

博士学位論文

マウス酸性ほ乳キチナーゼの
大腸菌での発現系の開発

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 bd12001

氏名 檜村 昭徳

指導教員 小山 文隆 教授

目次

第 I 章 序論

第 1 節 キチンとキチナーゼ	… 4
第 2 節 ほ乳類キチナーゼ	… 4
第 3 節 研究目的	… 5

第 II 章 マウス AMCCase の大腸菌での発現とその性質

第 1 節 序論	… 7
第 2 節 実験材料と実験方法	… 7
ほ乳類の発現ベクター	… 7
大腸菌発現ベクター	… 11
組換えタンパク質の培地, ペリプラズム画分, 可溶性画分からの精製	… 11
組換えタンパク質の不溶性画分からの Ni セファロース による精製	… 12
IgG セファロース と Ni セファロース による Protein A-AMCase-V5-His の精製	… 13
AMCase-V5-His の CHO 細胞での一過的発現と培地からの精製	… 14
タンパク質定量法, SDS ポリアクリルゲル電気泳動, ウェスタンブロット	… 14
キチナーゼ活性測定	… 14
キチナーゼ活性への pH と温度の影響	… 15
キチン結合活性の測定	… 16
大腸菌発現と CHO 細胞発現のマウス AMCCase のコロイダルキチンの分解	… 16
第 3 節 実験結果	… 17
組換えマウス AMCCase の構造	… 17
組換え融合タンパク質の大腸菌の培地と細胞内可溶性画分の分布	… 20
Protein A-AMCase-V5-His の IgG セファロース と Ni セファロース での精製	… 23
Protein A-AMCase-V5-His のキチナーゼ活性の性質	… 25
CHO 細胞と大腸菌で発現した組換え AMCCase のキチナーゼ活性の比較	… 27
Protein A-AMCase-V5-His はキチンに結合し, 分解する	… 28

第 4 節 考察	… 33
第 5 節 要約	… 35
第 III 章 大腸菌で発現した AMC _{Case} の触媒ドメインの性質	
第 1 節 序論	… 37
第 2 節 実験方法	
大腸菌発現ベクターの構築	… 37
組換え CatD の大腸菌での発現	… 38
キチナーゼの酵素活性	… 39
キチン結合活性	… 39
AMC _{Case} と CatD による各種キチンの分解	… 40
第 3 節 実験結果	
組換え CatD の構成	… 40
大腸菌の ペリプラズム 画分からの組換え CatD の精製	… 41
Protein A-CatD-V5-His のキチナーゼ活性	… 44
Protein A-CatD-V5-His の性質	… 44
Protein A-CatD-V5-His 画分のキチン結合活性	… 46
各種キチン基質に対する CatD の分解	… 49
第 4 節 考察	… 51
第 5 節 要約	… 54
第 IV 章 総合考察	… 56
第 V 章 結論	… 59
参考文献	… 60
謝辞	… 65

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 (GlcNAc) が β -1,4 結合した多糖で、甲殻類や昆虫の外骨格、寄生虫や真菌類の細胞壁に不可欠な成分である[1,2]。キチンを有する生物は地球上に多く生息するので、キチンはバイオマスとしてセルロースに次いで地球上に膨大に存在している[1,2]。

キチナーゼは、キチンの β -1,4 グリコシド結合を加水分解する。細菌類、真菌類、植物、線虫と節足動物など様々な生物は、キチナーゼを合成している[1-3]。これらのキチナーゼは、キチンを分解することで、自身の防御あるいは炭素およびエネルギー源として利用することに重要であると考えられている[4]。

第 2 節 ほ乳類キチナーゼ

ほ乳類はキチンを合成しないにもかかわらず、マウスとヒトでは活性を持つキチナーゼとして chitotriosidase (Chit1) と acidic mammalian chitinase (AMCase) の二種類が同定されている[3]。両酵素は糖質加水分解酵素のファミリー 18 に属している [the carbohydrate active enzymes (CAZy) database, <http://www.cazy.org/>] [5,6]。このファミリーは、触媒ドメインのアミノ酸配列に類似性が有り、 $(\beta/\alpha)_8$ -TIM バレルの基本構造を持つ一群のグループで、細菌類キチナーゼに高い配列相同性を示す。このファミリーには、キチナーゼに構造が似ているがキチナーゼ活性を欠損しているキチナーゼ様タンパク質 (chitinase-like proteins) が含まれている[7,8]。

Chit1 の活性は、常染色体劣性遺伝のリソソーム蓄積症である Gaucher 病で顕著に上昇すると報告されている[9,10]。Chit1 は最初のほ乳類のキチナーゼで、最初に精製、クローン化された分子である[11,12]。Chit1 の生理的役割は不明だが、

キチンを含む病原体からの防御が考えられている[13]。劣性遺伝性の Chit1 活性の欠損は、コーカサス人（白人）で一般的に観察される[14]。

もう一つのは乳類キチナーゼである AMCcase は、Chit1 の代償的役割により発見され、その酸性の等電点にちなんで酸性ほ乳類キチナーゼ (acidic mammalian chitinase, AMCcase) と命名された[15]。AMCcase は 50 kDa の酵素で、主として、マウスの胃と肺で発現している[15,16]。他のキチナーゼは低い pH で不活性になるが、AMCcase は低い pH 条件下でも失活しない。マウス AMCcase は酸性側の pH 2.0 で最も強い活性を示し、酸耐性であることが示されている[15]。

第 3 節 研究目的

AMCcase は病態状態で発現が増加するので、近年、生物医学の分野でかなりの注目を集めている。誘導型の喘息モデルマウスで AMCcase の mRNA とそのタンパク質が顕著に増加することが報告されている[17]。AMCcase の遺伝子多型とハプロタイプはヒトの気管支喘息に関連している[18,19]。そして、AMCcase を阻害することが喘息の治療戦略になる可能性があることが報告されている[17,20,21]。

AMCcase の発現は、また、抗原によって誘発されたアレルギー性肺炎マウスモデルで増加することも示されている[22]。さらに、AMCcase が目や胃の病気に関わっていることも報告されている[23-27]。しかし、マウスとヒトにおける AMCcase の病態生理学的な機能についての知見は、今のところ、限られている。

最近、当研究室の Ohno らは AMCcase の mRNA がマウスの胃で胃液の主要な消化酵素の前駆体である ペプシノーゲン C に匹敵する非常に高いレベルで合成されていることを報告した[28,29]。このことは、AMCcase がアレルギー、免疫応答、消化プロセスにおいて重要な役割を果たしている可能性を強く示唆する。しかしマウスとヒトでの AMCcase の病態生理学的機能については大部分

が不明瞭である。

本研究では、マウスとヒトにおける AMCase の病態生理学的な機能についての知見を得ることを目的とし、マウス AMCase の大腸菌での発現系の開発とその発現産物の性質について詳細な解析を行った。

第 II 章 マウス AMCCase の大腸菌での発現とその性質

第 1 節 序論

ほ乳類キチナーゼの生化学的解析には、精製したタンパク質が多量に必要である。現在、AMCCase の構造、生化学的解析には、ほ乳類と昆虫培養細胞での発現系、そして大腸菌での発現系が用いられている [15,17,19,20,22,30-34]。そこで、マウス AMCCase を Protein A, V5 エピトープ, (His)₆ との融合タンパク質 (ProteinA-AMCCase-V5-His) として発現し、その性質について検討する本研究を着想した。

その目的のため、発現を目的としたタンパク質を *Staphylococcus aureus* の短縮型 Protein A との融合タンパク質とするために、Protein A プロモーターの制御下で大腸菌の細胞外に分泌する発現ベクターである pEZZ18 [35] を使用した。AMCCase はシグナル配列を有する分泌タンパク質で、酸に安定である。そこで、pEZZ18 で発現した融合タンパク質は大腸菌の培地に分泌されると予想される。しかし、本研究で発現した融合タンパク質の大部分は大腸菌の ペリプラズム (periplasm) 画分に存在していた。

以下、大腸菌で発現した Protein A-マウス AMCCase-V5-His の融合タンパク質は、キチン分解活性とキチン結合能の両方において、哺乳類培養細胞で発現した AMCCase に匹敵した、との内容について記述する。

第 2 節 実験材料と実験方法

ほ乳類の発現ベクター

Total RNA Master Panel (Clontech Laboratories) に含まれているマウス胃の total RNA 使用し、すでに報告された方法で RNA を cDNA へ逆転写した。この

cDNA を鋳型にして KOD Plus DNA ポリメラーゼ (Toyobo) と EcoRI と XhoI の認識配列を持つオリゴヌクレオチドプライマー (Sigma-Aldrich Life Science Japan) を用いて AMCcase cDNA (GenBank accession number AK160173.1, nucleotides 6~1435) を PCR 増幅した。ここで用いた プライマーは、増幅されたマウス AMCcase cDNA が pre-AMCase-V5-His (pre-AMCase-V5-His, 図 1A) として発現できるように設計した (表 1)。フォワードプライマー (EcoRI-pre-AMCase-Fw) は、6 塩基の EcoRI 認識配列と 25 塩基の AMCcase cDNA の 6~30 番目の配列を含んでいる (表 1)。リバースプライマー (XhoI-pre-AMCase-Rv) は XhoI 認識配列 (下線部) と AMCcase cDNA の 1413~1435番目の配列に相補的な配列を含んでいる。そして、両プライマーの 5' 末端には、PCR 増幅された AMCcase cDNA の両末端が制限酵素で効率的に切断されるように 4 もしくは 5 塩基の余分な配列を含んでいる (表 1)。PCR 産物を Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) を用いて精製し、EcoRI と XhoI によって切断した。その DNA 断片を 1.5% アガロースゲル電気泳動で分離し、上述 Clean-Up System を使い精製した。この AMCcase cDNA 断片を、同様に制限酵素処理した pcDNA3.1/V5-His C ベクター (Invitrogen) にクローニングした。リバースプライマーの設計において、pcDNA3.1/V5-His C ベクターの V5-His の N 末端領域の読み枠につながるようにした。このように作製した プラスミド DNA (pcDNA3.1/pre-AMCase-V5-His) の全塩基配列は、ABI PRISM Big-Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit と 3130 Genetic Analyzer instrument (Applied Biosystems) を用いて確認した。

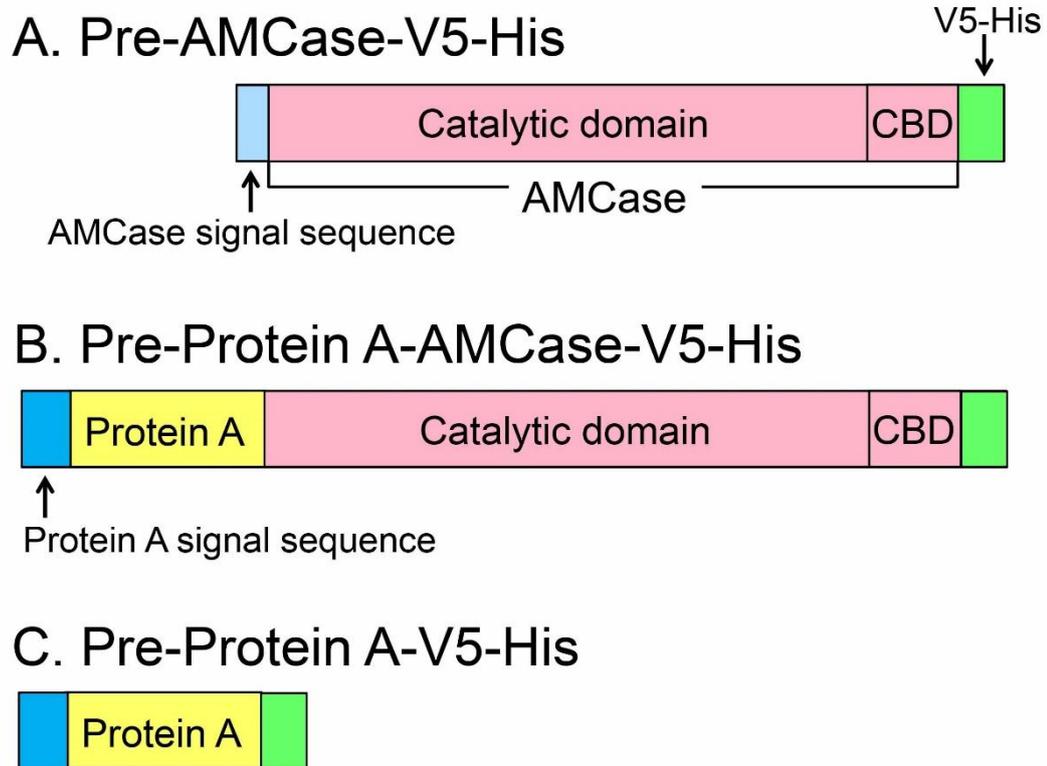


図 1. CHO 細胞と大腸菌で発現したマウス AMCase 融合タンパク質の模式図
 マウス AMCase は、分子量が約 50 kDa の分泌タンパク質で、N 末端に触媒ドメイン (CatD) と C 末端にキチン結合ドメイン (CBD) より構成されている。(A) CHO 細胞発現の pre-AMCase-V5-His。(B) 大腸菌発現の pre-Protein A-AMCase-V5-His。(C) 大腸菌発現の pre-Protein A-V5-His。大腸菌発現の融合タンパク質は、N 末端に Protein A の affinity tail を含んでいる。CHO 細胞と大腸菌の組換えタンパク質は、C 末端に V5-His を含んでいる。新たに合成された組換えタンパク質は、AMCase のシグナル配列 (A) あるいは Protein A のシグナル配列 (B と C) を含んでいる。

表 1. ほ乳類細胞と大腸菌発現ベクター構築のためのプライマーの塩基配列

EcoRI-pre-AMCase-Fw

5' -**CATG**GAATTCCGGGAGGAACGATGGCCAAGCTACT-3'

XhoI-pre-AMCase-Rv

5' -**GTGAC**CTCGAGCTGGCCAGTTGCAGCAATTACAGC-3'

EcoRI-mature-AMCase-Fw

5' -**CATG**GAATTCGTACAATCTGATATGCTATTTCCACC-3'

SalI-pcDNA BGH-Rv

5' -**AGGGG**TCGACTAGAAGGCACAGTCGAGGCTGATCA-3'

大腸菌発現ベクター

AMCase のシグナル配列を除いた AMCase-V5-His cDNA 領域を，
pcDNA3.1/pre-AMCase-V5-His を鋳型にし，KOD Plus DNA ポリメラーゼと
EcoRI と SalI 制限酵素部位を有するプライマーを用いて PCR で増幅した。フ
ォワードプライマー (EcoRI-mature-AMCase-Fw) は EcoRI 認識配列を含み，
AMCase cDNA の 80~103塩基，Protein A の C 末端領域とフレームが合うように
設計された (表1)。リバースプライマー (SalI-pcDNA BGH-Rv) は SalI 認識配列
を含み， pcDNA3.1/V5-His C ベクター
(http://tools.invitrogen.com/content/sfs/vectors/pcdna3_1v5hisc_seq.txt) の1080~1106
塩基に相補的になるように設計した。両プライマーは，上述したようにそれら
の 5' 末端に 4~5 塩基の余分な配列を含んでいる (表 1)。PCR 増幅された
DNA 断片を EcoRI と SalI で処理し，同様に切断された pEZZ18 (GE
Healthcare) [28] にクローニングした。得られたプラスミドが設計どおりに作成
されていることを，その塩基配列で確認した。この プラスミド DNA
(pEZZ18/pre-Protein A-AMCase-V5-His) を使って pre-Protein A-AMCase-V5-His
(図 1B) を発現するため，大腸菌 BL21 (DE3) (Novagen) を形質転換した。また，
コントロールとして pre-Protein A-V5-His (図 1C) を構築した。

