博士学位論文

氏名(本籍)	大野 美紗 (神奈川県)
学位の種類	博士 (工学)
学位記番号	博甲 第140号
学位授与年月日	平成 28 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	ほ乳類キチナーゼとキチナーゼ様タンパク質
	mRNA レベルの定量法の確立とその発現レベル
	の解析
論文審查委員	主查 小山 文隆 教授
	副查 今村 保忠 教授
	〃 南雲 紳史 教授

工学院大学大学院

〃 佐藤 光史 教授

]]

IJ

IJ

平 秀晴 岩手大学名誉教授

博士学位論文

ほ乳類キチナーゼとキチナーゼ様タンパク質 mRNA レベルの定量法の確立と その発現レベルの解析

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	bd13001
氏名	大野 美紗
指導教員	小山 文隆 教授

目次

第 I 章 序論	4
第 1 節 キチン	4
第2節キチナーゼ	4
第3節キチナーゼ様タンパク質	5
第 4 節 研究目的	5
第 Ⅱ 章 一つの標準 DNA を用いた定量 PCR によるキチナーゼ mRNA レベル:酸性	ŧ
ほ乳類キチナーゼはマウスの胃で主要な転写産物である	7
第1節序論	7
第 2 節 実験材料と実験方法	7
RNAと cDNA の調製	7
Real-time PCR	8
標準 DNA の作成	8
五つの全コード領域をカバーしている cDNA の調製	9
標準曲線	9
Real-time PCR による mRNA の定量	9
第3節実験結果1	0
新規 qPCR 法の確立1	0
マウス標準 DNA の作成1	0
標準曲線と qPCR システムの検証1	1
マウス組織における Chitl と AMCase の発現1	1
肺と胃組織での Chit1 と AMCase の mRNA レベル1	2
第4節考察1	2
第 5 節 要約14	4
第 Ⅲ 章 Real-time PCR によるヒトとマウス組織のキチナーゼ mRNA レベルの定量: 常	冒
組織における酸性ほ乳類キチナーゼの種特異的発現24	4
第1節序論2	4
第 2 節 実験材料と実験方法24	4
RNAとcDNAの調製2	4
Real-time PCR24	4
ヒト標準 DNA の作成2	5
完全コード領域をカバーしている五つのヒトの cDNA の調製	5
Real-time PCR による mRNA の定量2	5
ヒト-マウス複合型標準 DNA の作成2	5
抗体調製	6
マウスの胃のタンパク質の調製ととトの胃の可溶化液2	6

キチナーゼの酵素活性	26
ウェスタンブロット	26
第 3 節 実験結果	27
Real-time PCR システムの確立と検証	27
正常ヒト組織における Chitl と AMCase の発現	
正常ヒト肺と胃組織での Chitl と AMCase の発現レベルの解析	
ヒト-マウス複合型標準 DNA を使った定量システムの検証	
Chitl と AMCase mRNA レベルのヒトとマウス組織での比較	29
胃組織におけるタンパク質レベルの解析	
第 4 節 考察	31
第 5 節 要約	32
第 IV 章 キチナーゼ様タンパク質を識別するための定量 real-time PCR シス	テムの確
立:触媒的に不活性な breast regression protein-39 と Ym1 はマウスの肺で恒常	遺伝子で
ある	46
第1節序論	46
第 2 節 実験材料と実験方法	46
RNAと cDNA 調製	46
Real-time PCR のためのプライマーの選択	46
マウス Refs/CLPs 標準 DNA の作成	47
完全コード領域を含む BRP-39, Ym1, Ym2 cDNA の調製	47
標準曲線の作成と mRNA の定量	47
統計解析	48
第 3 節 実験結果	48
CLPs 定量のための qPCR システムの確立	48
マウス Refs/CLPs 標準 DNA の作成	
pGEM-T Easy 付マウス Refs/CLPs 標準 DNA の評価	
標準曲線と qPCR システムの検証	49
正常なマウス組織における CLPs の発現	
マウスの肺と胃組織における CLPs の mRNA レベルの比較	50
第4節考察	51
第 5 節 要約	
第 V 章 一つの標準 DNA を用いた正常なヒト組織における YKL-40 の定	量 Real-
time PCR 解析とほ乳類キチナーゼ mRNA との比較	65
第1節序論	65
第2節 実験材料と実験方法	65
RNAと cDNA 調製	65
Real-time PCR のためのプライマーの選択	65

ヒト Refs/YKL-40 標準 DNA の作成	65
完全コード領域をカバーしている YKL-40 cDNA の調製	66
qPCR を使った標準曲線の作成とmRNA の定量	66
第 3 節 実験結果	66
YKL-40 mRNA 定量のための qPCR システムの確立	66
ヒト Refs/YKL-40 標準 DNA の作成と qPCR システムの検証	66
正常なヒト組織における YKL-40 mRNA の発現レベル	67
正常なヒト組織における YKL-40 mRNA レベルの比較	67
第 4 節 考察	67
第 5 節 要約	68
第 Ⅵ 章 総合考察	76
第 Ⅶ 章 結論	
参考文献	79
謝辞	

第 I 章 序論

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 結合した直鎖の高分子 化合物で,自然界で二番目に多い多糖である (図 1.1) [1]。キチンは,真菌,甲殻 類,昆虫の主要な構成成分として不可欠な要素であり [1,2],外敵からの防御として 機能する。またこれらの生物は,キチンを分解し,エネルギー源として利用すると 考えられている [3]。キチンは,まれに動物の餌に含まれている。しかし,キチンは消化 システムで分解されないと考えられているため,食物繊維とみなされている。



図 1.1 キチン

第2節 キチナーゼ

キチナーゼは、高分子キチンの β -1,4 グリコシド結合を加水分解する。ほ乳類は キチンやその合成酵素を生産しないが、ヒトとマウスは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, AMCase) の二種類の活性のあるキチナーゼを発現している [2,4]。両酵素は、糖質 加水分解酵素ファミリー 18 に属している [the carbohydrate active enzymes (CAZy) database, http://www.cazy.org/] [5,6]。キチナーゼのファミリー 18 の触媒作用に関わるコン センサス配列は、DXXDXDXE で、E が触媒残基と考えられている [7-9]。

Chit1 は, ほ乳類で最初に精製, クローン化されたキチナーゼである [10,11]。 AMCase は, ほ乳類で二番目に見出された活性のあるキチナーゼで, Chit1 の代償的 な酵素と考えられている。AMCase は, 酸性の等電点であることから名づけられた [12,13]。

Chitl と AMCase は、分子量約 50 kDa のタンパク質として細胞外に分泌され る。両タンパク質は、N-末端に触媒ドメイン、ヒンジ(分子上の折れ曲がる可動 部)領域、C-末端にキチン結合ドメインの三領域からなる [11,12]。マウス AMCase は、Chitl に対し、52% の同一性と 60% の類似性がある [7]。これらの構造上の類 似性にも関わらず、これら酵素は酸性 pH での酵素化学的作用に関して著しい差異 がある。AMCase は、特徴的な至適 pH を有し、それは pH 2 であり、(明確ではな いけれども)二番目の至適 pH を pH 4~7 にも有する [12]。他方 Chitl は、pH 5 付近に至適 pH を有する [10,14]。

第3節 キチナーゼ様タンパク質

キチナーゼ様タンパク質 (Chitinase like proteins, CLPs) は構造的にキチナーゼと相 同であるが、キチンを分解する能力が欠損している [10,11]。CLPs は、ほ乳類キチ ナーゼと同様に、糖質分解酵素ファミリー18 に属する [5-8]。CLPs における活性の 欠損は、進化の過程でコンセンサス配列の触媒残基が変異したためであると一般的 に考えられている [7-9]。

マウスとヒトで, 複数種類の CLPs が同定されている [15-26]。マウスは, 主に breast regression protein-39 (BRP-39) [chitinase 3-like-1 (Chi311), 38-kDa glycoprotein (gp38k) ともよばれる], Ym1 (Chi313), Ym2 (Chi314) を発現している。一方, ヒト は, BRP-39 のヒト相同体である YKL-40 (CHI3L1, human cartilage glycoprotein-39) を発現しているが, Ym1 と Ym2 を合成していない [15-22]。

BRP-39 と YKL-40 は、マクロファージ、軟骨細胞、腫瘍細胞を含む様々な細胞 で分泌されている糖タンパク質である [15,22,27,28]。マウス BRP-39 のアミノ酸配 列は、YKL-40 のアミノ酸配列と 73% が同一である [27,28]。最近の研究で、BRP-39 と YKL-40 は機能的に同じであることが示された [29]。Ym1 は、Ym2 と高い 配列同一性 (91%) を有するが、これらのタンパク質は異なる発現パターンを示すこ とが報告されている [17,18,21]。

第4節 研究目的

ほ乳類キチナーゼと CLPs は、様々な疾患状況の患者でレベルが上昇するので、 かなり注目を集めている。

Chit1 レベルはゴーシェ病,慢性閉塞性肺疾患 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD), アルツハイマー病および喫煙者で増加する [30-33]。AMCase の発現と活性は,喘息モデルマウスのアレルギー性気道応答で増加する [34]。キチンは,AMCase の発現とアレルギーや喘息に関係する免疫細胞の動員を誘導する [35]。さらに,いくつかのヒト AMCase の遺伝子多型は,気管支喘息に関係している [36,37]。これらのほ乳類キチナーゼは,キチン含有病原体に対する生体防御として働くと考えられている [2,38]。

BRP-39/YKL-40 のレベルは,喘息,COPD,嚢胞線維症,関節リウマチ,炎症性 腸疾患,アルコール性肝硬変,様々なタイプの悪性腫瘍それぞれで上昇する [39-49]。Ym1 は,寄生虫感染症による炎症で合成される [43]。Ym1 と Ym2 は,アレ ルギー肺炎症で発現する [50]。

これらの結果は、キチナーゼと CLPs が様々な病態生理的状況下で重要な役割を果た していることを強く示唆する。しかし、キチナーゼと CLPs の医学的・生理学的役割は、未だ 十分に解明されていない。 本研究では、ほ乳類キチナーゼと CLPs の生体内での制御を考える重要な手掛か りを mRNA から得ることを目的とした。まず、新規定量 real-time PCR システムを 開発した。そして、キチナーゼ、CLPs、対照遺伝子の mRNA レベルを定量し、比 較を行った。

第 Ⅱ 章 一つの標準 DNA を用いた定量 PCR によるキチナーゼ

mRNA レベル:酸性ほ乳類キチナーゼはマウスの胃で主要な転写産物

である

第1節 序論

定量 real-time PCR (quantitative real-time PCR, 以下 qPCR)の開発は, mRNA の 定量における重要な進歩で,目的の特定遺伝子の発現を分子レベルで定量すること を可能にした。この技術を使った非常に低レベルの mRNA 定量については多くの 報告がある。それは, qPCR が,一細胞の mRNA を検出するのに十分な感度を持つ ことによる [51-54]。一般的な real-time PCR では,注目している遺伝子の発現レベ ルを,すべてのサンプルでほぼ同じレベルで発現していると考えられているハウス キーピング遺伝子の発現レベルで標準化している。しかし,real-time PCR は,同一 の尺度で,複数の遺伝子の発現レベルの定量ができないため、その目的のためには 広く使われていない。そこで本章では,複数遺伝子間の mRNA レベルを同じスケー ルで比較出来る新規 qPCR システムを開発した。このシステムは、ターゲットとす る遺伝子の cDNA 断片を連結して作成した DNA を標準として用いた。

第2節 実験材料と実験方法

RNA と cDNA の調製

この研究で,転写物のマウス組織分布を調べるため,Mouse Total RNA Master Panel (Clontech Laboratories 社)を使用した。四種類の胎生期と八種類の成体組織を 分析した。さらに、三ヶ月齢のオスのマウスの肺、胃からそれぞれ total RNA を調 製した。C57BL/6J マウス (CLEA Japan) は,理化学研究所脳科学総合研究センター の動物施設で飼育された。全ての動物実験は、施設の実験指針を順守して行われ た。動物実験のプロトコールは、理化学研究所脳科学総合研究センターの動物実験 倫理委員会での承認を受けている(承認番号 No.H19-2B013)。すべての外科的実験 は、麻酔薬としてジエチルエーテルを使って麻酔して行われた。そして、動物の苦 痛を最小限にするように処置された。これらの組織は、mRNA 調製のため、理化学 研究所脳科学総合研究センターの宮崎晴子博士と貫名信行チームリーダーから提供 された。Total RNA は、メーカーの推奨するプロトコールに従って、TRIzol Reagent (Invitrogen 社)を用いて肺,胃から調製した。わずかに混入するゲノム DNA を除去 するため, total RNA サンプルをメーカーのプロトコールに従って, RQ1 RNase-Free DNase (Promega 社) で処理した。核酸の濃度は, BioPhotometer Plus (Eppendorf 社) を用いて 260 nm の吸光度から求めた。次に、ランダムヘキサマーをプライマーとし て total RNA (3 μg) を鋳型に cDNA を合成した。反応液 (15 μl) は, 酵素バッファ

- [終濃度は 50 mM Tris-HCl (pH 8.3), 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂], ランダムヘキサ マー (Takara Bio 社) 100 ng, 10 mM DTT (Invitrogen 社), 0.5 mM deoxynucleotide triphosphates (dNTPs) より構成される。この反応液を 60 °C で 5 分間加熱し, 37 °C で 5 分間保温後, 組換えマウス白血病ウイルス逆転写酵素 (MuLV-reverse transcriptase, Invitrogen 社) を 200 U を加え, さらに 37 °C で 45 分間保温した。こ の逆転写反応は, 95 °C で 5 分間の加熱で停止した。

Real-time PCR

Real-time PCR のプライマーは, Primer Express Software (Applied Biosystems 社) の デフォルト設定で自動的に設計し, その合成は Sigma-Genosys に依頼した (Sigma-Aldrich 社)。PCR 反応は、2 x SYBR Green Master Mix (Brilliant II SYBR Green QPCR) Master Mix, Agilent 社), マウス cDNA 2.7 ng または適当な標準 DNA の希釈液, キ チナーゼ、ペプシノーゲン C、グリセルアルデヒド 3 リン酸脱水素酵素 (GAPDH), β-アクチンの プライマーから構成され, 最終液量 13 μl で行った。標準 的な real-time PCR は, Mx3005P (Agilent 社) を用いて行った。反応は, 95 ℃ 10 分 で DNA の変性とポリメラーゼ活性化を行った後,95 ℃1 分,55 ℃ 30 秒,72 ℃ 1 分で、この PCR 反応を 40 サイクル行った。反応産物の熱融解曲線は、PCR 増 幅後に MxPro QPCR Software version 4.10 (Agilent 社) で作成した。PCR 産物は, 10% ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し, Luminescent Image Analyzer (ImageQuant LAS 4000, GE Healthcare 社) で分析した。PCR 反応液を ExoSAP-IT (USB Products 社) で, メーカーのプロトコールに従って処理を行い, 未反応のプライマーと dNTPs を除去した。ABI PRISM Big-Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit と 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems 社) を用いて産物の塩基配列を決定した。Realtime PCR のために選択したプライマーの塩基配列は,表 2.1 に示した。

標準 DNA の作成

Real-time PCR によって転写産物のレベルを定量するためのマウス標準 DNA (913 塩基対) は、次のように作成した。AMCase, Chit1、ペプシノーゲン C、GAPDH、 β-アクチンの PCR ターゲット領域に、隣接した 9-120 塩基領域を加えた cDNA 断 片を、BgIII、XhoI、PstI、NotI (5'-または 3'-末端に)の制限酵素部位を含むオリゴ ヌクレオチドプライマーと KOD Plus DNA polymerase (Toyobo 社)を用い、メーカ ーのプロトコールに従って、マウスの胃から調製した cDNA から増幅した。フォワ ードプライマーとリバースプライマーの塩基配列を表 2.2 に記載した。PCR 産物 は、Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega 社)を使って精製し、該当する 制限酵素で処理を行った。得られた DNA 断片それぞれをアガロースゲル電気泳動 と上述の Clean-Up System を使って精製し、T4 DNA リガーゼ (Toyobo 社)で連結 した。得られた DNA 断片は、フォワードプライマー 5'-

GTGGATTCTGTGCCGACAAAGCAGATGGCC-3' とリバースプライマー 5'-TGGGTACATGGTGGTACCACCAGACAGCAC-3' を用いて KOD Plus DNA

polymerase で増幅した。増幅した DNA の 3'末端に Takara Taq HS (Takara Bio 社) を使って dA を付加し,上で述べた手順で精製した。得られた DNA は, TA cloning で pGEM-T Easy ベクター (Promega 社) にクローン化した。得られたプラスミドの 塩基配列は, ABI PRISM Big-Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit と 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems 社) を使って確認した。五つの cDNA 断片からなる直 鎖化した DNA は,同じプライマーで KOD Plus DNA polymerase を使った PCR で,プラスミド DNA から再び増幅して調製した。増幅した DNA 断片は、上で述 べたように精製、定量し、標準 DNA として使用した。

五つの全コード領域をカバーしている cDNA の調製

Real-time PCR による絶対定量法を検証するため,表 2.3 に記載したプライマー を用いて全コード領域 cDNA を調製した。二つのキチナーゼ (Chitl と AMCase), 対照遺伝子 (GAPDH, β -アクチン, ペプシノーゲン C) の五つの全コード領域をカ バーする cDNA は、マウスの胃の cDNA から KOD Plus DNA polymerase で増幅 し、pGEM-T Easy ベクターに TA クローニングにより挿入した。その cDNA の塩 基配列を決定し、図 2.1 の配列であることを確認した。サブクローニングした断片 は、同じプライマーを使ってプラスミド DNA から再び増幅し、全コード領域 cDNA として使用した。

標準曲線

複数の遺伝子の cDNA 断片から構成される標準 DNA のモル濃度は,溶液濃度と 分子量に基づいて計算した。段階希釈は, Ct (Threshold Cycle, Ct =閾値と増幅曲線 が交わる点) が約 13 サイクルで得られる標準 DNA の濃度で調製した。標準 DNA は,1 分子から 1,000 万分子の範囲で 10 倍ずつ段階希釈を行い,使用するまで一 定量を -20 ℃ で凍結保存した。

Real-time PCR による mRNA の定量

それぞれのサンプルは三度増幅し,それぞれの実験は少なくとも二回繰り返した。標準曲線を用いて,Chit1,AMCase,GAPDH,β-アクチン,ペプシノーゲン C mRNA の分子数を MxPro QPCR Software version 4.10 によって自動的に外挿で求めた。全ての値は,total RNA 10 ng あたりの分子数として表した。Ct 値は,MxPro QPCR Software で計算した。

第3節実験結果

新規 qPCR 法の確立

マウスキチナーゼの重要性を研究する上で重要なステップは、キチナーゼ転写物 の発現レベルを信頼性高く定量する方法の確立である。ごく微量から多量に存在す る mRNA の検出の目的には、現在の real-time PCR が最も感度の高い定量法であ る。まず、Chit1 と AMCase 遺伝子の遺伝子発現レベルを比較することを考えた (図 2.2)。

キチナーゼの発現レベルを客観的に評価するため、ほとんどの組織や細胞におい て高いレベルで発現することが知られている二つのハウスキーピング遺伝子であ る、GAPDH と β-アクチン、を対照として使用した [55]。さらに、ペプシノーゲン C (別名プロガストリックシンとして知られている)を胃での対照遺伝子として用い た。ペプシノーゲン C は、消化酵素として機能するアスパラギン酸プロテアーゼで あり、胃で生産される。この酵素は、胃液の主要な成分である [56]。これら三つの 対照遺伝子を使って、Chit1 と AMCase の遺伝子発現レベルを評価した (図 2.1)。

まず, qPCR のためのプライマーを設計し, そのプライマーから増幅した産物が 一つの熱融解温度 (Tm) を示すか, 10% ポリアクリルアミドゲルで一つのバンドか どうか, で適合性を評価した。そして, 産物の塩基配列も検証した。

プライマーの特異性を調べるために、それぞれの PCR 産物を四種類の胎生期と 八種類の成体組織からなるマウス組織 cDNA 混合液を鋳型に実際の real-time PCR 条件の下で増幅し、分析した。図 2.3A-E に示すように、Chitl (Tm = 79.7 °C)、 AMCase (Tm = 79.1 °C)、GAPDH (Tm = 81.4 °C)、 β -アクチン (Tm = 82.0 °C)、ペプシ ノーゲン C (Tm = 81.4 °C) で一つのピークが見られた。

PCR 反応終了後, 10% ポリアクリルアミドゲル電気泳動で産物を分析した。ゲル 電気泳動では, それぞれ Chitl (69 bp), AMCase (81 bp), GAPDH (77 bp), β-アクチ ン (71 bp), ペプシノーゲン C (82 bp) で期待サイズに明確な一つのバンドが認めら れた (図 2.3F)。PCR 産物のヌクレオチド配列は, 実験方法で述べた手順で直接決 定した。以上の結果から, これらの PCR 産物がターゲット cDNA から増幅するこ とを確認した (図 2.4B)。このことは, PCR 産物がターゲット cDNA から特異的 に増幅されており, 本研究の実験条件下では, ミスプライミングは無視できる範囲 であることを示している。

マウス標準 DNA の作成

同じスケールで二つのキチナーゼと三つの対照遺伝子の発現レベルを定量し,比 較することを考えた(図 2.2)。この目的のため,正確な定量のための標準 DNA を 作成し,それを用いた qPCR システムを確立した(図 2.4A)。五つの遺伝子断片を 1 分子ずつ連結した real-time PCR のための標準 DNA を作成した。その後,連結 した DNA 断片をベクターにクローン化した(図 2.4A)。913 塩基対の標準 DNA は、PCR ターゲット領域をカバーし、隣接する 9-120 塩基領域を加えた五つの cDNA 断片と BglII, XhoI, PstI, NotI の制限酵素部位を含んでいる(図 2.4A)。

標準曲線と qPCR システムの検証

両キチナーゼと対照遺伝子の mRNA の定量は標準曲線に依存している。標準 DNA の希釈系列は標準曲線を作成するために使用した。この標準曲線を使って,五 種類の mRNA を分析するために用いる real-time PCR による定量性を比較,評価し た。それぞれの標準曲線は,五つの異なったプライマーを使って,標準 DNA を 10 倍ずつ段階希釈して作成した(図 2.5A-E, 左図)。

指数関数的増幅は広いレンジで維持され,7桁の広範囲にわたって測定が可能だった(図 2.5A-E, 左図)。五つの cDNA 断片からなる標準 DNA を用いることによって,標準曲線を作成するために使うそれぞれの希釈を五つの遺伝子全てに割り当てることができた(図 2.5A-E, 右図)。

標準曲線が五つの遺伝子に対して絶対的に等量になっていることを示すために, 全コード領域をカバーしている既知濃度の cDNA を増幅し,未知試料として解析し た。この分析は,希釈液が期待量得られているかを確認するために行った。図 2.5A-E の右に示すように,標準曲線を作成するために使った量と等しい量の希釈に みられた(図 2.6)。この方法で少量の転写物から多量の転写量が定量できることか ら,real-time PCR の感度と信頼性を確認することができた。このことは,この qPCR 法は,広いダイナミックレンジでの定量が可能で,高い正確性,高感度であ ることを示している(図 2.5A-E,右)。従って,ここで確立した qPCR システム が,同じスケールで,二つのキチナーゼ遺伝子と対照遺伝子の発現について信頼性 の高い値を与えることが分かった。

マウス組織における Chit1 と AMCase の発現

四種類の胎生期と様々な成体組織から抽出した total RNA を,単一の標準 DNA を用いた qPCR 法で解析した (図 2.4)。結果は, total RNA 10 ng あたりの分子数と して表した (図 2.7)。

Chitl と AMCase mRNA は、マウス組織で広く発現していた(図 2.7A, 2.7B)。 両キチナーゼの発現パターンにおいて、明らかな組織特性があることが分かった。 Chitl mRNA の高い発現レベルは、マウスの胃(図 2.7A、上図)で、次いで、目と 肺において検出された。Chitl mRNA は、他の組織で低レベルながらも容易に検出 できた(図 2.7A、下図)。AMCase mRNA は、胃で極めて高く発現し、次いで顎下 腺においても高い発現レベルで検出され(図 2.7B 上図)、他の組織でも発現してい た(図 2.7B、下図)。

次に, AMCase の Chitl に対する比を求めた。それぞれの mRNA のコピー数を 同一の標準 DNA の希釈液を使って定量した。その結果, AMCase mRNA が主に胃 と顎下腺で極めて高いレベルで発現していることを見出した(図 2.7C,上図)。本 研究で調べた他の組織は,AMCase が Chitl より多く発現していた。また Chitl が AMCase よりも優勢に発現していたのは目のみであった(図 2.7C,下図)。

肺と胃組織での Chit1 と AMCase の mRNA レベル

ほ乳類キチナーゼに関わる多くの研究は、肺組織を用いて病態生理学的に行われている。本研究では、AMCase mRNA がマウスの胃組織で特異的に発現していることを示した(図 2.7)。ここで、三ヶ月齢のマウスの肺と胃組織から抽出した cDNA (n=5)を用いてキチナーゼと対照遺伝子の mRNA レベルの比較を行った。その定量結果は、total RNA 10 ng あたりの分子数として表した(図 2.8)。

Chit1 のレベルを 1.0 としたとき,各 cDNA の相対的な発現量は,マウスの肺で AMCase 14, GAPDH 196, β -アクチン 681 だった(図 2.8A)。この結果は,肺組織 で Chit1 より AMCase が多く発現しているが, AMCase の mRNA レベルはハウス キーピング遺伝子のレベルよりも低いことを示している。

胃組織において、Chit1 の mRNA レベルを 1.0 としたとき、それぞれの相対的 発現レベルは AMCase 721、ペプシノーゲン C 2,261、GAPDH 61、β-アクチン 127 だった(図 2.8B)。GAPDH と β-アクチン 遺伝子はよく知られたハウスキーピング 遺伝子で、ほとんどの組織と細胞で常に高いレベルで発現している。ペプシノーゲ ン C は、消化酵素として機能するアスパラギン酸プロテアーゼであり、胃において 生産され、胃液の主要な成分である [56]。AMCase mRNA の発現レベルは、 GAPDH や β-アクチンのレベルよりかなり高く、ペプシノーゲン C のレベルに匹 敵した。この結果は、胃の AMCase は胃粘膜で主要な転写産物であり、この酵素は 胃において生理的に重要な役割を果たしている可能性を示す。

第4節 考察

Chitl と AMCase はゴーシェ病,キチン含有病原体に対する生体防御の役割を果 たしていると考えられている [2,38]。さらに,AMCase はアレルギー炎症におい て,インターロイキン 13 のエフェクター応答に寄与している [34]。これらキチン 分解酵素は,喘息モデルマウスでのアレルギー性気道反応の病態生理で重要な役割 をしていると考えられている。しかし,生体内での Chitl と AMCase の発現レベル についてはあまり知られていない。mRNA の定量は,有用で生物医学的に重要な情 報を提供し得る。本研究において,同一の尺度で二つのほ乳類キチナーゼの mRNA レベルの定量とこれらのレベルを対照遺伝子のレベルと比較することができる新規 qPCR システムを確立した。

