

博士学位論文

氏名(本籍)	上原 麻衣子 (神奈川県)
学位の種類	博士 (工学)
学位記番号	博甲 171 号
学位授与年月日	令和 4 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	カニクイザル酸性キチナーゼの酵素特性に関する 研究：キトオリゴ糖生産への応用

論文審査委員	主査 小山 文隆 教授
	副査 今村 保忠 教授
	副査 松野 研司 教授
	副査 澤村 直哉 教授 (早稲田大学)
	//
	//
	//

工学院大学大学院

博士学位論文

カニクイザル酸性キチナーゼの酵素特性に
関する研究：キトオリゴ糖生産への応用

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 bd19001

氏名 上原 麻衣子

指導教員 小山 文隆 教授

目次

第1章 序論.....	3
第1節 キチン.....	3
第2節 キチナーゼ.....	3
第3節 キトサン.....	4
第4節 キトオリゴ糖.....	4
第5節 カニクイザル.....	4
第6節 研究目的.....	5
第2章 カニクイザルにおけるキチナーゼの遺伝子発現解析.....	6
第1節 序論.....	6
第2節 実験材料と実験方法.....	6
RNAとcDNAの調製.....	6
Real-time PCR.....	6
標準DNAの作成.....	7
サル, マウス, ヒトの肺および胃の抽出液.....	10
キチナーゼ酵素活性.....	10
第3節 実験結果.....	10
カニクイザル組織におけるキチナーゼ遺伝子と対照遺伝子の mRNA レベル測定のための qPCR システム.....	10
カニクイザル組織における CHIT1 と CHIA の発現.....	11
肺と胃組織での CHIA と CHIT1 の mRNA レベル.....	11
サル, マウス, ヒト胃組織におけるキチナーゼ遺伝子と対照遺伝子 mRNA レベルの比較.....	13
サル, マウス, ヒト肺組織におけるキチナーゼ遺伝子と対照遺伝子 mRNA レベルの比較.....	13
サル, マウス, ヒトの胃および肺におけるキチナーゼ発現レベルとその活性.....	14
第4節 考察.....	16
第5節 要約.....	17
第3章 カニクイザル酸性キチナーゼの酵素化学的性質の解析.....	19
第1節 序論.....	19
第2節 実験材料と実験方法.....	19
大腸菌用発現ベクターの構築.....	19
サル CHIA とマウス Chia の調製.....	20
SDS PAGE とウエスタンブロッティング, SYPRO Ruby, ザイモグラフィーでの組換えタンパク質の解析およびタンパク質濃度の決定.....	20
キチナーゼ活性の測定.....	20

高分子キチンの分解.....	21
第3節 実験結果.....	21
大腸菌における組換え融合タンパク質の発現.....	21
サル CHIA の pH 依存性およびマウス Chia との比較.....	24
サル CHIA の温度依存性およびマウス Chia との比較.....	25
サル CHIA の pH 安定性.....	27
サル CHIA の温度安定性.....	27
サル CHIA とマウス Chia による高分子キチンの分解.....	28
第4節 考察.....	29
第5節 要約.....	30
第4章 カニクイザル酸性キチナーゼによるキチンおよびキトサンの分解.....	32
第1節 序論.....	32
第2節 実験材料と実験方法.....	32
大腸菌用発現ベクターの構築.....	32
組換えサル CHIA サルの調製と SDS PAGE とウエスタンブロッティングによる解析....	32
高分子キチンおよびキトサン基質の分解.....	32
第3節 実験結果.....	33
高温条件下におけるサル CHIA のキチン分解.....	33
サル CHIA によるキチン基質の分解.....	34
サル CHIA によるキトサン基質の分解.....	36
サル CHIA によりキチンおよびキトサンから生成されたキトオリゴ糖の比較.....	37
第4節 考察.....	39
第5節 要約.....	43
第5章 総合考察.....	44
第6章 結論.....	47
参考文献.....	48
謝辞.....	54