組換えタンパク質の培地，ペリプラズム画分，可溶性画分からの精製

上記発現ベクターで形質転換された *E. coli* BL21 (DE3) 株を，100 µg/mL アン
ピシリンを含む 1 L の LB 培地で 37°C で 18 時間培養した。集菌後，遠心で
分離した培養培地はそのままカラムにアプライした。次に，残った菌体を高張
液 [20% sucrose, 20 mM Tris-HCl (pH 7.6), 0.5 mM EDTA, プロテアーゼインヒビ
ター (Complete, Roche)] 30 mL に懸濁し，30 分間氷上で静置した。その後，4°C，

15,000 x g で 15 分間遠心分離を行った。大腸菌に低張液 [20 mM Tris-HCl (pH 7.6), プロテアーゼインヒビター] を 120 mL 添加し, さらに 30 分間氷上で静置した。その後, 4°C, 15,000 x g で 15 分間遠心分離を行った。以上の上清を合わせた (この画分を periplasmic space 1/osmotic shock fraction とした)。細胞の沈殿を高張液 [20% sucrose, 20 mM Tris-HCl (pH 7.6), 0.5 mM EDTA, プロテアーゼインヒビター] 30 mL に再懸濁した。リゾチームを添加し, 37°C, 15 分間インキュベートし, 4°C, 15,000 x g で 15 分間遠心分離し, 上清を回収した。低張液 [20 mM Tris-HCl (pH 7.6), プロテアーゼインヒビター] を 120 mL 添加し, 大腸菌をさらに 30 分間氷上で静置し, 4°C, 15,000 x g で 15 分間の遠心分離し, 上清を回収した。そして, これらの上清をプールした。終濃度が 150 mM になるように NaCl を加え, 溶液の粘性を減少させるため, 短時間超音波破碎を行った。次に, 大腸菌の沈殿を TS 緩衝液 [20 mM Tris-HCl (pH 7.6), 150 mM NaCl] に懸濁し, 超音波処理し, 4°C, 15,000 x g で 15 分間遠心分離し, 上清をプールした。これらの 4つの画分を TS 緩衝液で平衡化した IgG セファロース (GE Healthcare) カラムにアプライした。カラムを TS 緩衝液で良く洗浄し, 結合した融合タンパク質を 0.1 M Gly-HCl (pH 2.5) で溶出し, 1 M Tris-HCl (pH 7.6) を添加して中和した。そして, キチナーゼ活性のある画分を TS 緩衝液で平衡化した PD10 カラム (GE Healthcare) で脱塩した。

組換えタンパク質の不溶性画分からの Ni セファロースによる精製

His-tag タンパク質の一部は, 不溶性になり, 破碎された細胞の遠心分離した後, 沈殿 (inclusion body) として回収できることが知られている[36]。遺伝子組換えタンパク質のリフォールディングと精製は 8 M 尿素と Ni セファロース (GE Healthcare) カラムで行った。まず, 沈殿画分を 8 M 尿素, 20 mM Tris-HCl

(pH 7.6), プロテアーゼインヒビターで 4°C で 30 分間放置し,可溶化した。この試料を, 4°C, 15,000 x g で 15 分間遠心分離し, 上清をプールした。その可溶性画分には組換えタンパク質 (Protein A-AMCase-V5-His) が含まれるので, Ni セファロースカラムに供し, His-tag を有する組換えタンパク質をカラム上に集めた。その後, カラムを 0.05 M イミダゾール, 0.5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.6) を用い, カラムの 10 倍量で洗浄した。この洗浄の間に尿素が除かれるので,組換えタンパク質はリフォールドされると期待される。そして, カラムに結合した組換えタンパク質を 0.5 M イミダゾール, 0.5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.6) で溶出し, 上記のように脱塩した。

IgG セファロース と Ni セファロース による Protein A-AMCase-V5-His の精製

ペリプラズム 1 画分から得た Protein A-AMCase-V5-His は, N 末端の Protein A を用いて IgG セファロース, C 末端の His-tag を用いて Ni セファロースを使い精製した。そのペリプラズム 1 画分は EDTA を含むので, 終濃度が 2 mM となるように MgSO₄ を添加してキレートし, 上記のように精製した。ペリプラズム 1 画分は IgG セファロースカラムに供した。結合タンパク質は 0.1 M Gly-HCl (pH 2.5) で溶出し, 1 M Tris-HCl (pH 7.6) を添加して中和した。ピーク画分を集め, Ni セファロースカラムに供した。カラムの 10 倍容の 50 mM イミダゾール, 0.5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.6) 溶液で洗浄し, タンパク質は 0.5 M イミダゾール, 0.5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.6) で溶出し, 上記のように脱塩した。度重なる凍結融解を防ぐため, 精製した酵素を一定量ずつ分注し, -80°C で保存した。

AMCase-V5-His の CHO 細胞での一過的発現と培地からの精製

CHO-K1 cells (CCL61, ATCC) は 10% ウシ胎児血清を添加した Minimum Essential Medium (Invitrogen) 中で継代した。

CHO 細胞に Lipofectamine plus (Invitrogen) を用いて、使用説明書にしたがって上記発現プラスミド (pcDNA3.1/pre-AMCase-V5-His) をトランスフェクトした。そして 48 時間後に培地を回収した。培地を 20 mM Tris-HCl (pH8.0), 0.5 M NaCl で平衡化した Ni セファロースに供した。その後、0.5 M NaCl を含む 20 mM Tris-HCl (pH 7.6), 500 mM イミダゾールで結合したタンパク質（この中に AMCase-V5-His が含まれる）を溶出し、脱塩した。

タンパク質定量法, SDS ポリアクリルゲル電気泳動, ウェスタンブロット

タンパク質の濃度は、ウシ血清アルブミンをスタンダードとし、Bradford 法で定量した[37]。タンパク質試料は、SDS ポリアクリルゲル電気泳動 (polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE) で分離した[37]。ゲルの中のタンパク質を Coomassie Brilliant Blue (CBB, Sigma-Aldrich) で染色した。ウェスタンブロット法では、電気泳動で分離したタンパク質を PVDF メンブレン (Immobilon-P, Millipore) に電気泳動的に転写し、抗 V5-HRP (Invitrogen) と反応した。目的タンパク質の V5 配列に結合した抗体を Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore) を用い検出し、Luminescent Image Analyzer (ImageQuant LAS 4000, GE Healthcare) で解析した。

キチナーゼ活性測定

キチナーゼ活性は、合成発色性基質である 4-nitrophenyl *N,N'*-diacetyl- β -D-chitobioside (Sigma-Aldrich) を 200 μ M の濃度で用いて測定した。それぞれの

反応は、n=3 で行った。大腸菌と CHO 細胞発現タンパク質の至適 pH, 至適温度を決める活性測定は、4 種類の緩衝液 (McIlvaine 緩衝液, 0.1 M Gly-HCl 緩衝液, Clack and Lubs あるいは 0.1M Carbonate 緩衝液) を用い、全量 50 μ L で行った。至適 pH を決める反応は、37°C, 30 分間行った。酵素反応は、1 M sodium carbonate を反応液に 20 μ L 添加して停止した。遊離した 4-nitrophenol を吸光度 405 nm で測定した。4-Nitrophenol のモル吸光係数は $17,700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ としてユニット (U) を計算した。1 酵素ユニット (U) は、Gly-HCl 緩衝液 (pH 2.0) で 37°C, 1 分間に 4-nitrophenyl *N,N'*-diacetyl- β -D-chitobioside から 4-nitrophenol を 1 μ mol 遊離する酵素量, と定義した。

キチナーゼ活性への pH と温度の影響

至適 pH は、4-nitrophenyl *N,N'*-diacetyl- β -D-chitobioside を基質とし、4 種類の緩衝液 [McIlvaine 緩衝液 (0.1 M citric acid と 0.2 M Na_2HPO_4 ; pH 2.0~pH 8.0) , 0.1 M Gly-HCl 緩衝液 (pH 1.0~pH 4.0), Clack and Lubs 緩衝液 (0.1 M KCl, 0.1M H_3BO_3 と 0.1 M NaOH; pH 8.0~pH 10.0) あるいは 0.05 M carbonate 緩衝液 (0.05 M NaHCO_3 と 0.1 M NaOH; pH 10.0~pH 11.0)] 中で 37°C, 30分間インキュベートすることで測定した。至適温度の測定は、0.1 M Gly-HCl 緩衝液 (pH 2.0) 中で、30°C~58°Cで測定した。

酵素の pH 安定性は以下のように行った。4 種類の緩衝液 [0.1 M Gly-HCl 緩衝液 (pH 1.0~pH 4.0), McIlvaine 緩衝液 (pH 2.0~pH 8.0), Clark and Lubs 緩衝液 (0.1 M KCl,0.1M H_3BO_3 と 0.1 M NaOH; pH 8.0~pH 10.0) と carbonate 緩衝液 (0.05 M NaHCO_3 と 0.1 M NaOH; pH 10.0~pH 11.0)] 中で、酵素を氷上で 1 時間インキュベートした。各 pH でのプレインキュベートのあと、残存するキチナーゼ活性を、0.1 M Gly-HCl 緩衝液 (pH 2.0) で上記のように分析した。熱安定

性の測定は McIlvaine 緩衝液 の pH 2.0 あるいは pH 7.0 で 30°C~58°C で 15 分インキュベートした。残存活性は、0.1 M Gly-HCl 緩衝液 (pH 2.0) で上記のように測定した。

キチン結合活性

キチンビーズ (50 μ L, New England Biolabs) を、結合緩衝液 [0.5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.6)] で 3 回洗浄した。CHO 細胞発現 AMCase-V5-His, 大腸菌発現 Protein A-AMCase-V5-His または Protein A-V5-His (コントロールタンパク質) をこのビーズに添加した。タンパク質をキチンビーズに結合させるために 4°C で 1 時間穏やかに混和した。懸濁液は、2,000 x g で 5 分間遠心分離した。上清は非結合画分とした。キチンビーズは、結合緩衝液 1 mL で、5 回洗浄した。Laemmle の SDS サンプル緩衝液[38] をキチンビーズと上清に加え、95°C で 3 分加熱し、SDS-PAGE で分離し、V5 抗体を用いたウェスタンブロットで分析した。

大腸菌発現と CHO 細胞発現のマウス AMCase のコロイダルキチンの分解

エビの殻のキチン (Sigma-Aldrich) からコロイダルキチンを調製し、キチナーゼ活性の測定のための基質とした[15]。全ての酵素反応は、コロイダルキチン (終濃度 1 mg/mL) を基質とし、大腸菌あるいは CHO 細胞発現タンパク質を含む 0.1 M Gly-HCl 緩衝液 (pH 2.0), 50 μ L で行った。反応は、37°C, 1 時間行った。組換え AMCase タンパク質が生成したキチン断片は、Jackson によって報告された方法に従い、それらの還元末端基に fluorophore 8-aminonaphthalene-1,3,6-trisulphonic acid (ANTS, Sigma-Aldrich) を共有結合的に標識し、生成した蛍光誘導物を、40% ポリアクリルアミドゲルを用いて分離し、Luminescent Image Analyzer

で分析した[39]。スタンダードとして *N*-acetyl chitooligoaccharides (Seikagaku Corporation) を用いた。

第 3 節 実験結果

組換えマウス AMCase の構造

組換えマウス AMCase タンパク質の模式図を図 1 に示した。マウス AMCase は、分子量が 50 kDa の分泌タンパク質である。N 末端に触媒ドメイン (catalytic domain, CatD), C 末端にキチン結合ドメイン (chitin binding domain, CBD) を有している。本研究では、CHO 細胞で発現するため、N 末端のシグナル配列を有する AMCase 前駆体 (pre-AMCase) cDNA の全コード領域をほ乳類発現ベクターである pcDNA3.1/V5-His C にサブクローニングした (図 1A と図 2A)。このプラスミド DNA を CHO 細胞で発現すると、培地の中に成熟 AMCase-V5-His (図 2B) が分泌されることが期待される。

大腸菌での発現では、成熟 AMCase-V5-His cDNA 領域 (AMCase のシグナル配列がない) を *Staphylococcus aureus* 由来の Protein A のシグナル配列を含む pEZZ18[35] に連結し、pre-Protein A-AMCase-V5-His として発現されることを期待した (図 1B と図 3A)。大腸菌でこのプラスミド DNA を発現すると、成熟 Protein A-AMCase-V5-His が培地中に直接に分泌されることが期待される (図 3B)。さらに、コントロールタンパク質として AMCase 領域を持たない pre-Protein A-V5-His を発現する プラスミド DNA も構築した (図 3C)。上述のように、pre-Protein A-V5-His は成熟 Protein A-V5-His (図 3D) に変換れ、培地に分泌されることが期待される。

A. Pre-AMCase-V5-His

503 amino acids 55,339 dalton

MAKLLLVVTGLALLLNAQLGSAYNLICYFTNWAQYRPLGLSFKPDDINPCLCTHLYAFA
GMQNEITTI EWNDVTLYKAFNDLKNRNSKLKTLAIGGWNFGTAPFTTMVSTSQNRQT
FITSVIKFLRQYGF DGLDLWEYPGSRGSPQDKHLFTVLVKEMREAFEQEAIENRPR
LMVTA AVAGGISNIQAGYEIPELSKYLDFIHVMTYDLHG SWEGYTGENSPLYKYPTETG
SNAYLNVDYVMNYWKNNGAPAEKLIVGFPEYGHFTFILRNPSDNGIGAPTS GDGPAGPYT
RQAGFWAYYEICTFLRSGATEVWDASQEV PYAYKANEWLGYDNIKSFSVKAQWLKQNNF
GGAMIWAIDLDDFTGSFCDQ GKFLPTSTLNKALGISTEGCTAPDVPSEPVTT PPGSGSG
GGSSGGSSGGSGFCADKADGLYPVADDRNAFWQCINGITYQQHCQAGLVFDTSCNCCNW
PARGHPFEGKPIPNPLLGLDSTRTGHHHHH

B. Mature AMCase-V5-His

482 amino acids 53,246 dalton

YNLICYFTNWAQYRPLGLSFKPDDINPCLCTHLYAFAGMQNEITTI EWNDVTLYKAF
NDLKNRNSKLKTLAIGGWNFGTAPFTTMVSTSQNRQTFITSVIKFLRQYGF DGLDLW
EYPGSRGSPQDKHLFTVLVKEMREAFEQEAIENRPRLMVTA AVAGGISNIQAGYEI
PELSKYLDFIHVMTYDLHG SWEGYTGENSPLYKYPTETGSNAYLNVDYVMNYWKNNGAP
AEKLIVGFPEYGHFTFILRNPSDNGIGAPTS GDGPAGPYTRQAGFWAYYEICTFLRSGATE
VWDASQEV PYAYKANEWLGYDNIKSFSVKAQWLKQNNFGGAMIWAIDLDDFTGSFCDQ
GKFLPTSTLNKALGISTEGCTAPDVPSEPVTT PPGSGSGGGSSGGSGFCADKADGL
YPVADDRNAFWQCINGITYQQHCQAGLVFDTSCNCCNWPARGHPFEGKPIPNPLLGLDS
TRTGHHHHH

