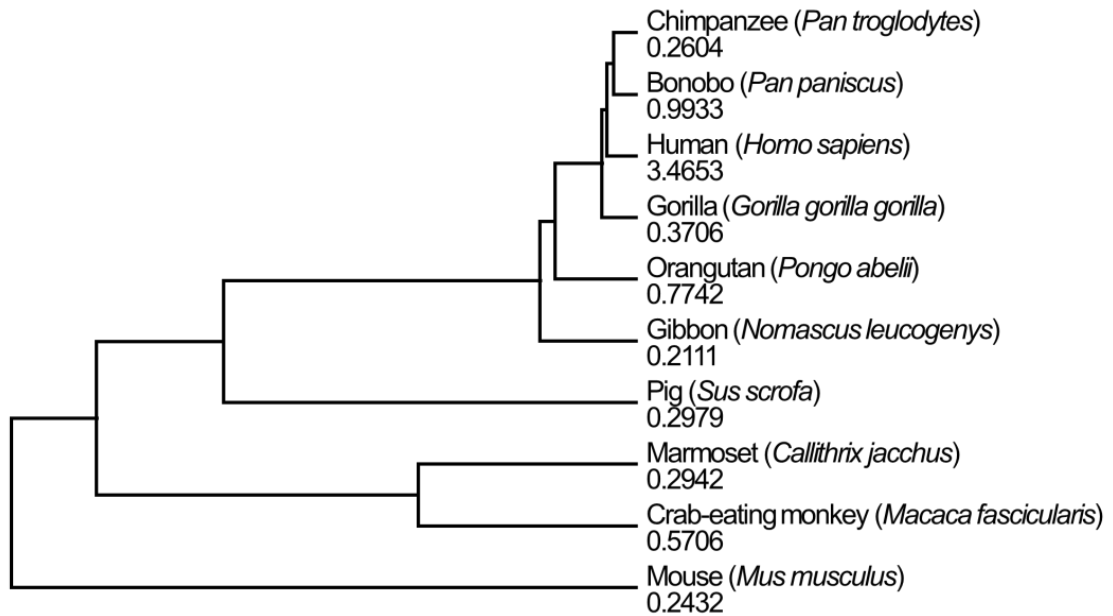


図 29. AMCcase の系統樹と dN/dS 検定

系統樹は、UPGMA 法を用いて作製した。dN/dS の算出には Ka/Ks 計算ツールを用いた。ヒト AMCcase は正の自然選択 ($dN/dS > 1$) を受け、機能的制約が緩和されていた。数字は、dN/dS 値である。