第1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。

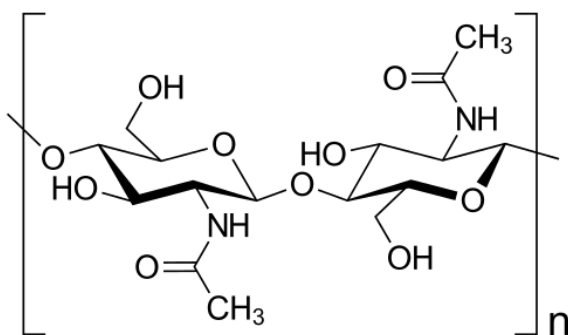


図 1.1. キチンの化学構造

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 chitinase, CHIA) の二種類の活性のあるキチナーゼを発現している [2,4-5]。配列の類似性に基づいて、CHIT1 と CHIA は糖質加水分解酵素ファミリー 18 (GH18) に属している [5-8]。GH18 の触媒作用に関わる保存配列は、DXXDXDXE で、E が触媒残基と考えられている [8]。

CHIT1 は、ほ乳類で最初に発見、精製され、クローニングされたキチナーゼである [9-10]。CHIA は、ほ乳類で二番目に発見された活性のあるキチナーゼで、CHIT1 の代償的な役割を果たす酵素と考えられている。CHIA は、「酸性側に等電点でもつ」ことにちなんで命名された [5,11]。

CHIA は病態生理学的状態において重要な役割を果たすと考えられている。CHIA の発現レベルは、喘息、アレルギー性炎症、ドライアイ症候群、胃がんなど、さまざまな疾患で著しく変化することが知られている [12-18]。さらに、CHIA の遺伝的変異がヒトの気管支喘息に関連することも報告されている [19-22]。Chia 欠損マウスを使用した研究では、ハウスダストの成分であるキチン含有生物 (酵母、カビ、ダニなど) のキチンが肺に蓄積し、肺線維症を

引き起こす。しかし、トランスジェニック技術で Chia を過剰発現すると、症状が起こらなかった。以上のことから、Chia が、環境由来のキチンを分解し、肺を保護していることが示されている [23]。さらに、CHIA は、宿主の消化管における胃腸線虫に対する防御免疫応答において重要な役割を果たすことも知られている [24]。

第3節 キトサン

キトサンは、D-グルコサミン (GlcN) と GlcNAc で構成される多糖類で、キチンの脱アセチル化誘導体である (図 1.2)。キトサンの脱アセチル化には二種類報告されている [25,26]。不均一に脱アセチル化されたキトサンは「ブロック型キトサン」、均一に脱アセチル化されたものは「ランダム型キトサン」と呼ばれる。調製法により、さまざまな GlcN/GlcNAc 比のキトサンがあり、それは脱アセチル化度 (DD, degree of deacetylation) で区別される。

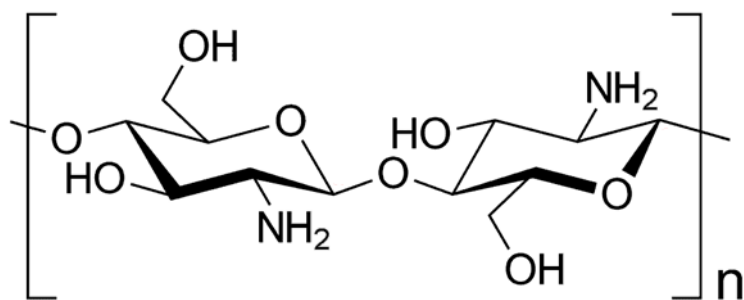


図 1.2. キトサンの化学構造

第4節 キトオリゴ糖

キトオリゴ糖は、キチンまたはキトサンからの分解生成物である。キトオリゴ糖は、抗腫瘍効果、抗炎症、抗菌などの生物活性を持っている [27-30]。一般に、キトオリゴ糖を得る主な方法は、化学的分解と酵素的加水分解である [31,32]。最近、キチナーゼとアセチル-グルコサミニダーゼの適用が工業的用途で議論されている [33-36]。最近、マウス Chia がランダム型キトサンからキトオリゴ糖を効率的に産生したことが報告されている [37]。