図 2. CHO 細胞で発現した pre-AMCase-V5-His と 成熟 AMCase-V5-His の推定アミノ酸配列とそれらの分子量

カラーで示された領域は図 1A に対応する。青, マウス AMCase のシグナル配列; ピンク, マウス AMCase; 緑, V5-His 配列。

A. Pre-Protein A-AMCase-V5-His

645 amino acids 71,255 dalton

MKKKNIYSIRKLGVIASVTLGTLTLLISGGVTPAANAQHQDEAVDNKFNKEQQNAFYEI
LHLPNLNEEQRNAFIQSLKDDPSQSANLLAEAKKLNDDAQAPKVDNKFNKEQQNAFYEI
LHLPNLNEEQRNAFIQSLKDDPSQSANLLAEAKKLNDDAQAPKVDANSYNLICYFTNWA
QYRPLGSGFKPDDINPCLCTHLYAFAGMQNNEITTEWWDVTLYKAFNDLKNRNSKL
KTLAIGGWNFGTAPFTTMVSTSQNRQTFITSVIKFLRQYGFGLDLDWEYPGSRGSP
PQDKHLFTVLVKEMREAFEQEAIENRPRMLMVTAAVAGGISNIQAGYEIPELSKYLDF
IHVMTYDLHGSWEGYTGENSPLYKYPTETGSNAYLNVDYVMNYWKNNGAPAEKLI VGF
PEYGHFTILRNPSDNGIGAPTSGDGPAGPYTRQAGFWAYYEICTFLRSGATEVWDASQ
EVPYAYKANEWLGYDNIKSFSVKAQWLKQNNFGGAMIWAIDLDDFTGSFCDQGKFPLT
STLNKALGISTEGCTAPDVPSEPVTTPPGSGSGGSSGGSSGGSGFCADKADGLYPVA
DDRNAFWQCINGITYQQHCQAGLVFDTSNCNWPARGHPFEGKPIPNPLLGLDSTRT
GHHHHHH

B. Mature Protein A-AMCase-V5-His

609 amino acids 67,629 dalton

AHQDEAVDNKFNKEQQNAFYEILHLPNLNEEQRNAFIQSLKDDPSQSANLLAEAKKLND
DAQAPKVDNKFNKEQQNAFYEILHLPNLNEEQRNAFIQSLKDDPSQSANLLAEAKKLND
DAQAPKVDANSYNLICYFTNWAQYRPLGSGFKPDDINPCLCTHLYAFAGMQNNEITTE
IEWWDVTLYKAFNDLKNRNSKLKTLAIGGWNFGTAPFTTMVSTSQNRQTFITSVIKF
LRQYGFGLDLDWEYPGSRGSPQDKHLFTVLVKEMREAFEQEAIENRPRMLMVTAAV
AGGISNIQAGYEIPELSKYLDFIHVMTYDLHGSWEGYTGENSPLYKYPTETGSNAYLN
VDYVMNYWKNNGAPAEKLI VGFPEYGHFTILRNPSDNGIGAPTSGDGPAGPYTRQAGF
WAYYEICTFLRSGATEVWDASQEVYAYKANEWLGYDNIKSFSVKAQWLKQNNFGGAM
IWAIDLDDFTGSFCDQGKFPLTSTLNKALGISTEGCTAPDVPSEPVTTPPGSGSGGSS
SGGSSGGSGFCADKADGLYPVADDRNAFWQCINGITYQQHCQAGLVFDTSNCNWP
ARGHPFEGKPIPNPLLGLDSTRTGHHHHHH

C. Pre-Protein A-V5-His

193 amino acids 21,362 dalton

MKKKNIYSIRKLGVIASVTLGTLTLLISGGVTPAANAQHQDEAVDNKFNKEQQNAFYEI
LHLPNLNEEQRNAFIQSLKDDPSQSANLLAEAKKLNDDAQAPKVDNKFNKEQQNAFYEI
LHLPNLNEEQRNAFIQSLKDDPSQSANLLAEAKKLNDDAQAPKVDANSARGHPFEGKPI
PNPLLGLDSTRTGHHHHHH

D. Mature Protein A-V5-His

157 amino acids 17,737 dalton

AHQDEAVDNKFNKEQQNAFYEILHLPNLNEEQRNAFIQSLKDDPSQSANLLAEAKKLND
DAQAPKVDNKFNKEQQNAFYEILHLPNLNEEQRNAFIQSLKDDPSQSANLLAEAKKLND
DAQAPKVDANSARGHPFEGKPIPNPLLGLDSTRTGHHHHHH

図 3. 大腸菌で発現した組換えタンパク質の推定アミノ酸配列とその分子量
カラーで示された領域は図 1B と C に対応する。濃紺, Protein A のシグナル配列;
黄色, 短縮型 Protein A; ピンク, 成熟マウス AMCase; 緑, V5-His 配列。

このように、CHO 細胞と大腸菌で発現したタンパク質を比較すると、大腸菌で発現させた組換えタンパク質は N 末端に IgG に親和性のある Protein A を持つ。大腸菌組換えタンパク質は、Protein A を使った IgG セファロースあるいは His タグを使った Ni セファロース で精製することが出来る (図 1B と C)。

4-Nitrophenyl *N,N'*-diacetyl- β -D-chitobioside を基質として用いてキチナーゼ活性を測定すること、さらに V5 抗体を用いた ウェスタンブロット により組換えタンパク質を検出した。

組換え融合タンパク質の大腸菌の培地と細胞内可溶性画分の分布

まず、BL21(DE3) を宿主とした大腸菌発現系で pEZZ18/pre-Protein A-AMCase-V5- His が発現するかどうかを検討した。このベクター は *Staphylococcus aureus* 由来の Protein A promoter とそのシグナル配列で、融合タンパク質が大腸菌の培地中に分泌されるように設計されている[35]。このベクターを用いた発現および培地からの目的タンパク質の発現と精製は、我々やその他の研究者から報告されている[35,40-42]。

発現した融合タンパク質をまず培地から調製し、キチナーゼ活性を測定した。しかし、培地のキチナーゼ活性と目的タンパク質の収量は非常に低かった (表 2)。

いくつかの His tag を付加されたタンパク質を大腸菌で発現すると、不溶性の沈殿物 (inclusion body) を形成し、可溶化できないことが報告されている。そこで、大腸菌を、ペリプラズム画分、可溶性画分、不溶性画分に大別し、キチナーゼ活性の分布を検討した。ペリプラズム画分は、菌体を浸透圧ショック後、リゾチーム処理し、再度の浸透圧ショック処理して調製した(実験方法の項を参照のこと)。次に、可溶性細胞質タンパク質を調製するため残ったスフェロプラ

ストを超音波処理した。これらの画分から IgG セファロースを用いて発現した融合タンパク質を調製した。そしてこれらの画分のキチナーゼ活性を測定した。

表 2 に示すように、大腸菌のペリプラズム画分 [ペリプラズム画分 1/オスモティック処理 (Peri 1) とペリプラズム画分 2/リゾチーム (Peri 2) 画分] に 80% 以上のキチナーゼ活性が検出された。培地画分と細胞質可溶性画分はそれぞれ全体の 5%, 10% のキチナーゼ活性が認められた。ペリプラズム 2/リゾチーム画分 (Peri 2) の 2 回目の浸透圧ショックを省略すると、Peri 2 画分のキチナーゼ活性がわずかに減少した。このことから、2 回目の浸透圧ショックが ペリプラズム空間からの融合タンパク質の抽出に影響を与えていることが分かった。

大腸菌での Protein A-AMCase-V5-His の発現をさらに調べるため、タンパク質を SDS-PAGE で分析した。上記の 4 画分から試料を調製し、10% SDS-PAGE で電気泳動し CBB で染色した。図 4A に示すように、形質転換された大腸菌は培地、ペリプラズム画分と細胞質画分に 68 kDa の成熟 Protein A-AMCase のバンドを与えた (図 3B)。さらに V5 抗体を用いた Western blot 法を行い、培地画分とペリプラズム 1/オスモティックショック画分 (Peri 1) の両方からメジャーバンドを検出した。そのサイズは、期待される成熟 Protein A-AMCase -V5-His の分子質量に一致した (図 3B, 図 4B, レーン 1 と 2)。ペリプラズム 2/リゾチーム 画分 (Peri 2) と細胞質画分から調製した画分で、はっきりとした目的のバンドを検出した。また、ペリプラズム 2/リゾチーム画分 (Peri 2) と細胞質画分で移動がわずかに遅いバンド (71 kDa) も検出した。これらの結

表 2. 大腸菌の各画分でのキチナーゼ活性の分布

Fraction	Total activity (U)	Distribution (%)	Total Protein (mg)	Specific activity (U/mg)
Medium	0.021 ± 0.005	4 ± 1.0	0.208 ± 0.07	0.107 ± 0.038
ペリプラズム 1 (Peri 1)	0.201 ± 0.063	33 ± 6.8	0.497 ± 0.09	0.410 ± 0.131
ペリプラズム 2 (Peri 2)	0.343 ± 0.149	54 ± 8.5	1.03 ± 0.11	0.349 ± 0.164
Cytoplasm	0.044 ± 0.009	7 ± 1.8	0.311 ± 0.10	0.151 ± 0.050
Insoluble	0.014 ± 0.009	2 ± 1.1	0.436 ± 0.11	0.030 ± 0.016

大腸菌の 1 L の培養から，組換えタンパク質を，IgG セファロース を用いて，培地，ペリプラズム 画分，可溶性と不溶性画分から調製し，キチナーゼ活性，タンパク質量を定量した。3 回の実験の結果を平均値 ±SD で表示してある。

果から、大腸菌で最も多くのキチナーゼ活性が存在しているのはペリプラズム画分であることが分かった (図 4 と表 2)。

次に、不溶性画分中の組換えタンパク質を調べた。不溶性画分を 8 M 尿素で可溶化し、組換えタンパク質のリフォールディングと精製を Ni セファロースを用いて行った (実験方法参照)。可溶化し、リフォールディングした画分のキチナーゼ活性を測定したところ、不溶性画分のリフォールディングした組換えタンパク質からもキチナーゼ活性を検出することができた。しかし、不溶性画分の全キチナーゼ活性は可溶性画分に比べてとても低い、もしくは無視できる程度 (およそ 2%) だった (表 2)。また、リフォールディングした組換えタンパク質画分に、予想されるサイズのバンドからわずかに移動が遅い別のバンドを検出した (図 4B, レーン 6)。ペリプラズム空間/オスモティック処理 (Peri 1) と比較すると、遅く泳動されるバンドは不溶性画分に多いことが分かった (図 4B, レーン 5 と 6)。これは現在のところ明確な説明は出来ない。しかし、以下のことは考えられる。すなわち、発現した pre-Protein A-AMCase-V5-His のシグナル配列の切断が不完全で [つまり、protein A の N 末端にシグナルペプチドが存在しており (図 1B)], 不溶性画分として存在していた、との説明ができるかもしれない。

Protein A-AMCase-V5-His の IgG セファロースと Ni セファロースでの精製

我々は目的タンパク質の精製のため、Protein A と His-tag を成熟 AMCase の両末端に加えてある (図 1B)。そこで、融合タンパク質は、IgG セファロースと Ni セファロースで精製出来る。

ペリプラズム画分 1 (Peri 1) に存在するタンパク質は、最初に IgG セファ

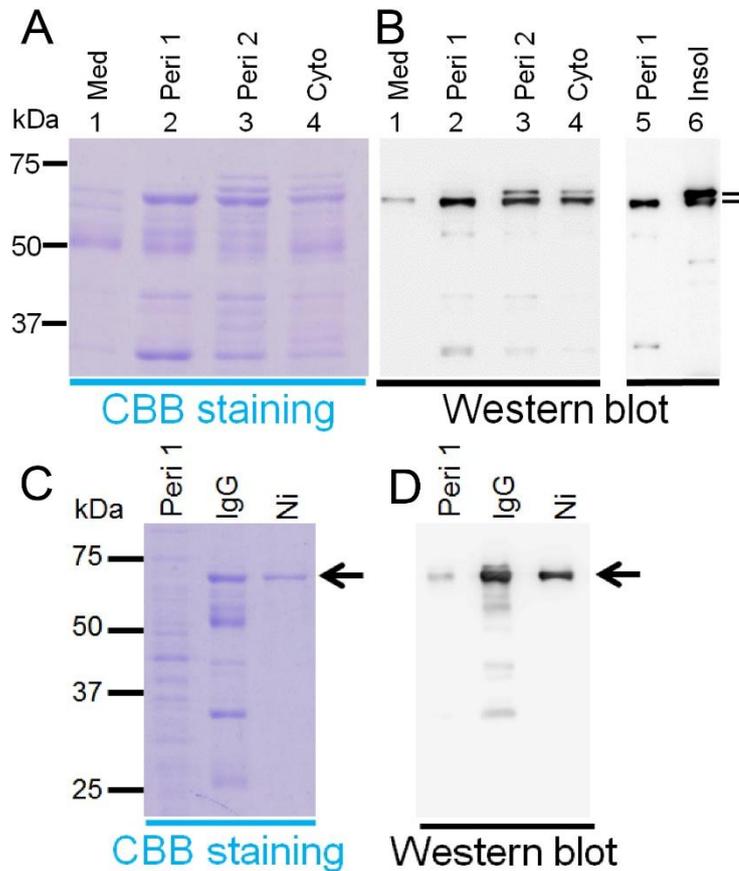


図 4. 大腸菌で発現した融合タンパク質の大腸菌での局在

(A) 培地 (Med), ペリプラズム (Peri 1 と Peri 2), 細胞質可溶性 (Cyo) と不溶性画分 (Insol) からの大腸菌組換えタンパク質の 10% SDS-PAGE での分析。ゲル中のタンパク質は, Coomassie Brilliant Blue (CBB) で染色された。(B) ウェスタンブロット解析。分子量マーカー (All Blue, Bio-Rad) の分子量 (kDa) は, 図の左の余白に示し, 融合タンパク質 (Protein A-AMCase-V5-His) の泳動位置は, 右の余白に矢印で示した。(C と D) 融合タンパク質の精製。融合タンパク質は, ペリプラズム画分 1 (Peri 1) から IgG セファロース と Ni セファロース で精製された。SDS-PAGE で分離されたタンパク質は, CBB で染色 (C), あるいは PVDF メンブレンに転写し, V5-HRP 抗体を用いた ウェスタンブロット (D) で解析した。

ロース, 続いて Ni セファロースクロマトグラフィーにより精製した。そして, 精製画分を SDS-PAGE に供し, CBB 染色, あるいはウェスタンブロット で分析した。図 4C と 4D に示すように, 精製画分は均一なバンドを与えた。