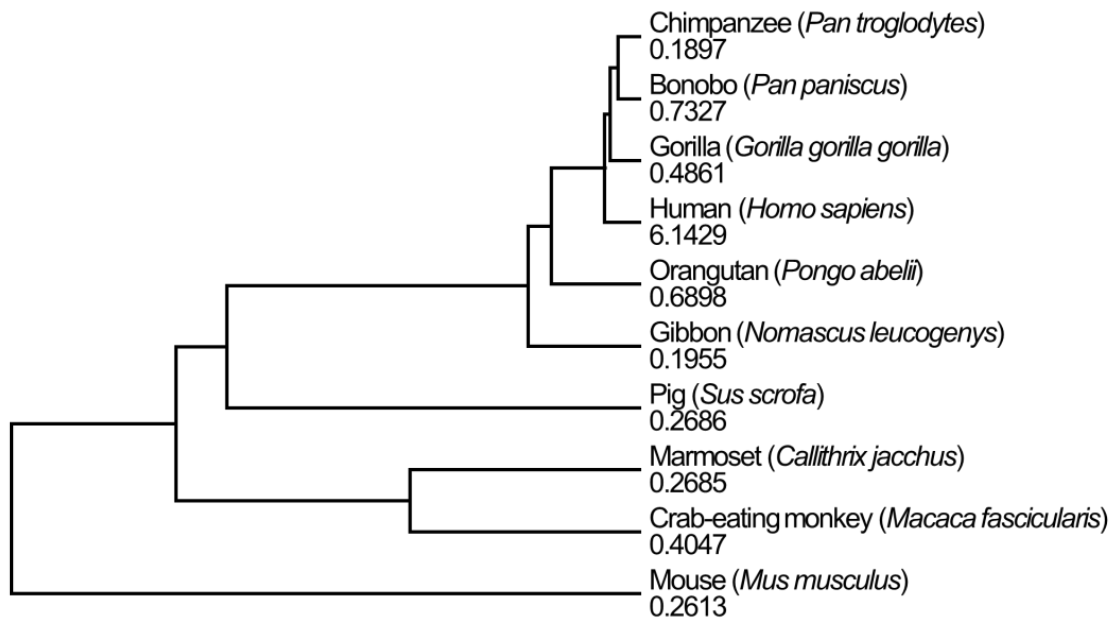


図 30. AMCase の CatD の系統樹と dN/dS 検定

系統樹は、UPGMA 法を用いて作製した。dN/dS の算出には Ka/Ks 計算ツールを用いた。ヒト AMCase の CatD は、正の自然選択 ($dN/dS > 1$) を受け、機能的制約が緩和されていた。数字は、dN/dS 値である。

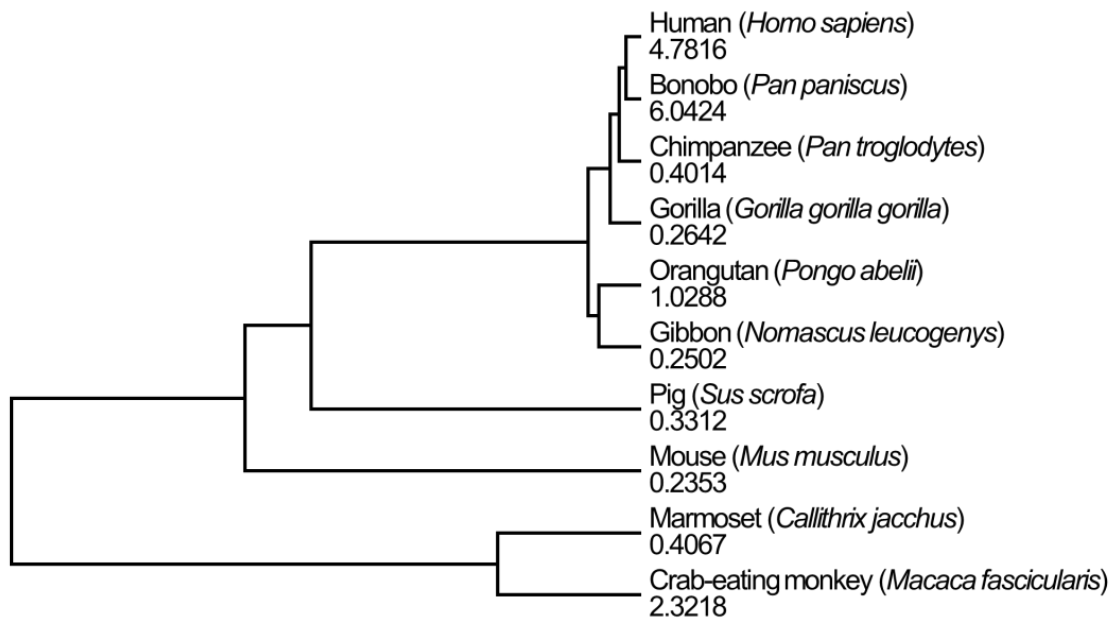


図 31. AMCase の CBD の系統樹と dN/dS 検定

系統樹は、UPGMA 法を用いて作製した。dN/dS の算出には Ka/Ks 計算ツールを用いた。ヒト AMCase の CBD は、正の自然選択 ($dN/dS > 1$) を受け、機能的制約が緩和されていた。数字は、dN/dS 値である。

第 V 章 総合考察

大腸菌で発現したヒト AMCase は、4MU-chitobioside を用いた活性測定の結果、活性の至適 pH が pH 4.0 であった。これは、文献で報告されたヒト AMCase の至適 pH の結果と一致する [28, 37]。このことから、大腸菌で発現した融合タンパク質はフォールディングされ、酵素機能を有していると考えられる。