Real-time PCR は、目的の特定遺伝子の発現を分子レベルで定量することが可能で ある。この技術を使った mRNA 定量については多くの報告がある。しかし、この 方法は同一の尺度での複数の遺伝子の定量ができないため、その目的には広く使わ れていない。本研究では、五つの cDNA 断片(長さはそれぞれ約 200 塩基対)で 構成されている標準 DNA を作成した。これらの断片は、二つのキチナーゼ、二つ のハウスキーピング遺伝子そして一つのマーカー遺伝子 cDNA 断片からなり、等量 ずつ連結した(図 2.4A)。現在、最も一般的なハウスキーピング遺伝子として使わ れるのは GAPDH と β -アクチンで、本研究では PCR 増幅の内部コントロールであ り対照遺伝子として用いた。さらに、胃で高いレベルで発現しているため、胃のマ ーカー遺伝子としてペプシノーゲン C を用いた [56]。この方法は、total RNA 10 ng あたりの Chit1 と AMCase mRNA と対照遺伝子 mRNA の分子数 (molecules/10 ng) の絶対定量を可能にした(図 2.7, 2.8)。

相対定量法は、この章で示したような検量線が必要ないため絶対定量より容易に 行える。相対定量において、目的遺伝子の mRNA レベルは、ハウスキーピング遺 伝子の mRNA レベルで割って、比較される [57]。しかし、この定量法では同一の 尺度で異なった遺伝子のレベルを比較することができない。本研究で確立した方法 は、標準 DNA の作成や検証過程に関して複数のステップが必要であるが、この方 法は遺伝子間を直接比較できる遺伝子発現データが得られる(図 2.7, 2.8)。この章 で確立した新規 qPCR 法は、定量性において、広いダイナミックレンジ、高感度で ある。さらに、転写産物の発現レベルの定量ができたことは、この方法の感度と信 頼性が高いことを示している(図 2.5)。この定量法は、同一の尺度で複数遺伝子間 の mRNA レベルの定量と比較にとてもよく適している。確立した方法は、医用生 体工学や臨床サンプルにも適用可能である。

この研究で、AMCase mRNA がマウスの胃においてハウスキーピング遺伝子より もかなり高いレベルで合成されていることを見出した(図 2.7, 2.8)。そして、 AMCase の mRNA レベルは、胃液の主要な成分であるであるペプシノーゲン C の レベルに匹敵すること(図 2.8B)、胃に加えて、顎下腺も AMCase mRNA が大量に 発現していることを示した(図 2.7)。ほ乳類キチナーゼ mRNA の合成に関し、マ ウスにおいて、胃と顎下腺はどちらも AMCase が大量に生産されている組織として 注目すべきである。

胃は、胃粘膜から塩酸が分泌され、ペプシンによるタンパク質の消化のために約 pH2の極酸性状態になっている [56,58]。マウス AMCase は、顕著な酸安定性を示 し、pH2.0 で最大活性を示すことが知られている。これらの点において、マウス AMCase は他の酵素とは明確に異なる [12]。マウス AMCase の酸性状態における特 徴的な pH 安定性と酸依存性は、極酸性条件下でのキチン物質の効率的な分解を可 能にする。AMCase がマウスの胃において極めて高いレベルで発現しているという 結果は、この酵素が胃での食物消化で機能している可能性がある。野生のマウス は、昆虫のようなキチン含有物を食べている。一方、実験動物施設で飼育している マウスは、細胞壁にキチンを含んでいる乾燥ビール酵母を含む人工飼料を食べてい る。従って、AMCase はおそらく胃内容物中において、高分子量キチンを分解する 消化酵素として機能していると推測される。

最も高い Chit1 mRNA レベルもマウスの胃で認められた。しかし、胃においての Chit1 のレベルは AMCase の 1/721 であった。また、二つのハウスキーピング遺伝 子の発現レベルよりも低かった(図 2.8A)。さらに Chit1 は、胃液の約 pH 2 の条 件下ではキチナーゼ活性を示さない [10,14]。Chit1 は、胃や小腸の非腺部分のよう な中性付近の pH 領域で発現することが示されている [13]。従って、Chit1 は、マ ウスの胃においてキチナーゼ活性に寄与していないと考えられる。

AMCase は胃や顎下腺で非常に高いレベルで発現していた。他方,この研究で調 べた他のすべての組織では、Chit1 と AMCase mRNA は低いレベルだった。Chit1 と AMCase mRNA の発現レベルは、これらの組織ではハウスキーピング遺伝子のレ ベルよりも低かった。Chit1 は、pH5 付近に広い至適 pH を示す [10]。他方、 AMCase の主要な至適 pH は pH2 で、第二の至適 pH は pH4-7 である。 AMCase は、この二番目の至適 pH では pH2 での 30% 未満のキチナーゼ活性を 保持しているに過ぎない [12]。Chit1 と AMCase は、どちらもエンド型キチナーゼ として作用すると考えられており、天然のキチンを分解し、キトビオースを生産す る [12,59]。AMCase は、マウスの多くの組織で Chit1 よりも優勢な発現をしている が、両酵素はおそらくマウス組織でキチン分解活性において著しい差はないと考え られる。

Chit1 mRNA は,発育段階の組織で徐々に発現が増加していることが分かった。 AMCase mRNA は目以外のマウス組織において,Chit1 mRNA よりも多く発現して いた。この結果は,Chit1 の遺伝子発現が発育段階で特異的に制御される可能性を示 し,Chit1 が個体発生において役割を果たす可能性を示唆している。

ほ乳類はキチンとその合成酵素を生産しないが,絶えず,キチン含有寄生虫や病 原体にさらされている。キチンは,それらの病原体の主要構成成分である。ほ乳類 キチナーゼの基質は,おそらく真菌,寄生虫,線虫などに由来する環境性のキチン であろう。両酵素は,肺において,気道アレルギーを誘導するカビやダニのような キチン含有病原体に対する生体防御メカニズムの一部として作用していると考えら れる。さらに,マウス胃における AMCase は,食物消化で重要な役割を果たしてい ると考えられる。

第5節要約

キチナーゼは、甲殻類、昆虫、真菌類の主な構成要素であるキチンの β-1,4 グリ コシド結合を加水分解する。ほ乳類はキチンとその合成酵素を生産しないが、活性 のある二種類のキチナーゼ、Chitl と AMCase、を発現している。これらのほ乳類キ チナーゼはゴーシェ病、アルツハイマー病、喘息などのいくつかの病態状況で発現 が増加するので、注目されている。しかし、Chitl と AMCase がそれらの病気の病 態生理にどのように寄与するかは未決定のままである。Chitl と AMCase mRNA レ ベルを定量し、良く知られている対照遺伝子の発現レベルと比較することで、両キ チナーゼの生物医学的に重要な情報を収集することができる。最初に mRNA レベ ルを定量しようとする目的遺伝子の cDNA 断片を 1 モルずつ結合して標準 DNA を作成し、それを標準物質とした新規 qPCR システムを確立した。このシステム は、キチナーゼと対照遺伝子の発現レベルを同じスケールで定量し、遺伝子間で発 現を比較することを可能にした。次に、AMCase mRNA が、マウスの胃で、極端に 高いレベルで合成されていることを見出した。マウスの胃での AMCase mRNA レベ ルは、ハウスキーピング遺伝子の発現レベルの 7-10 倍で、胃液の主要成分である ペプシノーゲン C mRNA の発現レベルに匹敵した。このことから、AMCase mRNA はマウスの胃で主要な転写産物の一つであることが分かった。この結果は、AMCase が胃の内容物中で高分子量キチンを分解する消化酵素として機能し、そしてキチン 含有病原体に対する生体防御の一部として働いている可能性を示唆する。

表 2.1. Real-time PCR プライマー の塩基配列

AMCase_Fw: TTTTGGCAGTGCATCAATGG AMCase_Rv: GCAGCAATTACAGCTGGTATCAA Chit1_Fw: CGGCAGGAACTAAATCTTCCAT Chit1_Rv: TGGGCGTGGCTCAGGTAT Pep C_Fw: TGCCAAGGCATTGTAGACACA Pep C_Rv: CTCCTATGGTCTGCAGAAGTTCATT GAPDH_Fw: TGTGTCCGTCGTGGATCTGA GAPDH_Rv: CCTGCTTCACCACCTTCTTGA β - $\mathcal{T}\mathcal{P}\mathcal{F}\mathcal{V}_Fw$: ACGGCCAGGTCATCACTATTG β - $\mathcal{T}\mathcal{P}\mathcal{F}\mathcal{V}_Fw$: CAAGAAGGAAGGCTGGAAAAGA

表 2.2. マウス標準 DNA を作成するために用いたプライマーの塩基配列

Quant_AMC_Fw: CATGGAATTCGGAGGCAGTGGATTCTGTGCCGACA Bgl_quant_AMC_Rv: TGACAGATCTTGGCCAGTTGCAGCAATTACAGCTG Bgl_quant_Pep C_Fw: CATGAGATCTTGGCAACCAGGCCTCTGGCTGGTGC Xho_quant_Pep C_Rv: TGACCTCGAGACAAAATACTGTCCATACTCTCCTT Xho_quant_Chit1_Fw: CATGCTCGAGTGGACTTGGATGACTTCAAGGGTTC Pst_quant_Chit1_Rv: TGACCTGCAGTAGCCCTGGGCTGGGTCCCTGCTCT Pst_quant_GAPDH_Fw: TGACCTGCAGGAGCTGAACGGGAAGCTCACTGGCA Not_quant_GAPDH_Rv: TCGAGCGGCCGCTCCTCAGTGTAGCCCAAGATGCC Not_quant_ β - $\mathcal{P}/\mathcal{P}\mathcal{F}\mathcal{V}$ _Fw: TCGAGCGGCCGCCCGAGCAGGAGATGGCCACTGCCG Quant_ β - $\mathcal{P}/\mathcal{P}\mathcal{F}\mathcal{V}$ _Rv: TGACAGATCTTGGGTACATGGTGGTACCACCAGAC

表 2.3. PCR で完全コード cDNA を増幅させるためのプライマーの塩基配列

Full_AMCase_FW: CATGGAATTCCGGGAGGAACGATGGCCAAGCTACT Full_AMCase_Rv: GTGACCTCGAGCTGGCCAGTTGCAGCAATTACAGC Full_Chit1_Fw: CATGGAATTCGGAACAAGTTGTAGAGCTCTCGGCT Full_Chit1_RV: GTGACCTCGAGCGCTCCAGGTACAACATTTGCAAG Full_Pep C_Fw: GCTCGAAGTGATTTCTTCCAGTGAG Full_Pep C Rv: GCGGGGCAGATGGGACAGGCTGAGG Full_GAPDH_Fw: GTGCAGTGCCAGCCTCGTCCCGTAG Full_GAPDH_Rv: ATTCAAGAGAGTAGGGAGGGCTCCC Full_ β - \mathcal{T} ρ + \mathcal{V} _Fw: GCGTCCACCCGCGAGCACAGCTTCT Full_ β - \mathcal{T} ρ + \mathcal{V} _Rv: GGAGTGGGGGGGGGGCTCTTTGGGAGGG

Chit1 MW=1002209.8

CATGGAATTCGGAACAAGTTGTAGAGCTCTCGGCTCCTTCTCCAGCACCAAGTCGGCCTAGACAGTGCCATGC TTCTCACCATGATGATGATGGATTAAACCGCTGAAACTGCCCGTCAGAGGAGAGCAGATCAGGACCTGTGGAG CCAGTCACAGGAGAGCACGGCAGGACCTGTGGAGCGGGTACTCACAGAGCTGATATCCCCCAGAGCCTTCATCA **TG**GTGCAGTCCCTGGCCTGGGCAGGTGTGATGACTCTGCTGATGGTCCAGTGGGGCTCTGCTGCAAAACTGGT CTGCTACCTCACCAACTGGTCCCAGTACCGGACGGAGGCAGTTCGGTTCTTTCCCAGGGATGTGGATCCCAAC <u>CTGTGTACCCACGTCATCTTTGCTTTTGCTGGAATGGACAACCATCAGCTCAGCACTGTGGAGCACAATGACG</u> AACTTCTCTACCAGGAGCTGAACAGCCTAAAGACTAAGAACCCCCAAGCTCAAGACCCTGTTAGCCGTTGGAGG CTGGACCTTTGGTACCCAGAAGTTCACAGACATGGTGGCCACCGCCAGCAACCGGCAGACCTTTGTGAAGTCA <u>GCCCTAAGTTTCCTGCGCACTCAAGGTTTTGATGGCCTTGACCTTGACTGGGAGTTCCCAGGTGGACGTGGGA</u> <u>GCCCCACAGTAGACAAAGAGAGATTCACAGCCCTGATACAGGACTTGGCCAAAGCCTTCCAGGAGGAAGCCCA</u> <u>GTCCTCAGGGAAGGAACGCCTCCTTCTGACTGCAGCTGTACCGAGTGATCGAGGCCTGGTGGATGCTGGCTAC</u> GAGGTGGACAAGATTGCCCAGAGCTTGGATTTCATCAACCTTATGGCCTACGACTTCCACAGCTCCTTGGAAA <u>AGACCACAGGGCATAACAGCCCCCTCTACAAAAGGCAAGGAGAAAGTGGGGCAGCCGCTGAGCAAAACGTGGA</u> CGCTCTTTCACCTTGGCCTCCTCGTCAGACAATGGAGTTGGGGCCCCAGCCACAGGGCCTGGTGCCCCAGGCC CCAGAAGGTGCCTTACGCCTTCCAGGACAACCAGTGGGTGAGCTTTGACGACGTGGAAAGCTTCAAAGCCAAG <u>GCTGCCTACCTGAAACAGAAGGGGCTGGGAGGAGCCATGGTCTGGGTCCTGGACTTGGATGACTTCAAGGGTT</u> CCTTCTGCAACCAGGGCCCGTACCCTCTCATCCGGACACTACGGCAGGAACTAAATCTTCCATCCGAGACTCC AAGGAGCCCAGAACAGATAATACCTGAGCCACGCCCATCTTCTATGCCAGAGCAGGGACCCAGGCCCAGGGCTA GATAACTTCTGCCAAGGCAAAGCTGATGGGGTCTACCCCCAACCCTGGAGACGAGTCCACTTACTACAACTGTG GAGGAGGGCGGCTGTTCCAGCAGAGCTGTCCTCCAGGCCTGGTGTTTAGAGCCTCTTGCAAATGTTGTACCTG GAGCGCTCGAGGTCAC

Mouse AMCase

MW=903246.8

AATGCTCAGCTGGGGTCTGCCTACAATCTGATATGCTATTTCACCAACTGGGCCCAGTATCGGCCAGGTCTGG <u>GGAGCTTCAAGCCTGATGACATTAACCCCTGCCTGTGTACTCACCTGATCTATGCCTTTGCTGGGATGCAGAA</u> CAATGAGATCACCACCATAGAATGGAATGATGTTACTCTCTATAAAGCTTTCAATGACTTGAAAAACAGGAAC <u>AGCAAACTGAAAAACCCTCCTGGCAATTGGAGGCTGGAACTTTGGAACTGCTCCTTTCACTACCATGGTTTCCA</u> CTTCTCAGAACCGCCAGACCTTCATTACCTCAGTCATCAAATTTCTGCGTCAGTATGGGTTTGATGGACTGGA <u>CCTGGACTGGGAATACCCAGGCTCACGTGGGAGCCCTCCTCAGGACAAGCATCTCTTCACTGTCCTGGTGAAG</u> <u>GAAATGCGTGAAGCTTTTGAGCAGGAGGCTATTGAGAGCAACAGGCCCAGACTGATGGTTACTGCTGCTGTAG</u> <u>CTGGTGGGATTTCCAACATCCAGGCTGGCTATGAGATCCCTGAACTTTCTAAGTACCTGGATTTCATCCATGT</u> <u>CATGACATATGACCTCCATGGCTCCTGGGGAGGGCTACACTGGGGGAGAATAGTCCTCTTTACAAATACCCTACT</u> GAGACTGGTAGCAATGCCTACCTCAATGTGGATTATGTCATGAACTATTGGAAGAACAATGGAGCCCCAGCTG <u>AGAAGCTCATTGTTGGATTCCCAGAGTATGGACACCTTCATCCTGAGAAACCCCTCTGATAATGGAATTGG</u> TGCCCCTACCTCTGGTGATGGCCCTGCTGGGCCCTATACCAGACAGGCTGGGTTCTGGGCCTACTATGAGATT TGCACCTTTCTGAGAAGTGGAGCCACTGAGGTCTGGGATGCCTCCCAAGAAGTGCCCTATGCCTATAAGGCCA <u>ACGAGTGGCTTGGCTATGACAATATCAAGAGCTTCAGTGTTAAGGCTCAGTGGCTTAAGCAGAACAATTTTGG</u> <u>AGGTGCCATGATCTGGGCCATTGACCTTGATGACTTCACTGGCTCTTTCTGTGATCAGGGAAAATTTCCTCTG</u> <u>ACTTCTACTTTGAACAAAGCCCTTGGCATATCCACTGAAGGTTGCACAGCTCCTGACGTGCCTTCCGAGCCAG</u> TGACTACTCCTCCAGGAAGTGGGAGTGGGGGTGGAAGCTCCGGAGGAAGCTCTGGAGGCAGTGGATTCTGTGC <u>CGACAAAGCAGATGGCCTCTACCCTGTGGCAGATGACAGAAATGCTTTTTGGCAGTGCATCAATGGAATCACA</u> TACCAGCAGCATTGTCAAGCAGGGCTTGTTTTTGATACCAGCTGTAATTGCTGCAACTGGCCAGCTCGAGGTC AC

Mouse GAPDH MW=732154.0

GTGCAGTGCCAGCCTCGTCCCGTAGACAAA**ATG**GTGAAGGTCGGTGTGAACGGATTTGGCCGTATTGGGCGCCC TGGTCACCAGGGCTGCCATTGCAGTGGCAAAGTGGAGATTGTTGCCATCAACGACCCCTTCATTGACCTCAA CTACATGGTCTACATGTTCCAGTATGACTCCACTCACGGCAAATTCAACGGCACAGTCAAGGCCGAGAATGGG AAGCTTGTCATCAACGGGAAGCCCATCACCATCTTCCAGGAGCGAGACCCCACTAACATCAAATGGGGTGAGG CCGGTGCTGAGTATGTCGTGGAGTCTACTGGTGTCTTCACCACCATGGAGAAGGCCGGGGCCCACTTGAAGGG TGGAGCCAAAAGGGTCATCATCTCCGCCCCTTCTGCCGATGCCCCCATGTTTGTGATGGGTGTGAACCACGAG AAATATGACAACTCACTCAAGATTGTCAGCAATGCATCCTGCACCAACTGCTTAGCCCCCCTGGCCAAGG TCATCCATGACAACTTTGGCATTGTGGAAGGGCTCATGACCACAGTCCATGCCATCACTGCCACCAGAAGAC TGTGGATGGCCCCTCTGGAAAGCTGTGGCGTGATGGCCGTGGGGCTGCCCAGAACATCATCCCTGCATCCACT GGTGCTGCCAAGGCTGTGGGCAAGGTCATCCCAGAGCTGAACGGGAAGCTCACTGGCATGGCCTTCCGTGTTC CTACCCCCAATGTGTCCGTCGTGGATCTGACGTGCCGCCTGGAGAAACCTGCCAAGTATGATGACATCAAGAA <u>GGTGGTGAAGCAGGCATCTGAGGGCCCACTGAAGGGCATCTTGGGCTACACTGAGGACCAGGTTGTCTCCTGC</u> GACTTCAACAGCAACTCCCACTCTCCACCTTCGATGCCGGGGCTGGCATTGCTCTCAATGACAACTTTGTCA AGCTCATTTCCTGGTATGACAATGAATACGGCTACAGCAACAGGGTGGTGGACCTCATGGCCTACATGGCCTC CAAGGAGTAAGAAACCCTGGACCACCCACCCAGCAAGGACACTGAGCAAGAGAGGGCCCTATCCCAACTCGGC CCCCAACACTGAGCATCTCCCTCACAATTTCCATCCCAGACCCCCATAATAACAGGAGGGGCCTAGGGAGCCC TCCCTACTCTCTTGAAT

Mouse β-actin MW=979274.0

GCGTCCACCCGCGAGCACAGCTTCTTTGCAGCTCCTTCGTTGCCGGTCCACACCCGCCACCAGTTCGCCATG ATGACGATATCGCTGCGCTGGTCGTCGACAACGGCTCCGGCATGTGCAAAGCCGGCTTCGCGGGCGACGATGC TCCCCGGGCTGTATTCCCCTCCATCGTGGGCCCCCTAGGCACCAGGGTGTGATGGTGGGAATGGGTCAGAAG GACTCCTATGTGGGTGACGAGGCCCAGAGCAAGAGGGTATCCTGACCCTGAAGTACCCCATTGAACATGGCA TTGTTACCAACTGGGACGACATGGAGAAGATCTGGCACCACCACCTTCTACAATGAGCTGCGTGTGGCCCCTGA <u>GGAGCACCCTGTGCTGCTCACCGAGGCCCCCCTGAACCCTAAGGCCAACCGTGAAAAGATGACCCAGATCATG</u> TTTGAGACCTTCAACACCCCAGCCATGTACGTAGCCATCCAGGCTGTGCTGTCCCTGTATGCCTCTGGTCGTA <u>CCACAGGCATTGTGATGGACTCCGGAGACGGGGTCACCCACACTGTGCCCATCTACGAGGGCTATGCTCTCCC</u> TCACGCCATCCTGCGTCTGGACCTGGCTGGCCGGGACCTGACAGACTACCTCATGAAGATCCTGACCGAGCGT TAGACTTCGAGCAGGAGATGGCCACTGCCGCATCCTCCTCCCCTGGAGAAGAGCTATGAGCTGCCTGACGG <u>GAATCCTGTGGCATCCATGAAACTACATTCAATTCCATCATGAAGTGTGACGTTGACATCCGTAAAGACCTCT</u> ATGCCAACACAGTGCTGTCTGGTGGTACCACCATGTACCCAGGCATTGCTGACAGGATGCAGAAGGAGATTAC TGCTCTGGCTCCTAGCACCATGAAGATCAAGATCATTGCTCCTCCTGAGCGCAAGTACTCTGTGTGGATCGGT ACCTAACTTGCGCAGAAAAAAAAAAAAAAAAGAGACAACATTGGCATGGCTTTGTTTTTTAAAATTTTTTTAA AAAACTGGAACGGTGAAGGCGACAGCAGTTGGTTGGAGCAAACATCCCCCCAAAGTTCTACAAATGTGGCTGAG GACTTTGTACATTGTTTTGTTTTTTTTTTTTTTGGTTTTGTCTTTTTTAATAGTCATTCCAAGTATCCATG AAATAAGTGGTTACAGGAAGTCCCTCACCCTCCCAAAAGCCACCCCCACTCC

Mouse Pepsinogen C MW=803236.0

 ${\tt GCTCGAAGTGATTTCTTCCAGTGAGACCAGCTGCAAACCGGCATC } {\tt ATGAAGTGGATGGTGGTCGCCTTGCTCT}$ <u>GCCTCCCACTCCTGGAGGCAGCTTTGATCAGGGTCCCCCTGAAGAAATGAAGAGTATCCGGGAGACCATGAA</u> <u>GGAACAAGGTGTCCTCAAAGACTTTCTGAAGAACCACAAGTATGACCCTGGCCAGAAATACCACTTTGGCAAG</u> TTTGGTGACTACAGTGTACTCTATGAGCCCATGGCCTATATGGATGCTTCCTACTATGGTGAGATCAGCATCG <u>GGACTCCACCCCAGAACTTCCTGGTCCTTTTCGACACTGGCTCCTCCAACCTGTGGGTGTCTTCTGTCTACTG</u> CCAGAGCGAGGCCTGCACCACACACCCCGCTACAACCCCCAGCAAGTCCTCCACCTACTACACTCAAGGGCAG <u>ACCTTCTCCCTGCAGTACGGCACCGGCAGCCTTACCGGCTTCTTCGGCTATGACACTCTGAGAGTCCAAAGCA</u> TCCAGGTCCCTAACCAGGAGTTCGGCCTGAGTGAGAATGAGCCTGGCACCAATTTTGTCTACGCCCAAT <u>CGGGATCATGGGCCTGGCCTACCCCGGCCTGTCTTCAGGGGGCGCCACCACCGCCTTGCAGGGCATGTTGGGG</u> TGTTCGGTGGCGTGGACGAGAACCTGTACACTGGCGAGCTCACCTGGATTCCTGTCACCCAGGAGCTTTACTG CCTCAATGGTGTCCAGTTCCCCCTGTCACCCTCTTCCTACATCATCCAGGAGGAAGGCTCCTGCATGGTGGGT <u>CTGGAGAGCCTCTCCCTGAACGCTGAGAGTGGCCAGCCCCTCTGGATCCTCGGGGATGTCTTCCTCAGGTCTT</u> <u>ACTATGCTGTCTTCGACATGGGCAATAACAGGGTGGGCCTTGCCCCTTCTGTC</u>TAGACTTGACATCTAGACAA ACCCCCCCCCCCGTGCCCTTCCTTCTCCCCTCAGCCTGTCCCATCTGCCCCGC

図 2.1. 完全コード cDNA の塩基配列と分子量

Chitl は 1,622 塩基対, AMCase は 1,462 塩基対, GAPDH は 1,185 塩基対, β-アクチンは 1,585 塩基対, ペプシノーゲン C は 1,300 塩基対である。開始コドン である ATG は, 太字で強調した。翻訳領域は, 下線で示す。



図 2.2. 五つの遺伝子発現レベルを比較するための研究方針

Chitl と AMCase 遺伝子の発現レベルを比較した。キチナーゼレベルを評価する ため、ほとんどの組織や細胞で常に高いレベルで発現している二つのハウスキーピ ング遺伝子である GAPDH と β-アクチンを用いた。さらに、胃粘膜の主要成分であ るペプシノーゲン C を胃組織での対照遺伝子とした。これら三つの対照遺伝子を用 いて、マウス組織での Chitl と AMCase の遺伝子発現レベルを評価した。



図 2.3. Real-time PCR 用のプライマー適合性の評価

PCR プライマーは, PCR 産物の Tm が均一であるか (A-E), 10% ポリアクリル アミドゲルで一つの PCR 産物を与えるか (F) をもとに選別した。プライマーの特 異性を検証するため,マウス組織 cDNA の混合液を鋳型として五つの遺伝子の PCR 産物の熱融解曲線を検討した。PCR 産物は, 10% ポリアクリルアミドゲル電 気泳動後,エチジウムブロマイド染色で分析した。



図 2.4. 標準 DNA の作成

(A) Real-time PCR で使用する標準 DNA の模式図。AMCase, ペプシノーゲン

C, GAPDH, β-アクチン cDNA のターゲット領域と隣接する配列と制限酵素部位を 有する断片を増幅し,得られた DNA 断片を一分子ずつ連結し,クローニングベク ターにクローン化した。プラスミド DNA から直鎖化した標準 DNA を増幅し,標 準 DNA として使用した。(B) 標準 DNA の塩基配列。標準 DNA は 913 塩基対 で,隣接する 9-120 塩基領域を加えた PCR ターゲット領域(太字下線で示した) をカバーする五つの cDNA 断片を含んでおり(異なる色で示した),BglII, XhoI, PstI, NotI (太字斜字体)の制限酵素部位を含んでいる。



図 2.5. 標準 DNA を使った qPCR システムの確立と検証

検証した DNA は次のとおりである。(A) Chit1, (B) AMCase, (C) GAPDH, (D) β-アクチン, (E) ペプシノーゲン C。(左図) 各ターゲット遺伝子のプライマーを使 った標準 DNA の各 10 倍の希釈系列での qPCR で定量した。(右図) 五つの cDNA 断片を含む標準 DNA を使った標準曲線(茶色〇)。また,完全コード cDNA の定量を各遺伝子のプライマーを使って行った。ターゲット cDNA を既知濃度の完 全コード cDNA の希釈から増幅し (図 2.6 参照),その後未知サンプルとして分析 した (青色令)。ここで検証した標準曲線と完全コード cDNA の希釈が同じ量であ ることが確認できた。



