

博士学位論文要旨

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.....	2
第 1 節 キチンとキチナーゼ.....	2
第 2 節 キチナーゼ様タンパク質.....	2
第 3 節 研究目的.....	2
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.....	3
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.....	3
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:触媒的に不活性化 breast regression protein-39 と Yml はマウスの肺で恒常遺伝子で ある.....	4
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.....	4
第 VI 章 結論.....	5

第 I 章 序論

第 1 節 キチンとキチナーゼ

キチンは、*N*-アセチル-*D*-グルコサミンが 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。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る。

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。両酵素は、糖質加水分解酵素ファミリー 18 に属している。Chit1 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、ヒンジ領域、*C*-末端にキチン結合ドメインの三領域からなる。マウス AMCase は、Chit1 に対し、52% の同一性と 60% の類似性がある。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、顕著な至適 pH を有し、それは pH 2 であり、二番目の至適 pH を pH 4~7 に有する。他方 Chit1 は、pH 5 付近に至適 pH を有する。

第 2 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。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。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。

マウスとヒトで複数種類の CLPs が同定されている。マウスは、主に breast regression protein-39 (BRP-39) [chitinase 3-like-1 (Chi3l1), 38-kDa glycoprotein (gp38k) ともよばれる], Ym1 (Chi3l3), Ym2 (Chi3l4) 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。

第 3 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ことから、疾患状況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、これらタンパク質の疾患の病態生理への貢献度合い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得ることを目的とした。まず、定量 real-time PCR システムを開発し、キチナーゼ、CLPs、対照遺伝子の発現レベルを同じスケールで定量、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

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、Chit1 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、Chit1 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。Chit1 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定量 real-time PCR (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、胃液の主要な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。

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 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。Chit1 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、Chit1 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。

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：触媒的に不活性化 breast regression protein-39

と Ym1 はマウスの肺で恒常遺伝子である

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 は、マウスの肺で大量に発現していた。一方、Ym2 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 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、ハウスキーピング遺伝子である 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。

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

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。

第 VI 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、同じスケールで発現レベルを評価するための定量 real-time PCR (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、胃の主要な消化酵素であるペプシノーゲン C の mRNA 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あり、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 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 Ym1 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。