今回の実験結果から、ヒトとマウス AMCase は、酸性領域に活性の至適 pH を有していた。ヒト AMCase の pH 特性には、H208, H269, R145 が関わっていると報告されている [35]。マウス AMCase もこのアミノ酸配列とは対応しており、アミノ酸配列の同一性、相同性が共に高いので、pH に特異性がある理由は同じであると考えられる。しかし、マウス AMCase の至適 pH が、pH 2.0 であるのに対し、ヒト AMCase は、pH 4.0 である。マウス AMCase は、胃で多く発現しており、消化酵素としての役割があると考えられている [18, 25, 29] が、ヒト AMCase の胃での発現量は、非常に少ない [30]。ヒト AMCase のキチナーゼ活性は、マウス AMCase と比べ、かなり低いことから、ヒト AMCase は、胃で働きうる pH 依存性を有してはいても、胃で消化酵素として機能していない、と考えられる。

本研究では、nsSNPs によって生じたヒト AMCase variants のキチナーゼ活性を調べた。ヒト AMCase のキチナーゼ活性は、マウスに存在しない特異的なアミノ酸によって顕著に減少した。Variant A と B はアミノ酸置換によって、基質への結合性や基質と結合した際の間体の安定性に影響が与えられることにより、活性を失ったと考えることが出来る。したがって、ヒト AMCase は、進化の過程で機能を失い、偽遺伝子 (pseudogene) になりつつあると推定される (図 32)。この仮説は、霊長類だけでなく遠縁のほ乳類との比較の結果からも裏付けられている。偽遺伝子化は、遺伝子の機能喪失による、表現型へ適応するためのゲノムの進化現象であると考えられている [43]。

他の霊長類の AMCase 遺伝子の dN/dS 値は、進化において、中立の値に近いのに対して、ヒト AMCase のみ dN/dS 値が大きい (図 29, 30, 31)。