図 2.6. 各ターゲット遺伝子のプライマーを使って既知濃度の完全コード cDNA の 10 倍の希釈系列での qPCR による定量



図 2.7. マウス組織における Chit1 と AMCase mRNA の発現

マウス組織における Chitl (A) と AMCase (B) mRNA の定量。両キチナーゼ標準 鋳型 DNA を使って qPCR で定量した。得られたすべての値は, total RNA 10 ng あ たりの分子数で表した。(C) AMCase の Chitl に対する比。全ての mRNA コピー数 は,同じ標準 DNA の希釈をもとに算出した。図の縦軸は,上は実数値で,下は対 数値で示している。



図 2.8. 肺と胃組織における Chit1, AMCase そして参照遺伝子 mRNA の分析 三カ月齢のマウスの肺 (A) と胃 (B) 組織(それぞれ n=5)から調製した cDNA を用いて五つの遺伝子の発現レベルを qPCR で定量した。図の縦軸は,上は実数値 で,下は対数値で示している。

第Ⅲ章 Real-time PCR によるヒトとマウス組織のキチナーゼ

mRNA レベルの定量:胃組織における酸性ほ乳類キチナーゼの種特異

的発現

第1節 序論

ヒトにおいて、ほ乳類キチナーゼの発現と炎症性疾患状態との関連が示されてい る。Chitl の発現は、ゴーシェ病、COPD、喫煙者、アルツハイマー病で上昇する [30-33]。AMCase は、喘息モデルマウスのアレルギー性気道応答で増加する [34]。 また、AMCase の発現は高分子量キチンによって誘導される [35]。さらに、AMCase の遺伝子多型は、ヒトの気管支喘息に関係している [36,37]。しかし、ほ乳類キチナ ーゼの病態生理学的な役割はわかっていない。第 II 章で、同じスケールでキチナ ーゼと参照遺伝子の発現レベルの定量と比較をするため、一つの標準 DNA を使っ た qPCR システムを確立した [61]。その方法での定量結果は、AMCase mRNA が、 マウスの胃で主要な転写産物であり、ペプシノーゲン C の発現に匹敵するレベルで 発現していることを示した [61]。本章では、正常なヒト組織でのほ乳類キチナーゼ の発現レベルを調べるために、確立した方法を応用した。さらに、ヒトとマウス組 織間で複数遺伝子の mRNA レベルを比較するために、ヒト-マウス複合型標準 DNA を使った定量システムを確立し、それぞれの発現レベルを定量した。

第2節 実験材料と実験方法

RNA と cDNA の調製

この研究では、Mouse Total RNA Master Panel と Human Total RNA Master Panel II (Clontech Laboratories 社) を使用した。さらに、三ヶ月齢のオスのマウスの唾液腺、 小腸、大腸から RNA を単離した。C57BL/6J マウスは、RIKEN 脳科学研究所の動 物施設で飼育された。マウスからの mRNA 調製は第 II 章第 2 節に記載したよう に行った。

Real-time PCR

Real-time PCR のプライマーは, Primer Express Software で設計し, その合成は Sigma-Genosys に依頼した (Sigma-Aldrich 社)。PCR 反応は, 第 II 章に記載した通 りに行った。反応産物の熱融解曲線は, PCR 増幅後に MxPro QPCR Software version 4.10 で作成した。ここで qPCR のために選択したプライマーの塩基配列は, 表 3.1 に示した。

ヒト標準 DNA の作成

ヒトの遺伝子の標準 DNA の作成と完全コード領域をカバーした五種類のヒトの cDNA の調製は, 第 Ⅱ 章に記載した方法で行った。

標準 DNA の作成に用いたプライマーは,表 3.2 に記載した。PCR 産物は,該当 する制限酵素で処理を行い,T4 DNA リガーゼ を使って結合した。連結した DNA 断片は,フォワードプライマー 5'-

CATGGAATTCTGGTCTGGGCCATTGATCTGGATG-3' とリバースプライマー 5'-CAATCTCATCTTGTTTTCTGCGCAAGTTAGG-3' を使って増幅し, pGEM-T Easy ベ クターにクローン化した。検証した cDNA の配列は,図 3.1 に示す。標準 DNA

(1,396 塩基対) は,同じプライマーを使って PCR でプラスミド DNA から再び増 幅して調製した。

完全コード領域をカバーしている五つのヒトの cDNA の調製

ヒトの完全コード cDNA は,表 3.3 に記載したプライマーを使って PCR で増幅 し,pGEM-T Easy ベクターにサブクローニングをした。cDNA の配列は,第 Ⅱ 章 と同様にシークエンスによって決定した(図 3.2)。サブクローニングした断片は, 同じプライマーを使ってプラスミド DNA から再び増幅し,完全コード領域の cDNA として使った。

Real-time PCR による mRNA の定量

第 Ⅱ 章で記載した通り,構成されるヒト標準 DNA のモル濃度を計算した。標 準 DNA は,100 分子から 1,000 万分子の範囲で 10 倍ずつ段階希釈を行い,使用 するまで一定量を -20℃ で凍結保存した。mRNA の定量は,第 Ⅱ 章で記載した通 りに行った。それぞれのサンプルは三度増幅し,それぞれの実験は少なくとも二回 繰り返した。

ヒト-マウス複合型標準 DNA の作成

この章での qPCR によって転写レベルの定量に使ったヒト-マウス複合型標準 DNA (2,305 塩基) は、以下の通りに作成した。3' 末端に EcoRI の制限酵素部位を 含むマウスの標準 DNA をフォワードプライマー 5'-

GTGGATTCTGTGCCGACAAAGCAGATGGCC-3' とリバースプライマー 5'-

CATGGAATTCTGGGTACATGGTGGTACCACCAGA-3'を使って PCR で増幅した。 5'末端に EcoRI の制限酵素部位を含むヒトの標準 DNA(図 3.1)も同様に調製し た。PCR 産物は、EcoRI で処理し、アガロースゲル電気泳動により精製し、T4 DNA リガーゼ を使って連結させた。連結した断片は、フォワードプライマー 5'-GTGGATTCTGTGCCGACAAAGCAGATGGCC-3'とリバースプライマー 5'-CAATCTCATCTTGTTTTCTGCGCAAGTTAGG-3'を使って PCR で増幅した。得ら れた DNA は、pGEM-T Easy ベクターにクローン化した。DNA の検証した配列は 図 3.3 に示す。直線化したヒト-マウス複合型標準 DNA は、同じプライマーを使っ てプラスミド DNA から PCR で再び増幅し、調製した。標準曲線を作成し、第 II 章で述べた通りに mRNA の定量を行った。

抗体調製

マウスとヒト AMCase に特異的なウサギのポリクローナル抗体を作製した。Cys-ペプチド (マウス AMCase は KADGLYPVADDRNAFWQC, ヒト AMCase は RANGLYPVANNRNAFWHC) は、C 末端システインを用いてキーホールリンペット ヘモシアニン (KLH) に結合した。ウサギの抗体は、抗原を Sulfolink (Pierce 社) に システインを介して結合させ、血清からアフィニティー精製した。それぞれの抗体 の特異性は、ウエスタンブロッティングにより確認した。

マウスの胃のタンパク質の調製とヒトの胃の可溶化液

三ヶ月齢のマウス (C57Bl/6J) の胃を,氷上で,10 倍量の 150 mM NaCl とプロテ アーゼ阻害剤 (Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablet, Roche Diagnostics 社)を含 む 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.6)で、テフロン-ガラスホモジナイザーを用いてホモ ジナイズした。破砕物は 17,000 x g で 4°C,10 分間遠心し、可溶性画分を回収し た。正常なヒト胃組織の全タンパク質の抽出液は、Novus Biologicals 社より購入し た [Cat. no. NB820-59263; Whole Normal Fundus Stomach Tissue Lysate (Adult Normal)]。それぞれのタンパク質は、Protein Assay (Bio-Rad 社)で定量した。

キチナーゼの酵素活性

キチナーゼの酵素活性は, Chitinase Assay Kit, Fluorimetric (Sigma-Aldrich 社) を使 って測定した [10,12,13,30]。遊離した 4-methylumbelliferyl β-D-*N*, *N*'-diacetylchitobiose (4MU-chitobiose) と 4-methylumbelliferyl β-D-*N*, *N*', *N*"-triacetylchitotriose (4MUchitotriose) は,分光蛍光光度計 (RF-5300PC, Shimazu 社) を用いて,励起波長 360 nm, 蛍光波長 450 nm で測定した。遊離した 4MU の量は,4MU (Sigma-Aldrich 社) で作製した標準曲線を使って算出した。

ウェスタンブロット

胃の可溶性タンパク質 12.5 μg を 10% SDS ポリアクリルアミドゲルでに分離し た [62]。電気泳動で分離したタンパク質を PVDF メンブレン (Immobilon-P, Millipore 社) に電気泳動的に転写し,上記の抗ヒト AMCase 抗体,または,抗マウ ス AMCase 抗体,続いて,抗ウサギ IgG (H+L) 抗体 (Jackson ImmunoResearch laboratories 社) と反応した。目的タンパク質に結合した抗体を Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore 社) を用い検出し, Luminescent Image Analyzer で解析した。コントロールとして, モノクローナル抗体である抗 β-アクチン抗体 (clone AC-15) (Sigma-Aldrich 社), 続いて, 抗マウス IgG 抗体 (H+L) (Jackson ImmunoResearch laboratories 社) と反応した。先に述べたように抗体を検出し, 解析した。

第3節実験結果

Real-time PCR システムの確立と検証

正常なヒト組織における Chit1 と AMCase 遺伝子の発現レベルを次の対照遺伝子 を使って解析した(図 3.4A)。対照遺伝子は第 II 章のマウスでの解析と同様に, 二つのハウスキーピング遺伝子 (GAPDH と β -アクチン), ペプシノーゲン C を用 いた。ペプシノーゲン C は, マウスの胃において AMCase mRNA レベルが, ペプ シノーゲン C のレベルに匹敵したためである [61]。

qPCR のためのプライマーを設計し,そのプライマーから増幅した産物が一つの 熱融解温度 (Tm) を示すか,10% ポリアクリルアミドゲルで一つのバンドかどう か,でプライマーを評価した。そして,産物の塩基配列も確認した。図 3.5A-E に 示すように,五つの cDNA の解離曲線それぞれで一つのピークが見られた。ゲル電 気泳動では,それぞれ Chitl (54 bp), AMCase (61 bp), GAPDH (56 bp),β-アクチン (56 bp),ペプシノーゲン C (60 bp) で期待サイズに明確な一つのバンドが認められた (図 3.5F)。従って,目的の PCR 産物がヒト組織 cDNA 混合液からここで選択し

たプライマーによって増幅したことが分かった。

次に, qPCR のための標準 DNA を, 五つの cDNA 断片を1分子ずつ連結させて 作成した(図 3.1, 3.4B)。1,396 塩基の標準 DNA は, PCR ターゲット領域をカバ ーし, 隣接する 66-143 塩基領域を加えた五つの cDNA 断片と BglII, Sall, Xhol, Notl の制限酵素部位を含んでいる(図 3.1, 3.4B)。

両キチナーゼと対照遺伝子の mRNA の定量には,標準曲線が必要である。ま ず,その標準曲線を使って,real-time PCR の定量性を検証した。それぞれの標準曲 線は,五つの異なるプライマーを使ってヒト標準 DNA を 10 倍希釈ずつ段階希釈 して作成した(図 3.1A-E,赤●)。

標準曲線が絶対的に等量になっていることを示すために、ヒトの全コード領域を カバーしている既知濃度の cDNA を増幅し、未知試料として解析した。この解析 は、希釈液が期待量得られているかを確認するために行った。図 3.6A-E に青◇で 示すように、標準曲線と完全コード cDNA の希釈が同じ量であることが確認でき た。

第 Ⅱ 章の方法を応用した方法でも,real-time PCR の敏感性と信頼性を確認する ことができ,定量化のダイナミックレンジ,高い正確性,高感度であることを示してい る(図 3.6A-E)。従って,応用した real-time PCR 法は,同じスケールで,ヒトの二 つのキチナーゼ遺伝子と三つの対照遺伝子の発現について信頼性の高い値を与える ことを確認できた。

正常ヒト組織における Chit1 と AMCase の発現

様々な正常ヒト組織の total RNA を一つの標準 DNA を使った定量 qPCR 法で解 析した (図 3.4)。結果は, total RNA 10 ng あたりの分子数として表した (図 3.7, 3.8)。

Chit1 と AMCase mRNA は、ヒト組織で広く発現していた(図 3.7A、3.7B)。 Chit1 mRNA はヒトの肺で最も高く、次いで脾臓、胎児の肝臓、胸腺であった(図 3.7A)。AMCase mRNA は肺で高いレベルで、次いで胎児脳、肝臓、甲状腺の順に検 出された(図 3.7B)。AMCase mRNA は、マウスの胃で非常に高いレベルで発現し ていたが、ヒトの胃では、肺、胎児脳、胎児肝臓、甲状腺、心臓のレベルよりもは るかに低かった(図 3.7B)。他の組織において、Chit1 と AMCase mRNA は低レベ ルであったが、容易に検出できた(図 3.7A、3.7B)。

AMCase と Chit1 mRNA レベルを比較すると,両 mRNA は脾臓と胎児肝臓で比 較的高く発現していた。一方,胎児脳,前立腺,肝臓は, Chit1 より AMCase が多 く発現していた。

正常ヒト肺と胃組織での Chit1 と AMCase の発現レベルの解析

第 II 章と同様に, ヒト肺と胃組織でのキチナーゼと対照遺伝子の発現レベルを 比較した(図 3.8)。ヒトの肺組織において, Chit1 レベルを 1.0 としたとき, 各 cDNA の相対発現レベルは, AMCase 0.8, GAPDH 39, β-アクチン 343 だった(図 3.8A)。Chit1 と AMCase mRNA は正常なヒトの肺で同じくらいのレベルで発現し ていたが, Chit1 の発現レベルは 二つのハウスキーピング遺伝子のレベルよりはる かに低かった。

ヒトの胃組織において、Chit1 レベルを 1.0 としたとき、それぞれの相対的発現 レベルは AMCase 1.5、GAPDH 323、 β -アクチン 1,736、ペプシノーゲン C 3,962 だ った(図 3.8B)。AMCase mRNA は Chit1 と同等のレベルであった。Chit1 と AMCase の mRNA レベルは、ヒトの胃組織において GAPDH と β -アクチンの発現 レベルよりかなり低かった。これらの結果から、ヒト組織において、全体の Chit1 と AMCase mRNA レベルは比較的低く、AMCase の胃での発現レベルはヒトとマウ スでかなり異なっていることがわかった。

ヒト-マウス複合型標準 DNA を使った定量システムの検証

次に、qPCR 法を使ってヒトとマウス組織で、同じスケールで二つのキチナーゼ の発現レベルを比較する(図 3.9A)。そこで、qPCR で用いるヒトとマウスの標準 DNA を結合した、ヒト-マウス複合型標準 DNA を作成した(図 3.3B)。得られた 2,305 塩基対の標準 DNA は、ヒトとマウス遺伝子の PCR ターゲット領域をカバー し、隣接する領域に 9-143 塩基加えた十個の cDNA 断片を含んでいる(図 3.3)。 標準曲線を使った qPCR 法の検証結果は、図 3.10, 3.11, 3.12 に示す。ヒト-マ ウス複合型標準 DNA の希釈液は、標準曲線を作成するために 10 倍ずつ段階希釈 して作成した(図 3.10, ヒト, 赤●;マウス、紫▲)。ヒトの全コード領域をカバー している既知濃度の各 cDNA と同じ量であることが確認できた(図 3.10A-E)。同 様に、マウスの五つの遺伝子もマウスの全コード領域をカバーしている既知濃度の 各 cDNA と同じ量であることが確認できた(図 3.11A-E)。さらに、二つの標準曲 線と既知濃度のヒトとマウスの完全コード cDNA の二つの希釈曲線は一致した(図 3.12A-E)。従って、確立したヒト-マウス複合型標準 DNA を使った qPCR 法は、同 ーのスケールで四つのキチナーゼ遺伝子と六つの対照遺伝子の発現について信頼で きる解析ができる(図 3.9B)。

Chit1 と AMCase mRNA レベルのヒトとマウス組織での比較

本研究では、Human Total RNA Master Panel II と Mouse Total RNA Master Panel (Clontech Laboratories 社)を使用した。ヒトとマウスで重複した組織が四つ(肺、肝 臓、腎臓、脾臓)あり、喘息とゴーシェ病に関係している。マウスの胃組織のキチ ナーゼの発現に顕著な違いがあったので、ヒトとマウスで消化器官である唾液腺、 胃、小腸、大腸におけるキチナーゼの発現レベルを調べた。ヒト組織において、ヒ ト-マウス複合型標準 DNA(図 3.9B)を用いて発現レベルを定量し、比較した結果 を図 3.13 に示した。

Chit1 mRNA は、マウスの胃で最も高い発現レベルで、次いでヒトの肺組織だっ た。全体的に見て Chit1 mRNA は、ヒト組織の方が高いレベルで発現していた(図 3.13A)。AMCase mRNA の最も高い発現レベルは、マウスの胃で、次いでマウスの 唾液腺で高かった(図 3.13B)。ヒト組織で AMCase は低かった(図 3.13B)。小腸 と大腸における Chit1 と AMCase mRNA レベルは、ヒトとマウス組織でとても低 かった(図 3.13)。この結果は、以前報告されたノーザンブロット解析で得られた結 果と一致した [12,13]。

次に、ヒトとマウスの肺と胃組織から抽出した cDNA を使ってキチナーゼと対照 遺伝子の発現レベルを比較した (図 3.14)。肺組織でヒト Chitl レベルを 1.0 とし たとき、それぞれの相対的発現レベルは、マウス Chitl 0.3、ヒト AMCase 0.3、マウ ス AMCase 7 であった (図 3.14A)。マウス AMCase は、マウスの肺で高く発現し ていた。ヒト肺の Chitl レベルは、マウスの肺より 3 倍高かった。Chitl と AMCase レベルは、GAPDH と β-アクチン遺伝子より著しく低かった (図 3.14A)。

胃組織において, ヒト Chit1 レベルを 1.0 としたとき, それぞれの相対的発現レベルは, マウス Chit1 10, ヒト AMCase 0.7, マウス AMCase 1,978 であった(図 3.14B)。マウスにおける AMCase の mRNA レベルは, GAPDH と β-アクチンより

高かく、ペプシノーゲン C のレベルに匹敵した。一方、ヒトの胃での AMCase mRNA は、とても低かった。胃において、ヒト AMCase の発現レベルを 1.0 とし たとき、マウス AMCase の相対発現レベルは 2,826 だった。

胃組織におけるタンパク質レベルの解析

ヒトとマウスで mRNA レベルの差がタンパク質レベルに反映されているかどう か調べるために、胃組織におけるキチナーゼの酵素活性を分析した。まず、マウス とヒトの胃組織で AMCase の活性を解析した。マウス AMCase は、おもな至適 pH が pH2 で、第二の至適 pH は pH5 付近である。一方、ヒトの AMCase は、 pH 2~pH5 の広い至適 pH を示す。そこで、人工基質である 4MU-chitobiose を用 いてキチン分解活性を、pH 2.0 と pH 5.0 で測定した [12,13]。マウスの胃の抽出液 において、pH 2.0、次いで pH 5.0 で強いキチン分解活性を検出した。一方、pH 2.0 でヒトのキチン分解活性は検出されなかった。また、pH 5.0 で活性は低かった(図 3.15A、左図)。

Chit1 の酵素活性を pH 5.2 で 4MU-chitotriose を使って測定した [12,13,30,63]。 また, Chit1 活性の影響を見るため、4MU-chitotriose を使って pH 2.0 でキチナーゼ 活性を分析した。4MU-chitotriose に対して強いキチナーゼ活性を pH 2.0 でマウスの 胃の抽出液で検出した(図 3.15A, 右図)。また、弱いキチナーゼ活性を pH 5.2 で も検出した(図 3.15A, 左図)。AMCase は、二つ目の至適 pH が pH 5 付近である ので、pH 5.2 のほとんどのキチン分解活性は、おそらく Chit1 というよりはむしろ AMCase と考えられる。また、この結果は、マウス AMCase が基質として 4MUchitotriose を pH 2.0 で加水分解できることも示している。以上のことから、マウス の胃におけるキチナーゼ活性の大部分は、AMCase 活性である。ヒトの胃の抽出液 においては、pH 2.0 と pH 5.2 でのキチン分解活性のレベルをとても弱いが、検出 可能なレベルであった(図 3.15A, 右下図)。pH 5.2 でのキチナーゼ活性は、pH 2.0 の活性に匹敵し、このことは、ヒトの胃で Chit1 が発現していることを示す。

AMCase に対する抗体を使ったウエスタンブロッティングでタンパク質の発現レ ベルを解析した。AMCase 抗体は、すでに報告されたマウスペプチド [35] に相当す るヒトペプチドに対して作製した。抗マウス AMCase 抗体は、マウスの胃の抽出液 で強い一つのバンドを認識した(図 3.15B, 左図)。同様に、抗ヒト AMCase 抗体 もマウスの抽出液で一つのバンドを認識した(図 3.15B, 右図)。しかし、ヒト胃の 抽出液では、少し分子質量が高いバンドがヒトとマウスの抗体でわずかに検出され た(図 3.15B)。ヒト胃の抽出液で 4MU-chitobiose を使った pH 2.0 か pH 5.0 のど ちらにも著しいキチナーゼ活性がなかったため、これらのバンドは、ヒト AMCase ではないと考えられる。従って、マウスとヒトの胃組織でキチン分解活性と相対的 なタンパク質発現レベルは、mRNA レベルで得られたデータと一致した。

第4節 考察

ヒトにおいて、ほ乳類キチナーゼの発現と炎症性疾患状態との関連が示されている [30-37]。しかし、ほ乳類キチナーゼの病態生理学的な役割はわかっていない。ヒト組織でこ れらのキチナーゼの発現レベルを研究するため、第 Ⅱ 章で確立した方法を応用し た。さらに、ヒトとマウス組織でキチナーゼの発現レベルを評価するため、一つの ヒト-マウス複合型標準 DNA を使った定量システムを開発し、定量した。ここで確 立した方法は mRNA の検出に十分な感度であり、ヒトとマウス組織で、同じスケ ールでキチナーゼの遺伝子発現パターンの網羅的な解析を可能にした。

定量結果から、ヒトとマウスの肺組織で Chit1 は、相対的に高いレベルで、互い にほとんど同程度の発現レベルであった。これは、Chit1 mRNA の発現レベルがヒ トとマウス間で保存されていることを示す。肺において Chit1 は、真菌やダニのよ うなキチン含有病原体に対して保護する生体防御の一部として作用していると考え られている [63]。ヒトとマウスにおける Chit1 の遺伝子発現レベルの保存は、肺に おける Chit1 の生理学的重要性を示唆している。

胃におけるキチナーゼの発現は、特に重要である。AMCase mRNA は、マウスの
胃で非常に高いレベルで合成されるが、ヒトの胃ではそうではなかった(図
3.14B)。ヒトの胃における AMCase mRNA レベルは、マウスの胃の約 1/2,800 であった。ペプシノーゲン C と二つのハウスキーピング遺伝子は、ヒトとマウスの胃組織でとても高いレベルで発現していた(図 3.14B)。従って、ヒトの胃における
AMCase mRNA の低い発現は、cDNA 調製中の RNA の分解によるものではない。
従って、胃組織における AMCase の発現レベルは、ヒトとマウスで著しく異なる。

胃は、食物の分解や有害な生物に対抗する保護の基本的な役割を果たす重要な器 官である。胃では塩酸が分泌され、ペプシンによるタンパク質の分解に適切な酸性 状態 (pH=~2) になっている [56,58]。マウス AMCase は、著明な酸安定性を示し、 pH 2 で最も活性が高い [12]。マウスの胃は、非常に多くの AMCase を合成する

(図 3.15)。AMCase は、マウスの胃でキチン含有食物を分解する消化酵素として 機能できるだろう。

一方, ヒトの胃で, AMCase のレベルは比較的低かった(図 3.13, 3.14, 3.15)。 これは,現代のヒトはキチン含有食物をたくさん食べないため,発現が低いと考え られる。従って,ヒトの胃で,AMCase がキチン含有生物に対する防御に役割を果 たさないことを示唆する。多くの胃の病気は,外来生物による感染と関連してい る。*Helicobacter pylori*の感染などは内在性 AMCase の活性と相関するだろう [64]。従って,AMCase の低いレベルがヒトの胃の疾患に関与するかどうか,検討の 必要がある。

高いキチン分解活性は、マウスの胃と腸の抽出液で検出されている [12]。ヒトと マウスの胃でキチナーゼの発現レベルで顕著な違いがあるので、これらのキチナー ゼの発現レベルを唾液腺、小腸、大腸を含む消化器官で検討した。その結果、小腸 と大腸で Chitl と AMCase mRNA レベルは, ヒトとマウスの組織でとても低かった が, マウスの唾液腺と胃は高いレベルで両キチナーゼ mRNA を生産した(図 3.13)。マウスの腸のほ乳類キチナーゼタンパク質は, おそらく唾液腺や胃のような 消化管に由来するだろう。これは, 以前 Boot らが示した概念と一致する [12,13]。

肺組織で Chitl 遺伝子の発現レベルは、ヒトとマウスで保存されている。一方、 胃組織で AMCase の発現レベルは種特異的である。これは、肺における Chitl mRNA の発現制御は進化で保存されていたが、一方、ヒトの胃で AMCase の発現 の減少は、遺伝子の発現抑制によるものと考えられる。

第5節要約

第 II 章で,一つの標準 DNA を使った qPCR システムを確立し,マウス AMCase mRNA が,正常マウスの胃で非常に高いレベルで合成されていることを示 した。本章では,この方法を正常なヒト組織におけるキチナーゼ mRNA の定量に 応用した。そして,正常なヒト組織で両キチナーゼ mRNA レベルは,広く発現し ていることを見出した。Chitl mRNA は,ヒトの肺で高く発現していた。一方, AMCase は正常なヒトの胃で低い発現だった。これらの mRNA レベルは,ヒト組 織において,ハウスキーピング遺伝子のレベルよりも著しく低かった。AMCase の 発現レベルがヒトとマウスの胃で著しく異なるため,ヒト-マウス複合型標準 DNA を使った qPCR システムを確立し,ヒトとマウス組織における mRNA レベルを比 較した。その結果,Chitl は正常なヒトとマウスの肺で同じレベルで発現していたこ とが分かった。一方,ヒトの胃で AMCase の発現レベルは,マウスの胃の発現レベ ルより著しく低かった。これらのヒトとマウスの胃での mRNA の違いは、キチン 分解活性とタンパク質発現レベルの違いに反映されていた。従って、胃での AMCase の発現レベルは種特異的である。

表 3.1. ヒト遺伝子の real-time PCR の塩基配列

H_Chit1_Fw: GTCAACTCGGCCATCAGGTT H_Chit1_Rv: CAAGGTCAAGGCCGTCAAA H_AMCase_Fw: CCCTAATCTCCACCCTGAAGAA H_AMCase_Rv: AGCTGGAGCCGTGCAACTT H_GAPDH_Fw: ATGGAAATCCCATCACCATCTT H_GAPDH_Rv: CGCCCCACTTGATTTTGG H_ β - $\mathcal{T}\mathcal{P}\mathcal{F}\mathcal{V}_F$ w: TGGATCAGCAAGCAGGAGTATG H_ β - $\mathcal{T}\mathcal{P}\mathcal{F}\mathcal{V}_R$ v: GCATTTGCGGTGGACGAT H_Pep C_Fw: TTCCCTCTGCCACCTTCCT H Pep C Rv: CGACTCCCACGTGCAGTA