大腸菌で発現した融合タンパク質は, 培地 1 L あたりの精製タンパク質の収量はペリプラズム 1 (Peri 1) から 0.5 mg であった。

Protein A-AMCase-V5-His のキチナーゼ活性の性質

大腸菌で発現した AMCase の性質を知るため, Protein A-AMCase-V5-His のキチナーゼ活性を 4-nitrophenyl *N,N'*-diacetyl- β -D-Chitobioside を基質として 37°C で 30 分間, pH 1.0~8.0 で測定した。0.1 M Gly-HCl (pH 1.0~4.0) と McIlvaine (pH 2.0~8.0) 緩衝液で至適 pH を調べた。図 5A に示すように, この酵素の特徴的な性質が強酸性領域で観察された。組換え AMCase は, pH 2.0 で最も高い活性が, pH 3.0~7.0 では低い活性だった (図 5A)。この組換え AMCase は, 至適 pH に関し, マウスの腸から調製された AMCase に類似していた。McIlvaine 緩衝液の代わりに Gly-HCl 緩衝液 を作用すると, pH 2.0 のキチナーゼ活性はより高いピークになった。

次に至適温度を調べた。酵素活性に対する反応温度の影響を, 0.1 M Gly-HCl 緩衝液 pH 2.0 で 30°C~58°C の範囲で, 4-nitrophenyl *N,N'*-diacetyl- β -D-chitobioside を基質として測定した。図 5B に示すように, マウス組換え AMCase の触媒活性は温度の増加と共に増加し, 54°C で最大レベルに達し, それ以降急激に減少した。

次に組換えタンパク質の pH 安定性について検討した。Protein A-AMCase -V5-His を 4 種類の緩衝液を用い, 各 pH で 60 分間氷上で静置した (実験方法参照)。その後, 酵素活性を 37°C, pH 2.0 で分析した。図 5C に示すよう

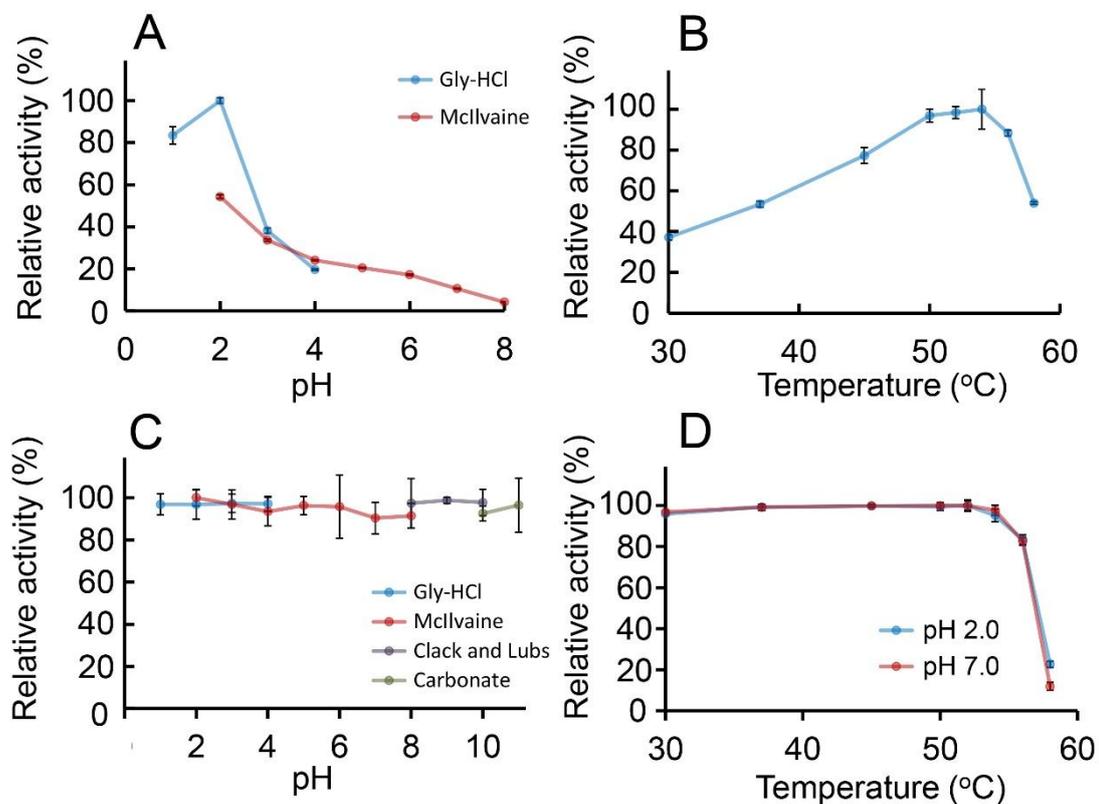


図 5. 大腸菌で発現した AMCcase のキチナーゼ活性の性質

(A) pH 依存性, (B) 温度依存性, (C) pH 安定性そして (D) 温度安定性。組換え AMCcase のキチナーゼ活性は、実験方法に述べたように測定した。結果は、それぞれ一連の実験の最大活性を 100 として % 表示をした。3 回の実験の結果を平均値 \pm SD で表示してある。

に、組換え AMCCase は幅広い pH (pH 1.0~11.0) での氷上で 1 時間の静置に安定だった。したがって、この酸、塩基性の処理はキチナーゼ活性の低下の原因とはならなかった。以上のことから、組換え AMCCase は酸と塩基に対して顕著な安定性を示すことが分かった。

次に、組換え AMCCase の温度安定性について検討した。AMCCase の温度安定性は、pH 2.0 (最適 pH) あるいは pH 7.0 (生理的 pH) での温度と酵素活性の関係を測定することによって評価した。

組換え AMCCase を 30°C~58°C で 20 分間、pH 2.0 あるいは pH 7.0 でプレインキュベートした。その後、pH 2.0 で 4-nitrophenyl *N,N'*-diacetyl- β -D-chitobioside を基質として残存したキチナーゼ活性を測定した。図 5D に示すように、組換え AMCCase は、pH 2.0 と pH 7.0 で、54°C まで熱安定性があり、56°C 以上でキチナーゼ活性の減少を示した。これらの結果は、組換え AMCCase が酸性と中性で熱安定性であることを示す。

CHO 細胞と大腸菌で発現した組換え AMCCase のキチナーゼ活性の比較

次に、大腸菌発現の Protein A-AMCCase-V5-His のキチナーゼ活性を CHO 細胞で発現した AMCCase-V5-His と比較することで評価した。

Ni セファロース を用いて CHO 細胞で発現した組換えタンパク質を調製した。組換えタンパク質はミスフォールディングした分子を含んでいる可能性がある。そこで、2 種類の組換え酵素のキチナーゼ活性を比較すると、酵素画分に含まれる夾雑物やミスフォールディングが、結果の解釈を複雑にする可能性がある。それらの問題を除去するため、初めに 4-nitrophenyl *N,N'*-diacetyl- β -D-chitobioside を用いて酵素試料のキチナーゼ活性を測定して、酵素溶液が同等の活性になるように調整した (図 6A)。次に CHO 細胞及び大腸菌で生産された

組換え融合 AMCase タンパク質を認識する V5 抗体を用いたウェスタンブロットでこれらの酵素の免疫反応性を分析した (図 1)。すなわち、同じキチナーゼ活性を示す酵素画分を SDS-PAGE で分離し、V5 抗体を用いたウェスタンブロットで検出した。

我々はマウス AMCase を CHO 細胞では AMCase-V5-His として、大腸菌では、Protein A-AMCase-V5-His として発現した (図 3B と 3D)。図 6B で示すように、大腸菌で発現した ProteinA-AMCase-V5-His の分子量は、CHO 細胞で発現した AMCase-V5-His のそれより大きかった (それぞれ約 68 kDa と 54 kDa)。CHO 細胞と大腸菌から得られるタンパク質の分子量の差は、大腸菌組換えタンパク質の Protein A の分子量に由来する (図 3B と 3D)。CHO 細胞で発現した AMCase と大腸菌で発現した AMCase は、ウェスタンブロットではほぼ同じ強度のシグナルを与えた。この結果は、CHO 細胞発現の AMCase-V5-His と大腸菌発現の ProteinA-AMCase-V5-His のキチナーゼ活性の比活性がほぼ同等であることを示す。

Protein A-AMCase-V5-His はキチンに結合し、分解する

発現した AMCase 融合タンパク質の C 末端領域にはキチン結合ドメインが含まれる (図 1)。組換えタンパク質の中のキチン結合ドメインに機能的活性があるかどうかを検証するため、キチンビーズを使用してキチン結合実験を行った (実験方法参照)。

この分析法において、キチンに結合することができるキチナーゼは、キチンビーズと反応後、遠心分離で沈殿することが期待される。図 7 に示すように、CHO 細胞で発現した成熟 AMCase-V5-His あるいは大腸菌で発現した成

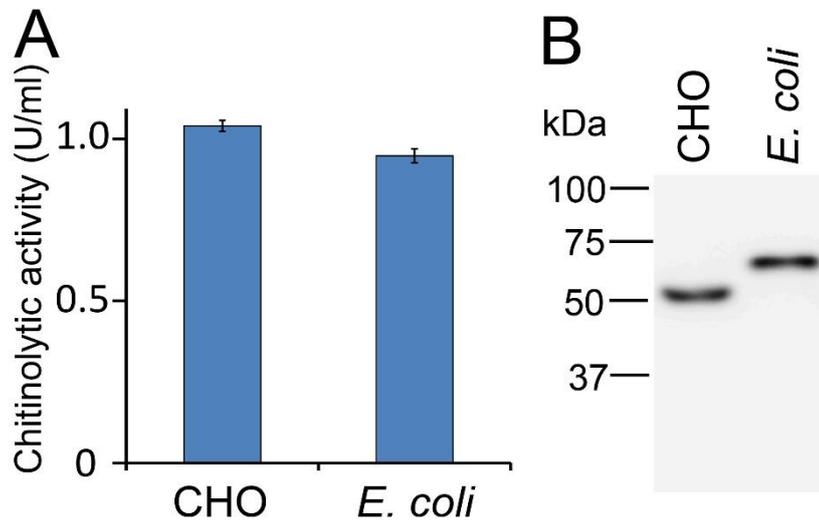


図 6. 大腸菌で発現した AMCase のキチナーゼ活性は CHO 細胞で発現した酵素と同じだった

最初に CHO 細胞と大腸菌発現の酵素試料のキチナーゼ活性を 0.1 M Gly-HCl 緩衝液 (pH 2.0) で 37°C, 30 分間で測定し, 同じ活性になるように酵素溶液濃度を調整した (A)。次に, これらの酵素溶液を V5 抗体を用いたウェスタンブロットで分析した。

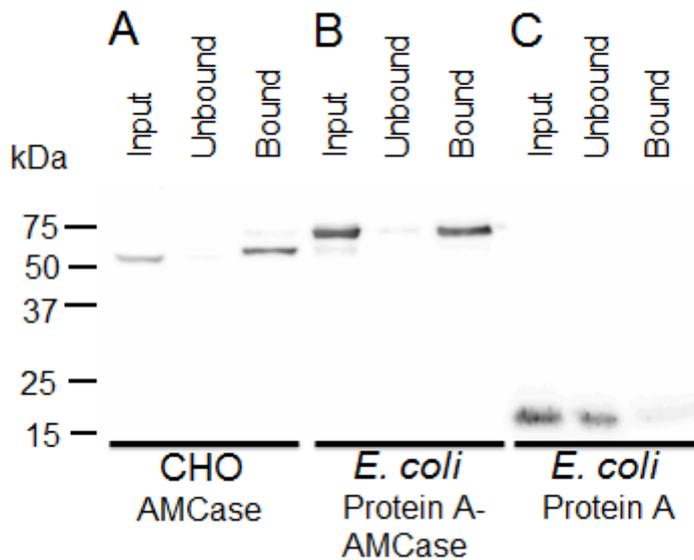


図 7. CHO 細胞あるいは大腸菌発現の AMCase のキチンビーズへの結合
 (A) CHO 細胞で発現した AMCase-V5-His, (B) 大腸菌で発現した Protein A-AMCase-V5-His, (C) 大腸菌で発現した Protein A- V5-His。キチンビーズを用いたキチン結合は、実験方法に記載したように行った。AMCase のキチン結合ドメイン (CBD) を持つ組換え融合タンパク質のみキチンビーズへの結合が認められ (A と B), CBD がない融合タンパク質はキチンビーズに結合しなかった (C)。

熟 Protein A-AMCase-V5-His の大部分は、キチンビーズ結合画分に存在した。これとは対照的に、AMCase 領域のない融合タンパク質 (Protein A-V5-His, 図 3D) は、上清 (非結合画分) に存在した。これらの結果は、組換え AMCase がキチンと結合することが出来ることを示す。

組換えヒト Chit1 と組換えマウス AMCase がコロイダルキチンを分解し、GlcNAc 二量体を遊離すると報告されている[15]。CHO 細胞と大腸菌で発現した AMCase タンパク質でコロイダルキチン分解能を測定した。結果として生じる単糖とオリゴ糖を Jackson が報告したフルオロフォア (fluorophore 8-aminonaphthalene-1,3,6-trisulphonic acid, ANTS) との共有結合で蛍光標識し、産物を高分離能 PAGE によって分離し[39]、蛍光イメージャーで解析した。図 8 に示すように、CHO 細胞と大腸菌で発現したマウス AMCase タンパク質は、COS-1 細胞で発現したマウス AMCase の結果[15]と同様に、コロイダルキチンから、GlcNAc 二量体と単量体を生成した。

以上、これまでの結果は、大腸菌で発現した AMCase が CHO 細胞で発現した AMCase に匹敵する機能を有するキチナーゼであることを示す。

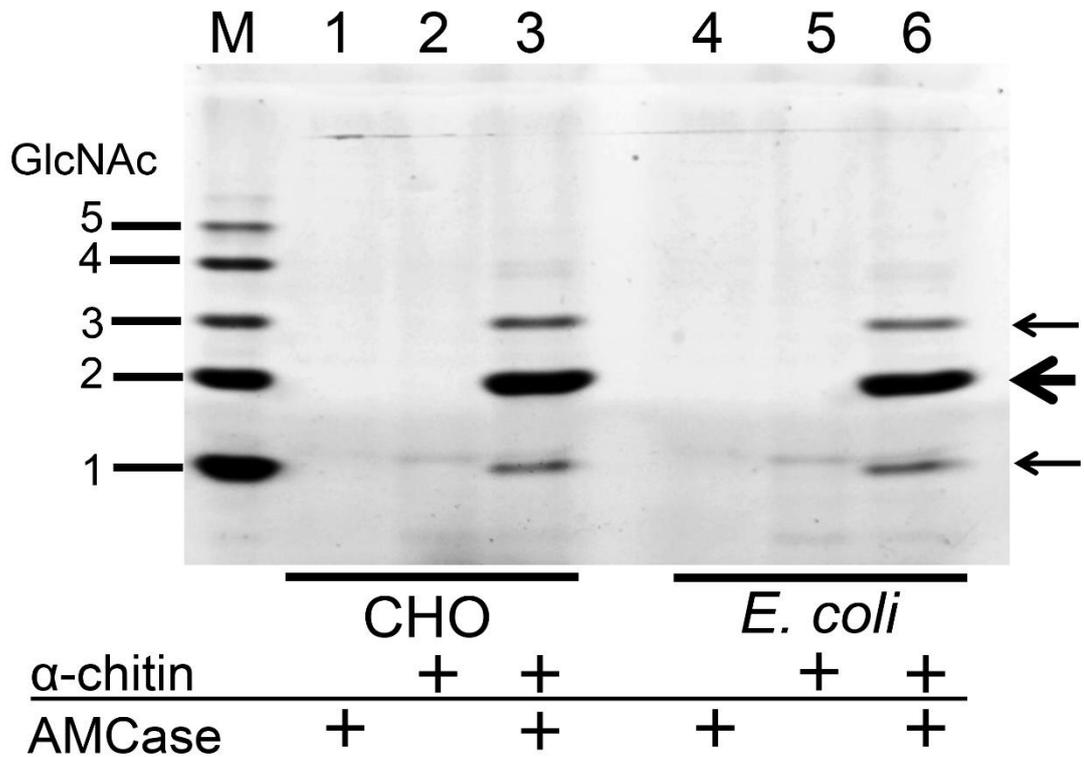


図 8. CHO 細胞あるいは大腸菌で発現したマウス AMCase のコロイダルキチンの分解産物の解析

CHO 細胞と大腸菌で発現したタンパク質を 0.1 M Gly-HCl 緩衝液 (pH 2.0) の条件下でコロイダルキチンと反応した。生じたキチン断片は、蛍光試薬によって標識し、電気泳動で分離後、蛍光イメージャーで解析した[15,39]。キチンオリゴマーの位置は、左マージンに示した。