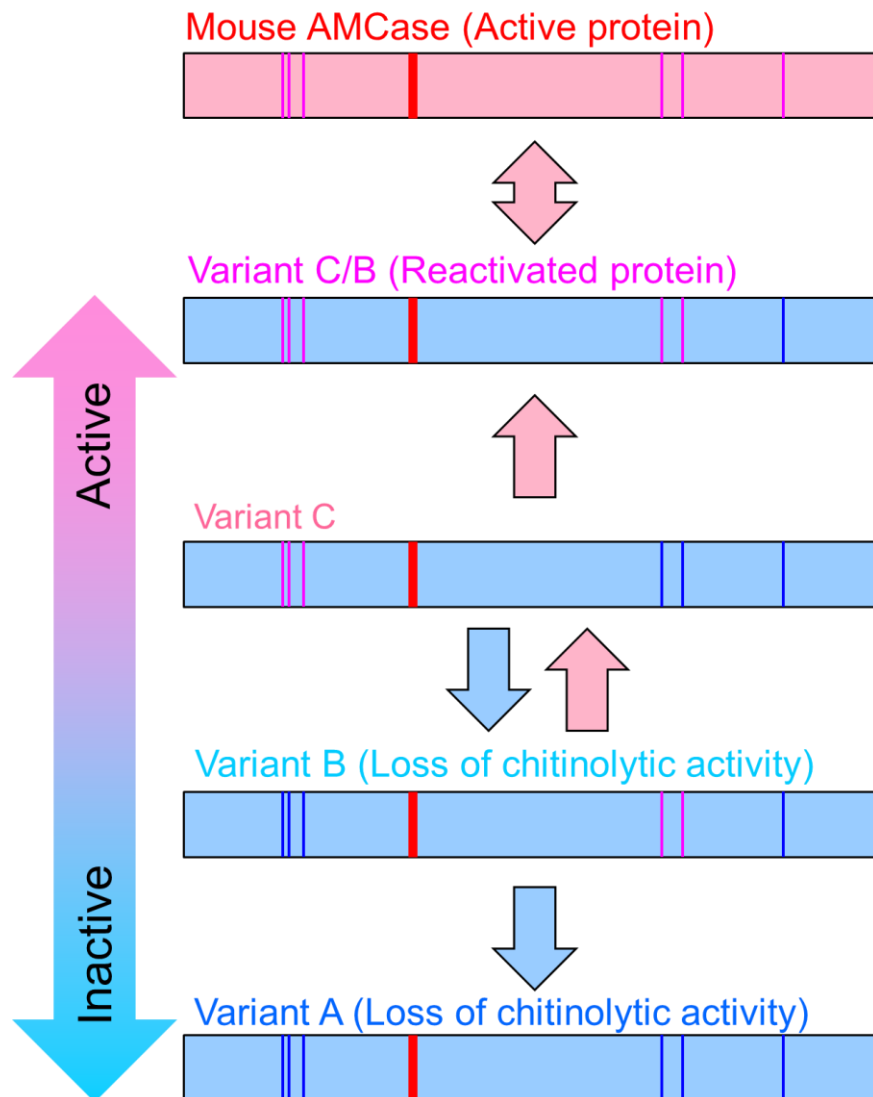


図 32. アミノ酸置換が生じる SNPs によるヒト AMCase の活性の喪失と復活

SNPs によってヒト AMCase variants が生成する。これらの variants のキチナーゼ活性は、アミノ酸置換の位置および組み合わせに依存した。ヒト AMCase におけるキチナーゼ活性は, variant C の N 末端領域と variant B の C 末端領域とを結合することによって再活性化できた。取得した新規 variant C/B は, マウス AMCase に匹敵する高いキチナーゼ活性を有していた。

このことから、ヒト **AMCase** は、進化の過程で機能的喪失を起こし、未知の表現形への適応が起きている可能性が高い。また、マウス **AMCase** と比較した時、ヒト **AMCase** のキチナーゼ活性は、減少している。さらに、ヒトの胃組織においては、**AMCase mRNA** の発現レベルが相対的に減少している [30]。これは、現代人がキチン含有食物を大量に消費しないことから考えても妥当と言えるだろう。多くの胃の疾患は、外因性の微生物による感染に関連している。ピロリ菌の感染に関連した胃炎の重症度は、内在性のキチナーゼの発現に関係している可能性がある [44, 45]。以上のように、ヒトの胃組織での **AMCase** のキチナーゼ活性が低いことに関連し、この酵素の胃の疾患への関与についてはまだ不明な点が多い。

Max Seibold らのヒト **AMCase** に関する先行研究において、その活性中心をコードする領域付近に認められる新規の塩基置換 (A290G, G296A, G339T) を含む 8 つの nsSNPs が同定されている。そして、集団遺伝学的解析から、**AMCase** の nsSNP である G339T (R61M) は、喘息に対して保護的に働くと報告されている [28]。しかし、そのアミノ酸置換の生物・医学的重要性は、これまで不明であった。本研究において、61 番目に存在する M は、ヒトとオランウータンを除くほ乳類で完全に保存されていた。さらに、M61R と M61I は、マウス WT **AMCase** のキチナーゼ活性の著しい減少を引き起こした。このことから、ヒト **AMCase** 61R は、キチナーゼを有していない機能喪失 (loss of function) **AMCase variant** であることを示した。そして、本研究と Max Seibold らの先行研究において、喘息に対して保護的に働くヒト **AMCase** G339T (R61M) は、機能獲得的 (gain of function) な強いキチナーゼ活性を有した **AMCase variant** であることを示した。このラインでの今後の展望として、様々な人種での集団遺伝学的大規模解析で、喘息患者と R61/M61 との関係性を調べることに合理性がある。その解析で、喘息と **AMCase** の関係がより明確になると考えられる。

最近の研究でネアンデルタール人とデニソワ人のゲノムの塩基配列が決定されている [46-48]。それらのヒト族の古代人の **AMCase** 遺伝子において、M61 あるいは R61 を有するかどうかは、進化を考えるうえで重要である。多くの古代人で決定することは大変興味深く、重要なことである。

この研究において不活性化していたヒト **AMCase variants** を組み合わせることで、ヒト **AMCase** を、マウス並みに活性化することができた。マウス **AMCase** のアミノ酸配列がよく保存された variant C/B (図 14) は、高いキチナーゼ活性を有し、マウス **AMCase** と似た pH 依存性であった (図 19, 20, 32)。これらの結果は、酵素に導入された特異的アミノ酸置換がその活性を低下させる (特に、M61R および M61I 置換はキチン分解活性に重要である) が、他方、活性が高い酵素において保存されたアミノ酸は、ヒト **AMCase** をマウス **AMCase** に匹敵するレベルに再活性化すること示す。さらに、この研究では、ヒト **AMCase** のキチン分解活性を低下させる原因となる特定のアミノ酸を nsSNPs として決定した。ここでのコンセプトの概略は将