第5節 カニクイザル

サルは霊長類で、遺伝学的、生理学的にヒトと似ている。サルは、薬の安全性、効果を確認するために、医薬品開発の臨床試験の前段階の過程でよく使用される。カニクイザルは、生物医化学研究において、重要な非ヒト霊長類動物モデルの一つである [38]。カニクイザルは、人間の生息地でも生育できる霊長類である [39]。し

かし、カニクイザルにおける遺伝子および酵素を含む生物医化学的な情報の不足は、医薬品開発分野において利用する際に、大きな障害となっている [38,40]。

カニクイザルは、「カニクイザル」という名前の通り、カニを食糧とし、他にも、甲殻類や昆虫のようなキチン含有生物を食す。

第6節 研究目的

キチンは、自然界で二番目に多く存在する多糖であり、未利用のバイオマスである。ほ乳類キチナーゼは、疾患や生理現象に関連することから、注目を集めている。特に、CHIA 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 [12]。また、CHIA は、肺における正常機能維持のためのキチン分解酵素として [23]、消化器系における消化酵素として [19-22]、機能している。キチンとキトサンが分解されて、生成するキトオリゴ糖には生理活性報告されており、抗腫瘍効果、抗炎症、抗菌などの生理活性を持っている [27-30]。

カニクイザルは、非ヒト霊長類モデルであるにも関わらず、疾患や生理現象に関連するキチナーゼのデータを含む遺伝子および生物・医学的な研究は進んでいない [38,40]。また、カニクイザルは「カニ」を含むキチン含有生物を食糧とすることから、活性の高いキチナーゼを発現していることが期待される。

本研究では、カニクイザルにおけるほ乳類キチナーゼの遺伝子発現解析および酵素化学的性質を解析することを目的とし、研究を進めた。さらに、カニクイザル酸性キチナーゼの優れた性質を活かした応用利用について検討した。

第2章 カニクイザルにおけるキチナーゼの遺伝子発現解析

第1節 序論

本研究で利用した定量 real-time PCR (quantitative real-time PCR, qPCR) システムは、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標準 DNA を用いており、複数遺伝子間さらには種間の mRNA レベルを同じスケールで比較出来ることが特徴である [41,42]。本章では、カニクイザルにおけるキチナーゼの遺伝子発現解析を行った。次に、カニクイザルにおける遺伝子発現レベルを評価するため、得られた結果をマウスおよびヒトと比較した。

第2節 実験材料と実験方法

RNA と cDNA の調製

カニクイザル、マウス、ヒトの組織におけるキチナーゼ mRNA のレベルを検討するため、Monkey Total RNA Panel (Funakoshi 社), Mouse Total RNA Panel (Takara Bio 社), Human Total RNA Panel (Takara Bio 社) を使用した。本研究室の先行研究にしたがって、Total RNA を cDNA に逆転写した [41,42]。

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、酵素バッファー [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) で構成されている。この反応液を 60°C で 5 分間加熱し、37°C で 5 分間インキュベートした後、組換えマウス白血病ウイルス逆転写酵素 (MuLV-reverse transcriptase, Invitrogen 社) を加え、さらに 37°C で 45 分間インキュベートした。この逆転写反応は、95°C, 5 分間の加熱で停止した。

Real-time PCR

qPCR のためのサル、マウス、ヒト、それぞれのキチナーゼ、グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素 (GAPDH), Pepsinogen C (Pep C) のプライマーは PrimerQuest Input (Integrated DNA Technologies 社) を用いて設計し、合成は Eurofins Genomics 社に委託した。それらのプライマーを用いて PCR 増幅した産物が、一つの熱融解温度 (T_m 値) を示すかどうかに基づき評価した [41,42]。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。

qPCR 反応液は、2 x SYBR Green Master Mix [Brilliant II SYBR Green QPCR Master Mix] (Agilent 社), cDNA 4.95 ng または適切な濃度の標準 DNA の希釈液, 2.3 pmol のプライマーから構成され, 最終液量 13 μ l である。Mx3005P (Agilent 社) を用いて解析を行った。反応は, 95°C, 10 分で DNA の変性とポリメラーゼ活性化を行った後, 95°C を 30 秒, 55°C を 30 秒, 72°C を 10 秒で, PCR 反応を 40 サイクル行った。Real-time PCR のために選択したプライマーの塩基配列は, 表 2.1 に示した。