第 4 節 考察

マウス AMCCase は、pEZZ18 ベクターを用いて、Protein A, V5 epitope と (His)₆ tag (V5-His)(図 1) からなる融合タンパク質として発現した[35]。pEZZ18 ベクターは、*Staphylococcus aureus* 由来の Protein A の二つの合成 IgG 結合領域 (ZZ ドメイン) を有する大腸菌発現ベクターである。このベクターに組み込んだタンパク質は protein A との融合タンパク質として細胞外に分泌される。このベクターは、分泌タンパク質の発現に使われてきた[35,40-42]。融合タンパク質の発現は、発現誘導を必要としない *Staphylococcus aureus* 由来 Protein A のプロモーターでコントロールされている。pEZZ18 は *Staphylococcus aureus* 由来 Protein A のシグナル配列を含むので、融合タンパク質はシグナル配列のために培地に分泌される。

今回、この大腸菌発現システムで、機能的に活性のあるマウス AMCCase を精製することが出来た。我々の場合、発現した Protein A-AMCCase-V5-His の大部分は、大腸菌のペリプラズム画分に存在した (図 3 と 表 2)。また、組換えタンパク質は、pH 1~3 での酸安定性を示した (図 3C)。この酸耐性 Protein A 融合タンパク質を IgG セファロース を用いワンステップで回収できた。結合タンパク質は、0.1 M の Gly-HCl (pH 2.5) で溶出された。この方法は、融合産物がこれらの状況下で安定である場合に限り使用できる。我々の研究結果は、酸安定性分泌タンパク質であるマウス AMCCase の発現に pEZZ18 システムが有効であることを示した。

この研究の目的は、大腸菌で作成したマウス AMCCase と CHO 細胞で発現したマウス AMCCase の酵素としての性質を比較することだった。N 末端あるいは C 末端の His-tag は、昆虫やほ乳類の培養細胞システムを用いた AMCCase の精製のために含まれることが多い[19,20,22,31,32,34]。pH 依存性と酸安定性に

関して、大腸菌で発現した AMCase の性質は、pH 依存性と酸安定性に関してマウスの天然キチナーゼのデータと一致していた。加えて、組換え AMCase は、キチン結合に結合した。さらに組換え AMCase はコロイダルキチンを分解し、主に GlcNAc 二量体を生産した。以上の結果は、大腸菌で発現した AMCase は、マウスの天然酵素[15] および CHO 細胞で発現した AMCase に匹敵する性質特性を持つことを示す。

Protein A は 17.8 kDa で、特徴的な構造特性を有している。今回の実験で、Protein A が融合された AMCase の立体構造にほとんど影響を及ぼさないことが示された。つまり、大腸菌で発現した AMCase の性質が、マウスで発見された天然酵素と CHO 発現の AMCase と類似しているため、大腸菌のペリプラズム空間に発現した AMCase は、マウスの体内で合成された AMCase と同様の三次構造が形成されていたことを示す。この研究結果は、AMCase の一次構造は、キチナーゼとキチン結合活性発現のための三次構造形成に十分に強力な情報を有することを示した。この大腸菌組換え酵素における三次構造の形成は、細菌等のキチナーゼ[7] との間で保存されている共通配列（コンセンサス配列）やペリプラズムに分泌される際の膜通過のためかもしれない。

マウス AMCase のためのこの発現システムには、いくつかの重要な利点がある。1つ目は、Protein A 融合タンパク質のキチナーゼ活性の多くがペリプラズム画分に可溶性タンパク質として存在し、不溶性画分にはほとんど認められなかった、ことである。第 2 に pEZZ18 ベクターは、*Staphylococcus aureus* 由来の Protein A プロモーターを使っているため、発現誘導の必要なく、経済的な実験が出来る。つまり、pEZZ18 プロモーターは T7 プロモーターほど強力ではないが、IPTG (isopropyl- β -thiogalactopyranoside) の誘導なしで一晩の大腸菌培養によって活性のある酵素を得ることが出来る。我々は、生化学的分析のため

に十分な量の組換え AMCase を得ることができた。工業的にタンパク質をさらに必要とするときには大腸菌培養容量を簡単に増やすことで対応が出来る。最後に、キチンと組換え AMCase を反応後、IgG セファロース または Ni セファロース カラムに通すことによって、反応混合物から Protein A-AMCase-V5-His を簡単に取り除き、キチン分解産物を得ることが出来る。

第 5 節 要約

AMCase は喘息，アレルギー性炎症，食物消化と関係していることが示されている。今回，大腸菌で N 末端に Protein A，C 末端に V5 epitope と (His)6 tag を融合させた活性のある AMCase (Protein A-AMCase-V5-His) の ペリプラズムでの生産を可能にする大腸菌発現系を確立した。マウス AMCase の cDNA を，*Staphylococcus aureus* 由来 protein A プロモーター，Protein A のシグナル配列と短縮型 Protein A 持つ発現ベクターである pEZZ18 ベクターに組み込み，発現を試みた。発色性合成基質である 4-nitrophenyl *N,N'*-diacetyl- β -D-chitobioside を用いて測定したキチナーゼ活性の測定で，最も多く Protein A-AMCase-V5-His が存在したのは ペリプラズム 画分であることを明らかにした。ペリプラズム画分の Protein A-AMCase-V5-His を IgG セファロース と Ni セファロース を用いて精製した。組換えタンパク質は pH 2.0 で最大活性を示し，その時の最適温度は 54°C だった。氷上で pH 1.0~pH 11.0 で 1 時間インキュベートしても，全く残存活性は低下しなかった。このタンパク質は，pH 2.0 と 7.0 で 54°C まで熱安耐性を示した。さらに，大腸菌組換え AMCase の 4-nitrophenyl *N,N'*-diacetyl- β -D-chitobioside に対するキチナーゼ活性は，CHO 細胞で発現させた AMCase に匹敵した。さらに，組換え AMCase はキチンビー

ズに結合し、コロイダルキチンを分解し、主に GlcNAc 二量体を遊離した。このように、大腸菌で発現した Protein A-AMCase-V5-His 融合タンパク質は、CHO 細胞で発現した AMCase に相当するキチナーゼ活性を備えていた。この組換え型タンパク質は、マウス AMCase の生化学的機能を詳細に解析する実験に用いることが出来る。

第 III 章 大腸菌で発現した AMCcase の触媒ドメインの性質

第 1 節 序論

AMCase は喘息, アレルギー, 自然免疫そして食物消化で重要な役割を果たしていると考えられている[2,3]。しかし, マウスとヒトでの AMCcase の病態生理学的機能についてはあまり分かっていない。

AMCase を生化学的に解析するため, 前章で, マウス AMCcase を Protein A, V5エピトープと (His)6 tag (V5-His) の融合タンパク質として大腸菌のペリプラズム空間に発現する発現システムを確立した[43]。大腸菌で生産した AMCcase は, pH 2.0 で活性の強いピークを示して, コロイダルキチンを分解し, 主に GlcNAc 二量体を遊離した。そして, 大腸菌で発現した AMCcase は, CHO 細胞で発現したタンパク質と同じ機能を持っていることを示した。

AMCase は, N 末端に触媒ドメイン (catalytic domain, CatD), C 末端側にはキチン結合ドメイン (CBD) を含んでいる[15]。CBD がキチンを認識し, CatD はそれを分解することが示唆されている[44]。しかし, マウス AMCcase のキチン消化における CatD と CBD の機能的な役割, 特に高分子量結晶性のキチンとエビの殻の消化, については解明されていない。

そこで, マウス AMCcase の CatD を Protein A と V5-His の組換え融合タンパク質として大腸菌で発現した。組換え CatD は, キチンビーズに結合し, GlcNAc 六量体, コロイダルおよび結晶性キチンそしてエビの殻を pH 2.0 で分解し, 二量体を遊離した。つまり, マウス AMCcase の CatD は, キチンを認識し, 分解することができる。

第 2 節 実験方法

大腸菌発現ベクターの構築

マウス AMCase の CatD は, Protein A と V5-His の組換え融合タンパク質として大腸菌で発現する。CatD のコード領域は, KOD Plus DNA ポリメラーゼと EcoRI あるいは XhoI 認識部位をもつ オリゴヌクレオチドプライマーを用いて, 完全長のマウス AMCase のプラスミド DNA (pEZZ18/AMCase-V5-His) から PCR 増幅した。CatD のフォワードプライマー (5'-CATGGAATTCGTACAATCTGATATGCTATTTTCACC-3') は, 6 塩基の EcoRI 認識配列 (下線部) と 25 塩基の AMCase cDNA (GenBank accession number AK160173.1) の 80~103 塩基に対応する AMCase 配列を含んでいる。V5-His の N 末端領域にフレームが合うように組み込んだリバープライマーを設計した。そのリバープライマー (5'-GTGACCTCGAGCACTCCCCTCCTGGAGGAGTAG-3') は, XhoI 認識配列 (下線部) と AMCase cDNA の1230~1253 塩基に相補的な配列を含んでいる。両プライマーは, PCR 増幅された cDNAs の両末端を制限酵素で効率的に切断するために余分な 4 もしくは 5 塩基の余分な配列を含んでいる (太字)。増幅された DNA は, PCR プライマーを用いて付加された EcoRI と XhoI 認識領域を含んでいる。PCR 産物は, Wizard SV Gel と PCR Clean-Up System を用いて精製し, EcoRI と XhoI で切断した。その DNA 断片は, 初めに 1.5% アガロースゲル電気泳動を使いその後 Clean-Up System で精製した。そして, この DNA を同様の方法で切断された pEZZ18 発現ベクターにサブクローニングした。得られたプラスミド DNA (pEZZ18/CatD/V5-His) の全ての塩基配列は, Eurofins Genomics 社のシーケンシングサービスを利用して確かめた。

組換え CatD の大腸菌での発現

上述のプラスミド DNA で形質転換した大腸菌 BL21 (DE3) を、100 µg/mL のアンピシリンを含む 1 L の LB 培地で 37°C, 18 時間培養した。大腸菌は、4°C, 5,000 x g の条件で 20 分遠心し、集めた。組換え CatD は、前述のように大腸菌のペリプラズム画分から IgG セファロース と、それに続く Ni セファロースクロマトグラフィーで精製した。キチナーゼ活性を有するタンパク質画分は、TS 緩衝液 [20 mM Tris-HCl (pH 7.6), 150 mM NaCl そしてプロテアーゼインヒビター] で平衡化した PD MidiTrap G-25 (GE Healthcare) で脱塩した。第 2 章に記載したように、Protein A-AMCase-V5-His と Protein A-V5-His も同様に発現した。

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動とウェスタンブロット

得られタンパク質画分は、SDS-PAGE で分離し、V5-HRP 抗体を用いたウェスタンブロットで分析した。

キチナーゼの酵素活性

詳細なキチナーゼ活性の測定法は、第二章 第 2 節 実験材料と実験方法 参照。

キチン結合活性

Protein A-AMCase-V5-His, Protein A-CatD-V5-His と Protein A-V5-His (それぞれ 20 µg) を 0.5 M NaCl を含む pH 2.0 と pH 7.6 にそれぞれ調整された結合緩衝液と混合した。その混合液は、結合緩衝液 [0.5 M NaCl, 100 mM Gly-HCl (pH 2.0) あるいは 0.5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.6)] で平衡化したキチンビーズを充填したカラムに、キチンビーズに組換えタンパク質が結合するように 10

回循環させた。カラムの素通りの画分は非結合画分とした。カラムを 10 倍容の同じ緩衝液で洗浄し、5 倍容の 2 M NaCl, 100 mM Gly-HCl (pH 2.0) あるいは 2 M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.6) でそれぞれ洗浄した。洗浄後、それぞれ 10 倍容の 0.5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.6) で pH を調整した。結合タンパク質は、8 M 尿素, 20 mM Tris-HCl (pH 7.6) で溶出した。結合と非結合画分は、SDS-PAGE で分離し、V5 抗体を用いたウェスタンブロットで分析した。

AMCase と CatD による各種キチンの分解

コロイダルキチンは 2 章で述べたように、エビの殻のキチン (Sigma-Aldrich) から調製し、キチナーゼ活性を測定する基質として使用した。結晶性キチンは、エビの殻より調製されたキチンを使用した。エビのキチンは、Wiley mill (Thomas Scientific) で 250 μm のサイズに粉末化した。乾燥エビの殻 (Tosayasyoten) は、乳鉢で粉末状にした。基質としてコロイダルキチン (終濃度 1 mg/mL), 結晶性キチン (1 mg/reaction) あるいは、乾燥キチン (1 mg/reaction) を使用し、0.1 M Gly-HCl 緩衝液 (pH 2.0) と大腸菌で発現のタンパク質を含む全量 50 μL で反応した。反応は、10 分間、1 時間 あるいは 16 時間、37°C で行った。これら基質より生成したキチンオリゴ糖の蛍光標識と分析は、第二章 第 2 節 実験材料と実験方法参照。

第 3 節 実験結果

組換え CatD の構成

組換えマウス AMCase と CatD の模式図を図 9 に示した。大腸菌生産のために、成熟 AMCase-V5-His cDNA あるいはその CatD 領域をコードする cDNA を pEZZ18 にクローニングした。そして pre-Protein A-AMCase-V5-His

と pre-Protein A-CatD-V5-His の組換えタンパク質前駆体を発現させるために、*Staphylococcus aureus* 由来 Protein A のシグナル配列を含んでいる (図 9A と B; 図 10A)。同様に、コントロールタンパク質として pre-Protein A-V5-His を作成した (図 9C)。大腸菌細胞で発現したこれら融合タンパク質は大腸菌のペリプラズム画分に、成熟体組換えタンパク質 Protein A-AMCase-V5-His, Protein A-CatD-V5-His そして Protein A-V5-His として分泌されることが期待される (図 9B)。

目的の組換え融合タンパク質は、Protein A を用いた IgG セファロースあるいは His-tag を用いた Ni セファロースクロマトグラフィーによって精製することが出来る (図 9)。合成発色基質である 4-nitrophenyl *N,N'*-diacetyl- β -D-chitobioside を用いたキチナーゼ活性測定と V5 抗体を用いたウェスタンブロットで融合タンパク質を検出した。