表 3.2. ヒト標準 DNA を作成するために用いたプライマー

Eco_quant_H_AMCase_Fw: CATGGAATTCTGGTCTGGGCCATTGATCTGGATGA Bgl_quant_H_AMCase_Rv: TGACAGATCTGCATTTCTGTTATTTGCCACGGGGT Bgl_quant_H_Pep C_Fw: TGACAGATCTGCAGGCCACAGGGGCCCAGGAGGAT Sal_quant_H_Pep C_Rv: TGACGTCGACCCCAAGTCGTAGACGGAATAGTAGG Sal_quant_H_Chit1_Fw: TGACGTCGACTCTCTACCAGGAGTTCAATGGCCTG Xho_quant_H_Chit1_Rv: TGACCTCGAGCTGCTGGAAGGCATTGGCCAAGTCC Xho_quant_H_GAPDH_Fw: TGACCTCGAGGCCATCAATGACCCCTTCATTGACC Not_quant_H_GAPDH_Rv: TCGAGCGGCCGCTGGGGGCATCAGCAGAGGGGGCA Not_quant_H_ β - $\mathcal{P}\mathcal{P}\mathcal{F}\mathcal{V}$ _Fw: TCGAGCGGCCGCATGCAGAAGGAGATCACTGCCCT Quant_H_ β - $\mathcal{P}\mathcal{P}\mathcal{F}\mathcal{V}$ _Rv: CAATCTCATCTTGTTTTCTGCGCAAGTTAGG

CATGGAATTCTGGTCTGGGCCATTGATCTGGATGACTTCACTGGCACTTTCTGCAACCAGGGCAAGTTTCCCCC TAATCTCCACCCTGAAGAAGGCCCTCCGGCCTGCAGAGTGCAAGTTGCACGGCTCCAGCTCAGCCCATTGAGCC AATAACTGCTGCTCCCAGTGGCAGCGGGAACGGGAGCGGGAGTAGCAGCTCTGGAGGCAGCTCGGGAGGCAGT GGATTCTGTGCTGTCAGAGCCAACGGCCTCTACCCCGTGGCAAATAACAGAAATGCAGACAGCAGGCCACAG GGGCCCAGGAGGATGAGTATGGACAGTTTCTCGTGAACTGTAACAGCATTCAGAATCTGCCCAGCTTGACCTT CATCATCAATGGTGTGGAG**TTCCCTCTGCCACCTTCCT**CCTATATCCTCAGTAACAACGGC**TACTGCACCGTG** GGAGTCCACCTACCTGTCCTCCCAGAACGGCCAGCCCCTGTGGATCCTCGGGGATGTCTTCCTCAGGT CCTACTATTCCGTCTACGACTTGGGG**CTCGAC**TCTCTACCAGGAGTTCAATGGCCTGAAGAAGATGAATCCCAA GCTGAAGACCCTGTTAGCCATCGGAGGCTGGAATTTCGGCACTCAGAAGTTCACAGATATGGTAGCCACGGCC AACAACCGTCAGACCTTTGTCAACTCGGCCATCAGGTTTCTGCGCCAAATACAGCTTTGACGGCCTTGACCTTG ACTGGGAGTACCCAGGAAGCCAGGGGAGCCCTGCCGTAGACAAGGAGCGCTTCACAACCCTGGTACAGGACTT GGCCAATGCCTTCCAGCAGCTCGAGGCCATCAATGACCCCTTCATTGACCTCAACTACATGGTTTACATGTTC CAATATGATTCCACCCATGGCAAATTCCATGGCACCGTCAAGGCTGAGAACGGGAAGCTTGTCATCA**ATGGAA** ATCCCATCACCATCTTCCAGGAGCGAGATCCCTCCAAAATCAAGTGGGGCCGATGGCGCCTGAGTACGTCGT ATCTCTGCCCCCTCTGCTGATGCCCCCAGCGCCCCCCAGCAGAAGGAGATCACTGCCCTGGCACCCAGCACAA TGAAGATCAAGATCATTGCTCCTCCTGAGCGCAAGTACTCCGTGTGGATCGGCGGCTCCATCCTGGCCTCGCT GTCCACCTTCCAGCAGATG**TGGATCAGCAAGCAGGAGTATG**ACGAGTCCGGCCCCTCC**ATCGTCCACCGCAAA** $\underline{\mathbf{TGC}} \mathtt{TTCTAGGCGGACTATGACTTAGTTGCGTTACACCCTTTCTTGACAAAACCTAACTTGCGCAGAAAACAAG$ ATGAGATTG

図 3.1. ヒト標準 DNA の塩基配列

5' 末端に EcoRI の制限酵素部位を含むヒト標準 DNA(1,396 塩基対) と隣接す る 60-143 塩基領域を加えた PCR ターゲット領域(太字下線) をカバーする五つの cDNA 断片を含む(異なる色で示した)。さらに, BglII, Sall, XhoI, NotI(太字斜 字体)の制限酵素部位を含んでいる。

表 3.3. PCR で完全コード cDNA を増幅させるためのプライマー

H_entire_Chit1_Fw: CATGGAATTCGGACCTGGAAAGCTGGTTTGTATGG H_entire_Chit1_Rv: GTGACCTCGAGCATTCCAGGTGCAGCATTTGCAGG H_entire_AMCase_FW: GCTACGGAATTCAACCATGACAAAGCTTATTCTCC H_entire_AMCase_Rv: GTGACCTCGAGCTGCCCAGTTGCAGCAATCACAGC H_entire_GAPDH_Fw: CCATGGGGAAGGTGAAGGTCGGAGT H_entire_GAPDH_Rv: TTACTCCTTGGAGGCCATGTGGGCC H_entire_ β - $\mathcal{P}/\mathcal{F}\mathcal{V}$ _Fw: CACCATGGATGATGATATCGCCGCG H_entire_ β - $\mathcal{P}/\mathcal{F}\mathcal{V}$ _Rv: CGCCTAGAAGCATTTGCGGTGGACG H_entire_Pep C_Fw: CTCTGTGGCCAGTTGGGGCCAGCA H_entire_Pep C_Rv: TCTAGGCGGCAGTGGCCAAGCCTAC
Human Chit1 MW=908917.4

CATGGAATTCGGACCTGGAAAGCTGGTTTGTATGGGCTGCAGCCTGCCGCTGAGCTGCATCATGGTGCGGTCT <u>GTGGCCTGGGCAGGTTTCATGGTCCTGCTGATGATCCCATGGGGCTCTGCTAAAACTGGTCTGCTACTTCA</u> <u>CCAACTGGGCCCAGTACAGACAGGGGGGGGGGGCTCGCTTCCTGCCCAAGGACTTGGACCCCAGCCTTTGCACCCA</u> CCTCATCTACGCCTTCGCTGGCATGACCAACCACCAGCTGAGCACCACTGAGTGGAATGACGAGACTCTCTAC CAGGAGTTCAATGGCCTGAAGAAGATGAATCCCAAGCTGAAGACCCTGTTAGCCATCGGAGGCTGGAATTTCG GCACTCAGAAGTTCACAGATATGGTAGCCACGGCCAACAACCGTCAGACCTTTGTCAACTCGGCCATCAGGTT TCTGCGCAAATACAGCTTTGACGGCCTTGACCTTGACTGGGAGTACCCAGGAAGCCAGGGGAGCCCTGCCGTA <u>GACAAGGAGCGCTTCACAACCCTGGTACAGGACTTGGCCAATGCCTTCCAGCAGGAAGCCCAGACCTCAGGGA</u> AGGAACGCCTTCTTCTGAGTGCAGCGGTTCCAGCTGGGCAGACCTATGTGGATGCTGGATACGAGGTGGACAA <u>AATCGCCCAGAACCTGGATTTTGTCAACCTTATGGCCTACGACTTCCATGGCTCTTGGGAGAAGGTCACGGGA</u> <u>ACTGGCCTCCTCATCAGACACCAGAGTGGGGGGCCCCAGCCACAGGGTCTGGCACTCCAGGCCCCTTCACCAAG</u> <u>GAAGGAGGGATGCTGGCCTACTATGAAGTCTGCTCCTGGAAGGGGGCCACCAAACAGAGAATCCAGGATCAGA</u> <u>AGGTGCCCTACATCTTCCGGGACAACCAGTGGGTGGGCTTTGATGATGTGGAGAGCTTCAAAACCAAGGTCAG</u> CTATCTGAAGCAGAAGGGACTGGGCGGGGCCATGGTCTGGGCACTGGACTTAGATGACTTTGCCGGCTTCTCC <u>TGCAACCAGGGCCGATACCCCCTCATCCAGACGCTACGGCAGGAACTGAGTCTTCCATACTTGCCTTCAGGCA</u> CCCCAGAGCTTGAAGTTCCAAAACCAGGTCAGCCCTCTGAACCTGAGCATGGCCCCAGCCCTGGACAAGACAC GTTCTGCCAGGGCAAAGCTGATGGGCTCTATCCCAATCCTCGGGAACGGTCCAGCTTCTACAGCTGTGCAGCG GGGCGGCTGTTCCAGCAAAGCTGCCCGACAGGCCTGGTGTTCAGCAACTCCTGCAAATGCTGCACCTGGAATG CTCGAGGTCAC

Human AMCase MW=899602.4

GCTACGGAATTCAACC**ATG**ACAAAGCTTATTCTCCTCACAGGTCTTGTCCTTATACTGAATTTGCAGCTCGGC TCTGCCTACCAGCTGACATGCTACTTCACCAACTGGGCCCAGTACCGGCCAGGCCTGGGGGCGCTTCATGCCTG <u>ACAACATCGACCCCTGCCTCTGTACCCACCTGATCTACGCCTTTGCTGGGAGGCAGAACAACGAGATCACCAC</u> <u>CTCCTGGCCATTGGAGGCTGGAACTTCGGGACTGCCCCTTTCACTGCCATGGTTTCTACTCCTGAGAACCGCC</u> <u>AGACTTTCATCACCTCAGTCATCAAATTCCTGCGCCAGTATGAGTTTGACGGGCTGGACTTTGACTGGGAGTA</u> TTTGAGCAGGAGGCCAAGCAGATCAACAAGCCCAGGCTGATGGTCACTGCTGCAGTAGCTGCTGGCATCTCCA <u>ATATCCAGTCTGGCTATGAGATCCCCCCAACTGTCACAGTACCTGGACTACATCCATGTCATGACCTACGACCT</u> CCATGGCTCCTGGGAGGGCTACACTGGAGAGAACAGCCCCCTCTACAAATACCCGACTGACACCGGCAGCAAC <u>GCCTACCTCAATGTGGATTATGTCATGAACTACTGGAAGGACAATGGAGCACCAGCTGAGAAGCTCATCGTTG</u> <u>GATTCCCTACCTATGGACACAACTTCATCCTGAGCAACCCCTCCAACACTGGAATTGGTGCCCCCACCTCTGG</u> <u>TGCTGGTCCTGCTGGGCCCTATGCCAAGGAGTCTGGGATCTGGGCTTACTACGAGATCTGTACCTTCCTGAAA</u> AATGGAGCCACTCAGGGATGGGATGCCCCTCAGGAAGTGCCTTATGCCTATCAGGGCAATGTGTGGGTTGGCT ATGACAACATCAAGAGCTTCGATATTAAGGCTCAATGGCTTAAGCACAACAAATTTGGAGGCGCCATGGTCTG <u>GGCCATTGATCTGGATGACTTCACTGGCACTTTCTGCAACCAGGGCAAGTTTCCCCTAATCTCCACCCTGAAG</u> <u>AAGGCCCTCGGCCTGCAGAGTGCAAGTTGCACGGCTCCAGCTCAGCCCATTGAGCCAATAACTGCTGCTCCCA</u> <u>GTGGCAGCGGGAACGGGAGCGGGAGTAGCAGCTCTGGAGGCAGCTCGGGAGGCAGTGGATTCTGTGCTGTCAG</u> <u>AGCCAACGGCCTCTACCCCGTGGCAAATAACAGAAATGCCTTCTGGCACTGCGTGAATGGAGTCACGTACCAG</u> CAGAACTGCCAGGCCGGGCTTGTCTTCGACACCAGCTGTGATTGCTGCAACTGGGCAGCTCGAGGTCAC

Human GAPDH MW=624009.0

Human β-actin MW=701314.0

CACCATGGATGATGATATCGCCGCGCTCGTCGTCGACAACGGCTCCGGCATGTGCAAGGCCGGCTTCGCGGGC GACGATGCCCCCCGGGCCGTCTTCCCCTCCATCGTGGGGCGCCCCAGGCACCAGGGCGTGATGGTGGGCATGG GTCAGAAGGATTCCTATGTGGGCGACGAGGCCCAGAGCAAGAGAGGCATCCTCACCCTGAAGTACCCCATCGA <u>GCACGGCATCGTCACCAACTGGGACGACATGGAGAAAATCTGGCACCACACCTTCTACAATGAGCTGCGTGTG</u> GCTCCCGAGGAGCACCCCGTGCTGCTGACCGAGGCCCCCTGAACCCCAAGGCCAACCGCGAGAAGATGACCC AGATCATGTTTGAGACCTTCAACACCCCAGCCATGTACGTTGCTATCCAGGCTGTGCTATCCCTGTACGCCTC TGGCCGTACCACTGGCATCGTGATGGACTCCGGTGACGGGGTCACCCACACTGTGCCCATCTACGAGGGGTAT <u>GCCCTCCCCATGCCATCCTGCGTCTGGACCTGGCCGGGACCTGACTACCTCATGAAGATCCTCA</u> <u>CGTCGCCCTGGACTTCGAGCAAGAGATGGCCACGGCTGCTTCCAGCTCCTCCCTGGAGAAGAGCTACGAGCTG</u> TGGGCATGGAGTCCTGTGGCATCCACGAAACTACCTTCAACTCCATCATGAAGTGTGACGTGGACATCCGCAA AGACCTGTACGCCAACACAGTGCTGTCTGGCGGCACCACCATGTACCCTGGCATTGCCGACAGGATGCAGAAG GAGATCACTGCCCTGGCACCAGCACAATGAAGATCAAGATCATTGCTCCTCCTGAGCGCAAGTACTCCGTGT <u>GGATCGGCGGCTCCATCCTGGCCTCGCTGTCCACCTTCCAGCAGATGTGGATCAGCAGGAGTATGACGA</u> GTCCGGCCCCTCCATCGTCCACCGCAAATGCTTCTAGGCG

Human Pepsinogen C MW=738363.0

CTCTGTGGCCAGTTGGGGACCAGCATCATGAAGTGGATGGTGGTGGTCTTGGTCTGCCTCCAGCTCTTGGAGG CAGCAGTGGTCAAAGTGCCCCTGAAGAAATTTAAGTCTATCCGTGAGACCATGAAGGAGAAGGGCTTGCTGGG <u>GGAGTTCCTGAGGACCCACAAGTATGATCCTGCTTGGAAGTACCGCTTTGGTGACCTCAGCGTGACCTACGAG</u> CCCATGGCCTACATGGATGCTGCCTACTTTGGTGAGATCAGCATCGGGACTCCACCCCAGAACTTCCTGGTCC TTTTTGACACCGGCTCCTCCAACTTGTGGGTGCCCCTCTGTCTACTGCCAGAGCCAGGCCTGCACCAGTCACTC CCGCTTCAACCCCAGCGAGTCGTCCACCTACTCCACCAATGGGCAGACCTTCTCCCTGCAGTATGGCAGTGGC AGCCTCACCGGCTTCTTTGGCTATGACACCCTGACTGTCCAGAGCATCCAGGTCCCCAACCAGGAGTTCGGCT TGAGTGAGAATGAGCCTGGTACCAACTTCGTCTATGCGCAGTTTGATGGCATCATGGGCCTGGCCTACCCTGC TCTGTCCGTGGATGAGGCCACCACCACCATGCAGGGCCATGGTGCAGGAGGGCGCCCTCACCAGCCCCGTCTTC <u>ACACGGGGCAGATCTACTGGGCGCCTGTCACCCAGGAACTCTACTGGCAGATTGGCATTGAAGAGTTCCTCAT</u> <u>CGGCGGCCAGGCCTCCGGCTGGTGTTCTGAGGGTTGCCAGGCCATCGTGGACACAGGCACCTCTCTGCTCACT</u> <u>GTGCCCCAGCAGTACATGAGTGCTCTTCTGCAGGCCACAGGGGCCCAGGAGGATGAGTATGGACAGTTTCTCG</u> TGAACTGTAACAGCATTCAGAATCTGCCCAGCTTGACCTTCATCAATGGTGTGGAGTTCCCTCTGCCACC GGCCAGCCCTGTGGATCCTCGGGGATGTCTTCCTCAGGTCCTACTATTCCGTCTACGACTTGGGCAACAACA GAGTAGGCTTTGCCACTGCCGCCTAGA

図 3.2. ヒトの完全コード cDNA の塩基配列と分子量

Chit1 は 1,471 塩基対, AMCase は 1,456 塩基対, GAPDH は 1,010 塩基対, β-アクチンは 1,135 塩基対, ペプシノーゲン C は 1,195 塩基対である。開始コドン である ATG は, 太字で強調した。翻訳領域は, 下線で示す。

GTGGATTCTGTGCCGACAAAGCAGATGGCCTCTACCCTGTGGCAGATGACAGAAATGCTTTTTGGCAGTGCATCAA $\underline{\mathbf{TGG}} \texttt{AATCACATACCAGCAGCATTGTCAAGCAGGGCTTGTTT} \underline{\mathbf{TTGATACCAGCTGTAATTGCTGC}} \texttt{AACTGGCCA} \underline{\mathbf{AGA}}$ TCTCGAGTGGACTTGGATGACTTCAAGGGTTCCTTCTGCAACCAGGGCCCGTACCCTCTCATCCGGACACTACGGC AGGAACTAAATCTTCCATCCGAGACTCCAAGGAGCCCCAGAACAGATAACCTGAGCCACGCCCATCTTCTATGCC AGAGCAGGGACCCAGCCCAGGGCTACTGCAGGAGCTGAACGGGAAGCTCACTGGCATGGCCTTCCGTGTTCCTACC CCCAATGTCCGTCGTCGGACCTGACGACCTGCAAGAACCTGCCAAGTATGATGACATCAAGAAGGTGGTGA AGCAGGCATCTGAGGGCCCACTGAAGGGCATCTTGGGCTACACTGCGCCGCCGAGCAGGAGATGGCCACTGCCGC ATCCTCTTCCTCCCTGGAGAAGAGCTATGAGCTGCCTGACGGCCAGGTCATCACTATTGGCAACGAGCGGTTCCGA TGCCCTGAGGCTCTTTTCCAGCCTTCCTTGGGTATGGAATCCTGTGGCATCCATGAAACTACATTCAATTCCA TCATGAAGTGTGACGTTGACATCCGTAAAGACCTCTATGCCAACACAGTGCTGTCTGGTGGTACCACCATGTACCC A GAATTC TGGTCTGGGCCATTGATCTGGATGACTTCACTGGCACTTTCTGCAACCAGGGCAAGTTTCCCCCTAATCT CCACCCTGAAGAAGGCCCTCGGCCTGCAGAGTGCAAGTTGCACGGCTCCAGCTCAGCCCATTGAGCCAATAACTGC TGCTCCCAGTGGCAGCGGGAACGGGAGCGGGAGTAGCAGCTCTGGAGGCAGCTCGGGAGGCAGTGGATTCTGTGCT GTCAGAGCCAACGGCCTCTACCCCGTGGCAAATAACAGAAATGCAGATCTGCAGGCCACAGGGGCCCAGGAGGATG TCCTCCCAGAACGGCCAGCCCCTGTGGATCCTCGGGGATGTCTTCCTCAGGTCCTACTATTCCGTCTACGACTTGG GETCGACTCTCTACCAGGAGTTCAATGGCCTGAAGAAGATGAATCCCAAGCTGAAGACCCTGTTAGCCATCGGAGG CTGGAATTTCGGCACTCAGAAGTTCACAGATATGGTAGCCACGGCCAACAACCGTCAGACCTTTG**TCAACTCGGCC** ATCAGGTT TCTGCGCAAATACAGCTTTGACGGCCTTGACCTTG CCGTAGACAAGGAGCGCTTCACAACCCTGGTACAGGACTTGGCCAATGCCTTCCAGCAGCTCGAGGCCATCAATGA CCCCTTCATTGACCTCAACTACATGGTTTACATGTTCCAATATGATTCCACCCATGGCAAATTCCATGGCACCGTC AAGGCTGAGAACGGGAAGCTTGTCATCAATGGAAATCCCATCACCATCTTCCAGGAGCGAGATCCCTCCAAAAATCA AGTGGGGCGATGCTGGCGCTGAGTACGTCGTGGAGTCCACTGGCGTCTTCACCACCATGGAGAAGGCTGGGGGCTCA TTTGCAGGGGGGGGGCCAAAAGGGTCATCATCTCTGCCCCCTCTGCTGATGCCCCCA**GCGGCCGC**ATGCAGAAGGAG ATCACTGCCCTGGCACCAGCACAATGAAGATCAAGATCATTGCTCCTCCTGAGCGCAAGTACTCCGTGTGGATCG GCGGCTCCATCCTGGCCTCGCTGTCCACCTTCCAGCAGATG<u>TGGATCAGCAAGCAGGAGTATG</u>ACGAGTCCGGCCC TTGCGCAGAAAACAAGATGAGATTG

図 3.3. ヒト-マウス複合型標準 DNA の塩基配列

ヒトとマウス標準 DNA は, EcoRI 部位を使って連結した(大文字,太字,斜体 で示した), DNA 断片を一対一の割合で連結し,その後,ヒト-マウス標準 DNA と して使った。2,305 塩基対の DNA は,十個の cDNA 断片を含む(異なる色で示し た), PCR のターゲット領域(太字,下線で示した)とヒトとマウス遺伝子の隣接し た 9-143 塩基領域をカバーしており,適切な制限酵素部位を含む(太字斜体)。



図 3.4. ヒトの五つの遺伝子発現レベルを比較するための研究方針

(A) Chit1 と AMCase 遺伝子の発現レベルを比較した。キチナーゼレベルを評価 するため、二つのハウスキーピング遺伝子(GAPDH と β-アクチン)と胃組織での 対照遺伝子としてペプシノーゲン C を用いた。これら三つの対照遺伝子を用いて、 ヒト組織での Chit1 と AMCase の遺伝子発現レベルを評価した。(B) qPCR で使う 標準 DNA の模式図。AMCase、ペプシノーゲン C, Chit1, GAPDH、β-アクチンの ターゲット断片は、それに隣接する配列、制限酵素部位を含み、一対一の割合で DNA 断片を連結した。そして、ヒト遺伝子の解析の標準 DNA として使った。



図 3.5. ヒトの qPCR システムに適したプライマーの評価

ヒトの解析のための PCR プライマーは, PCR 産物の Tm が一つであるか (A-E), 10% ポリアクリルアミドゲルで一つの PCR 産物を与えるか (F) をもとに選別 した。プライマーの特異性を検証するため, ヒト組織 cDNA の混合液を鋳型として 五種類の遺伝子の PCR 産物の熱融解曲線を検討した。PCR 産物は, 10% ポリアク リルアミドゲル電気泳動後, エチジウムブロマイド染色で分析した。



図 3.6. ヒト組織の解析のための qPCR システムの発展と検証

解析した cDNA は次の通りである。A は Chit1, B は AMCase, C は GAPDH, D は β -アクチン, E はペプシノーゲン C。標準曲線は, 五つのヒトの cDNA 断片を 含む標準 DNA を使って作成した (赤色●)。さらに, ヒトの完全コード cDNA の 定量は, それぞれの遺伝子のプライマーを使って行った。ターゲット cDNA は, 既 知濃度の完全コード cDNA の希釈液から増幅し, 未知試料として解析した (青色 ◇)。ここで検証した標準曲線と完全コード cDNA の希釈が同じ量であることが確 認できた。



図 3.7. 正常ヒト組織における Chit1 と AMCase mRNA の発現

ヒト組織における Chitl (A) と AMCase (B) mRNA の定量。両キチナーゼ標準鋳型 DNA を使って qPCR で定量した。すべての値は, total RNA 10 ng あたりの分子数で表した。



図 3.8. 肺と胃組織における Chit1, AMCase, 対照遺伝子 mRNA の解析

正常なヒトの肺 (A) と胃 (B) 組織から調製した cDNA を用いて五つの遺伝子の 発現レベルを qPCR で定量した。図の縦軸は、上は実数値で、下は対数値で示して いる。図中の値は、ヒト Chit1 遺伝子の発現レベルを 1.0 としたときの相対発現レ ベルを示している。



図 3.9. ヒトとマウス組織の Chit1 と AMCase レベルを比較するための研究方針 (A) ヒトとマウス組織における Chit1 と AMCase 遺伝子の発現レベルを比較し た。(B) 定量に使ったヒト-マウス複合型標準 DNA の模式図。ヒトとマウスの標準 DNA は, EcoRI 部位を使って一対一の割合で連結した。その後, ヒト-マウス標準



図 3.10. ヒト遺伝子の解析のためのヒト-マウス複合型標準 DNA を使った qPCR システムの発展と検証

解析したヒト DNA は次の通りである。(A) Chit1, (B) AMCase, (C) GAPDH, (D) β -アクチン, (E) ペプシノーゲン C。標準曲線は,五種類のヒトの cDNA 断片を含 む複合型標準 DNA を使って作成した (赤●)。さらに,ヒトの完全コード cDNA の定量は,それぞれの遺伝子のプライマーを使って行った。ターゲット cDNA は, 既知濃度の完全コード cDNA の希釈液から増幅し (図 3.2),その後,未知試料と して解析した (青◇)。ここで検証した標準曲線と完全コード cDNA の希釈が同じ 量であることが確認できた。



図 3.11. マウス遺伝子の解析のためのヒト-マウス複合型標準 DNA を使った qPCR システムの発展と検証

図 3.10 に示したのと同様の実験をマウス遺伝子で行った。標準曲線は,五つのマ ウスの cDNA 断片を含む複合型標準 DNA を使って得た(紫▲)。さらに,マウス の完全コード cDNA の定量は,それぞれの遺伝子のプライマーを使って行った。タ ーゲット cDNA は,既知濃度の完全コード cDNA の希釈液から増幅し(図 3.2), その後,未知試料として解析した(緑の×)。ここで検証した標準曲線と完全コード cDNA の希釈が同じ量であることが確認できた。



図 3.12. 標準 DNA を使った qPCR システムの発展と検証

図 3.10 と図 3.11 の結果を重ねた。低量と大量のヒトとマウスの転写産物の定量 は、qPCR システムの感度と信頼性の検証を可能にした。ヒト-マウス複合型標準 DNA を用いた qPCR システムは、広い定量のダイナミックレンジ、高い正確性、 高感度であることを示している。