来，最小の遺伝子操作で，酵素活性の増強に利用することができる（図 32）。

AMCase 遺伝子の発現レベルの上昇または低下は，喘息，アレルギー性炎症，眼球のアレルギー，ドライアイ症候群，胃がん，アデノイド肥大，結膜炎，胃炎や鼻ポリープ形成など多くの疾患で報告されている [27, 34, 44, 45, 49-55]。さらに，AMCase は，病原体，寄生虫およびオボアルブミンに対する Th2 ヘルパー細胞媒介免疫応答中のインターロイキン-13 が介在する重要な下流エフェクターである [27, 56]。ヒト AMCase のキチン分解活性は，マウス AMCase よりも顕著に低かったが，ヒトに存在する 2 つの比較的不活性な variants を組み合わせることで，ヒト AMCase のキチン分解活性を活性化することができた（図 32）。結果として新しく作製された variant C/B は，マウス AMCase に匹敵するキチン分解活性と pH 依存性を示した。これらの結果は，導入された特定のアミノ酸残基が，その酵素の活性を減少させ，他方，活性の高い酵素で保存されたアミノ酸は，ヒトの酵素を活性化させることを示している。したがって，この研究で作製した組換えタンパク質は，ヒトでの AMCase の病態生理学的な役割の解明に利用できる可能性がある。

本研究の成果は，AMCase が関係した治療法の開発だけでなく，AMCase の活性に起因する特定のヒト疾患の治療につながると期待される。

第 VI 章 結論

AMCase は、喘息とアレルギー性炎症、食物消化に関わっている。しかし、AMCase のキチナーゼ活性の遺伝的制御に関する知見は、とても限られていた。組換えヒト AMCase のキチナーゼ活性をマウス AMCase と比較した時、ヒト AMCase のキチナーゼ活性は、マウスに比べ、約 70 倍低下していた。このことから、本研究において、ヒト AMCase が活性を喪失していることを明らかにした。

次に、ヒトとマウスで AMCase のキメラタンパク質を作製することで、ヒト AMCase のキチナーゼ活性低下の原因がキチナーゼの活性中心を含む N 末領域に存在することを明らかにした。

ヒト AMCase のキチナーゼ活性は、nsSNPs にコードされたアミノ酸置換によって変化した。ヒト AMCase のキチナーゼ活性は、N45, D47, R61 をマウス AMCase のアミノ酸配列において保存されている D45, N47, M61 に置換することによって著しく上昇させることができた。他方、マウス AMCase のキチナーゼ活性は M61R 変異を導入することで顕著に減少させることができた。

さらに、進化的解析から、AMCase の M61 は、ヒトやオランウータンを除いた他の霊長類やほ乳類で保存されたものであった。オランウータンの AMCase は 61I であり、これもマウス AMCase に置換した際にキチナーゼ活性を低下させた。これらのことから、M61 は、AMCase のキチナーゼ活性にとって重要なアミノ酸残基であることが示された。

以上、本博士学位論文の結論として、ヒト AMCase キチナーゼ活性が nsSNPs によって制御され、高い活性を有したヒト AMCase variant のアミノ酸置換は、マウス AMCase のアミノ酸配列と一致することを明らかにした [57]。