表 2.1. Real-time PCR プライマー の塩基配列

Gene	Forward primer	Reverse primer
Monkey CHIA	GCATCTCCACCATCCAATCT	CCAGTGTCTAGTCGGGTATTT
Monkey CHIT1	CACCTGGAATTGAGTCCCTAAG	GAAAGCCTGGGTAAAGGAAGA
Monkey Pep C	AGACCTTCTCCCTGCAGTAT	ATTCTCACTCAAGCCGAAGCTC
Monkey GAPDH	CTTTGGTATCGTGGAAGGACTC	AGTAGAGGCAGGGATGATGT
Mouse CHIA	TTTTGGCAGTGCATCAATGG	GCAGCAATTACAGCTGGTATCAA
Mouse Chit1	CGGCAGGAAGTAAATCTTCCAT	TGGGCGTGGCTCAGGTAT
Mouse Pep C	TGCCAAGGCATTGTAGACACA	CTCCTATGGTCTGCAGAAGTTCATT
Mouse GAPDH	TGTGTCCGTCGTGGATCTGA	CCTGCTTACCACCTTCTTGA
Human CHIA	CCCTAATCTCCACCCTGAAGAA	AGCTGGAGCCGTGCAACTT
Human CHIT1	GTCAACTCGGCCATCAGGTT	CAAGGTCAAGGCCGTCAAA
Human Pep C	TTCCCTCTGCCACCTTCCT	CGACTCCCACGGTGACAGTA
Human GAPDH	ATGGAAATCCCATCACCATCTT	CGCCCCACTTGATTTTGG

標準 DNA の作成

Krykbaev らは, カニクイザルの MACase (Macaca Acidic Chitinase) について報告した [40]。最近, MACase は, NCBI GenBank で, CHIA (accession number NM_001284548.1) として登録されている。qPCR による mRNA レベルの測定のために使用したサル標準 DNA (542 bases: 図 2.1) は, 以下のように構築した。

CHIA (GenBank accession number NM_001284548.1, nucleotides 560-707 of the CHIA cDNA), CHIT1 (GenBank accession number XM_005540484.1, nucleotides 1479-1626), Pep C (GenBank accession number XM_005553043.1, nucleotides 455-567), GAPDH (GenBank accession number XM_005569912.2, nucleotides 502-634) をコードする cDNA の増幅ターゲット領域を連結した標準 DNA を合成した (Eurofins Genomics 社)。この cDNA は, pTAKN-2 vector に挿入されていた。標準 DNA は, Fw プライマー 5'-CTTTGGTATCGTGGAAGGACTC-3' と Rv プライマー 5'-CCAGTGTCTAGTCGGGTATTT-3' を用いて, プラスミド DNA から KOD Plus DNA polymerase を使った PCR でプラスミド DNA から増幅し, 1% アガロースゲル電気泳

動で分離し、PCR clean up kit (Promega 社) で精製した。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。

サル-マウス-ヒトハイブリッド標準 DNA (1,086 bases: 図 2.2) は、以下のように構築した。カニクイザルの CHIA (前述), マウス CHIA (GenBank accession number NM_023186.3, nucleotides 1333-1413 of the mouse CHIA cDNA), マウス Chit1 (GenBank accession number NM_001284525.1, nucleotides 1402-1470), マウス Pep C (GenBank accession number NM_025973.3, nucleotides 887-968) そしてマウス GAPDH (GenBank accession number XM_001476707.5, nucleotides 766-842), ヒト CHIA (GenBank accession number NM_201653.3, nucleotides 1300-1361), ヒト CHIT1 (GenBank accession number NM_003465.2, nucleotides 454-508), ヒト Pep C (GenBank accession number NM_002630.3, nucleotides 1049-1109), ヒト GAPDH (GenBank accession number NM_001289746.1, nucleotides 383-439) をコードする cDNA の配列の増幅ターゲット領域を連結した標準 DNA を合成した (Eurofins Genomics 社)。この cDNA は、pTAKN-2 vector に挿入されていた。ハイブリッド標準 DNA は、Fw プライマー 5'-CTTTGGTATCGTGGAAGGACTC-3' と Rv プライマー 5'-AGCTGGAGCCGTGCAACTT-3' を使用して増幅し (表 2.3), カニクイザル標準 DNA と同様な方法で調整し、標準 DNA として使用した。