図 3.13. ヒトとマウス組織での Chit1 と AMCase mRNA の発現

八種類のヒトとマウス組織における Chit1 (A) と AMCase (B) mRNA の発現レベルを複合型標準 DNA を使って qPCR で定量した。塗りつぶしてあるバーはヒト組織, 斜線のバーはマウス組織である。得られたすべての値は, y 軸に total RNA 10

ng あたりの分子数で表した。図の縦軸は、上は実数値で、下は対数値で示している。



図 3.14. ヒトとマウスの肺と胃組織での発現レベルの解析

正常なヒトとマウスの肺 (A) と胃 (B) 組織から調製した cDNA を使って検出し た五つの発現レベルは, qPCR で定量した。塗りつぶしてあるグラフはヒト組織, 斜線のグラフはマウス組織である。図の縦軸は,上は実数値で,下は対数値で示し ている。図中の値は,ヒト Chit1 遺伝子の発現レベルを 1.0 としたときの相対発現 レベルを示している。



図 3.15. マウスとヒトの胃組織におけるキチナーゼ活性とタンパク質発現レベル

(A) マウスとヒト胃組織の抽出液におけるキチン分解活性。(左) 合成キチン基質 である 4MU-chitobiose を使って AMCase の活性を検出した。pH 2.0 と pH 5.0 で キチン分解活性を y 軸に示した。(右) Chitl 活性は, 4MU-chitotriose を使って pH 5.2 で測定した。AMCase 活性も pH 2.0 で測定した。全てのグラフの値は, 三回測 定した平均値であり, 複数実験の代表である。(B) マウスとヒト AMCase のウエス タンブロッティングの結果。タンパク質は, SDS ポリアクリルアミドゲルで分離し た。ウエスタンブロッティングで, 抗ヒト AMCase 抗体または抗マウス AMCase 抗体を使って。胃の可溶性タンパク質 (12.5 μ g) は, SDS ポリアクリルアミドゲル で分離し, メンブレンに転写した。その後, AMCase 特異的抗体で標識した。

第 Ⅳ 章 キチナーゼ様タンパク質を識別するための定量 real-time

PCR システムの確立: 触媒的に不活性な breast regression protein-39

と Ym1 はマウスの肺で恒常遺伝子である

第1節 序論

CLPs はキチナーゼに構造が似ているが,キチナーゼ活性が欠損しているタンパク質で ある [7,8]。マウスでは,主に三種類 (BRP-39, Ym1, Ym2),ヒトは一種類 (YKL-40)の CLPs が同定されている。これらほ乳類の CLPs の発現と炎症性疾患と関連が 注目されている [8,29,65]。しかし,これらのタンパク質の疾患への寄与はわかってい ない。また,CLPs はキチン分解活性が欠損しているため,それらの生物学的特徴は 部分的にしか明らかにされていない [2]。

第 Ⅱ 章と第 Ⅲ 章でキチナーゼと参照遺伝子の発現レベルを定量するために, 一つの標準 DNA を使った qPCR システムを確立した [61,67]。この方法は,同じ スケールで,複数遺伝子の発現レベルを定量し,比較することを可能にした。そこ で,本章では,同じスケールで,BRP-39,Ym1,Ym2 それぞれの mRNA を定量す るための qPCR システムを確立した。さらに,それらの発現レベルを,細胞機能を 維持するためにすべての組織で恒常的に発現しているハウスキーピング遺伝子の mRNA レベルと比較した。

第2節 実験材料と実験方法

RNA と cDNA 調製

この章での qPCR 分析は, Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments (MIQE) ガイドに従って設計した [71,72]。

この研究では, Mouse Total RNA Master Panel (Clontech Laboratories 社) を使用した。さらに, 第 II 章で調製したマウスの肺と胃組織の mRNA を使った。

Real-time PCR のためのプライマーの選択

Real-time PCR のためのプライマーは、第 II 章で述べた通りに設計し、Sigma-Genosys に依頼し合成した (Sigma-Aldrich 社)。PCR 反応と反応産物の融解曲線は、 第 II 章に記載した通りに行った。この章で用いた qPCR のために選択したプライマー の塩基配列は、表 4.1 に示した。Chit1、AMCase、ペプシノーゲン C、GAPDH、β-アクチンのプライマーは、第 II 章で報告したものを使った [61]。

マウス Refs/CLPs 標準 DNA の作成

BRP-39, Ym1, Ym2 の PCR のターゲット領域に隣接する領域 11-137 塩基を付加したをカバーしている cDNA 断片は, PCR によって, マウス組織 cDNA の混合液から増幅した。使用したプライマーは, 表 4.2 に記載した。その後, 該当する制限酵素で切断し, T4 DNA リガーゼ を使って連結した。連結した断片は,

EcoRI_Ym1_Fw プライマーと Ym2_Rv プライマー(表 4.2)を使って PCR で増幅 し,得られた断片は CLPs 標準 DNA とした。

その後、マウス遺伝子の五種類の対照遺伝子 (Refs) と三つの CLPs を連結した Refs/CLPs 標準 DNA を次のように作成した。AMCase/ペプシノーゲン

C/Chit1/GAPDH/β-アクチンから成る, 3' 末端に EcoRI 制限部位を含むマウス Refs 標準 DNA は, PCR で第 II 章で作成したマウスキチナーゼの標準 DNA から増幅 した [61]。CLPs とマウス Refs 標準 DNA は, EcoRI で処理し, T4 DNA リガー ゼを使って連結した。連結した断片は, Quant_mouse_AMCase_Fw プライマーと Ym2_Rv プライマー(表 4.2)を使って増幅し, pGEM-T Easy ベクターにクローン 化した。得られたプラスミドの塩基配列の決定は, 第 II 章と同様に行った。マウ ス Refs/CLPs 標準 DNA (1,597 塩基; 図 4.1A, 4.2) は, 同じプライマーを使って, プラスミド DNA から PCR で再び増幅し, 調製した。

pGEM-T Easy ベクター配列を含む Refs/CLPs 標準 DNA (4,629 塩基; 図 4.3B, 4.4) は, BgIII_BRP-39_Fw プライマーと BgIII_Ym1_Rv プライマー(表 4.2)を使って, プラスミ ド DNA から PCR で調製した。

完全コード領域を含む BRP-39, Ym1, Ym2 cDNA の調製

BRP-39, Ym1, Ym2 の完全コード cDNA は,表 4.3 に記載したプライマーで, BRP-39 と Ym1 はマウスの肺, Ym2 は胃組織 cDNA から増幅し, pcDNA3.1/V5-His C ベクター (Invitrogen 社) にクローン化した。cDNA の塩基配列は,第 II 章 と同様に決めた (図 4.5)。サブクローニングした断片は,同じプライマーを使って (図 4.5) プラスミド DNA から再び増加し,完全コード領域 cDNA として使っ た。

標準曲線の作成と mRNA の定量

第 Ⅲ 章と同様に,標準 DNA は 100 から 10⁷ 分子の範囲で 10 倍ずつ段階希釈 を行い,使用するまで -20 ℃ で冷凍保存した。

PCR 反応は、95 ℃ で 10 分で DNA の変性とポリメラーゼ活性化を行った後、 95 ℃ 30 秒で変性、55 ℃ 30 秒でアニーリング、72 ℃ 10 秒で伸長する反応を 40 サイクル行った。mRNA の定量は、第 II 章で記載した通りに行った。それぞれの サンプルは三度増幅し、それぞれの実験は少なくとも二回繰り返した。

統計解析

データは、平均値±標準偏差 (SD) で示した。Student's t 検定を用いて mRNA レベルの統計解析を行った。統計学的有意性は、p < 0.05 と設定した。

第3節 実験結果

CLPs 定量のための qPCR システムの確立

正常マウス組織における CLPs 遺伝子の発現レベルを定量し、CLPs とほ乳類キ チナーゼ、対照遺伝子の mRNA を比較するため(図 4.6)、qPCR システムを確立 した。まず、BRP-39、Ym1、Ym2 mRNA レベルを解析するためにプライマーを設 計した(表 4.1)。Ym1 は、Ym2 と核酸配列同一性 94% を示す(図 4.7)[21]。ミ スプライミングを防ぐために、3' 末端領域がユニークなリバースプライマーを設計 した(図 4.7、表 4.1)。しかし、Ym1 と Ym2 は非常に高い配列相同性を有するた め、Ym1 と Ym2 で高い相同性のあるフォワードプライマーしか選べなかった(図 4.7、表 4.1)マウス組織 cDNA 混合液から設計したプライマーを使って増幅した産 物が一つの熱融解温度(Tm)を示すか、10% ポリアクリルアミドゲル電気泳動で一 つのバンドかどうか、で評価した。図 4.8A-C に示すように、Ym1(Tm = 76.3°C)、 Ym2(Tm = 77.3°C) そして BRP-39(Tm = 80.8°C)で一つのピークが見られた。図 4.8D は、Ym1(65 bp)、Ym2(65 bp)、BRP-39(57 bp)PCR 断片の予想サイズで明確 な一つのバンドが認められた。これらの結果から、目的の PCR 産物がマウス組織 cDNA 混合液からここで選択したプライマーによって増幅したことが分かった。

マウス Refs/CLPs 標準 DNA の作成

標準 DNA は正確な三つの CLPs の定量に必要な qPCR システムを設計した。二 つのキチナーゼと対照遺伝子として二つのハウスキーピング遺伝子 (GAPDH と β -アクチン) とペプシノーゲン C を使用した。CLPs mRNA のレベルを評価するため に、GAPDH と β -アクチンが恒常的にほとんどの組織で高いレベルで発現するため に使用した [55,68-70]。さらに、ペプシノーゲン C を胃における対照遺伝子として 選択した。これらの対照遺伝子を使用して、三種類の CLPs とキチナーゼの遺伝子 mRNA レベルをマウスの組織で評価した。CLPs 標準 DNA を五種類の対照遺伝子 cDNA と一対一の割合で結合し、この DNA 断片を pGEM-T Easy ベクターにクロー ン化した。1,597 塩基長の DNA は五つの対照遺伝子 (Refs) と三つの CLPs cDNA 断片を含む。PCR のターゲット領域の隣接領域の 9-146 塩基、そして制限酵素部位 を含む (図 4.1, 4.2)。この章において、標準 DNA を Refs/CLPs 標準 DNA と呼 ぶ。

pGEM-T Easy 付マウス Refs/CLPs 標準 DNA の評価

次に、八遺伝子のプライマーを使ってターゲットの cDNA がマウス Refs/CLPs

標準 DNA から増幅されるかを検討した。Ym1 プライマーは、一つの融解温度と 10% ポリアクリルアミドゲル電気泳動で一つのバンドで示すことから、一つの産物 が得られた(図 4.1B, 4.1D)。しかし, Ym2 プライマーによる増幅産物は, 熱融解 曲線のピークが三つ認められ、さらに、複数のバンドが得られた(図 4.1C、 4.1D)。従って, Ym2 プライマーで, マウス Refs/CLPs 標準 DNA から複数の産物 が増幅された。この問題を克服するため, NCBI Blast Search (2 blast search; http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=MegaBlast&PROGRAM=blastn&BLAST PR OGRAMS=megaBlast&PAGE TYPE=BlastSearch&BLAST SPEC=blast2seq&DATABASE =n/a&OUERY=&SUBJECTS=)を使って標準 DNA の塩基配列と Ym2 フォワードプ ライマーを比較した。その結果, Ym2 フォワードプライマーは, Ym1 にアニーリ ングできることが分かった(図 4.7)。また、AMCase cDNA にクロス反応しうるこ とが分かった。一方, Ym1 と Ym2 は, BRP-39 と Chit1 との配列類似性はなかっ た。従って、Ym2 cDNA の増幅に加えて、二つの cDNA (Ym1/BRP-39/Ym2 と AMCase/Pep C/Chit1/GAPDH/β-アクチン/Ym1/BRP-39/Ym2) が Ym2 プライマーを使 って標準 DNA から増幅されたと考えられる。この問題は、アニーリング温度の変 更では解決できなかった。

多くの qPCR 解析での研究では、プライマーを、イントロンをまたがるかイント ロン/エクソンの境界で設計している [73]。本研究で、マウス Refs/CLPs 標準 DNA を pGEM-T Easy ベクターにクローン化した (図 4.3A)。AMCase/Ym1 と Ym2 断 片との間の距離を広げるため、pGEM-T Easy ベクター配列を含む直鎖化した標準 DNA を調製した。これは、BgIII BRP-39 Fw プライマーと BgIII Ym1 Rv プライ マーを使った PCR で, BRP-39/Ym2/pGEM-T Easy/AMCase/Pep C/Chit1/GAPDH/β-ア クチン/Yml を含む (図 4.3, 表 4.2)。この標準 DNA は, pGEM-T Easy 付マウス Refs/CLPs 標準 DNA と呼ぶ (図 4.3B)。次に、Ym2 プライマーがこの標準 DNA から一つの Ym2 cDNA を増幅するか検討した。ミスプライミング増幅を避けるた め, qPCR プログラムのアニーリング時間と伸長時間を短くした(55℃ で 30 秒, 72°C で 10 秒)。PCR を行った後, Ym1 産物と同様に (図 4.3C, 4.3E), Ym2 の 産物も一つの融解温度(図 4.3D)と 10% ポリアクリルアミドゲル電気泳動で予想 サイズの一つのバンド(図 4.3E)を与えた。つまり, Ym2 プライマーは, pGEM-T Easy 付マウス Refs/CLPs 標準 DNA から一種類の産物を与えた(図 4.3B, 4.4)。 従って, pGEM-T Easy 配列(約 ~3 kbp)は, PCR 反応においてイントロンのよう な役割を果たした。以降, pGEM-T Easy 付マウス Refs/CLPs 標準 DNA を標準 DNA として使用した。

標準曲線と qPCR システムの検証

この定量システムで三つの CLPs と五種類の対照遺伝子 mRNA を正確に定量で きるか,検証した。pGEM-T Easy 付マウス Refs/CLPs 標準 DNA (図 4.3B, 4.4) の段階希釈液は,標準曲線を作成するために使用した。それぞれの標準曲線は,八 種類の異なるプライマーを使って,標準 DNA を 10 倍ずつ段階希釈して作成した。

標準曲線が八種類の遺伝子に対して絶対的に等量になっていることを示すため に、全コード領域をカバーしている既知濃度の cDNA(図 4.5)を増幅し、未知試 料として解析した。標準曲線を作成するために用いた量と全コード領域をカバーし ている既知濃度の各 cDNA の量が同じであることが確認できた(図 4.9A-H)。

正常なマウス組織における CLPs の発現

四種類の胎生期と様々な成体組織から抽出した total RNA を, pGEM-T Easy 付マ ウス Refs/CLPs 標準 DNA を用いた qPCR システムで分析した (図 4.3B, 4.4)。結 果は, total RNA 10 ng あたりの分子数として表した (図 4.10)。BRP-39, Ym1, Ym2 mRNA は, マウス組織において広く発現していた (図 4.10 A-C)。CLPs mRNA の発現パターンにおいて, 明らかな組織特性が認められた。BRP-39 mRNA の最も 高い発現は肺で, 次いで 7 日目の胎児, 目, 胃, 17 日目の胎児だった (図 4.10A, 上と下の図)。同様に, Ym1 mRNA の最も高い発現はマウスの肺で, 次いで 7日目の胎児だった (図 4.10B, 上図)。一方, Ym2 mRNA の最も高い発現はマウス の胃で, 次に肺であった (図 4.10C, 上図)。その他の組織では, Ym1 と Ym2 mRNA は低いレベルであったが, バックグラウンドより高く, 容易に検出できるレ ベルだった (図 4.10B, 4.10C, 下図)。BRP-39, Ym1, Ym2 mRNA のレベルを比較 したところ, BRP-39 と Ym1 は肺で高いレベルで合成されていた (図 4.10)。

マウスの肺と胃組織における CLPs の mRNA レベルの比較

BRP-39 と Ym1 mRNA は肺で, Ym2 mRNA は胃で発現が最も高かった(図 4.10)。 そこで次に, CLPs と二つのキチナーゼ, ペプシノーゲン C の mRNA レベルをマ ウスの肺と胃組織 cDNA を用いて比較した。

図 4.11A は、マウスの肺組織における定量結果を示す。Chit1 は、肺組織で深く 研究されたほ乳類キチナーゼである。マウスの肺組織において、Chit1 のレベルを 1.0 としたときの cDNA の相対発現レベルは、 BRP-39 は 78、Ym1 は 50、Ym2 は 0.3、AMCase は 7.0、GAPDH は 81、 β -アクチンは 292 であった(図 4.11A)。 肺組織で、BRP-39 と Ym1 mRNA は、活性のあるキチナーゼである Chit1 と AMCase よりも高い発現レベルだった (p < 0.01)。さらに、マウスの肺組織における RBP-39 と Ym1 の mRNA レベルは、ハウスキーピング遺伝子である GAPDH の レベルに匹敵した。このことは、BRP-39 と Ym1 はマウスの肺で大量に転写されて いることを示す。図 4.11B は、マウスの胃組織における定量結果を示す。マウスの 胃組織において、Chit1 のレベルを 1.0 にしたとき、それぞれの相対発現レベル は、BRP-39 は 0.05、Ym1 は 0.03、Ym2 は 0.6、AMCase は 473、GAPDH は 34, β -アクチンは 65, ペプシノーゲン C は 1,443 であった (図 4.11B)。胃組織 は, BRP-39 と Ym1 mRNA が Chit1 より低いことが分かった (p < 0.01)。Ym2 mRNA は, 胃で高い発現だったが, Chit1 より低かった。

第4節 考察

第 IV 章では、CLPs の mRNA レベルの解析に第 II 章で確立した方法を応用した [61]。Ym1 と Ym2 の塩基配列がとても似ているので、Ym1 と Ym2 プライマーが互いにミスプライム反応する懸念があった。しかし、設計した Ym1 プライマーと Ym2 プライマー は区別でき、マウス組織 cDNA 混合液から目的の cDNA を 増幅できた (図 4.3)。Ym1 と Ym2 のリバースプライマーは、PCR 効率に強く影響を与える 3'末端領域にユニークな配列を含んでいる。一方、フォワードプライ マーは、Ym1 と Ym2 cDNA 間でよく似ている (図 4.7)。この結果は、これらの cDNA の塩基配列が類似していても、フォワードプライマーまたは、リバースプラ イマーのどちらか一方が、ターゲット cDNA を特異的に増幅するためにユニークな 配列を含めば区別して増幅することができることを示した。この概念は、Ym1 と Ym2 のように、互いに塩基配列がよく似ている他の分子の定量に応用することがで きる。

マウス Refs/CLPs 標準 DNA の検証において, マウス Refs/CLPs 標準 DNA を Ym2 プライマーを用いて増幅すると, 複数の産物が得られた。この結果は, Ym1/AMCase と Ym2 間のクロス反応であると考えられた (図 4.1C, 4.1E)。通常 は, qPCR のプライマーを設計するとき, 混入したゲノム DNA からの非標的産物 の増幅を避けるために, 増幅する目的の領域にイントロン配列を含む [73]。一般的 に, ほ乳類のイントロンは約 3 kbp 以上の長さであるため, 目的の cDNA と比較 して, ゲノム配列を PCR で増幅するのは困難である。マウス Refs/CLPs 標準 DNA は, pGEM-T Easy ベクター (約 ~3 kbp, 図 4.3A) にクローン化していたの で, PCR で Ym1 と Ym2 の間に pGEM-T Easy ベクター配列を含む直鎖化したマ ウス Refs/CLPs 標準 DNA を調製した (図 4.3A, 4.3B)。さらに, qPCR のプロト コールを変更した (アニーリング 55 °C で 30 秒, 伸長反応 72 °C で 10 秒)。 pGEM-T Easy 付マウス Refs/CLPs 標準 DNA の検証から, Ym1 と Ym2 をそれぞ れ区別して定量できる (図 4.9)。これにより, Ym2 プライマーのクロス反応の問題 を克服した。

確立した定量法を用いて定量した結果, BRP-39, Ym1, Ym2 の遺伝子発現パター ンの結果は,以前の報告と一致した [15,21,50]。BRP-39 と Ym1 mRNA は,同じ発 現パターンであり, Ym1 mRNA は,マウスの肺で高いレベルで発現した(図 4.10A, 4.10B)。一方, Ym2 mRNA は胃,次に,肺の順の発現レベルだった。Ym1 と Ym2 は高い配列相同性を示すが,その mRNA の発現パターンは異なってい た。マウスの肺における mRNA レベルの順序は,GAPDH≈BRP-39≈Ym1> AMCase > Chit1 > Ym2 であった。

マウス肺組織において, BRP-39 と Ym1 の mRNA レベルが活性のあるキチナー ゼである Chit1 と AMCase より高かいことがわかった。BRP-39 と Ym1 mRNA の レベルは, GAPDH のレベルに匹敵した。活性のあるキチナーゼの mRNA レベルと 比較して, BRP-39 と Ym1 mRNA レベルは,マウスの肺で高く発現している。さ らに, BRP-39 と Ym1 mRNA はマウスの肺で共発現しているように見える(図 4.10A, 4.10 B)。Qureshi らは, BRP-39, Ym1, Ym2 が炎症を促進した初期の腫瘍 モデルで過剰に発現していたと報告した [74]。彼らは,これらの CLPs が組織リモ デリングと免疫応答を増加する役割があることを示した [74]。BRP-39 と Ym1 は キチン分解活性を欠いているが、マウス肺でのこれらの高い mRNA の発現は、生 物学的防御として生理学的重要性を示唆している。

胃での Ym2 mRNA の発現は, Chitl と AMCase より低かったが, BRP-39 と Ym1 mRNA レベルと比較して高い発現だった(図 4.11)。Ym1 の機能はまだ知ら れていないが,表面プラズモン共鳴を用いた解析で, Ym1 がキトビオース,キトト リオース,キトテトラオースに結合できることが証明されている [21]。さらに,へ パリン/へパラン硫酸は, Ym1 のリガンドである可能性が示唆されている [21]。 Ym2 も Ym1 に密接に関連している機能未知のタンパク質である [17]。胃での AMCase とともに Ym2 mRNA の高い発現は,食物消化や胃の防御メカニズムに関 与している可能性を示唆している。

最近の研究で,病気のマウスやヒトの肺で BRP-39/YKL-40 mRNA またはタンパ ク質の発現レベルの増加は,発現の脱制御の結果であろうと報告されている [2,8]。 さらに, BRP-39 遺伝子を欠損し,YKL-40 遺伝子を導入したマウスを使って,これ らタンパク質が機能的に同じであり,組織リモデリング,細胞死経路の制御と気道 閉塞において同じ役割をしていることが示された [29]。さらに,BRP-39 は,イン ターロイキン(IL)-13 受容体 α2 を介した細胞死,炎症とリモデリングのコントロー ルによる細菌除去が促進される細菌感染症で誘導される [76,77]。本研究で確立した qPCR システムを使って,CLPs mRNA レベルをマウス組織でほ乳類キチナーゼと比 較することができた。この解析は、特に、マウスモデルを使った生体病理学的研究 において CLPs の生物学的機能の解明につなげることができるだろう。

第5節要約

マウスは、キチナーゼと高い相同性があるがキチン分解活性が欠損している CLPs を生産している。マウスは、主に BRP-39、Ym1、Ym2 の三種類の CLPs を発現し ている。最近、CLPs は、喘息、アレルギー、関節リウマチ、悪性腫瘍などの病気 で、発現が上昇するため、かなり注目されている。CLPs の正確な機能はほとんど知 られていないので、病気でのそれらの発現レベルの上昇の重要性を解明する必要が ある。BRP-39、Ym1、Ym2 の定量は、CLPs の生体内での制御の洞察を得るために 重要なステップである。第 II 章で確立した qPCR システムを発展させ,Ym1 と Ym2 を区別して定量できる方法を確立した。正常なマウス組織を,pGEM-T Easy 付マウス Refs/CLPs 標準 DNA を使った qPCR システムで分析した。BRP-39 と Ym1 mRNA は,マウスの肺で大量に発現していた。一方,Ym2 mRNA は胃で,次 に肺で高い発現をしていた。マウスの肺における BRP-39 と Ym1 mRNA の発現レ ベルは,二つの活性のあるキチナーゼよりも高く,GAPDH に匹敵するレベルであ った。このことから,キチナーゼ活性のない BRP-39 と Ym1 は,マウス肺におい て構成的な遺伝子であることを示す。

表 4.1. Real-time PCR プライマーの塩基配列

Ym1_Fw: TCTGGTGAAGGAAATGCGTAAA Ym1_Rv: GCAGCCTTGGAATGTCTTTCTC Ym2_Fw: TCTGGTGCAGGAAATGCGTAAA Ym2_Rv: GCAGCCTTGGAATGTGGTTCAAAG BRP-39_Fw: CCAGCCAGGCAGAGAGAAAC BRP-39 Rv: GCCACCTTTCCTGCTGACA

表 4.2. 標準 DNA を作成するために用いたプライマー

EcoRI_Ym1_Fw: CATGGAATTCATTCCTTCGTCAATATAACTTTGAT BglII_Ym1_Rv: TGACAGATCTCCTGAATATAGTCAAGAGACTGAGA BglII_BRP-39_Fw: CATGAGATCTACAAAGGAGGTCCAGCCAGGCAGAG XhoI_BRP-39_Rv: TGACCTCGAGTGGCCTGTGATTTGGCGCCAGACTC XhoI_Ym2_Fw: GTACCCTGGGT<u>CTCGAG</u>GAAGCCCTC Ym2_Rv: CATGGAGCTCTCTCCAGTGTAGCCATTCTTAGGAT Quant Mouse AMCase Fw: GTGGATTCTGTGCCGACAAAGCAGATGGCC



図 4.1. マウス Refs/CLPs 標準 DNA の作成と検証

(A) Real-time PCR 解析で用いたマウス Refs/CLPs 標準 DNA の模式図。EcoRI を 含む CLPs と対照遺伝子 (Refs) のそれぞれの標準 DNA を EcoRI で処理し,連結 した [61,68]。その後,得られた断片は pGEM-T Easy ベクターにクローン化した。 直鎖化した標準 DNA は,プラスミド DNA から増幅した。標準 DNA が一つの熱 融解温度を与えるかどうか調べるために、マウス Refs/CLPs 標準 DNA を Ym1 プ ライマー (B) と Ym2 プライマー (C) を使って増幅した。(D) Ym1 と Ym2 の PCR 産物は、10% ポリアクリルアミドゲル解析で調べた。(E) 複数の産物が、Ym2 プライマーでマウス Refs/CLPs 標準 DNA から増幅された。ピンクの矢印は、Ym2 プライマーを示す。線は、推定上の増幅した DNA 産物を示している。