参考文献

1. Aam BB, Heggset EB, Norberg AL, Sorlie M, Varum KM, Eijsink VG. Production of chitooligosaccharides and their potential applications in medicine. *Mar Drugs*. 2010;8:1482-517.
2. Khoushab F, Yamabhai M. Chitin research revisited. *Mar Drugs*. 2010;8:1988-2012.
3. Carlstrom D. The crystal structure of alpha-chitin (poly-N-acetyl-D-glucosamine). *J Biophys Biochem Cytol*. 1957;3:669-83.
4. Hackman RH, Goldberg M. Studies on chitin. VI. The nature of alpha- and beta-chitins. *Aust J Biol Sci*. 1965;18:935-46.
5. Minke R, Blackwell J. The structure of alpha-chitin. *J Mol Biol*. 1978;120:167-81.
6. Gardner KH, Blackwell J. Refinement of the structure of beta-chitin. *Biopolymers*. 1975;14:1581-95.
7. Merzendorfer H, Zimoch L. Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. *J Exp Biol*. 2003;206:4393-412.
8. Peesan M, Rujiravanit R, Supapho P. Characterisation of beta-chitin/poly(vinyl alcohol) blend films. *Polymer Testing*. 2003;22 381-7.
9. Younes I, Rinaudo M. Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications. *Mar Drugs*. 2015;13:1133-74.
10. Hamid R, Khan MA, Ahmad M, Ahmad MM, Abdin MZ, Musarrat J, et al. Chitinases: An update. *J Pharm Bioallied Sci*. 2013;5:21-9.
11. Bussink AP, van Eijk M, Renkema GH, Aerts JM, Boot RG. The biology of the Gaucher cell: the cradle of human chitinases. *Int Rev Cytol*. 2006;252:71-128.
12. Meibom KL, Li XB, Nielsen AT, Wu CY, Roseman S, Schoolnik GK. The *Vibrio cholerae* chitin utilization program. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:2524-9.
13. Bierbaum S, Nickel R, Koch A, Lau S, Deichmann KA, Wahn U, et al. Polymorphisms and haplotypes of acid mammalian chitinase are associated with bronchial asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;172:1505-9.
14. Chatterjee R, Batra J, Das S, Sharma SK, Ghosh B. Genetic association of acidic mammalian chitinase with atopic asthma and serum total IgE levels. *J Allergy Clin Immunol*. 2008;122:202-8, 8 e1-7.
15. Funkhouser JD, Aronson NN, Jr. Chitinase family GH18: evolutionary insights from the genomic history of a diverse protein family. *BMC Evol Biol*. 2007;7:96.
16. Tiffin P. Comparative evolutionary histories of chitinase genes in the Genus *zea* and Family *poaceae*. *Genetics*. 2004;167:1331-40.
17. Renkema GH, Boot RG, Muijsers AO, Donker-Koopman WE, Aerts JM. Purification and characterization of human chitotriosidase, a novel member of the chitinase family

- of proteins. *J Biol Chem.* 1995;270:2198-202.
18. Boot RG, Blommaert EF, Swart E, Ghauharali-van der Vlugt K, Bijl N, Moe C, et al. Identification of a novel acidic mammalian chitinase distinct from chitotriosidase. *J Biol Chem.* 2001;276:6770-8.
 19. Lee CG, Da Silva CA, Dela Cruz CS, Ahangari F, Ma B, Kang MJ, et al. Role of chitin and chitinase/chitinase-like proteins in inflammation, tissue remodeling, and injury. *Annu Rev Physiol.* 2011;73:479-501.
 20. Bueter CL, Specht CA, Levitz SM. Innate sensing of chitin and chitosan. *PLoS Pathog.* 2013;9:e1003080.
 21. Hollak CE, van Weely S, van Oers MH, Aerts JM. Marked elevation of plasma chitotriosidase activity. A novel hallmark of Gaucher disease. *J Clin Invest.* 1994;93:1288-92.
 22. Boot RG, Renkema GH, Strijland A, van Zonneveld AJ, Aerts JM. Cloning of a cDNA encoding chitotriosidase, a human chitinase produced by macrophages. *J Biol Chem.* 1995;270:26252-6.
 23. Boot RG, Renkema GH, Verhoek M, Strijland A, Blik J, de Meulemeester TM, et al. The human chitotriosidase gene. Nature of inherited enzyme deficiency. *J Biol Chem.* 1998;273:25680-5.
 24. Olland AM, Strand J, Presman E, Czerwinski R, Joseph-McCarthy D, Krykbaev R, et al. Triad of polar residues implicated in pH specificity of acidic mammalian chitinase. *Protein Sci.* 2009;18:569-78.
 25. Boot RG, Bussink AP, Verhoek M, de Boer PA, Moorman AF, Aerts JM. Marked differences in tissue-specific expression of chitinases in mouse and man. *J Histochem Cytochem.* 2005;53:1283-92.
 26. Kimura M, Wakita S, Ishikawa K, Sekine K, Yoshikawa S, Sato A, et al. Functional Properties of Mouse Chitotriosidase Expressed in the Periplasmic Space of *Escherichia coli*. *PLoS One.* 2016;11:e0164367.
 27. Zhu Z, Zheng T, Homer RJ, Kim YK, Chen NY, Cohn L, et al. Acidic mammalian chitinase in asthmatic Th2 inflammation and IL-13 pathway activation. *Science.* 2004;304:1678-82.
 28. Seibold MA, Reese TA, Choudhry S, Salam MT, Beckman K, Eng C, et al. Differential enzymatic activity of common haplotypic versions of the human acidic Mammalian chitinase protein. *J Biol Chem.* 2009;284:19650-8.
 29. Ohno M, Tsuda K, Sakaguchi M, Sugahara Y, Oyama F. Chitinase mRNA levels by quantitative PCR using the single standard DNA: acidic mammalian chitinase is a major transcript in the mouse stomach. *PLoS One.* 2012;7:e50381.
 30. Ohno M, Togashi Y, Tsuda K, Okawa K, Kamaya M, Sakaguchi M, et al.