大腸菌の ペリプラズム 画分からの組換え CatD の精製

ペリプラズム画分 1 (Peri 1) に存在するタンパク質は、IgG セファロースに続いて Ni セファロースクロマトグラフィーで精製した。精製画分のタンパク質は、SDS-PAGE で分離し、CBB での染色で可視化した。図 11 に示すように、大腸菌で生産した AMCase と CatD は同等のバンド強度を示した。次に、それらの組換え融合タンパク質を認識する V5 抗体を用いたウェスタンブロットで検討した。大腸菌発現の Protein A-AMCase-V5-His の分子量は、Protein A-CatD-V5-His よりも大きい。AMCase と CatD は、約 68 kDa と 61 kDa に同等のシグナルを与えた (図 11B)。AMCase と CatD の分子量の違いは、CBD 領域が存在するかどうかによる (図 10A と B)。

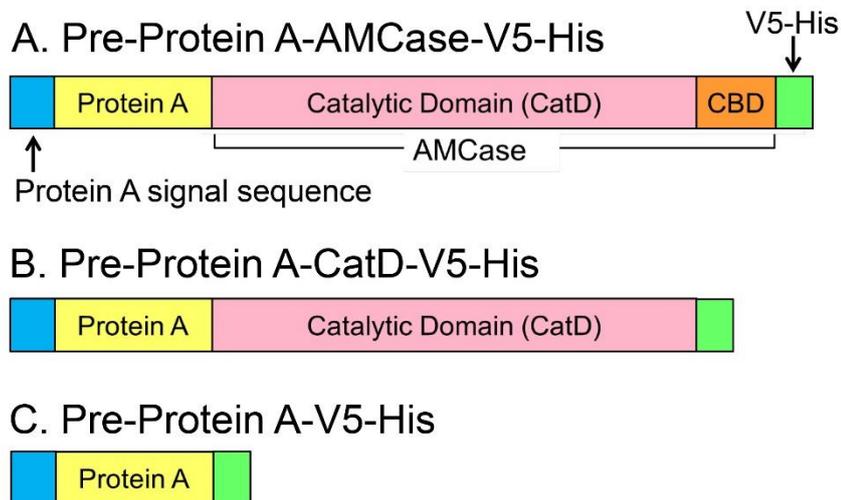


図 9.大腸菌で発現した融合タンパク質の模式図

マウス AMCase は、N 末端に触媒ドメイン (CatD) と C 末端にキチン結合ドメイン (CBD) を含んでいる。(A) 大腸菌発現の pre-Protein A-AMCase-V5-His. (B) 大腸菌発現の pre-Protein A-CatD-V5-His. (C)大腸菌発現の pre-Protein A-V5-His。

A. Pre-Protein A-CatD-V5His

584 amino acids 64,688 dalton

MKKKNIYSIRKLGVIASVTLGTLISGGVTPAANA**AQHDEAVDNKFNKEQQNAFYEI**
LHLPNLNEEQRNAFIQSLKDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPKVDNKFNKEQQNAFYEI
LHLPNLNEEQRNAFIQSLKDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPKVDANSYNLICYFTNWA
QYRPGLSFKPDDINPCLCTHLIYAFAGMQNNEITTEWNDVTLYKAFNDLKNRNSKL
KTLAIGGWNFGTAPFTTMVSTSONRQTFITSVIKFLRQYGFGLDLDWEYPGSRGSP
PQDKHLFTVLVKEMREAFEQEAIESNRPRMLVTA AVAGGISNIQAGYEIPELSKYLDF
IHVMTYDLHGSWEGYTGENSPLYKYPTETGSNAYLNVDYVMNYWKNNGAPAEKLI VGF
PEYGHTFILRNPSDNGIGAPTS GDGPAGPYTRQAGFWAYYEICTFLRSGATEVWDASQ
EVPYAYKANEWLGYDNIKSFSVKAQWLKQNNFGGAMIWAIDLDDFTGSFCDQGKFPLT
STLNKALGISTEGCTAPDVPSEPVTT**PPARGHPFEGKPIPNPLLGLDSTRTGHHHHH**

B. Mature -Protein A-CatD-V5His

548 amino acids 61,063 dalton

AQHDEAVDNKFNKEQQNAFYEILHLPNLNEEQRNAFIQSLKDDPSQSANLLAEAKKLN
DAQAPKVDNKFNKEQQNAFYEILHLPNLNEEQRNAFIQSLKDDPSQSANLLAEAKKLN
DAQAPKVDANSYNLICYFTNWAQYRPGLSFKPDDINPCLCTHLIYAFAGMQNNEITTE
IEWNDVTLYKAFNDLKNRNSKLKTLAIGGWNFGTAPFTTMVSTSONRQTFITSVIKF
LRQYGFGLDLDWEYPGSRGSP**PQDKHLFTVLVKEMREAFEQEAIESNRPRMLVTA AV**
AGGISNIQAGYEIPELSKYLDFIHVMTYDLHGSWEGYTGENSPLYKYPTETGSNAYLN
VDYVMNYWKNNGAPAEKLI VGFPEYGHTFILRNPSDNGIGAPTS GDGPAGPYTRQAGF
WAYYEICTFLRSGATEVWDASQ**EVPYAYKANEWLGYDNIKSFSVKAQWLKQNNFGGAM**
IWAIDLDDFTGSFCDQGKFPLTSTLNKALGISTEGCTAPDVPSEPVTTPPARGHPFEG****
KPIPNPLLGLDSTRTGHHHHH

図 10. 大腸菌で発現した CatD の推定アミノ酸配列とその分子量

カラーで示された領域は図 9B に対応する。濃紺, Protein A のシグナル配列; 黄色, 短縮型 Protein A; ピンク, CatD; 緑, V5-His 配列。

Protein A-CatD-V5-His のキチナーゼ活性

組換え CatD (Protein A-CatD-V5-His) のキチナーゼ活性を pH 2.0 (Gly-HCl 緩衝液) と pH 7.0 (McIlvaine 緩衝液) で測定した。Protein A-CatD-V5-His は、4-nitrophenyl *N, N'*-diacetyl- β -D-chitobioside を用いて測定した。強いキチナーゼ活性を pH 2.0 で検出した (図 11C)。発色基質に対する組換え CatD のキチナーゼ活性は、pH 2.0 と pH 7.0 で、ほぼ揃ったタンパク質のバンドからほぼ同じ活性が得られ、完全長の AMCCase に匹敵することが分かった。

Protein A-CatD-V5-His の性質

大腸菌で発現した AMCCase の CatD の性質を調べた。まず、Protein A-CatD-V5-His が、合成基質に対し、pH 1.0~10.0 の条件下で、pH 依存性を調べた。図 3A に完全長 AMCCase で示したように、組換え CatD は pH 2.0 付近で最も高い活性を、pH 3.0~7.0 では低い活性を示した (図 12A)。pH 2.0 でのキチナーゼ活性は、Gly-HCl 緩衝液を用いた方が McIlvaine 緩衝液よりも高かった (図 12A)。

酵素活性への温度の影響は、4-nitrophenyl *N, N'*-diacetyl- β -D-chitobioside を使用し、0.1 M Gly-HCl 緩衝液 (pH 2.0) 中で 30~58°C の範囲で 15 分間反応した。組換え CatD のキチナーゼ活性は、温度の上昇に伴い増加し、54°C で最大のレベルに到達し、その後急激に減少した (図 12B)。

次に融合タンパク質の pH 安定性を調べた。組換え CatD は、三種類の異なる緩衝液 (実験方法参照) を使用し、様々な pH で 60 分間プレインキュベートした。その後、37°C、pH 2.0 でキチナーゼ活性を測定した。

組換え CatD は、pH 1.0~10.0 で氷上での 1 時間プレインキュベートでも安定だった (図 12C)。このように、大腸菌で発現した CatD は、酸性~塩基性

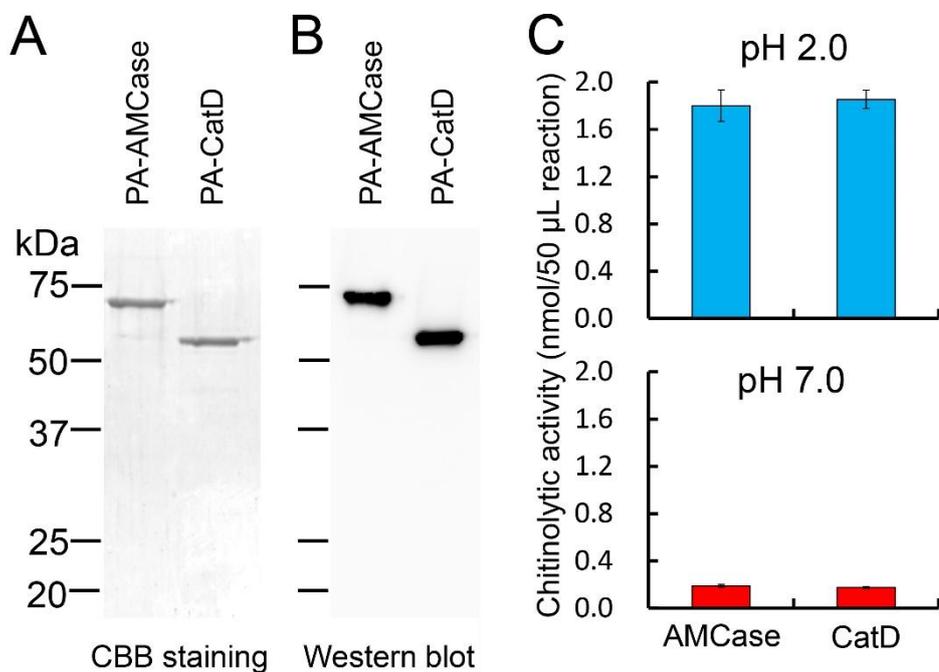


図 11. 大腸菌で発現した融合タンパク質の分析

(A) 大腸菌のペリプラズム画分 (Peri 1) から精製した組換えタンパク質の 12.5% SDS-PAGE での分析。大腸菌で発現した融合タンパク質を IgG セファロース, 続いて Ni セファロースクロマトグラフィーで融合タンパク質を精製した。それぞれ 1 μg のタンパク質を SDS-PAGE で分離後, CBB で染色した。分子量マーカーの分子量 (kDa) は左マージンに示した。融合タンパク質の泳動位置は右マージンに示した。(B) 組換えタンパク質 (それぞれ 0.1 μg) の V5 抗体を用いた ウェスタンブロット。(C) 完全長 AMCase と CatD のキチナーゼ活性の比較。実験方法に記載したように, 0.1 M Gly-HCl 緩衝液 (pH 2.0) あるいは McIlvaine 緩衝液 (pH 7.0) で, 37°C, 30 分間反応し, キチナーゼ活性を測定した。

の条件下でも安定だった。

次に、pH 2.0 (至適 pH) と pH 7.0 (生理的 pH) の条件で、CatD の熱安定性を評価した。CatD をそれぞれの pH で 30°C~58°C の範囲で 20 分間プレーンキュベートした。その後、pH 2.0 の条件下で残存するキチナーゼ活性を測定した。組換え CatD は pH 2.0 と 7.0 の条件で、54°C まで熱安定性が認められた (図 12D)。56°C 以上の温度では CatD のキチナーゼ活性が減少した。

このように、組換え CatD の 4-nitrophenyl *N, N'*-diacetyl- β -D-chitobioside に対する酵素特性は、pH と温度の最適条件、ならびに pH と熱の安定性は、第 2 章で述べた完全長 AMCase と本質的に一致した。

Protein A-CatD-V5-His のキチン結合活性

完全長の AMCase は、その C 末端にキチン結合ドメイン (chitin binding domain, CBD) を含んでいるが、CatD はこの CBD を欠損している (図 9A と B)。組換え CatD がキチンを認識し、結合することができるかどうか決定するために、キチンビーズカラムを使用し、キチン結合実験を行った (図 9A と B)。この方法は、Protein A-AMCase-V5-His、Protein A-CatD-V5-His そして Protein A-V5-His の三種類の組換えタンパク質を pH 2.0 あるいは pH 7.6 の条件下で、実験方法に記述したようにキチンビーズに結合した。キチンビーズと結合することができたタンパク質は、8 M 尿素 でカラムから抽出した。

pH 2.0 の条件下、大部分の Protein A-CatD-V5-His と Protein A-AMCase-V5-His は、キチンビーズカラムの結合画分に検出された。これに対し、Protein A-V5-His は大部分が素通り画分に検出された (図 13A)。さらに、pH 7.6 のキチンビーズカラムでも同様の結果が得られた (図 13B)。これらの結果は、CBD が欠損している組換え CatD は、pH 2.0 と pH 7.6 の条件下で、CBD

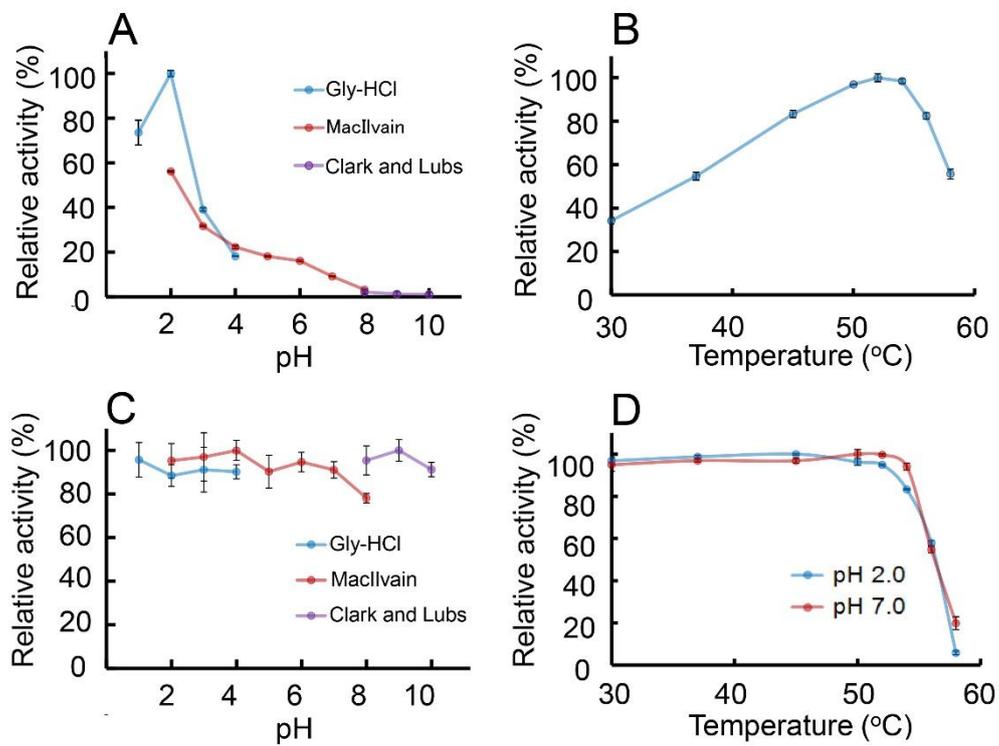


図 12. Protein A-CatD-V5-His のキチナーゼ活性の性質

組換え CatD のキチナーゼの (A) pH 依存性, (B) 温度依存性, (C) pH 安定性, (D) 温度安定性を実験方法に記載したように行った。組換え AMCCase のキチナーゼ活性の分析は, 実験方法に述べたように行った。結果は, それぞれ一連の実験の最大活性を100 として % 表示をした。3 回の実験の結果を平均値 \pm SD で表示してある。