Mw 986,684.8

${\tt GTGGATTCTGTGCCGACAAAGCAGATGGCCTCTACCCTGTGGCAGATGACAGAAATGCT} {\tt TTTTGGCAGTGCATCAATGG} {\tt A} {\tt A}$
$\label{eq:accade} {\tt ATCACATACCAGCAGCATTGTCAAGCAGGGGCTTGTTT\underline{TTGATACCAGCTGTAATTGCTGC} {\tt AACTGGCCA} {\tt AGATCT} {\tt TGGCA}$
ACCAGGCCTCTGGCTGGTGCTCCTCCTCTGGC T GCCAAGGCATTGTAGACACA GGCACCTCTCTGCTCGTCATGCCTGCC C GCCAGGCCTCTGGCCCGTCATGCCTGCC GCCAGGCCTTGTAGACACA GGCACCTCTCTGCTCGTCATGCCTGCC GCCAGGCCATTGTAGACACA GGCACCTCTCTCTGCTCGTCATGCCTGCC GCCAGGCCATTGTAGACACA GGCACCTCTCTGCTCGTCATGCCTGCC GCCAGGCCATTGTAGACACA GGCACCTCTCTCTGCTCGTCATGCCTGCC GCCAGGCCATTGTAGACACACA GGCACCTCTCTCTCTGCTCGTCATGCCTGCC GCCAGGCCATTGTAGACACACA GGCACCTCTCTCTGCTCGTCATGCCTGCC GCCAGGCCATTGTAGACACACA GGCACCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTGCTCATGCCTGCC
$\texttt{CAGTACCTG} \underline{\textbf{AATGAACTTCTGCAGACCATAGGAG} \texttt{CCCAGGAAGGAGGAGTATGGACAGTATTTTGT} \\ \textbf{CTCGAG} \underline{\textbf{TGGACTTGG}} \\ CCCAGGAAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG$
$\label{eq:atgact} ATGACTTCAAGGGTTCCTTCTGCAACCAGGGCCCGTACCCTCTCATCCGGACACTA\underline{CGGCAGGAACTAAATCTTCCAT}CCCTCTCATCCGGACACTACGGCACGAACTAAATCTTCCATCCGGACACTACGGCACGACTACACTACATCTTCCATCCGGACACTACGGCACGACTACACACTACACTACACTACACTACACACTAC$
$GAGACTCCAAGGAGCCCAGAACAGATA \\ \mathbf{\underline{ATACCTGAGCCACGCCCA}} \\ TCTTCTATGCCAGAGCAGGGACCCAGGCCCAGGGCC \\ TCTTCTATGCCAGAGCAGGGACCCAGGCCCAGGGCC \\ TCTTCTATGCCAGAGCAGGGACCCAGGCCCAGGGCC \\ TCTTCTATGCCAGAGCAGGGACCCAGGCCCAGGGCC \\ TCTTCTATGCCAGAGCAGGGACCCAGGCCCAGGGCC \\ TCTTCTATGCCAGAGCAGGGACCCAGGCCCAGGGCC \\ TCTTCTATGCCAGAGCAGGGACCCAGGCCCAGGCCCAGGCCCAGGGACCCAGGGCCCAGGGC \\ TCTTCTATGCCAGAGCAGGGACCCAGGCCCAGGGCCCAGGGACCCAGGGCCCAGGGCCCAGGGCCCAGGGCCCAGGGCCCAGGGCCCAGGCCCAGGCCCAGGGCCCAGGCCCAGGCCCAGGGACCCCAGGCCCAGGGACCCAGGGACCCAGGCCCCAGGCCCAGGCCCAGGCCCCAGGCCCCAGGCCCCAGGCCCCAGGCCCCAGGCCCCAGGCCCCAGGCCCCAGGCCCCAGGCCCCAGGCCCCAGGCCCCAGGCCCCCAGGCCCCAGGCCCCAGGCCCCAGGCCCCCC$
$\mathbf{A} \textbf{CTGCAG} \mathbf{G} \mathbf{A} \mathbf{G} \mathbf{G} \mathbf{G} \mathbf{G} \mathbf{G} \mathbf{G} \mathbf{G} G$
${\tt GCCGCCTGGAGAAACCTGCCAAGTATGATGACA} {\tt TCAAGAAGGTGGTGAAGCAGG} {\tt CATCTGAGGGCCCACTGAAGGGCATC} {\tt GCCGCCTGGAGAAACCTGCCAAGTATGATGACA} {\tt GCCGCCTGGAGAGCAGG} {\tt CATCTGAGGGCCCACTGAAGGGCATC} {\tt GCCGCCTGGAGAAACCTGCCAAGTATGATGACAAGGTGGTGAAGCAGG} {\tt CATCTGAGGGCCCACTGAAGGGCATC} {\tt GCCGCCTGGAGAAACCTGCCAAGTATGATGACAAGGTGGTGAAGCAGG} {\tt GCCGCCACTGAAGGGCCCACTGAAGGGCCACC} {\tt GCCGCCACTGAAGGGCCCACTGAAGGGCCACC} {\tt GCCGCCACTGAAGGGCCCACTGAAGGGCCCACTGAAGGGCCACC} {\tt GCCGCCACTGAAGGGCCACC} {\tt GCCGCCACTGAAGGGCCACC} {\tt GCCGCCCACTGAAGGGCCCACTGAAGGGCCCACTGAAGGGCCACC} {\tt GCCGCCACTGAAGGGCCCACTGAAGGGCCACC} {\tt GCCGCCACTGAAGGGCCACC} {\tt GCCGCCACTGAAGGGCCCACTGAAGGGCCACC} {\tt GCCGCCACTGAAGGGCCCACTGAAGGGCCACC} {\tt GCCGCCCACTGAAGGGCCCCACTGAAGGGCCCCACTGAAGGGCCCCACTGAAGGGCCCCACTGAAGGGCCCCACTGAAGGGCCCCACTGAAGGGCCCCACTGAAGGCCCCACTGAAGGCCCCCACTGAAGGCCCCACTGAAGGCCCCCACTGAAGGCCCCCACTGAAGGCCCCACTGAAGGCCCCCACTGAAGGCCCCCACTGAAGGCCCCCACTGAAGGCCCCCACTGAAGCCACGC} {\tt GCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC$
${\tt TTGGGCTACACT} {\tt GCGGCCGC} {\tt CGAGCAGGAGAGGAGAGGGCCACTGCCGCATCCTCTTCCTCCCTGGAGAAGAGCTATGAGCTGCC}$
${\tt TG} \underline{{\tt ACGGCCAGGTCATCACTATTG}} {\tt GCAACGAGCGGTTCCGATGCCCTGAGGC} \underline{{\tt TCTTTCCAGCCTTCCTTG}} {\tt GGTATGG}$
${\tt AATCCTGTGGCATCCATGAAACTACATTCAATTCCATCATGAAGTGTGACGTTGACATCCGTAAAGACCTCTATGCCAAC}$
$\mathbf{ACAGTGCTGTCTGGTGGTACCACCATGTACCCA} \textbf{GAATTC} \mathbf{ATTCCTTCGTCAATATAACTTTGATGGCCTCAACCTGGACT}$
$GGCAGTACCCTGGGTCTCGAGGAAGCCCTCCTAAGGACAAACATCTCTTCAGTGT\underline{\mathbf{TCTGGTGAAGGAAATGCGTAAA}GCT$
${\tt TTTGAGGAAGAATCTGTG} \underline{{\tt GAGAAAGACATTCCAAGGCTGC} {\tt TACTCACTTCCACAGGAGCAGGAATCATTGACGTAATCAA}$
${\tt GTCTGGGTACAAGATCCCTGAACTGTCTCAGTCTCTTGACTATATTCAGG{\tt AGATCT}{\tt ACAAAGGAGGT}{\tt CCAGCCAGGCAGA}{\tt CCAGCCAGCCAGGCAGA}{\tt CCAGCCAGGCAGA}{\tt CCAGCCAGCCAGGCAGA}{\tt CCAGCCAGCCAGCAGA}{\tt CCAGCCAGCCAGCAGA}{\tt CCAGCCAGCCAGCCAGCAGA}{\tt CCAGCCAGCCAGCAGA}{\tt CCAGCCAGCCAGCAGA}{\tt CCAGCCAGCCAGCCAGCCAGCAGA}{\tt CCAGCCAGCCAGA}{\tt CCAGCCAGCCAGCCAGA}{\tt CCAGCCAGCCAGA}{\tt CCAGCCAGCCAGCAGA}{\tt CCAGCCAGCCAGA}{\tt CCAGCCAGCCAGCAGA}{\tt CCAGCCAGCCAGCAGA}{\tt CCAGCCAGCCAGCAGA}{\tt CCAGCCAGCAGA}{\tt CCAGCCAGCAGCAGA}{\tt CCAGCCAGCAGA}{\tt CCAGCCAGCAGACAGCAGCCCCAGCAGCAGACGAGCAGCA$
$\underline{GAGAAAC} \texttt{TCCTGCTCAGCGCAGCTT} \underline{\texttt{TGTCAGCAGGAAAGGTGGC}} \texttt{CATTGACACTGGCTATGACATCGCCCAGATAGCCCA}$
$\label{eq:accord} a caccord gatter catcated a construction of the second seco$
$\texttt{CCTAAGGACAAACATCTCTTCAGTGT} \underline{\texttt{TCTGGTGCAGGAAATGCGTAAA}} \texttt{GCTTTTGAGGAAGAATCCA} \underline{\texttt{CTTTGAACCACAT}}$
$\underline{\mathbf{TCCAAGGCTGC}} TACTCACTTCCACAGGAGCTGGATTCATTGACGTAATCAAGTCTGGGTACAAGATCCCTGAACTGTCTCCACAGGAGCTGGATTCATTGACGTAATCAAGTCTGGGTACAAGATCCCTGAACTGTCTCCACAGGAGCTGGATTCATTGACGTAATCAAGTCTGGGTACAAGATCCCTGAACTGTCTCCACAGGAGCTGGATTCATTGACGTAATCAAGTCTGGGTACAAGATCCCTGAACTGTCTCCACAGGAGCTGGATTCATTGACGTAATCAAGTCTGGGTACAAGATCCCTGAACTGTCTCCACAGTATCAAGTCTGGGTACAAGATCCCTGAACTGTCTCCTGAACTGTCCTGAACTGTCTCCTGAACTGTCTCCTGAACTGTCTCCTGAACTGTCTCCTGAACTGTCTCCTGAACTGTCTCCTGAACTGTCTCCTGAACTGTCTCCTGAACTGTCTCCTGAACTGTCTCCTGAACTGTCTCCTGAACTGTCTCCTGAACTGTCTCCTGAACTGTCTCCTGAACTGTCTGT$
AGTCTCTCGACTATATTCAGGTCATGACATATGATCTCCATGATCCTAAGAATGGCTACACTGGAGAGAGCTCCATG

図 4.2. マウス Refs/CLPs 標準 DNA の塩基配列

マウス Refs/CLPs 標準 DNA (1,597 塩基対) は, 隣接する 9-146 塩基領域を加 えた PCR ターゲット領域 (太字下線) をカバーする八種類の cDNA 断片を含んで おり (異なる色で示した), BglII, XhoI, PstI, NotI, EcoRI (太字斜字体) の制限酵 素部位を含んでいる。



図 4.3. pGEM-T Easy 付マウス Refs/CLPs 標準 DNA の調製と検証

(A) pGEM-T Easy ベクターにクローン化したマウス Refs/CLPs 標準 DNA の略
図。(B) pGEM-T Easy 付マウス Refs/CLPs 標準 DNA は, BRP-39 フォワードプラ イマー(青矢印)と Ym1 リバースプライマー(赤矢印)を使ってプラスミド DNA から PCR で増幅した。この標準 DNA から Ym1(C)と Ym2(D) プライマーで
Ym1 と Ym2 cDNA を増幅し、これらの PCR 産物を 10% ポリアクリルアミドゲル 電気泳動で解析した (E)。横軸は熱融解温度、縦軸は蛍光強度の一次微分した値で表 した (C, D)。

Mw 2,860,159.6

CATGAGATCTACAAAGGAGGTCCAGCCAGGCAGAGAGAAACTCCTGCTCAGCGCAGCTTTGTCAGCAGGAGA AAGGTGGCCATTGACACTGGCTATGACATCGCCCAGATAGCCCAACACCTGGATTTTATCAATCTCATGA CCTACGATTTCCATGGAGTCTGGCGCCAAATCACAGGCCA**CTCGAG**GAAGCCCTCCTAAGGACAAACATC TCTTCAGTGT**TCTGGTGCAGGAAATGCGTAAA**GCTTTTGAGGAAGAATCCA**CTTTGAACCACATTCCAAG GCTGC**TACTCACTTCCACAGGAGCTGGATTCATTGACGTAATCAAGTCTGGGTACAAGATCCCTGAACTG TCTCAGTCTCCGACTATATTCAGGTCATGACATATGATCTCCATGATCCTAAGAATGGCTACACTGGAG AGAGCTCCATGAATCGAATTCCCGCGGCCGCCATGGCGGCCGGGAGCATGCGACGTCGGGCCCAATTCGC CCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGT TACCCAACTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACC GATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGC GGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCGCT TTCTTCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTCGCCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGGCTCCCTTTAG GGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGG GCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTG TTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTT CGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAACAAAATATTAACGCT TACAATTTCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTCACACCGCATCAGGTGGCACT TTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCA TGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCG TGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAA GTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGA ${\tt TCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGC$ GGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTG GTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTG CCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAAC ATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACGTTGCGCAAACTATTAACTG ACTTCTGCGCTCGGCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCT CGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGA GTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTA TAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGT CAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCA AACAAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAG GTAACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACT TCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGG CGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCGGGCTGA ACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTG AGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGG AACAGGAGAGCGCACGAGGGGGGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGC ACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCC TGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAG CGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGGAAGCGCAGCCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGC CGATTCATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAA TGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGA ATTGTGAGCGGATAACAATTTCACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTATTTAGGTGAC ACTATAGAATACTCAAGCTATGCATCCAACGCGTTGGGAGCTCTCCCATATGGTCGACCTGCAGGCGGCC **GCGAATTCACTAGTGATTTGTGGATTCTGTGCCGACAAAGCAGATGGCCTCTACCCTGTGGCAGATGACA** GAAATGCT**TTTTGGCAGTGCATCAATGG**AATCACATACCAGCAGCATTGTCAAGCAGGGCTTGTTT**TTGA**

図 4.4. pGEM-T Easy 付マウス Refs/CLPs 標準 DNA の塩基配列

pGEM-T Easy 配列を含むマウス Refs/CLPs 標準 DNA(4,627 塩基対)は, pGEM-T Easy ベクター(黒字)と PCR ターゲット領域(太字下線)と隣接する 9-146 塩基領域を加えた八種類の cDNA 断片を含んでおり(異なる色で示した), BglII, XhoI, PstI, NotI, EcoRI(太字斜字体)の制限酵素部位を含んでいる。

表 4.3. 完全コード cDNA を PCR で増幅させるためのプライマー

Entire_BRP-39_Fw: CATGGGATCCGTGGAGCCTAAGGAAGAGGGCCCTGA Entire_BRP-39_Rv: TGACCTCGAGCAGCCAGGGCATCCTTGATGGCGTT Entire_Ym1_Fw: CATGGAATTCAATCCTGAAGACACCATGGCCAAGC Entire_Ym1_RV: TCGAGCGGCCGCATAAGGGCCCTTGCAACTTGCAC Entire_Ym2_FW: CATGGAATTCAATCCTGAAGACACCATGGCCAAGC Entire_Ym2_RV: TCGAGCGGCCGCAAGCTCCCCTCGATAAGAGGCCT

BRP-39 MW 767,970.2

CATGGGATCCGTGGAGCCTAAGGAAGAGGCCCTGACTAGGAAGCTGGGTACTAGGAGAAGCCATCATGCACAC CTCTACTGAAGCCAGGATGGGCATGAGGGCGGCACTGACAGGCTTTGCGGTCCTGATGCTGCTCCAGAGCTGC TCTGCGTACAAGCTGGTCTGCTACTTCACCAGCTGGTCCCAGTACCGGGAAGGCGTTGGAAGCTTCTTACCAG ACGCCATCCAACCTTTCCTGTGCACCCACATCATCTACAGCTTTGCCAACATCAGCAGCGACAACATGCTTAG CACATGGGAGTGGAATGACGAGTCGAACTATGACAAGCTGAATAAACTGAAGACCAGAAACACCAACCTGAAG ACCCTCCTGTCTGTTGGAGGGTGGAAATTTGGCGAAAAAAGATTTTCCGAGATTGCCTCCAACACTGAGAGAC <u>GCACTGCTTTCGTCCGGTCGGTAGCCCCGTTCCTGCGTTCTTATGGCTTTGATGGGCTGGATCTCGCCTGGCT</u> CTACCCTCGCTTAAGAGACAAGCAGTATTTCTCCACCCTGATCAAGGAACTGAATGCGGAATTCACAAAGGAG <u>GTCCAGCCAGGCAGAGAGAGAAACTCCTGCTCAGCGCAGCTTTGTCAGCAGGAAAGGTGGCCATTGACACTGGCT</u> ATGACATCGCCCAGATAGCCCAACACCTGGATTTTATCAATCTCATGACCTACGATTTCCATGGAGTCTGGCG CCAAATCACAGGCCATCACAGCCCCCTCTTCCAAGGCCAGAAGGACACTAGGTTTGACAGATACAGCAATGTG AACTATGCCGTGCAGTACATGATACGTCTGGGAGCCCAGGCCAGCAAGCTACTGATGGGCATCCCCACCTTTG GGAAGAGCTTCACTCTGGCATCTTCTGAAAATCAGTTGGGAGCTCCAATCTCAGGGGAAGGATTACCAGGCCG <u>GTTCACCAAGGAGGCAGGGACCCTGGCCTACTACGAGATATGCGACTTCCTCAAAGGAGCTGAAGTACATCGA</u> AAAACAAGGTTGGGTTCCTGAAGGAGAAGAAGCTGGCAGGAGCCATGGTGTGGGCACTGGATTTGGATGATTT ${\tt CCAGGGCACCTGTCAGCCGAAGGAATTCTTCCCGCTCACCAACGCCATCAAGGATGCCCTGGCTGCTCGAGGT}$ CA

Ym1 MW 760,470.4

CATGGAATTCAATCCTGAAGACACCATGGCCAAGCTCATTCTTGTCACAGGTCTGGCAATTCTTCTGAACGTA CAGCTGGGATCTTCCTACCAGCTGATGTGCTACTATACCAGTTGGGCTAAGGACAGGCCAATAGAAGGGAGTT TCAAACCTGGTAATATTGACCCCTGCCTGTGTACTCACCTGATCTATGCCTTTGCTGGAATGCAGAATAATGA GATCACTTACACACATGAGCAAGACTTGCGTGACTATGAAGCATTGAATGGTCTGAAAGACAAGAACACTGAG CTAAAAACTCTCCTGGCCATTGGAGGATGGAAGTTTGGACCTGCCCCGTTCAGTGCCATGGTCTCTACTCCTC <u>AGAACCGTCAGATATTCATTCAGTCAGTTATCAGATTCCTTCGTCAATATAACTTTGATGGCCTCAACCTGGA</u> CTGGCAGTACCCTGGGTCTCGAGGAAGCCCTCCTAAGGACAAACATCTCTTCAGTGTTCTGGTGAAGGAAATG CGTAAAGCTTTTGAGGAAGAATCTGTGGAGAAAGACATTCCAAGGCTGCTACTCACTTCCACAGGAGCAGGAA TCATTGACGTAATCAAGTCTGGGTACAAGATCCCTGAACTGTCTCAGTCTCTTGACTATATTCAGGTCATGAC <u>ATATGATCTCCATGATCCTAAGGATGGCTACACTGGAGAAAATAGTCCCCTCTATAAATCTCCATATGACATT</u> <u>GGAAAGAGTGCTGATCTCAATGTGGATTCAATCATTTCCTACTGGAAGGACCATGGAGCAGCTTCTGAGAAGC</u> TCATTGTGGGATTTCCAGCATATGGGCATACCTTTATCCTGAGTGACCCTTCTAAGACTGGAATTGGTGCCCC TACAATTAGTACTGGCCCACCAGGAAAGTACACAGATGAATCAGGACTCCTGGCTTACTATGAGGTTTGTACA TTTCTGAATGAAGGAGCCACTGAGGTCTGGGATGCCCCCCAGGAAGTACCCTATGCCTATCAGGGTAATGAGT GGGTTGGTTATGACAATGTCAGGAGCTTCAAGTTGAAGGCTCAGTGGCTCAAGGACAACAATTTAGGAGGTGC <u>ACTTTAAAGGGAGATCTCAATATACACAGTGCAAGTTGCAAGGGCCCTTAT</u>GCGGCCGCTCGA

Ym2 MW 767,879.2

 $\texttt{CATGGAATTCAATCCTGAAGACACCC} \\ \textbf{ATGGCCAAGCTCATTCTTGTCACAGGTCTGGCAATTCTTCTGAATGTAAT$ <u>CAGCTGGGATCTTCCTACCAGCTGATGTGCTACTATACCAGCTGGGCTAAGGACAGGCCAACAGAAGGGAGTT</u> TCAAACCTGGTAATATTGACCCCTGCCTGTGTACTCACCTGATCTATGCCTTTGCTGGGATGAAGAATAATGA GATCACTTACTTAAGTGAGCAAGACTTGCGTGACTATGAAGCATTAAATGGTCTGAAAGACAGGAACACTGAG CTAAAAACTCTCCTGGCCATTGGAGGATGGAAGTTTGGACCTGCCCCGTTCAGTTCCATGGTCTCTACTCCTC AGAACCGTCAGACATTCATTAAGTCAGTTATCAGATTCCTTCGTCAATATAACTTTGATGGCCTCAACCTGGA <u>CTGGCAGTACCCTGGGTCTCGAGGAAGCCCTCCTAAGGACAAACATCTCTTCAGTGTTCTGGTGCAGGAAATG</u> <u>CGTAAAGCTTTTGAGGAAGAATCCACTTTGAACCACATTCCAAGGCTGCTACTCACTTCCACAGGAGCTGGAT</u> TCATTGACGTAATCAAGTCTGGGTACAAGATCCCTGAACTGTCTCAGTCTCTCGACTATATTCAGGTCATGAC ATATGATCTCCATGATCCTAAGAATGGCTACACTGGAGAAAATAGTCCCCTCTATAAATCTCCATATGACATT <u>GGAAAGAGTGCTGATCTCAATGTGGATTCAATTATTACCTACTGGAAGGACCATGGAGCAGCTTCTGAGAAGC</u> TCATTGTGGGATTTCCAGCATATGGTCATACCTTTATCCTGAGTGACCCTTCTAAGAATGGAATAGGTGACCC TACTGTTAGTGCTGGACCACCAGGAAAGTACACAAATGAACAAGGACTCCTGGCTTACTTTGAGATTTGTACA TTTCTGAATGAAGGAGCCACTGAGATCTTTGATGCCACCCAGGAAGTACCCTATGCCTATCTGGGTAATGAGT GGGTTGGTTATGACAATGTCAGGAGCTTCAAGTTGAAGGCTCAGTGGCTCAAGGACAACAATTTAGGAGGTGC <u>ACTTTAAAGAGAGATCTGAATGTACACAGTGCAAGTTGCAAGGCCTCTTATCGAGGGGAGCTT</u>GCGGCCGCTC GΑ

図 4.5. BRP-39, Ym1, Ym2 の完全コード cDNA の塩基配列と分子量

BRP-39 は 1,243 塩基対, Yml は 1,231 塩基対, Ym2 は 1,243 塩基対である。 開始コドンである ATG は、太字で強調した。翻訳領域は、下線で示す。



図 4.6. マウス CLPs とキチナーゼの遺伝子発現レベルを比較する研究方針

マウスの不活性の CLPs (BRP-39, Ym1, Ym2) mRNA の発現レベルを,定量し, 比較した。その後, CLPs と活性のあるキチナーゼ, Chit1 と AMCase, ハウスキー ピング遺伝子の mRNA レベルを比較した。

Iden Ym1	tities		88
Ym2	1	ATTCCTGAAGACACCATGGCCAAGCTCATTCTTGTCACAGGTCTGGCAATTCTTCTGAAT	60
Ym1	89	GTACAGCTGGGATCTTCCTACCAGCTGATGTGCTACTATACCAGTTGGGCTAAGGACAGG	148
Ym2	61	GTACAGCTGGGATCTTCCTACCAGCTGATGTGCTACTATACCAGCTGGGCTAAGGACAGG	120
Ym1	149	CCAATAGAAGGGAGTTTCAAACCTGGTAATATTGACCCCTGCCTG	208
Ym2	121	CCAACAGAAGGGAGTTTCAAACCTGGTAATATTGACCCCTGCCTG	180
Ym1 Ym2	209	TA TGCC TT TGCT GGAA TGCAGAA TAA TGAGA TCACT TACACACA TGAGCAAGAC TT GCGT	268
Ym1	269	GACTATGAAGCATTGAATGATGATGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAGCTAGAGCTAAAAAACTCTCCTGGCC	328
Ym2	241	GACTATGAAGCATTAAATGGTCTGAAAGACAGGAACACTGAGCTAAAAACTCTCCTGGCC	300
Ym1	329	ATTGGAGGATGGAAGTTTGGACCTGCCCGTTCAGTGCCATGGTCTCTACTCCTCAGAAC	388
Ym2	301	ATTGGAGGATGGAAGTTTGGACCTGCCCCGTTCAGTTCCATGGTCTCTACTCCTCAGAAC	360
Ym1	389	CGTCAGATATTCATTCAGTCAGTTATCAGATTCCTTCGTCAATATAACTTTGATGGCCTC	448
Ym2	361	CGTCAGACATTCATTAAGTCAGTTATCAGATTCCTTCGTCAATATAACTTTGATGGCCTC	420
Ym2	449	AACCTGGACTGGCAGTACCCTGGGTCTCGGAGGAAGCCCTCCTAAGGACAAACATCTCTTC	480
Ym1	509	AGTGT <u>TCTGGTGAAGGAAATGCGTAAA</u> GCTTTTGAGGAAGAATCTGTG <u>GAGAAAGACATT</u>	568
Ym2	481	AGTGT <u>TCTGGTGCAGGAAATGCGTAAA</u> GCTTTTGAGGAAGAATCCA <u>CTTTGAACCACATT</u>	540
Ym1	569	CCAAGGCTGCTACTCACTCCACAGGAGCAGGAATCATTGACGTAATCAAGTCTGGGTAC	628
Ym2	541		600
Ym1 Ym2	629 601	AAGATCCCTGAACTGTCTCAGTCTCTGACTATATTCAGGTCATGACATATGATCTCCCAT	688
Ym1	689	GATCCTAAGGATGGCTACACTGGAGAAAATAGTCCCCTCTATAAATCTCCCATATGACATT	748
Ym2	661	GATCCTAAGAATGGCTACACTGGAGAAAATAGTCCCCCTCTATAAATCTCCCATATGACATT	720
Ym1	749	GGAAAGAGTGCTGATCTCAATGTGGATTCAATCATTTCCTACTGGAAGGACCATGGAGCA	808
Ym2	721	déaaagagtecteatétégatétégattéaattattaétaétaétégaagea	780
Ym1 Vm2	809	GCTTCTGAGAAGCTCATTGTGGGGATTTCCAGCATATGGGCATACCTTTATCCTGAGTGAC	868
Ym1	869	CCTTCTAAGACTGGAATTGGTGCCCCTACAATTAGTACTGGCCCACCAGGAAAGTACAA	840 928
Ym2	841	CCTTCTAAGAATGGAATAGGTGACCCTACTGTTAGTGCTGGACCACCAGGAAAGTACACA	900
Ym1	929	GATGAATCAGGACTCCTGGCTTACTATGAGGTTTGTACATTTCTGAATGAA	988
Ym2	901	aatdaacaaddactcctddcttactttdadatttdtacatttctdaatdaa	960
Ym1	989	GAGGTCTGGGATGCCCCCCAGGAAGTACCCTATGCCTATCAGGGTAATGAGTGGGTTGGT	1048
rmz Ym1	901 1049	TATGACAATGTCAGGAGGCTCAAGTTGAAGGCTCAGTGGCTCAAGGACAACAATTTAGGA	1020
Ym2	1021	TATGACAATGTCAGGAGCTTCAAGTTGAAGGCTCAGTGGCTCAAGGACAACAATTTAGGA	1080
Ym1	1109	GGTGCCGTGGTCTGGCCCCTGGACATGGATGACTTCAGTGGTTCTTTCT	1168
Ym2	1081	GGTGCCGTGGTCTGGCCCCTGGACATGGATGACTTCAGTGGTTCTTTCT	1140
Ym1	1169	CATTTCCCTCTGACATCTACTTAAAGGGAGATCTCAATATACACAGTGCAAGTTGCAAG	1228
Ym2 Ym1	11229	CGITICCCTCTGACAACTACTTAAAGAAGAGATCTGAATGTACACAGTGCAAGTGCAAG	1200
Ym2	1201	GCCTCTTATCGAGGGGGGGCTTTAGACAATGATTTCTACTTGAAACTCTCAGAATAAGAGC	1260
Ym1	1289	AAGTTCAACGGTTTTTCCACAGTGCATTCTGCATCATGCTTCCATGGAGAATAATAGAAA	1348
Ym2	1261	AACTTCAACGGTTTTTCCACGATGGATTCTGCATCATGCTTCCATGGAGAATAATAGAAC	1320
Ym1	1349		1408
Ym2	1321	TAAGTCACGATCTTTCCTGAATTGAATCCCAGAGTAGAACTAAGATATATGŤĆŤŤĠŤĆŤĠ	1380
rmi Ym2	1409		140/
Ym1	1468	GAACATCTTTTGCTTCCTGTAAAACCACCACGATGCTTGTTTCTTGCTCTCACAATAAATTCC	1527
Ym2	1441	GAACAT-TITTGCTTCCTGTAAAACCACCTTCCTTGTTTCTTCCTTTCATAATAAATTCC	1499
Ym1	1528	ACATTCATAGC 1538	
Ym2	1500	ÀAGTTCÀAAÁGC 1510	