- Quantification of chitinase mRNA levels in human and mouse tissues by real-time PCR: species-specific expression of acidic mammalian chitinase in stomach tissues. *PLoS One*. 2013;8:e67399.
31. Kashimura A, Kimura M, Okawa K, Suzuki H, Ukita A, Wakita S, et al. Functional Properties of the Catalytic Domain of Mouse Acidic Mammalian Chitinase Expressed in *Escherichia coli*. *Int J Mol Sci*. 2015;16:4028-42.
 32. Ohno M, Kimura M, Miyazaki H, Okawa K, Onuki R, Nemoto C, et al. Acidic mammalian chitinase is a proteases-resistant glycosidase in mouse digestive system. *Sci Rep*. 2016; 6 37756.
 33. Chou YT, Yao S, Czerwinski R, Fleming M, Krykbaev R, Xuan D, et al. Kinetic characterization of recombinant human acidic mammalian chitinase. *Biochemistry*. 2006;45:4444-54.
 34. Reese TA, Liang HE, Tager AM, Luster AD, Van Rooijen N, Voehringer D, et al. Chitin induces accumulation in tissue of innate immune cells associated with allergy. *Nature*. 2007;447:92-6.
 35. Bussink AP, Vreede J, Aerts JM, Boot RG. A single histidine residue modulates enzymatic activity in acidic mammalian chitinase. *FEBS Lett*. 2008;582:931-5.
 36. Chen L, Shen Z, Wu J. Expression, purification and in vitro antifungal activity of acidic mammalian chitinase against *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* and *Trichophyton rubrum* strains. *Clin Exp Dermatol*. 2009;34:55-60.
 37. Goedken ER, O'Brien RF, Xiang T, Banach DL, Marchie SC, Barlow EH, et al. Functional comparison of recombinant acidic mammalian chitinase with enzyme from murine bronchoalveolar lavage. *Protein Expr Purif*. 2011;75:55-62.
 38. Kashimura A, Okawa K, Ishikawa K, Kida Y, Iwabuchi K, Matsushima Y, et al. Protein A-mouse acidic mammalian chitinase-V5-His expressed in periplasmic space of *Escherichia coli* possesses chitinase functions comparable to CHO-expressed protein. *PLoS One*. 2013;8:e78669.
 39. Reikofski J, Tao BY. Polymerase chain reaction (PCR) techniques for site-directed mutagenesis. *Biotechnol Adv*. 1992;10:535-47.
 40. Jackson P. The use of polyacrylamide-gel electrophoresis for the high-resolution separation of reducing saccharides labelled with the fluorophore 8-aminonaphthalene-1,3,6-trisulphonic acid. Detection of picomolar quantities by an imaging system based on a cooled charge-coupled device. *Biochem J*. 1990;270:705-13.
 41. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol*. 2016;33:1870-4.
 42. Tamura K, Nei M, Kumar S. Prospects for inferring very large phylogenies by using