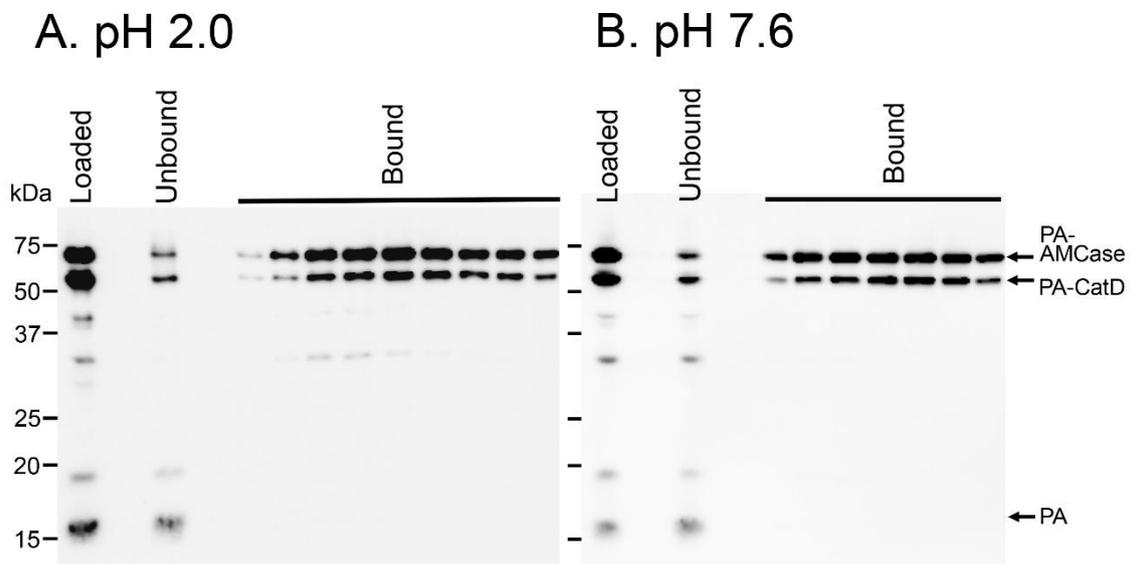


図 13. Protein A-CatD-V5-His のキチンビーズ結合活性

Protein A-AMCase-V5-His, Protein A-CatD-V5-His そして Protein A-V5-His を混合し、キチンビーズカラムに供した。キチン結合活性は、pH 2.0 (A) あるいは pH 7.6 (B) の条件で、実験方法に記載した方法で分析した。結合と非結合画分は、V5 抗体を用いたウェスタンブロットで分析した。

を含む完全長の AMCase に比べて、若干低いですが、キチンに結合することができることを示す。

本実験では、Protein A-AMCase-V5-His, Protein A-CatD-V5-His そして Protein A-V5-His を混合し、同時にキチンカラムに供している。この場合、AMCase と CatD がキチンビーズに対して競合的に作用する可能性がある。このことを明らかにするために、それぞれの組換えタンパク質を単独でキチンカラムに供した。その結果、CatD 単独でもキチンカラムに結合することは確認している（結果は示さず）。

各種キチン基質に対する CatD の分解

最後に、GlcNAc 六量体、コロイダルキチンと大腸菌発現の完全長 AMCase と CatD タンパク質を作用した。分解産物の単糖とキチンオリゴ糖は、その還元末端をフルオロフォアで蛍光標識し、高分解能の PAGE で分離し、蛍光イメージャーで解析した。完全長 AMCase と CatD は、pH 2.0 で、GlcNAc 六量体とコロイダルキチンを分解し、同程度の GlcNAc 二量体のキチンオリゴマーを生産することが分かった (図 14A と B)。

さらに構造を有するキチン基質について完全長 AMCase と CatD を作用した。完全長 AMCase と CatD は、pH 2.0 で、結晶性キチン質とエビ殻を分解し、GlcNAc 二量体を生成した (図 14C と D)。しかし、CatD の有する加水分解活性は、完全長の AMCase のそれよりわずかに低かった (図 14C と D)。このように、マウス AMCase の CatD は、CBD の非存在下でも高分子量キチン基質を認識し、それらを分解することができることが分かった。

以上の結果は、大腸菌で発現した組換え CatD がキチンオリゴマーと重合体キチンを認識して、消化することができる機能的な酵素であることを示した。

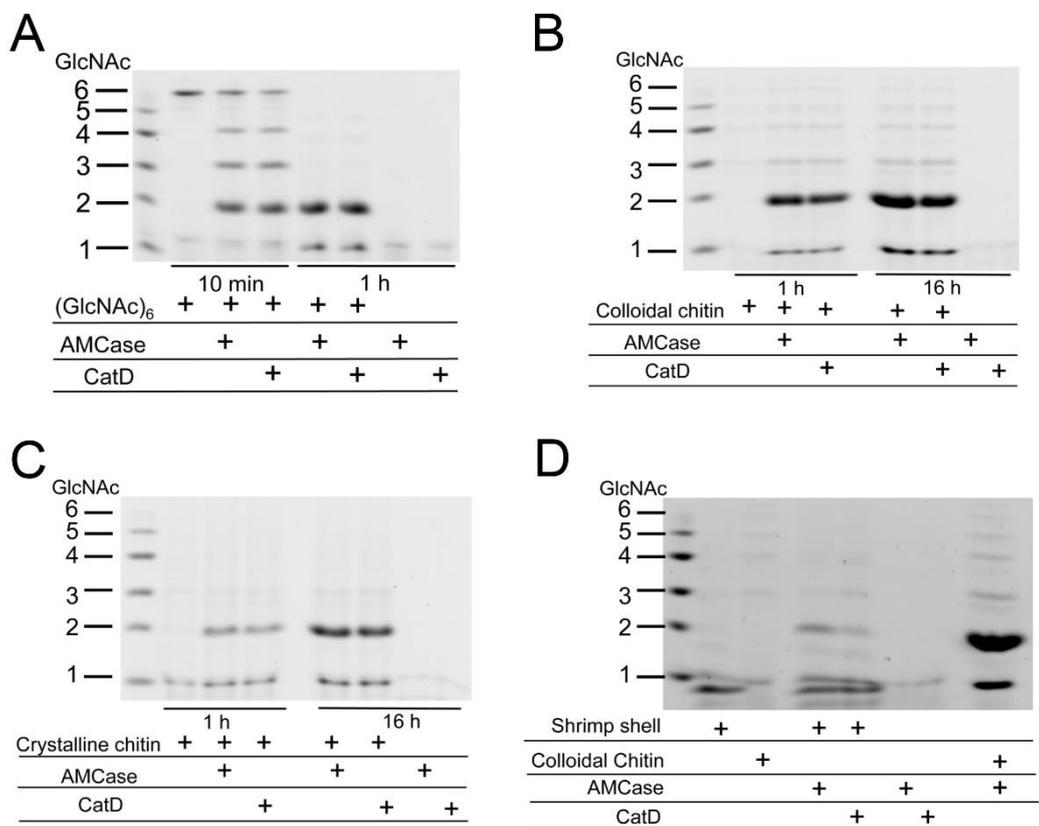


図 14. CatD による GlcNAc 六量体, コロイダルおよび結晶性キチン, エビの殻の分解

大腸菌で発現した組換えタンパク質を 0.1 M Gly-HCl (pH 2.0) の条件下, (A) GlcNAc 六量体, (B) コロイダルキチン, (C) 結晶性キチン, (D) エビの殻に, 10分, 1時間あるいは 16 時間反応した。生成したキチン断片は, 還元末端を蛍光標識後, PAGE で分離し, 蛍光イメージャーで分析した。

したがって、AMCase の CatD それ自身は、CBD の非存在下で、低分子、高分子量キチンを認識し分解することができる。

第 4 節 考察

AMCase は N 末領域の触媒ドメイン (CatD) と C 末領域のキチン結合ドメイン (CBD) から構成されている[15]。CBD がキチンを認識し CatD が分解していると考えられることができる[44]。この章で、pEZZ18 ベクターを用いて、マウス AMCase の CatD を Protein A と V5-His との融合タンパク質として大腸菌で発現し、その特性を調べた。

ヒト Chit1 は、マウス AMCase と類似 (52% の同一性と 60% の相同性) [15] しており、N 末領域の CatD と C 末領域の CBD からなる[11,12]。Tjoelker らは、ヒト Chit1 を COS-1 細胞で発現し、生化学的手法で CBD 領域を同定し、CatD と CBD の性質を明らかにした[44]。これらの情報をもとに、相同性検索を行い、マウス AMCase の CatD と CBD の領域を予測した。本研究では、pEZZ18 ベクターを使用した。pEZZ18 は、*Staphylococcus aureus* 由来の Protein A promoter でドライブされ、そのシグナル配列、そして Protein A の短縮型と目的タンパク質との融合タンパク質として大腸菌外に分泌する発現ベクターである [35]。このベクターは、様々な分泌タンパク質の細胞外発現のために使用した報告例がある[35,40-42]。このベクターを使用して、第 2 章において活性のある AMCase を Protein A と V5-His との融合タンパク質としてペリプラズム空間に発現する大腸菌発現系を確立した。さらに、すでに我々は、pEZZ18 を用い、*Caulobacter crescentus* CB15 の glucoamylase の発現に成功した。この遺伝子を pET システムで発現した場合、封入体を形成した

[45]。しかし、pEZZ18 のシステムでは大腸菌の可溶性画分に活性を有した形で生成することが出来た[45]。このように、ここで用いた Protein A は、融合タンパク部分の高次構造の形成を助け、可溶化する働きがあるものと考えられる。

本章で、この大腸菌発現システムを用い機能的に活性を有する CatD を生産することが可能なことを示した。生産された CatD は、IgG セファロースクロマトグラフィーで迅速に回収できた。IgG セファロースに結合した Protein A-CatD-V5-His は、0.1 M Gly-HCl (pH 2.5) で溶出することが出来る。この Protein A-IgG セファロースを用いたタンパク質回収法は、目的とするタンパク質が酸性条件下で安定ならば使用可能である。CatD は、pH 1.0~pH 3.0 の強酸性での安定性を示した (図 12C)。そこで、Protein A 融合タンパク質の精製のためのアフィニティークロマトグラフィー担体としての IgG セファロースを用いる際に、酸性溶液でタンパク質をカラムから溶出することが出来た。

第 2 章で、大腸菌発現 AMCase は、マウス由来の天然酵素[15] と CHO 細胞発現の AMCase とほぼ同じ性質をもつことを示した。本章において、組換え CatD の 4-nitrophenyl *N,N'*-diacetyl- β -D-chitobioside に対する比活性、至適 pH、至適温度、pH 安定性そして温度安定性において、完全長 AMCase と同等のキチナーゼ活性を持つことを示した。さらに、組換え CatD は、各種キチン基質を分解し、主に GlcNAc 二量体を生成した。これらの結果は、大腸菌で発現した Protein A-AMCase-V5-His と Protein A-CatD-V5-His が実験的に同等であることを示している。さらに、この結果は、CatD が、CBD の非存在下でも、キチナーゼ活性発現するのに適した三次構造をつくるのに十分な強い情報を一次構造上に持つことを明確に示唆している。

三次構造形成には、ジスルフィド結合が重要な役割を果たす。ペリプラズムは酸化状態であることが知られているので[46]、ATP が無くてもジスルフィド結

合が形成したものと考えられる。さらに、この高次構造形成にペリプラズム画分に存在するシャペロンが高次構造形成を手助けした可能性も考えられる。また、ペリプラズム画分に存在する、Dsb システムが AMCase の高次構造形成に働いた可能性が大きい[46]。これらの結果は、今回発現したタンパク質がペリプラズムに局在していたことが優位に働いた可能性がある。

AMCase は分泌タンパク質である。多くの分泌タンパク質には糖鎖が付加されていることが知られている。実際に、ヒト AMCase に糖鎖が付加されている可能性が示されている。また我々も培養細胞で発現したヒト AMCase が電気泳動上糖鎖付加を示唆するようなバンドを確認している (Okawa et al., 未発表データ)。しかし、マウスの胃の AMCase については、電気泳動上、糖鎖付加を示す兆候は認められていない (Ohno et al., 未発表データ)。また、今回 CHO 細胞で発現したマウス AMCase はアミノ酸の一次構造から推定したサイズに泳動されている。以上のことから、マウス AMCase には糖鎖が付加しないものと考えられる。

AMCase の組換え CatD は、キチンビーズに結合し、pH 2.0 の条件下で、GlcNAc 六量体、コロイダルキチン、結晶性キチン、そしてエビの殻を分解した。これらの結果は、マウス AMCase の CatD は、CBD の非存在下で高分子キチン基質を認識し、それを分解したことを示している。ヒト AMCase の X 線結晶構造解析は芳香族アミノ酸が並んだ分子上のクレフトがキチン結合サイトであることを示している[31]。これらの芳香族アミノ酸は、種を超えてキチナーゼで保存されている。したがって、CatD は芳香族アミノ酸を介してキチンを認識して結合しているものと思われる。この点は重要なので、今後芳香族アミノ酸に変異を導入し、キチン結合活性に与える影響を調べる必要がある。

Serratia marcescens 2170 は、キチナーゼ C1 と C2 を産生する[47]。Suzuki

らは、キチナーゼ C1 は、CatD と CBD からなる完全長キチナーゼであり、他方キチナーゼ C2 は CatD を含んでいて、キチナーゼ C1 から CBD のプロテアーゼによる分解除去によって生じることを報告した[48]。著者らはキチナーゼ C2 がキチン結合活性を有し、キチン基質を分解することを示したが、キチナーゼ C1 と比較すると、キチナーゼ C2 はコロイドキチンより粉末状のキチンで加水分解能が減少したことを示した。今回の AMCase の CatD に関する実験結果は、キチンへの結合とその分解において、キチナーゼ C2 と本質的に一致した。このように、以上の結果は、結晶性キチンとエビ殻の効率的に加水分解を行う上で、キチナーゼの CBD の重要性を例示している。

第 5 説 要約

マウス AMCase は、生体防御と食物消化において重要な生理的役割を果たしている。AMCase は N 末領域の触媒ドメイン (CatD) と C 末領域のキチン結合ドメイン (CBD) から構成されている。マウス AMCase の CatD を Protein A と V5-His との融合タンパク質として大腸菌で発現し、その性質について調べた。4-nitrophenyl *N, N'*-diacetyl- β -D-chitobioside を基質とした組換え CatD のキチナーゼ活性は、比活性、至適 pH、至適温度、pH 安定性そして温度安定性において、完全長 AMCase とほぼ同等だった。この CatD は pH 2.0 でキチンビーズに結合し、GlcNAc 六量体、コロイダルおよび結晶性キチンそしてエビの殻を分解し、主として GlcNAc 二量体を生成した。したがって、マウス AMCase の CatD は CBD の非共存下でキチン基質を認識し、分解することができる。これらの結果は、AMCase とその CatD の一次構造が、キチナーゼ活性、キチン基質認識とその分解に必要な三次構造の形成に十分であることを示す。我々の組

換え AMCase と CatD が様々な病気においての AMCase の生体病理学的役割の解明に使用することが出来る。

第IV章 総合考察

AMCase は喘息，免疫応答，そして消化プロセスにおいて重要な役割を果たしている可能性がある。しかし，マウスとヒトの AMCase の病態生理学的な機能はほとんど知られていない。