図 4.7. Ym1 と Ym2 の塩基配列の比較

Ym1 と Ym2 プライマーの塩基配列をピンク字に下線で示す。



図 4.8. qPCR の CLPs プライマー の適合性の評価

PCR プライマーは, Tm が一つであるか (A-C), 10% ポリアクリルアミドゲル電 気泳動で一つの PCR 産物を与えるか (D) をもとに選別した。縦軸は, 横軸に融解 温度, 縦軸に蛍光強度の一次微分した値で表した (A-C)。プライマーの特異性の検 証のため, マウス組織 cDNA 混合物を鋳型として三つの遺伝子の PCR 産物の熱融 解曲線を検討した。PCR 産物は, 10% ポリアクリルアミドゲル電気泳動後, エチジ ウムブロマイド染色で解析した (D)。



図 4.9. マウス組織解析のための qPCR システムの検証

(A) BRP-39, (B) Ym1, (C) Ym2, (D) Chit1, (E) AMCase, (F) GAPDH, (G) β-アク チン, (H) ペプシノーゲン C。標準曲線は、八種類のマウス cDNA 断片を含む pGEM-T Easy 付マウス Refs/CLPs 標準 DNA を使って得た(赤●)。さらに、マウ

ス完全コード cDNA の定量を各遺伝子のプライマーを使って行った。目的の cDNA は,既知濃度の完全コード cDNA の希釈液から,増幅し,続いて未知試料として分析した(青◇)。ここで検証した標準曲線と完全コード cDNA の希釈が同じ量であることが確認できた。データは,三回の測定の平均値±SD として示した。



図 4.10. マウス組織における BRP-39, Ym1, Ym2 mRNA 発現

マウス組織における BRP-39 (A), Ym1 (B), Ym2 (C) mRNA の定量結果。CLPs の mRNA レベルを八種類のマウス遺伝子を含む標準 DNA (pGEM-T Easy を有する マウス Refs/CLPs 標準 DNA) を使って qPCR で定量した。図の縦軸は、上は実数 値で、下は対数値で示している。データは、三回の測定の平均値±SD で示した。



図 4.11. 肺と胃組織における BRP-39, Ym1, Ym2, 対照遺伝子 mRNA の分析 三ヶ月齢のマウスの肺 (A) と胃 (B) 組織 (それぞれ n=5) から調製した cDNA を用いて, 八種類の遺伝子の mRNA レベルを qPCR で定量した。図の縦軸は, 上 は実数値で,下は対数値で示している。データは, 五つのサンプルの平均値±SD と して示した。*p<0.05; **p<0.01。

第 V 章 一つの標準 DNA を用いた正常なヒト組織における YKL-40

の定量 Real-time PCR 解析とほ乳類キチナーゼ mRNA との比較

第1節 序論

YKL-40 のアミノ酸配列は, BRP-39 と 73% 同一性があり [26,27], 最近の研究 で,これらのタンパク質は機能的に同じであると示されている [28]。キチナーゼ活 性を欠損しているにもかかわらず,YKL-40 は複数の炎症性の病気に関係がある [80]。また,最近の研究で,二つのほ乳類キチナーゼの発現レベルと炎症状態の関係 が報告されている [30-33,36,37]。そこで,ほ乳類キチナーゼ,ハウスキーピング 遺 伝子と YKL-40 の mRNA レベルの比較は,YKL-40 の生体内の制御の理解へ重要 なステップである。

第 II~IV 章で, CLPs, キチナーゼ, 対照遺伝子の mRNA レベルを定量するために, 一つの標準 DNA 分子を使った qPCR システムを確立した [61,67,81]。この方法は, 同じスケールで複数遺伝子の mRNA レベルの解析を可能にした。本章では, ヒト組織において, YKL-40 mRNA レベルの定量のために qPCR システムを応用した。さらに, そのレベルとキチナーゼと対照遺伝子の mRNA レベルを比較した。

第2節 実験材料と実験方法

RNA と cDNA 調製

Human Total RNA Master Panel II と Human Stomach Total RNA (Clontech Laboratories 社) を使用した。mRNA の調製は第 II 章と同様に行った。

Real-time PCR のためのプライマーの選択

Real-time PCR のためのプライマーは,第 II 章で述べた通りに設計し,商業的に 合成した。PCR 反応と反応産物の融解曲線は,第 II 章に記載した通りに行った。 Real-time PCR のために選択したプライマーの塩基配列は,表 5.1 に示した。 Chit1, AMCase, ペプシノーゲン C, GAPDH, β -アクチンプライマーは第 III 章に 記載したものを使用した [61,67,81]。

ヒト Refs/YKL-40 標準 DNA の作成

本章では、標準 DNA をヒト Refs/YKL-40 標準 DNA と呼ぶ。1,581 塩基対のヒ ト Refs/YKL-40 標準 DNA (図 5.1) は、次のように構築した。PCR ターゲット領 域に隣接した領域を加えた YKL-40 cDNA 断片を、PstI の制限酵素部位を含む Pst_YKL-40_Fw プライマーと Quant_YKL-40_Rv プライマー(表 5.2) を使って、 ヒト組織 cDNA 混合液から増幅した。AMCase/ペプシノーゲン C/Chit1/GAPDH/βアクチンから成るヒト Refs 標準 DNA [67] は, Quant_Human_AMCase_Fw プライ マーと Pstl_Human_アクチン_Rv プライマー(表 5.2)を使って PCR で増幅し た。両 PCR 産物を Pstl で処理し, T4 DNA リガーゼを使って連結し, pGEM-T Easy ベクターにクローン化した。挿入した cDNA を含むプラスミドを選択し, 配 列決定した。ヒト Refs/YKL-40 標準 DNA は,同じプライマーを使って PCR によ ってプラスミド DNA から再び増幅し,調製した(図 5.1)。

完全コード領域をカバーしている YKL-40 cDNA の調製

YKL-40 の完全コード領域をカバーする cDNA は, ヒト組織 cDNA 混合液から 表 5.3 に記載したプライマーを使って PCR で増幅した。増幅産物は, pGEM-T Easy ベクターにサブクローニングし, 配列確認した(図 5.2)。サブクローニングし た断片は, M13_Fw プライマーと M13_Rv プライマー(表 5.3)を使ってプラスミ ド DNA から再び増幅し, 全コード領域 YKL-40 として使用した。

qPCR を使った標準曲線の作成と mRNA の定量

PCR 反応と mRNA の定量は, 第 IV 章と同様に行った。それぞれのサンプルは 三度増幅し, それぞれの実験は少なくとも二回繰り返した。

第3節 実験結果

YKL-40 mRNA 定量のための qPCR システムの確立

第 II 章で、マウス組織で二つのほ乳類キチナーゼの mRNA レベルの定量とそ れらのレベルを対照遺伝子と比較することができる qPCR システムを確立した [61,67,81]。本章において、YKL-40 のレベルを定量し、活性のあるキチナーゼであ る Chitl と AMCase、ハウスキーピング遺伝子である GAPDH と β-アクチンと比 較することを目的とした(図 5.3A)。最初に、YKL-40 を定量するためにプライマ ーを設計し(表 5.1)、その適合性を一つの熱融解温度(Tm)を示すか、10% ポリア クリルアミドゲルで一つのバンドかどうか、で評価した(図 5.3B、5.3C)。YKL-40 断片は、YKL-40 プライマーでヒト組織 cDNA 混合液から増幅することを確認した (図 5.1)。

ヒト Refs/YKL-40 標準 DNA の作成と qPCR システムの検証

これまでと同様に、YKL-40 と五種類の対照遺伝子が、正確に定量できるか調べた(図 5.4A-F)。それぞれの標準曲線は、六種類の異なったプライマーを使って、 ヒト Refs/YKL-40 標準 DNA を 10 倍ずつ段階希釈して作成した(図 5.4A-F,赤 ●)。次に、標準曲線が絶対的に等量になっていることを示すために、全コード領域 をカバーしている既知濃度の cDNA(図 5.2)を増幅し、未知試料として解析し た。標準曲線を作成するために用いた量と全コード領域をカバーしている既知濃度 の各 cDNA の量が同じであることが確認できた(図 5.4A-F, 青◇) この結果から, ヒト Refs/YKL-40 標準 DNA を使って同じスケールで YKL-40 と対照遺伝子 を定量できる。

正常なヒト組織における YKL-40 mRNA の発現レベル

生体内での YKL-40 遺伝子発現制御を研究するため,21 種類の正常ヒト組織か ら抽出した total RNA を,ヒト Refs/YKL-40 標準 DNA を用いた qPCR 法で解析 した(図 5.3D, 5.1)。ヒト組織のサンプルは、1~64 人のコーカサス人から集められ た。胎児の脳 n=59, 脳全体 n=1,小脳 n=10,唾液腺 n=24,胎児の肝臓 n=63,肝 臓 n=1,肺 n=3,心臓 n=3,胃 n=1,大腸 n=1,腎臓 n=1,胎盤 n=15,骨格筋 n=2,脾臓 n=12,精巣 n=39,副腎 n=62,胸腺 n=2,甲状腺 n=64,気管 n=22,子 宮 n=8,前立腺 n=12。YKL-40 mRNA はヒト組織全体で広く発現しており(図 5.5),肝臓,次に,腎臓,気管,肺組織で高いレベルで検出したことを見出した(図 5.5,上図)。残りの組織において,YKL-40 mRNA は低い発現だったが,検出可能な レベルであった(図 5.5,下図)。

正常なヒト組織における YKL-40 mRNA レベルの比較

次に, 正常なヒト組織における YKL-40, Chit1, AMCase, GAPDH, β -アクチン の mRNA レベルを比較した(図 5.6, 5.7)。図 5.6 は, YKL-40 mRNA レベルが Chit1 レベル 10 倍以上である 10 種類のヒト組織を示す。Chit1 の発現レベルを 1.0 とした場合, YKL-40 の相対発現レベルは, 腎臓 453, 肝臓 345, 気管 59, 心 臓 58, 子宮 46, 唾液腺 38, 小脳 21, 胎盤 19, 胎児の脳 17, 脳 13 であった (図 5.6)。腎臓と肝臓で Chit1 と比較したとき, YKL-40 mRNA の発現は 100 倍 以上の高いレベルであるので, これらの組織で活性のあるキチナーゼより発現が優 勢であった(図 5.6A, 5.6B)。しかし, その YKL-40 のレベルは, ハウスキーピン グ遺伝子のレベルより著しく低かった(図 5.6A, 5.6B)。図 5.7 は, Chit1 のレベ ルの 10 倍未満か同等のレベルの 11 組織を示している。Chit1 の mRNA レベルを 1.0 としたとき, YKL-40 の相対発現レベルは, 胃 8.6, 前立腺 6.7, 骨格筋 3.7, 脾臓 2.7, 胎児の肝臓 2.5, 胸腺 2.2, 精巣 2.1, 大腸 1.8, 副腎 1.6, 甲状腺 1.4, 肺 1.1 である(図 5.7)。骨格筋, 精巣, 大腸, 副腎組織は, YKL-40 mRNA より AMCase が多く発現していた(図 5.7C, G, H, I)。肺において, YKL-40 の mRNA レベルは, Chit1 のレベルと同じであった(図 5.7K)。

第4節考察

第 Ⅱ 章と第 Ⅲ 章の研究で、マウスとヒト組織において、Chit1 と AMCase の mRNA レベルを定量し、比較した [61,67]。第 Ⅳ 章では、マウス組織で CLPs の レベルを解析するためにを確立した定量法を応用した [81]。Ym2 プライマーのクロ

ス反応による非特異的な断片の増幅を防ぐために、イントロンのような挿入として Ym1 と Ym2 cDNA の間に位置している pGEM-T Easy ベクター配列を含む直鎖化 した DNA 分子を調製し、qPCR のプロトコールを変更した(アニーリング 55°C で 30 秒、重合 72°C で 10 秒)[81]。pGEM-T Easy 付マウス Refs/CLPs 標準 DNA の検証をしたところ、Ym1 と Ym2 それぞれ区別して定量することができた [81]。そこで、ヒト組織での YKL-40 レベルの解析のための方法を応用した。Refs 標準 DNA に YKL-40 プライマーはクロス反応しないため、ベクター配列を除いた ヒト Refs/YKL-40 標準 DNA を使った。

YKL-40 mRNA レベルは、ヒトの肝臓、続いて腎臓で高かった(図 5.5)。肝臓と 腎臓の RNA サンプルは、それぞれ一個体から得たので、このデータは、より多く のサンプルで確認する必要がある。マウスの肺における BRP-39 mRNA レベルは、 二つの活性のあるキチナーゼより高く、GAPDH に匹敵した [81]。これに対して、 YKL-40 mRNA はヒトの肺で過剰発現していなかった(図 5.5)。従って、肺組織に おける BRP-39/YKL-40 の発現は種特異的である。

この研究において, ヒトの 21 組織において, YKL-40, ほ乳類キチナーゼ, 二つ のハウスキーピング遺伝子 mRNA の発現レベルの割合を明らかにした(図 5.6, 5.7)。YKL-40 mRNA の発現は, Chitl と比較たとき, 肺を除く 20 組織において高 かった(図 5.6, 5.7)。多くの研究は, 炎症性疾患において YKL-40 の発現が上昇 したことを示しており [39-49,65,79], これは組織のリモデリングに関連していると 考えられている [28,45]。従って, 組織防御における YKL-40 と他の CLPs の重要 性は, キチン分解活性と関係ないと考えられる。これらのデータは, YKL-40 とキ チナーゼの生体機能の理解や病態生理学的研究に役立つと考えられる。

BRP-39 欠損 YKL-40 トランスジェニックマウスを使って,これらのタンパク質 が機能的に同等であり,組織リモデリング,細胞死経路の制御,気道閉塞において 同じ役割をしていることが証明されている [29]。さらに,BRP-39 は,インターロ イキン(IL)-13 受容体 a2 を介した細胞死,炎症とリモデリングのコントロールによ る細菌除去が促進される細菌感染症で誘導される [76,77]。本章の研究で示した定量 システムは,上述したような異なる病的過程によって影響される組織の YKL-40 mRNA レベルを解析するために使うことができ,病態生理学的研究でキチナーゼと CLPs の生体機能の解明につながると考えられる。

第5節要約

YKL-40 は、CLPs の一つである。YKL-40 mRNA とそのタンパク質レベルが、喘息、嚢胞線維症、関節リウマチ、悪性腫瘍を含む複数の病気で上昇すると報告されている。この章で、ヒトの正常組織で YKL-40 mRNA レベルを定量し、キチナーゼとハウスキーピング遺伝子と比較した。様々な正常ヒト組織から cDNA を作成し、ヒト Refs/YKL-40 標準 DNA の qPCR システムを使って YKL-40 mRNA の発現レ

ベルを解析した。YKL-40 は、ヒト組織において広く存在していることを見出した。一方、その mRNA の発現パターンは明白な組織特異性を示す。高い YKL-40 mRNA レベルは、肝臓、次いで腎臓、気管支、肺で検出した。腎臓と肝臓における YKL-40 mRNA レベルは、Chit1 のレベルより 100 倍以上高かった。本研究では、初めて正常ヒト組織におけるほ乳類のキチナーゼに対する YKL-40 mRNA の相対発現レベルの総合的な分析結果を示した。

表 5.1. Real-time PCR プライマーの塩基配列

YKL-40_Fw: GGCTTCTTCTGAGACTGGTGTTG YKL-40 Rv: GAACCGGCCTGGAATTCC

Mw 976864.4

CATGGAATTCTGGTCTGGGCCATTGATCTGGATGACTTCACTGGCACTTTCTGCAACCAGGGCA AGTTTCCCCTAATCTCCACCCTGAAGAAGGGCCCTCGGCCTGCAGAGTGCAAGTTGCACGGCTCC AGCT CAGCCCATTGAGCCAATAACTGCTGCTCCCAGTGGCAGCGGGAACGGGAGCGGGAGTAGC AGCTCTGGAGGCAGCTCGGGAGGCAGTGGATTCTGTGCTGGCAGAGCCAACGGCCTCTACCCCG TGGCAAATAACAGAAATGCAGATCTGCAGGCCCACAGGGGCCCAGGAGGATGAGTATGGACAGTT TCTCGTGAACTGTAACAGCATTCAGAATCTGCCCAGCTTGACCTTCATCATCAATGGTGTGGAG TTCCCTCTGCCACCTTCCTCCTATATCCTCAGTAACAACGGCTACTGCACCGTGGGAGTCGAGC ${\tt CCACCTACCTGTCCTCCCAGAACGGCCAGCCCCTGTGGATCCTCGGGGATGTCTTCCTCAGGTC}$ CTACTATTCCGTCTACGACTTGGGGTCGACTCTCTACCAGGAGTTCAATGGCCTGAAGAAGATG AATCCCAAGCTGAAGACCCTGTTAGCCATCGGAGGCTGGAATTTCAGCACTCAGAAGTTCACAG ATATGGTAGCCACGGCCAACAACCGTCAGACCTTT<u>GTCAACTCGGCCATCAGGTT</u>TCTGCGCAA $\texttt{ATACAGC} \underline{\textbf{TTTGACGGCCTTGACCTTG}} \texttt{ACTGGGAGTACCCAGGAAGCCAGGGGAGCCCTGCCGTA}$ GACAAGGAGCGCTTCACAACCCTGGTACAGGACTTGGCCAATGCCTTCCAGCAG**CTCGAG**GCCA TCAATGACCCCTTCATTGACCTCAACTACATGGTTTACATGTTCCAATATGATTCCACCCATGG ATCTTCCAGGAGCGAGATCCCTCCAAAAATCAAGTGGGGGCGAGCTGAGTACGTCGTGG GGTCATCATCTCTGCCCCCTCTGCTGATGCCCCCCA**GCGCCCCCATGCAGAAGGAGATCACTGCC** CTGGCACCCAGCAATGAAGATCAAGATCATTGCTCCTCCTGAGCGCAAGTACTCCGTGTGGA TCGGCGGCTCCATCCTGGCCTCGCTGTCCACCTTCCAGCAGATG**TGGATCAGCAAGCAGGAGTA** TGACGAGTCCGGCCCCTCCATCGTCCACCGCAAATGCTTCTAGGCGGACTATGACTTAGTTGCG TTACACCCTTTCTTGACAAAACCTAACTTGCGCAGAAAACAAGATGAGATTGCTGCAGTACATG TTGAGGCTGGGGGCTCCTGCCAGTAAGCTGGTGATGGGCATCCCCACCTTCGGGAGGAGCTTCA CTCTGGCTTCTTCTGAGACTGGTGTTGGAGCCCCAATCTCAGGACCGGGAATTCCAGGCCGGTT $\underline{\mathbf{C}} \texttt{ACCAAGGAGGCAGGGACCCTTGCCTACTATGAGAGAATTCCATG}$

図 5.1. ヒト Refs/YKL-40 標準 DNA の塩基配列

ヒト Refs/YKL-40 標準 DNA (1,581 塩基対) は, 隣接する 44-143 塩基領域を加 えた PCR ターゲット領域 (太字下線で示した) をカバーする六種類の cDNA 断片 を含んでおり (異なる色で示した), BglII, Sall, XhoI, NotI, PstI (太字斜字体) の 制限酵素部位を含んでいる。

表 5.2. 標準 DNA 作成のために使ったプライマー

PstI_YKL-40_Fw: **TGAC**<u>CTGCAG</u>TACATGTTGAGGCTGGGGGGCTCCTG Quant_YKL-40_Rv: CATGGAATTCTCTCATAGTAGGCAAGGGTCCCTGC Quant_Human_AMCase_Fw: CATGGAATTCTGGTCTGGGCCATTGATCTGGATGA PstI_Human_アクチン_Rv: **TGAC**<u>CTGCAG</u>CAATCTCATCTTGTTTTCTGCGCAA
表 5.3. PCR で完全コード cDNA を増幅させるためのプライマー

Entire YKL-40_Fw: CATGGGATCCCCTGTCTAGGTAGCTGGCACCAGGA Entire YKL-40_Rv: TGACCTCGAGCCGTTGCAGCGAGTGCATCCTTGAT M13_Fw: GTTTTCCCAGTCACGAC

M13_Rv: CAGGAAACAGCTATGAC

MW 926,190.6

GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGG CCCGACGTCGCATGCTCCCGGCCGCCATGGCGGCCGCGGGAATTCGATTCATGGGATCCCCTGTCTAGGTAG CTGGCACCAGGAGCCGTGGGCAAGGGAAGAGGCCACACCCTGCCCTGCTGCTGCAGCCAGTGGTGCTGCT CCAGTGCTGCATGGGTGTGAAGGCGTCTCAAACAGGCTTTGTGGTCCTCTGCATACAAACTGGTCTGCTACT <u>ACACCAGCTGGTCCCAGTACCGGGAAGGCGATGGGAGCTGCTTCCCAGATGCCCCTTGACCGCTTCCTCTGTA</u> $\underline{CCCACATCATCTACAGCTTTGCCAATATAAGCAACGATCACATCGACACCTGGGAGTGGAATGATGTGACGC}$ $\underline{TCTACGGCATGCTCAACACCTCAAGAACAGGAACCCCCAACCTGAAGACTCTCTTGTCTGGCGGAGGATGGA$ <u>ACTTTGGGTCTCAAAGATTTTCCAAGATAGCCTCCAACACCCCAGAGTCGCCGGACTTTCATCAAGTCAGTAC</u> CGCCATTTCTGCGCACCCATGGCTTTGATGGGCTGGACCTTGCCTGGCTCTACCCTGGACGGAGAGACAAAC <u>TCCTGCTCAGCGCAGCACTGTCTGCGGGGAAGGTCACCATTGACAGCAGCTATGACATTGCCAAGATATCCC</u> <u>AACACCTGGATTTCATTAGCATCATGACCTACGATTTTCATGGAGCCTGGCGTGGGACCACAGGCCATCACA</u> GTCCCCTGTTCCGAGGTCAGGAGGATGCAAGTCCTGACAGATTCAGCAACACTGACTATGCTGTGGGGTACA TGTTGAGGCTGGGGGGCTCCTGCCAGTAAGCTGGTGATGGGCATCCCCACCTTCGGGAGGAGCTTCACTCTGG CTTCTTCTGAGACTGGTGTTGGAGCCCCAATCTCAGGACCGGGAATTCCAGGCCGGTTCACCAAGGAGGCAG GGACCCTTGCCTACTATGAGATCTGTGACTTCCTCCGCGGAGCCACAGTCCATAGAATCCTCGGCCAGCAGG TCCCCTATGCCACCAAGGGCAACCAGTGGGTAGGATACGACGACCAGGAAAGCGTCAAAAGCAAGGTGCAGT <u>ACCTGAAGGACAGGCAGCTGGCGGGCGCCATGGTATGGGCCCTGGACCTGGATGACTTCCAGGGCTCCTTCT</u> <u>GCGGCCAGGATCTGCGCTTCCCTCTCACCAATGCCATCAAGGATGCACTCGCTGCAACG</u>GCTCGAGGTCAAA TCACTAGTGAATTCGCGGCCGCCTGCAGGTCGACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATAGCTT GAGTATTCTATAGTGTCACCTAAATAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTG

図 5.2. YKL-40 の翻訳領域の塩基配列と分子量

塩基配列は, 1,499 塩基対である。開始コドンである ATG は太字で強調した。 YKL-40 の翻訳領域は, 下線で示す。



図 5.3. YKL-40, キチナーゼ, ハウスキーピング遺伝子の遺伝子発現レベルを比較す るための研究方針と Refs/YKL-40 標準 DNA の作成

(A) YKL-40 mRNA レベルを定量し,続いて YKL-40,活性のあるキチナーゼ (Chitl と AMCase),ハウスキーピング遺伝子 (GAPDH と β-アクチン)を比較し た。(B),(C): Real-time PCR のプライマーの適合性の評価。プライマーは,一つの熱 融解温度を示すかどうか (B), 10% ポリアクリルアミドゲルで一つの PCR 産物を 与えるか (C) をもとに評価した。横軸は熱融解温度,縦軸は蛍光強度の一次微分し た値で表した (B)。PCR 産物は,10% ポリアクリルアミドゲル電気泳動後,エチジ ウムブロマイド染色で分析した (C)。(D) Real-time PCR で使用するヒト Refs/YKL-40 標準の模式図。



図 5.4. ヒト組織解析のための qPCR システムの検証

(A) YKL-40, (B) Chit1, (C) AMCase, (D) GAPDH, (E) β -アクチン, (F) ペプシノ ーゲン C。標準曲線は,六つのヒト cDNA 断片を含むヒト Refs/YKL-40 標準 DNA を使って作成した (赤色●)。さらに,ヒト完全コード cDNA の定量を各遺伝 子のプライマーを使って行った。目的の cDNA は,既知濃度の完全コード cDNA の希釈液から増幅し (図 5.2 参照),続いて未知試料として分析した (青◇)。ここ で検証した標準曲線と完全コード cDNA の希釈が同じ量であることが確認できた。 データは,三回の独立した測定の平均値±SD で示している。



図 5.5. 正常なヒト組織における YKL-40 mRNA の発現

YKL-40 の mRNA レベルをヒト Refs/YKL-40 標準 DNA を使った qPCR で定量 した。図の縦軸は,上は実数値で,下は対数値で示している。ヒト組織のサンプルは, 1~64 人のコーカサス人から集めたサンプルである。胎児の脳 n=59, 脳全体 n=1, 小脳 n=10, 唾液腺 n=24, 胎児の肝臓 n=63, 肝臓 n=1, 肺 n=3, 心臓 n=3, 胃 n=1, 大腸 n=1, 腎臓 n=1, 胎盤 n=15, 骨格筋 n=2, 脾臓 n=12, 精巣 n=39, 副腎 n=62, 胸腺 n=2, 甲状腺 n=64, 気管 n=22, 子宮 n=8, 前立腺 n=12。



図 5.6. YKL-40 mRNA レベルが Chit1 のレベルの 10 倍以上高いヒト組織

qPCR を使った次の組織における五種類の遺伝子の発現解析。(A) 腎臓, (B) 肝臓, (C) 気管, (D) 心臓, (E) 子宮, (F) 唾液腺, (G) 小脳, (H) 胎盤, (I) 胎児の肝臓, (J) 脳全体。すべての値は, total RNA の 10 ng あたりの分子数として表している。それぞれ対数値で示している。Chit1 の mRNA レベルを 1.0 とした場合の相対発現レベルを図中に示した。ヒト組織は, 腎臓 n=1, 肝臓 n=1, 気管 n=22, 心臓 n=3, 子宮 n=8, 唾液腺 n=24, 小脳 n=10, 胎盤 n=15, 胎児の脳 n=59, 脳全体 n=1。