- the neighbor-joining method. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:11030-5.
43. Wang X, Grus WE, Zhang J. Gene losses during human origins. *PLoS Biol*. 2006;4:e52.
 44. Cozzarini E, Bellin M, Norberto L, Polese L, Musumeci S, Lanfranchi G, et al. CHIT1 and AMCase expression in human gastric mucosa: correlation with inflammation and *Helicobacter pylori* infection. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2009;21:1119-26.
 45. Nookaew I, Thorell K, Worah K, Wang S, Hibberd ML, Sjoval H, et al. Transcriptome signatures in *Helicobacter pylori*-infected mucosa identifies acidic mammalian chitinase loss as a corpus atrophy marker. *BMC Med Genomics*. 2013;6:41.
 46. Green RE, Krause J, Briggs AW, Maricic T, Stenzel U, Kircher M, et al. A draft sequence of the Neandertal genome. *Science*. 2010;328:710-22.
 47. Meyer M, Kircher M, Gansauge MT, Li H, Racimo F, Mallick S, et al. A high-coverage genome sequence from an archaic Denisovan individual. *Science*. 2012;338:222-6.
 48. Prufer K, Racimo F, Patterson N, Jay F, Sankararaman S, Sawyer S, et al. The complete genome sequence of a Neanderthal from the Altai Mountains. *Nature*. 2014;505:43-9.
 49. Bucolo C, Musumeci M, Maltese A, Drago F, Musumeci S. Effect of chitinase inhibitors on endotoxin-induced uveitis (EIU) in rabbits. *Pharmacol Res*. 2008;57:247-52.
 50. Musumeci M, Aragona P, Bellin M, Maugeri F, Rania L, Bucolo C, et al. Acidic mammalian chitinase in dry eye conditions. *Cornea*. 2009;28:667-72.
 51. Bucolo C, Musumeci M, Musumeci S, Drago F. Acidic Mammalian chitinase and the eye: implications for ocular inflammatory diseases. *Front Pharmacol*. 2011;2:43.
 52. Seibold MA, Donnelly S, Solon M, Innes A, Woodruff PG, Boot RG, et al. Chitotriosidase is the primary active chitinase in the human lung and is modulated by genotype and smoking habit. *J Allergy Clin Immunol*. 2008;122:944-50 e3.
 53. Heo KW, Hur DY, Park SK, Yang YI, Kwak HH, Kim TY. Expression of chitinases in hypertrophied adenoids of children. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2011;145:660-5.
 54. Correale J, Fiol M. Chitinase effects on immune cell response in neuromyelitis optica and multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2011;17:521-31.
 55. Park SK, Cho HW, Heo KW, Hur DY, Lee HK. Role of acidic mammalian chitinase and chitotriosidase in nasal polyps. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2009;141:462-6.
 56. Hartl D, He CH, Koller B, Da Silva CA, Kobayashi Y, Lee CG, et al. Acidic mammalian chitinase regulates epithelial cell apoptosis via a chitinolytic-independent mechanism. *J Immunol*. 2009;182:5098-106.
 57. Okawa K, Ohno M, Kashimura A, Kimura M, Kobayashi Y, Sakaguchi M, et al. Loss

and gain of human acidic mammalian chitinase activity by nonsynonymous SNPs. *Mol Biol Evol.* 2016;33:3183-93.

謝辞

本研究を遂行するにあたり、6年間熱心なご指導を頂き終始暖かく、真剣に見守って下さった小山文隆教授に心から感謝いたします。

日常の議論を通じて多くの知識や示唆を頂いた菅原康里准教授と坂口政吉講師に深く感謝いたします。

原著論文作成に際して多くの協力、助言、指摘を賜りました Peter O. Bauer 米国メイヨークリニック研究員、紀嘉浩明治薬科大学講師、本学釜谷美則准教授に深く感謝いたします。

本学位論文の副査を担当していただき、副査としてご助言を戴くとともに本論文の細部にわたりご指導を戴いた今村保忠教授、南雲紳史教授、澤村直哉早稲田大学准教授に深く感謝いたします。

私が、研究室にいる間、共に実験を行い、論文作成を助けて下さった大野美紗さん、檜村昭徳さん、木村将大さんをはじめ生物医化学研究室の皆様、有難うございました。

最後になりましたが、どんな時でも温かく応援してくれ経済的にも援助してくれた両親には深く感謝します。