A



B

CTTTGGTATCGTGGAAGGACTCATGACCACAGTCCACGCCATCACTGCCACCCAGAAGACTGTGGATGGCCCCCTCCGGGAAACTGTGGCGTGATGGCCGCGGAGCTCTCCAGAACATCATCCCTGCCTCTACTAGACCTTCTCCCTGCAGTATGGCAGCGGCAGCCTCACCGGCTTCTTTGGCTACGACACCCTGACTGTCCAGAGCATCCAGGTCCCCAACAGGAGTTCGGCTTGAGTGAGAATCACCTGGAATTGAGTCCCTAAGGCCCCCTCCAGTCCCAGCTTCGAGGCTGGGCCCAGGATCACTCTACAGCCTGCCTCCTGCGGTTTCCCTGTGGGCTGTGATCTGGCTCCTGCAGGCCTCTCTGTGGTCTTCCTTTACCCAGGCTTTCGCATCTCCACCATCCAATCTTGGCTACGAGATCCCCAACTGTCGCAGTACCTGGACTACATCCATGTCATGACCTACGACCTCCATGGCCCCCTGGGAGGGCTACACAGGAGAGAACAGCCCCCTGTACAAATACCCGACTGACACTGG

図 2.1. サル標準 DNA の作成

(A) Real-time PCR で使用する標準 DNA の模式図。GAPDH, Pep C, CHIT1, CHIA のターゲット領域の cDNA 断片を連結した標準 DNA を合成した。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 542 塩基対で、PCR ターゲット領域をカバーする四つの cDNA 断片を含んでいる (異なる色で示した)。