図 5.7. YKL-40 mRNA レベルが Chit1 の mRNA レベルと同等または 10 倍未満 のヒト組織

(A) 胃, (B) 前立腺, (C) 骨格筋, (D) 脾臓, (E) 胎児の肝臓, (F) 胸腺, (G) 精 巣, (H) 大腸, (I) 副腎, (J) 甲状腺, (K) 肺。すべての値は, total RNA の 10 ng あ たりの分子数として表しており, それぞれ対数値で示している。Chit1 の mRNA レ ベルを 1.0 とした場合の相対発現レベルの数字を図中に示す。ヒト組織は, 胃, n=1; 前立腺, n=12; 骨格筋, n=2; 脾臓, n=12; 胎児の肝臓, n=63; 胸腺, n=2; 精 巣, n=39; 大腸, n=1; 副腎, n=62; 甲状腺, n=64; 肺, n=3。

第 VI 章 総合考察

ほ乳類キチナーゼと CLPs の mRNA やタンパク質のレベルの増加は,多くの炎 症性の状態で知られている [8,29,65]。Chit1 のレベルは,ゴーシェ病,喫煙者,慢 性閉塞性肺疾患 (COPD) 患者,アルツハイマー病で上昇する [30-33]。AMCase の 発現と活性も,喘息モデルマウスや重合体キチン投与によるアレルギー性気道応答 で増加する [34,35]。BRP-39/YKL-40 のレベルは,喘息,慢性閉塞性肺疾患 (COPD),囊胞線維症,関節リウマチ,炎症性腸疾患,アルコール性肝硬変,様々な タイプの悪性腫瘍それぞれで上昇する [39-49]。Ym1 は,寄生虫感染症による炎症 で合成される [43]。Ym1 と Ym2 は,アレルギー肺炎症で発現する [50]。従っ て,キチナーゼと CLPs は,多くの病態生理学的状態で重要な役割をしていると考 えられている [2,8,66]。しかし,これら病気の病態生理学的にキチナーゼと CLPs の役割はほとんどわかっていない。mRNA の定量は,有用で生物医学的に重要な情 報を提供する。本研究において,同一の尺度でキチナーゼと CLPs mRNA レベルの 定量とこれらのレベルを対照遺伝子のレベルと比較することができる定量 real-time PCR (qPCR) システムを確立した。

これまでほ乳類キチナーゼと CLPs の発現制御は, ノザンブロッティング, semiquantitative PCR と real-time PCR を使って行われた [12,14,17,18,21,31,34,35,60,64]。 これらの方法は, 遺伝子発現パターンの解析には利点があるが, 同じスケールで異 なる遺伝子の転写産物のレベルを比較できない。本研究では, 同一の尺度で mRNA レベルの定量と比較することができる qPCR システムを確立した。まず, 目的の cDNA 断片を等量ずつ連結した標準 DNA を作成した。ハウスキーピング遺伝子と して GAPDH と β-アクチンで PCR 増幅の内部コントロールであり対照遺伝子とし て用いた。さらに, 胃のマーカー遺伝子としてペプシノーゲン C を用いた [56]。 確立した定量法は, 定量性において, 広いダイナミックレンジ, 高感度を与え, 医 用生体工学や臨床サンプルの評価にも適用可能である。

キチナーゼと CLPs mRNA の発現は、様々な病気の状態で誘導されている。本研 究で確立した定量システムを使って、ヒトとマウス組織のキチナーゼと CLPs mRNA レベルを比較することができた。この分析は、これらキチナーゼと CLPs の 生物学的機能、病態生理学的研究についての理解の助けになるだろう。また、ほ乳 類キチナーゼと CLPs の発現制御の研究をすすめることで、これら酵素の病理学的 役割への洞察を得られる可能性がある。

二つのほ乳類活性のあるキチナーゼ(Chit1 と AMCase)は、組織特異的と種特異 的な発現を示した。Chit1 mRNA の発現レベルはヒトとマウスの肺組織で、互いに ほとんど同程度で、相対的に高いレベルで発現していたことから、Chit1 mRNA の 発現レベルが保存されていることが分かった。マウスの胃において AMCase がハウ スキーピング遺伝子よりもかなり高いレベルで合成され、胃液の主要な成分である ペプシノーゲン C のレベルに匹敵することを見出した(図 2.8B, 3.14B)。しか し、ヒトの胃では AMCase の過剰な発現は見られなかった(図 3.14B)。このこと から、マウス AMCase の遺伝子発現には、ペプシノーゲン C と同じ転写因子が関 与していることが考えられる。しかし、キチナーゼと CLPs 遺伝子のプロモーター 領域の詳細な特徴づけ、*cis-と trans-*的に作用する転写因子は同定されていない。 今後、これらのタンパク質の選択的発現を理解するには、これらの特徴づけや同定 が必要だろう。

ヒトとマウスの AMCase は、アミノ酸配列同一性 81%、類似性 90% である。こ れまでの研究で、マウス AMCase とヒト AMCase の至適 pH が異なる [12,37]。両分 子は非常によく似た分子であるにも関わらず、遺伝子の発現パターンや酵素活性に おける至適 pH が異なっている。また、ヒト AMCase の遺伝子多型が、気管支喘息 に関係していると報告されている [36,37]。AMCase の生体内での機能を解明する ために、マウスとヒトの AMCase の酵素としての特徴を比較し、解析する必要があ ると考えられる。

CLPs の mRNA レベルの解析の結果, BRP-39 と Ym1 mRNA は, 同じ発現パタ ーンを示すことを見出した (図 4.10A, 4.10B)。Ym1 と Ym2 は高い配列相同性を 示すが, mRNA の発現パターンは異なっていた。マウス肺組織において, BRP-39 と Ym1 の mRNA レベルが活性のあるキチナーゼより高く GAPDH のレベルに匹 敵した (図 4.11)。これに対して, ヒトの肺では, BRP-39 のヒト相同体である YKL-40 は過剰に発現していなかった (図 5.7)。このことから, 肺組織における BRP-39/YKL-40 の発現は, 種特異的であることが示唆された。また, これまで, CLPs の発現が炎症性疾患において上昇することが報告されており [39-49,65,74,79], 組織リモデリングに関連していると考えられている [28,45,74]。本研究 結果で, 正常状態で高く発現しているということは, 組織構築に関連していると考 えられる。

第 VII 章 結論

マウスにおいて、二つのキチナーゼと二つのハウスキーピング遺伝子、ペプシノ ーゲン C を等量ずつ連結した標準 DNA を使って, 同じスケールで mRNA レベル を評価するための qPCR システムを確立した。この qPCR システムは、ヒト組織で の定量やヒトとマウス組織間のレベルの比較,配列がよく似た分子(Ym1 と Ym2)を区別して定量するために発展させることができた。AMCase は主にマウス の胃で多量に発現しており、胃液の主要な消化酵素であるペプシノーゲン CmRNA に匹敵するレベルであった。しかし、ヒトの胃での AMCase の過剰な発現は見られ なかった。AMCase のヒトとマウスの胃での mRNA レベルの違いは、キチン分解 活性とタンパク質発現レベルの違いに反映されていた。従って、胃での AMCase の 発現レベルは種特異的でり, AMCase はマウスの胃で主要な転写産物であることが 分かった。また、三つの CLPs mRNA の発現では、 BRP-39 と Ym1 はマウスの肺 で最も高く発現していた。その発現レベルは、活性のあるキチナーゼよりも高く、 ハウスキーピング遺伝子である GAPDH のレベルに匹敵した。従って, BRP-39 と Yml は、マウスの肺において恒常的な遺伝子である。一方、正常なヒトの肺におい て, BRP-39 の相同体である YKL-40 の発現は低かった。このことから, BRP-39/YKL-40 の発現レベルは、種特異的であると考えられる。本研究で示したデータ は、これらキチナーゼと CLPs の生物学的機能、病態生理学的研究についての理解 につながるだろう。

参考文献

- 1. Khoushab F, Yamabhai M (2010) Chitin research revisited. Mar Drugs 8: 1988-2012.
- Lee CG, Da Silva CA, Dela Cruz CS, Ahangari F, Ma B, et al. (2011) Role of chitin and chitinase/chitinase-like proteins in inflammation, tissue remodeling, and injury. *Annu Rev Physiol* 73: 479-501.
- Hamid R, Khan MA, Ahmad M, Ahmad MM, Abdin MZ, et al. (2013) Chitinases: An update. *J Pharm Bioallied Sci* 5: 21-29.
- 4. Bussink AP, van Eijk M, Renkema GH, Aerts JM, Boot RG (2006) The biology of the Gaucher cell: the cradle of human chitinases. *Int Rev Cytol* 252: 71-128.
- Henrissat B (1991) A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J* 280 (Pt 2): 309-316.,
- Cantarel BL, Coutinho PM, Rancurel C, Bernard T, Lombard V, et al. (2009) The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Res* 37: D233-238.
- Renkema GH, Boot RG, Muijsers AO, Donker-Koopman WE, Aerts JM (1995) Purification and characterization of human chitotriosidase, a novel member of the chitinase family of proteins. *J Biol Chem* 270: 2198-2202.
- Boot RG, Renkema GH, Strijland A, van Zonneveld AJ, Aerts JM (1995) Cloning of a cDNA encoding chitotriosidase, a human chitinase produced by macrophages. *J Biol Chem* 270: 26252-26256.
- Boot RG, Blommaart EF, Swart E, Ghauharali-van der Vlugt K, Bijl N, Moe C, Place A, Aerts JM (2001) Identification of a novel acidic mammalian chitinase distinct from chitotriosidase. *J. Biol. Chem* 276: 6770-6778.
- Boot RG, Bussink AP, Verhoek M, de Boer PA, Moorman AF, Aerts JM (2005) Marked differences in tissue-specific expression of chitinases in mouse and man. *J. Histochem. Cytochem* 53: 1283-1292.
- Bussink AP, Speijer D, Aerts JM, Boot RG (2007) Evolution of mammalian chitinase(like) members of family 18 glycosyl hydrolases. *Genetics* 177: 959-970.
- 12. Zheng T, Rabach M, Chen NY, Rabach L, Hu X, et al. (2005) Molecular cloning and functional characterization of mouse chitotriosidase. *Gene* **357**: 37-46.
- 13. Kawada M, Hachiya Y, Arihiro A, Mizoguchi E (2007) Role of mammalian chitinases in inflammatory conditions. *Keio J Med* **56(1)**: 21–27.
- Hakala BE, White C, Recklies AD (1993) Human cartilage gp-39, a major secretory product of articular chondrocytes and synovial cells, is a mammalian member of a chitinase protein family. *J Biol Chem* 268(34): 25803–25810.
- 15. Rehli M, Krause SW, Andreesen R (1997) Molecular characterization of the gene for

human cartilage gp-39 (CHI3L1), a member of the chitinase protein family and marker for late stages of macrophage differentiation. *Genomics* **43(2)**: 221–225.

- Webb DC, McKenzie AN, Foster PS (2001) Expression of the Ym2 lectin-binding protein is dependent on interleukin (IL)-4 and IL-13 signal transduction: identification of a novel allergy-associated protein. *J Biol Chem* 276(45): 41969–41976.
- Ward JM, Yoon M, Anver MR, Haines DC, Kudo G, Gonzalez FJ, Kimura S (2001) Hyalinosis and Ym1/Ym2 gene expression in the stomach and respiratory tract of 129S4/SvJae and wild-type and CYP1A2-null B6, 129 mice. *Am J Pathol* 158(1): 323– 332.
- Sun YJ, Chang NC, Hung SI, Chang AC, Chou CC, Hsiao CD (2001) The crystal structure of a novel mammalian lectin, Ym1, suggests a saccharide binding site. *J Biol Chem* 276(20): 17507–17514.
- Chang NC, Hung SI, Hwa KY, Kato I, Chen JE, Liu CH, Chang AC (2001) A macrophage protein, Ym1, transiently expressed during inflammation is a novel mammalian lectin. J *Biol Chem* 276(20): 17497–17506.
- 20. Jin HM, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Kirkpatrick RB, Rosenberg M (1998) Genetic characterization of the murine Ym1 gene and identification of a cluster of highly homologous genes. *Genomics* 54(2): 316–322.
- Shackelton LM, Mann DM, Millis AJ (1995) Identification of a 38-kDa heparin-binding glycoprotein (gp38k) in differentiating vascular smooth muscle cells as a member of a group of proteins associated with tissue remodeling. *J Biol Chem* 270(22): 13076–13083.
- Hu B, Trinh K, Figueira WF, Price PA (1996) Isolation and sequence of a novel human chondrocyte protein related to mammalian members of the chitinase protein family. *J Biol Chem* 271(32): 19415–19420.
- Arias EB, Verhage HG, Jaffe RC (1994) Complementary deoxyribonucleic acid cloning and molecular characterization of an estrogen-dependent human oviductal glycoprotein. *Biol Reprod* 51(4): 685–694.
- Sendai Y, Komiya H, Suzuki K, Onuma T, Kikuchi M, Hoshi H, Araki Y (1995) Molecular cloning and characterization of a mouse oviduct-specific glycoprotein. *Biol Reprod* 53(2): 285–294.
- 25. Kzhyshkowska J, Mamidi S, Gratchev A, Kremmer E, Schmuttermaier C, Krusell L, Haus G, Utikal J, Schledzewski K, Scholtze J, Goerdt S (2006) Novel stabilin-1 interacting chitinase-like protein (SI-CLP) is up-regulated in alternatively activated macrophages and secreted via lysosomal pathway. *Blood* 107(8): 3221–3228.
- Morrison BW, Leder P (1994) neu and ras initiate murine mammary tumors that share genetic markers generally absent in c-myc and int-2-initiated tumors. *Oncogene* 9(12): 3417–3426.

- 27. Johansen JS (2006) Studies on serum YKL-40 as a biomarker in diseases with inflammation, tissue remodelling, fibroses and cancer. *Dan Med Bull* **53(2)**: 172–209.
- 28. Lee CG, Hartl D, Lee GR, Koller B, Matsuura H, Da Silva CA, Sohn MH, Cohn L, Homer RJ, Kozhich AA, Humbles A, Kearley J, Coyle A, Chupp G, Reed J, Flavell RA, Elias JA (2009) Role of breast regression protein 39 (BRP-39)/chitinase 3-like-1 in Th2 and IL-13-induced tissue responses and apoptosis. *J Exp Med* 206(5): 1149–1166.
- Watanabe T, Kobori K, Miyashita K, Fujii T, Sakai H, Uchida M, Tanaka H (1993) Identification of glutamic acid 204 and aspartic acid 200 in chitinase A1 of Bacillus circulans WL-12 as essential residues for chitinase activity. *J Biol Chem* 268(25): 18567-18572.
- Hollak CE, van Weely S, van Oers MH, Aerts JM (1994) Marked elevation of plasma chitotriosidase activity. A novel hallmark of Gaucher disease. *J Clin Invest* 93: 1288-1292.
- 31. Seibold MA, Donnelly S, Solon M, Innes A, Woodruff PG, et al. (2008) Chitotriosidase is the primary active chitinase in the human lung and is modulated by genotype and smoking habit. *J Allergy Clin Immunol* 122: 944-950 e943.
- 32. Letuve S, Kozhich A, Humbles A, Brewah Y, Dombret MC, et al. (2010) Lung chitinolytic activity and chitotriosidase are elevated in chronic obstructive pulmonary disease and contribute to lung inflammation. *Am J Pathol* 176: 638-649.
- 33. Watabe-Rudolph M, Song Z, Lausser L, Schnack C, Begus-Nahrmann Y, et al. (2012) Chitinase enzyme activity in CSF is a powerful biomarker of Alzheimer disease. *Neurology* 78: 569-577.
- 34. Zhu Z, Zheng T, Homer RJ, Kim YK, Chen NY, et al. (2004) Acidic mammalian chitinase in asthmatic Th2 inflammation and IL-13 pathway activation. *Science* **304**: 1678-1682.
- 35. Reese TA, Liang HE, Tager AM, Luster AD, Van Rooijen N, et al. (2007) Chitin induces accumulation in tissue of innate immune cells associated with allergy. Nature 447: 92-96.
- 36. Bierbaum S, Nickel R, Koch A, Lau S, Deichmann KA, et al. (2005) Polymorphisms and haplotypes of acid mammalian chitinase are associated with bronchial asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 172: 1505-1509.
- 37. Seibold MA, Reese TA, Choudhry S, Salam MT, Beckman K, et al. (2009) Differential enzymatic activity of common haplotypic versions of the human acidic mammalian chitinase protein. *J Biol Chem* 284: 19650-19658.
- 38. Goldman DL, Vicencio AG (2012) The chitin connection. MBio 3: e00056-12.
- Letuve S, Kozhich A, Arouche N, Grandsaigne M, Reed J, Dombret MC, Kiener PA, Aubier M, Coyle AJ, Pretolani M (2008) YKL-40 is elevated in patients with chronic obstructive pulmonary disease and activates alveolar macrophages. *J Immunol* 181(7): 5167–5173.

- 40. Hector A, Kormann MS, Mack I, Latzin P, Casaulta C, Kieninger E, Zhou Z, Yildirim AO, Bohla A, Rieber N, Kappler M, Koller B, Eber E, Eickmeier O, Zielen S, Eickelberg O, Griese M, Mall MA, Hartl D (2011) The chitinase-like protein YKL-40 modulates cystic fibrosis lung disease. *PLoS One* 6(9): e24399.
- Johansen JS, Stoltenberg M, Hansen M, Florescu A, Horslev-Petersen K, Lorenzen I, Price PA (1999) Serum YKL-40 concentrations in patients with rheumatoid arthritis: relation to disease activity. *Rheumatology (Oxford)* 38(7): 618–626.
- 42. Bernardi D, Podswiadek M, Zaninotto M, Punzi L, Plebani M (2003) YKL-40 as a marker of joint involvement in inflammatory bowel disease. *Clin Chem* **49(10)**: 1685–1688.
- 43. Koutroubakis IE, Petinaki E, Dimoulios P, Vardas E, Roussomoustakaki M, Maniatis AN, Kouroumalis EA (2003) Increased serum levels of YKL-40 in patients with inflammatory bowel disease. *Int J Colorectal Dis* 18(3): 254–259.
- 44. Vind I, Johansen JS, Price PA, Munkholm P (2003) Serum YKL-40, a potential new marker of disease activity in patients with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 38(6): 599–605.
- 45. Chupp GL, Lee CG, Jarjour N, Shim YM, Holm CT, He S, Dziura JD, Reed J, Coyle AJ, Kiener P, Cullen M, Grandsaigne M, Dombret MC, Aubier M, Pretolani M, Elias JA (2007) A chitinase-like protein in the lung and circulation of patients with severe asthma. *N Engl J Med* 357(20): 2016–2027.
- 46. Vos K, Steenbakkers P, Miltenburg AM, Bos E, van Den Heuvel MW, van Hogezand RA, de Vries RR, Breedveld FC, Boots AM (2000) Raised human cartilage glycoprotein-39 plasma levels in patients with rheumatoid arthritis and other inflammatory conditions. *Ann Rheum Dis* 59(7): 544–548.
- 47. Johansen JS, Moller S, Price PA, Bendtsen F, Junge J, Garbarsch C, Henriksen JH: Plasma YKL-40: a new potential marker of fibrosis in patients with alcoholic cirrhosis? Scand J Gastroenterol 1997, 32(6):582–590.
- 48. Johansen JS, Cintin C, Jorgensen M, Kamby C, Price PA (1995) Serum YKL-40: a new potential marker of prognosis and location of metastases of patients with recurrent breast cancer. *Eur J Cancer* 31A(9): 1437–1442.
- 49. Cintin C, Johansen JS, Christensen IJ, Price PA, Sorensen S, Nielsen HJ (1999) Serum YKL-40 and colorectal cancer. *Br J Cancer* 79(9-10): 1494–1499.
- Hung SI, Chang AC, Kato I, Chang NC (2002) Transient expression of Ym1, a heparinbinding lectin, during developmental hematopoiesis and inflammation. *J Leukoc Biol* 72(1): 72–82.
- Vandenbroucke, II, Vandesompele J, Paepe AD, Messiaen L (2001) Quantification of splice variants using real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 29: E68-68.
- 52. Leong DT, Gupta A, Bai HF, Wan G, Yoong LF, et al. (2007) Absolute quantification of

gene expression in biomaterials research using real-time PCR. *Biomaterials* 28: 203-210.

- 53. Wada K, Kubota N, Ito Y, Yagasaki H, Kato K, et al. (2007) Simultaneous quantification of Epstein-Barr virus, cytomegalovirus, and human herpesvirus 6 DNA in samples from transplant recipients by multiplex real-time PCR assay. *J Clin Microbiol* 45: 1426-1432.
- 54. Tiziano FD, Pinto AM, Fiori S, Lomastro R, Messina S, et al. (2010) SMN transcript levels in leukocytes of SMA patients determined by absolute real-time PCR. *Eur J Hum Genet* 18: 52-58.
- 55. Nygard AB, Jorgensen CB, Cirera S, Fredholm M (2007) Selection of reference genes for gene expression studies in pig tissues using SYBR green qPCR. *BMC Mol Biol* 8: 67.
- 56. Kageyama T (2002) Pepsinogens, progastricsins, and prochymosins: structure, function, evolution, and development. *Cell Mol Life Sci* **59**: 288-306.
- 57. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25: 402-408.
- Richter C, Tanaka T, Yada RY (1998) Mechanism of activation of the gastric aspartic proteinases: pepsinogen, progastricsin and prochymosin. *Biochem J* 335 (Pt 3): 481-490.
- 59. Eide KB, Norberg AL, Heggset EB, Lindbom AR, Varum KM, et al. (2012) Human chitotriosidase-catalyzed hydrolysis of chitosan. *Biochemistry* **51**: 487-495.
- Saito A, Ozaki K, Fujiwara T, Nakamura Y, Tanigami A (1999) Isolation and mapping of a human lung-specific gene, TSA1902, encoding a novel chitinase family member. *Gene* 239: 325-331.
- 61. Ohno M, Tsuda K, Sakaguchi M, Sugahara Y, Oyama F (2012) Chitinase mRNA levels by quantitative PCR using the single standard DNA: acidic mammalian chitinase is a major transcript in the mouse stomach. *PLoS One* 7: e50381.
- 62. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- 63. van Eijk M, van Roomen CP, Renkema GH, Bussink AP, Andrews L, et al. (2005) Characterization of human phagocyte-derived chitotriosidase, a component of innate immunity. *Int Immunol* 17: 1505-1512.
- 64. Cozzarini E, Bellin M, Norberto L, Polese L, Musumeci S, et al. (2009) CHIT1 and AMCase expression in human gastric mucosa: correlation with inflammation and Helicobacter pylori infection. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 21: 1119-1126.
- 65. Sohn MH, Kang MJ, Matsuura H, Bhandari V, Chen NY, Lee CG, Elias JA (2010) The chitinase-like proteins breast regression protein-39 and YKL-40 regulate hyperoxiainduced acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* **182(7)**: 918–928.
- Bueter CL, Specht CA, Levitz SM (2013) Innate sensing of chitin and chitosan. *PLoS Pathog* 9(1): e1003080.
- 67. Ohno M, Togashi Y, Tsuda K, Okawa K, Kamaya M, Sakaguchi M, Sugahara Y, Oyama F

(2013) 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* **8(6)**: e67399.

- 68. Kouadjo KE, Nishida Y, Cadrin-Girard JF, Yoshioka M, St-Amand J (2007) Housekeeping and tissue-specific genes in mouse tissues. *BMC Genomics* 8:127.
- 69. Dabek J, Wilczok J, Kulach A, Gasior Z (2010) Altered transcriptional activity of gene encoding GAPDH in peripheral blood mononuclear cells from patients with cardiac syndrome X an important part in pathology of microvascular angina? *Arch Med Sci* 6(5): 709–712.
- 70. Zainuddin A, Chua KH, Abdul Rahim N, Makpol S (2010) Effect of experimental treatment on GAPDH mRNA expression as a housekeeping gene in human diploid fibroblasts. *BMC Mol Biol* 11: 59.
- 71. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT (2009) The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 55(4): 611–622.
- 72. Bustin SA, Beaulieu JF, Huggett J, Jaggi R, Kibenge FS, Olsvik PA, Penning LC, Toegel S (2010) MIQE precis: Practical implementation of minimum standard guidelines for fluorescence-based quantitative real-time PCR experiments. *BMC Mol Biol* 11:74.
- O'Connell J (2002) The basics of RT-PCR. Some practical considerations. *Methods Mol Biol* 193: 19–25.
- 74. Qureshi AM, Hannigan A, Campbell D, Nixon C, Wilson JB (2011) Chitinase-like proteins are autoantigens in a model of inflammation-promoted incipient neoplasia. *Genes Cancer* 2(1): 74–87.
- 75. Kashimura A, Okawa K, Ishikawa K, Kida Y, Iwabuchi K, Matsushima Y, Sakaguchi M, Sugahara Y, Oyama F (2013) 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* 8(11): e78669.
- 76. He CH, Lee CG, Dela Cruz CS, Lee CM, Zhou Y, Ahangari F, Ma B, Herzog EL, Rosenberg SA, Li Y, Nour AM, Parikh CR, Schmidt I, Modis Y, Cantley L, Elias JA (2013) Chitinase 3-like 1 regulates cellular and tissue responses via IL-13 receptor alpha2. *Cell Rep* 4(4): 830–841.
- 77. Dela Cruz CS, Liu W, He CH, Jacoby A, Gornitzky A, Ma B, Flavell R, Lee CG, Elias JA (2012) Chitinase 3-like-1 promotes Streptococcus pneumoniae killing and augments host tolerance to lung antibacterial responses. *Cell Host Microbe* 12(1): 34–46.
- 78. Khoushab F (2010) Yamabhai, M. Chitin research revisited. Mar. Drugs 8: 1988-2012.
- 79. Ober C, Tan Z, Sun Y, Possick JD, Pan L, Nicolae R, Radford S, Parry RR, Heinzmann A,

Deichmann KA, et al. (2008) Effect of variation in chi3l1 on serum ykl-40 level, risk of asthma, and lung function. *N. Engl. J. Med.* **358**: 1682-1691.

- Prakash M, Bodas M, Prakash D, Nawani N, Khetmalas M, Mandal A, Eriksson C (2013) Diverse pathological implications of ykl-40: Answers may lie in 'outside-in' signaling. *Cell. Signal.* 25: 1567-1573.
- 81. Ohno M, Kida Y, Sakaguchi M, Sugahara Y, Oyama F (2014) Establishment of a quantitative per system for discriminating chitinase-like proteins: Catalytically inactive breast regression protein-39 and ym1 are constitutive genes in mouse lung. *BMC Mol. Biol.* 15: 23.

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致します。

本学位論文の副査を担当していただき,適切なご意見ご助言をいただきました今 村保忠教授,南雲紳史教授,佐藤光史教授,平秀晴岩手大学名誉教授に深く感謝い たします。

日頃から多くの知識や示唆を賜り,惜しみないご協力を頂いた菅原康里准教授, 坂口政吉講師に深く感謝を致します。

私が,研究室にいる間,共に実験を行い,助けてくださった大川一明さん,貴田 雄太さんをはじめ生命工学研究室の皆様,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,援助してくれた両親に 深く感謝します。