AMCase の生化学的特性解析は大量の機能的なタンパク質を必要とする。この目的には，簡便で，迅速で，安価な発現システムの使用を必要とする。大腸菌を用いた過剰発現系は，大腸菌が安価な培地で迅速に生育し，簡便な生産物のスケールアップがおこなえることから，広く用いられている。本学位論文では，培養細胞で発現した AMCase に匹敵するキチナーゼ活性を持つ，大腸菌のペリプラズム産物の，マウスの AMCase の発現システムを述べた。

最近，我々は AMCase mRNA がマウスの胃で非常に高いレベルで合成されると報告した[28,29,49]。組換えマウス AMCase は胃の強酸性度から反映された pH 2.0 で最大活性であり，酸性安定性であることを示した (図3A および 3C)。この結果はマウスの腸と胃由来の天然酵素を使っている以前の報告と一致している[15,29]。酸性の条件下でのマウス AMCase の強酸性への依存と安定性は特徴的であり，胃での強酸性環境の下でキチン質の効果的な消化を可能にすると考えられる。

マウス AMCase は，pH 2.0 の McIlvaine 緩衝液よりも Gly-HCl 緩衝液の方がよりキチナーゼ活性がより高かった (図3A)。この結果の理由は不明だが，以下の可能性は考えられる。ペプシンは，前駆体チモーゲンのペプシノーゲンとして合成される。胃粘膜細胞から塩酸が分泌され，強酸性の状況 (pH= ~ 2) になり，ペプシノーゲンが自己触媒的に活性のあるペプシンに変換される[50,51]。AMCase はこのような前駆体としては合成されないが，塩酸は，胃で AMCase に似たような活性化をする可能性がある。また，Cl イオンが AMCase の活性

に関わる His-187, Asp-117, Asp-115, Tyr-6 に影響を与えた可能性も考えられる。この点はさらに明らかにすべきであろう。

キチナーゼは、キチンを内部から分解する活性 (エンドキチナーゼ活性) と GlcNAc 単糖類をキチンポリマーの末端から遊離する (エキソキチナーゼ活性) [52-54] に大別できる。最近, Eide らは, ヒトの Chit1 が, キトサン [β -(1-4) 結合された D-glucosamine と N-acetyl-D-glucosamine から構成される多糖類] を主にエンドプロセシブに分解することを報告した[55]。これまで, AMCase がキチンとキトサンにどのように作用するかという特性は研究されてこなかった。AMCase は, アレルギー性気道炎症に関係している[17-19,22]。我々は, キチンとキトサンに対して組換え型 AMCase の酵素特性の詳細な分析を行うことが出来る。

マウス AMCase は, 食物消化と生体防御で重要な生理的役割を果たしている。さらにヒト AMCase の特定のハプロタイプは, 喘息に関係する[18]。ヒトの AMCase 遺伝子のアミノ酸置換により生じる variants は AMCase の酵素活性を変えることが出来る[19]。Bussink らは, COS-7 細胞で発現した AMCase の部位特定的な変異導入法を用いて, AMCase の His-187 がその至適の pH が強酸性であることに重要であることを示した[30]。

我々は, 最近, AMCase の mRNA が, マウス胃で異常に高いレベルで合成されることを報告した[28,29,49]。胃は, 食物の消化と有害な生物に対する防御で主要な役割を果たす重要な臓器である。マウスの胃では大量のペプシンを産生し, 分泌する[28,50]。AMCase は, ペプシンにドメインの接合部で CatD と CBD に分解される可能性がある。Chit1 はヒトのマクロファージで CatD と CBD に分割されることが報告されているので[56], この可能性は AMCase でもあり得る。

組換えマウス AMCase と CatD は pH 2.0 で最も活性をもつ。そして, それ

は胃の酸性度を示し、きわだった酸性の安定性を示した (図 3A と 3C)。さらに、完全長 AMCase と CatD は、様々なキチン基質を認識することができ、それらを分解することができる。酸性条件下のマウス AMCase と CatD の特殊な酸性の依存と安定性は、胃で極端な酸性の環境下でキチン質の物質の効果的な消化を可能にする。我々は、AMCase がマウスの胃でキチン質の物質を分解する消化酵素として機能するかどうかを検討し、慎重な分析を行うことを予定している。

AMCase は、病原体、寄生虫、卵白アルブミンへの免疫応答において、TH2 細胞でのインターロイキン-13 で活性化される重要な下流エフェクターである。AMCase の肺や目でのレベルが上昇すると、喘息、アレルギー性炎症、目のアレルギー、ドライアイに関わると考えられている[25]。そこで、AMCase を阻害することが、これらの疾患の重要な治療ターゲットであると考えられている[17,20,21]。ほ乳類は、二種類のキチナーゼ (Chit1 と AMCase) を合成しているので、AMCase に特異的なインヒビターの開発はこれらの病気の治療には必要である。この研究で発現系を確立したマウス AMCase と CatD は、ほ乳類細胞で発現した組換えタンパク質と酵素の性質がよく似ている。この研究で確立した組換えタンパク質が、病態条件下で、AMCase の病態生理学的な役割を明らかにする研究に利用でき、より AMCase に特異的なインヒビターの開発につながる。

第 V 章 結論

AMCase は喘息, アレルギー性炎症, 食物消化と関係していることが示されている。今回, N 末端に Protein A, C 末端に V5 epitope と (His)6 tag を融合させた活性のある AMCase (Protein A-AMCase-V5-His) の生産を可能にする大腸菌発現系を確立した。大腸菌で発現した Protein A-mouse AMCase-V5-His は, CHO 細胞で発現した AMCase に相当するキチナーゼ活性を備えていた[43]。さらに, その触媒ドメインである CatD を Protein A-CatD-V5-His として発現することも出来た。そして, Protein A-CatD-V5-His Protein A-AMCase-V5-His と Protein A-CatD-V5-His が, 我々の実験条件下で同等の機能を持ちことを明らかにした。このことは, CatD の一次構造にはキチナーゼ活性に必要な固有の三次構造形成に十分な情報があることを示す。その結果として, マウス AMCase の CatD は, CBD の非存在下で, キチン基質を認識し, 分解できる[57]。今回開発した組換え AMCase とその CatD, 特に CatD は, 新薬の開発につながるような特異的阻害剤の研究に利用できるだろう。

参考文献

1. Khoushab F, Yamabhai M (2010) Chitin research revisited. *Mar Drugs* 8: 1988-2012.
2. Bueter CL, Specht CA, Levitz SM (2013) Innate sensing of chitin and chitosan. *PLoS Pathog* 9: e1003080.
3. 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.
4. Hamid R, Khan MA, Ahmad M, Ahmad MM, Abdin MZ, et al. (2013) Chitinases: An update. *J Pharm Bioallied Sci* 5: 21-29.
5. Henrissat B (1991) A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J* 280 (Pt 2): 309-316.
6. 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.
7. Bussink AP, Speijer D, Aerts JM, Boot RG (2007) Evolution of mammalian chitinase(-like) members of family 18 glycosyl hydrolases. *Genetics* 177: 959-970.
8. Kawada M, Hachiya Y, Arihiro A, Mizoguchi E (2007) Role of mammalian chitinases in inflammatory conditions. *Keio J Med* 56: 21-27.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. Boot RG, Renkema GH, Verhoek M, Strijland A, Bliet J, et al. (1998) The human chitotriosidase gene. Nature of inherited enzyme deficiency. *J Biol Chem* 273:

25680-25685.

15. Boot RG, Blommaert EF, Swart E, Ghauharali-van der Vlugt K, Bijl N, et al. (2001) Identification of a novel acidic mammalian chitinase distinct from chitotriosidase. *J Biol Chem* 276: 6770-6778.
16. Boot RG, Bussink AP, Verhoek M, de Boer PA, Moorman AF, et al. (2005) Marked differences in tissue-specific expression of chitinases in mouse and man. *J Histochem Cytochem* 53: 1283-1292.
17. 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.
18. 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.
19. 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.
20. Sutherland TE, Andersen OA, Betou M, Eggleston IM, Maizels RM, et al. (2011) Analyzing airway inflammation with chemical biology: dissection of acidic mammalian chitinase function with a selective drug-like inhibitor. *Chem Biol* 18: 569-579.
21. Yang CJ, Liu YK, Liu CL, Shen CN, Kuo ML, et al. (2009) Inhibition of acidic mammalian chitinase by RNA interference suppresses ovalbumin-sensitized allergic asthma. *Hum Gene Ther* 20: 1597-1606.
22. 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.
23. Bucolo C, Musumeci M, Maltese A, Drago F, Musumeci S (2008) Effect of chitinase inhibitors on endotoxin-induced uveitis (EIU) in rabbits. *Pharmacol Res* 57: 247-252.
24. Musumeci M, Aragona P, Bellin M, Maugeri F, Rania L, et al. (2009) Acidic mammalian chitinase in dry eye conditions. *Cornea* 28: 667-672.
25. Bucolo C, Musumeci M, Musumeci S, Drago F (2011) Acidic Mammalian chitinase and the eye: implications for ocular inflammatory diseases. *Front Pharmacol* 2: 43.
26. 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.
27. Nookaew I, Thorell K, Worah K, Wang S, Hibberd ML, et al. (2013) Transcriptome signatures in *Helicobacter pylori*-infected mucosa identifies acidic mammalian chitinase loss as a corpus atrophy marker. *BMC Med Genomics* 6: 41.
 28. 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.
 29. Ohno M, Togashi Y, Tsuda K, Okawa K, Kamaya M, et al. (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: e67399.
 30. Bussink AP, Vreede J, Aerts JM, Boot RG (2008) A single histidine residue modulates enzymatic activity in acidic mammalian chitinase. *FEBS Lett* 582: 931-935.
 31. Olland AM, Strand J, Presman E, Czerwinski R, Joseph-McCarthy D, et al. (2009) Triad of polar residues implicated in pH specificity of acidic mammalian chitinase. *Protein Sci* 18: 569-578.
 32. Goedken ER, O'Brien RF, Xiang T, Banach DL, Marchie SC, et al. (2011) Functional comparison of recombinant acidic mammalian chitinase with enzyme from murine bronchoalveolar lavage. *Protein Expr Purif* 75: 55-62.
 33. Chen L, Shen Z, Wu J (2009) Expression, purification and in vitro antifungal activity of acidic mammalian chitinase against *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* and *Trichophyton rubrum* strains. *Clin Exp Dermatol* 34: 55-60.
 34. Chou YT, Yao S, Czerwinski R, Fleming M, Krykbaev R, et al. (2006) Kinetic characterization of recombinant human acidic mammalian chitinase. *Biochemistry* 45: 4444-4454.
 35. Lowenadler B, Jansson B, Paleus S, Holmgren E, Nilsson B, et al. (1987) A gene fusion system for generating antibodies against short peptides. *Gene* 58: 87-97.
 36. Yang Z, Zhang L, Zhang Y, Zhang T, Feng Y, et al. (2011) Highly efficient production of soluble proteins from insoluble inclusion bodies by a two-step-denaturing and refolding method. *PLoS One* 6: e22981.
 37. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
 38. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

39. Jackson P (1990) The use of polyacrylamide-gel electrophoresis for the high-resolution separation of reducing saccharides labelled with the fluorophore 8-aminonaphthalene-1,3,6-trisulphonic acid. Detection of picomolar quantities by an imaging system based on a cooled charge-coupled device. *Biochem J* 270: 705-713.
40. Tiwary E, Gupta R (2010) Extracellular expression of keratinase from *Bacillus licheniformis* ER-15 in *Escherichia coli*. *J Agric Food Chem* 58: 8380-8385.
41. Kumari A, Gupta R (2012) Extracellular expression and characterization of thermostable lipases, LIP8, LIP14 and LIP18, from *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol Lett*.
42. Oyama F, Hashino K, Oyama R, Kato I, Titani K (1993) Improved method for expression of Kunitz-type serine proteinase inhibitor domain of beta-amyloid protein precursor in *Escherichia coli* and characterization of disulfide bonds of the product. *J Biochem* 114: 813-819.
43. Kashimura A, Okawa K, Ishikawa K, Kida Y, Iwabuchi K, et al. (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: e78669.
44. Tjoelker LW, Gosting L, Frey S, Hunter CL, Trong HL, et al. (2000) Structural and functional definition of the human chitinase chitin-binding domain. *J Biol Chem* 275: 514-520.
45. Sakaguchi M, Matsushima Y, Nankumo T, Seino J, Miyakawa S, et al. (2014) Glucoamylase of *Caulobacter crescentus* CB15: cloning and expression in *Escherichia coli* and functional identification. *AMB Express* 4: 5.
46. Denoncin K, Collet JF (2013) Disulfide bond formation in the bacterial periplasm: major achievements and challenges ahead. *Antioxid Redox Signal* 19: 63-71.
47. Watanabe T, Kimura K, Sumiya T, Nikaidou N, Suzuki K, et al. (1997) Genetic analysis of the chitinase system of *Serratia marcescens* 2170. *J Bacteriol* 179: 7111-7117.
48. Suzuki K, Taiyoji M, Sugawara N, Nikaidou N, Henrissat B, et al. (1999) The third chitinase gene (*chiC*) of *Serratia marcescens* 2170 and the relationship of its product to other bacterial chitinases. *Biochem J* 343 Pt 3: 587-596.
49. Ohno M, Kida Y, Sakaguchi M, Sugahara Y, Oyama F (2014) Establishment of a quantitative PCR system for discriminating chitinase-like proteins: catalytically inactive breast regression protein-39 and *Yml1* are constitutive genes in mouse lung. *BMC Mol Biol* 15: 23.

50. Kageyama T (2002) Pepsinogens, progastricsins, and prochymosins: structure, function, evolution, and development. *Cell Mol Life Sci* 59: 288-306.
51. 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.
52. Kanneganti M, Kamba A, Mizoguchi E (2012) Role of chitotriosidase (chitinase 1) under normal and disease conditions. *J Epithel Biol Pharmacol* 5: 1-9.
53. Hussain M, Wilson JB (2013) New paralogues and revised time line in the expansion of the vertebrate GH18 family. *J Mol Evol* 76: 240-260.
54. Ober C, Chupp GL (2009) The chitinase and chitinase-like proteins: a review of genetic and functional studies in asthma and immune-mediated diseases. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 9: 401-408.
55. Eide KB, Norberg AL, Heggset EB, Lindbom AR, Varum KM, et al. (2012) Human chitotriosidase-catalyzed hydrolysis of chitosan. *Biochemistry* 51: 487-495.
56. Renkema GH, Boot RG, Au FL, Donker-Koopman WE, Strijland A, et al. (1998) Chitotriosidase, a chitinase, and the 39-kDa human cartilage glycoprotein, a chitin-binding lectin, are homologues of family 18 glycosyl hydrolases secreted by human macrophages. *Eur J Biochem* 251: 504-509.
57. Kashimura A, Kimura M, Okawa K, Suzuki H, Ukita A, , et al. (2015) Functional Properties of the Catalytic Domain of Mouse Acidic Mammalian Chitinase Expressed in *Escherichia coli*. *Int J Mol Sci* 16: 4028-4042.

謝辞

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

本学位論文の副査を担当していただき、適切なお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、坂口政吉講師に厚く感謝いたします。

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、石川晃太郎さん、木村将大さん、脇田悟誌さん、大野美紗さん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精神的にも経済的に援助してくれた両親には深く感謝します。