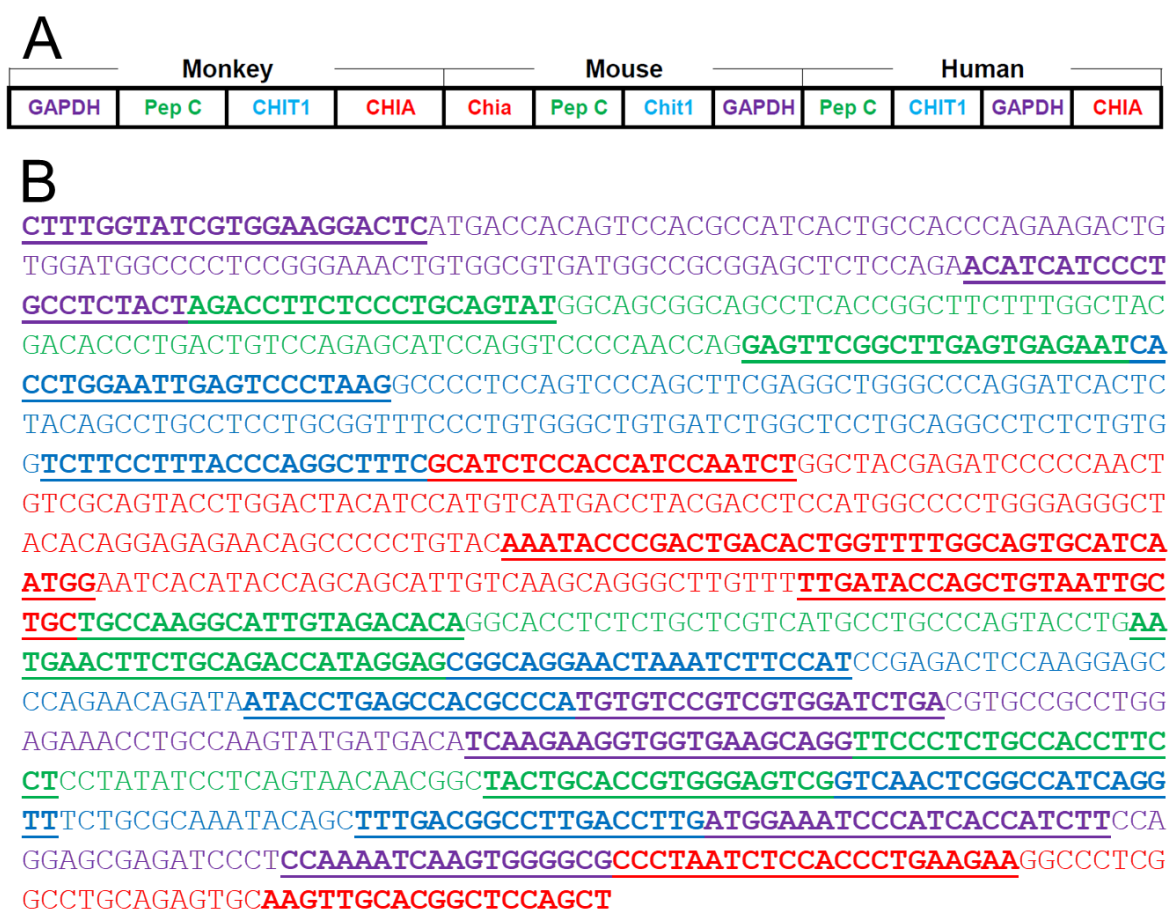


図 2.2. サル-マウス-ヒト ハイブリッド標準 DNA の作成

(A) Real-time PCR で使用したサル-マウス-ヒトのハイブリッド標準 DNA の模式図。サル，マウス，ヒトのターゲット領域の cDNA 断片を連結したハイブリッド標準 DNA を合成した。プラスミド DNA から直鎖化したハイブリッド標準 DNA を増幅し，標準 DNA として使用した。(B) ハイブリッド標準 DNA の塩基配列。このハイブリッド標準は DNA 1,086 塩基対で，それぞれ 12 種類の PCR ターゲット領域の cDNA 断片より構成されている (異なる色で示した)。

表 2.2. サル標準 DNA を作成するために用いたプライマーの塩基配列

Primer	Sequence
Quant_Monkey GAPDH_Fw	CTTTGGTATCGTGGAAGGACTC
Quant_Monkey CHIA_Rv	CCAGTGTCTAGTCGGGTATTT

表 2.3. ハイブリッド標準 DNA を作成するために用いたプライマーの塩基配列

Primer	Sequence
Quant_Monkey GAPDH_Fw	CTTTGGTATCGTGGAAGGACTC
Quant_Human CHIA_Rv	AGCTGGAGCCGTGCAACTT

サル、マウス、ヒトの肺および胃の抽出液

カニクイザル、マウス、ヒトの胃および肺の Total protein extract (タンパク質濃度 5 mg/mL) を Zyagen 社から購入し使用した。

キチナーゼ酵素活性

キチナーゼ活性は合成蛍光基質 4-methyl umbelliferyl β -D-N, N'-diacetyl chitobioside [4-MU-(GlcNAc)₂] (Sigma-Aldrich 社) を基質として用い、測定した。McIlvaine Buffer (0.1 M citric acid, 0.2 M Na₂HPO₄; pH 2.0 または pH 5.0) 中、37°C および 30 分間の条件で実験を行った。遊離した 4-methyl umbelliferon (4-MU) の蛍光はマイクロプレートリーダー GloMax (Promega 社) を用い、励起波長 365 nm; 蛍光波長 445 nm で測定した。

第3節 実験結果

カニクイザル組織におけるキチナーゼ遺伝子と対照遺伝子の mRNA レベル測定のための qPCR システム

本研究で私は、カニクイザルにおいて、CHIA と CHIT1 の遺伝子発現レベルを測定し、比較した (図 2.3)。当研究室の Ohno らは、同じスケールで、CHIA と CHIT1 の mRNA レベルを、対照遺伝子の mRNA レベルと比較できる qPCR システムを確立し、マウスとヒトにおいて両キチナーゼの mRNA レベルを測定している [41,42]。本研究では、CHIA と CHIT1 の mRNA レベルを評価するため、すべての細胞において高いレベルで発現している GAPDH を対照遺伝子として使用した [43]。さらに、ペプシンの前駆体である Pep C を胃における対照遺伝子として使用した [44]。

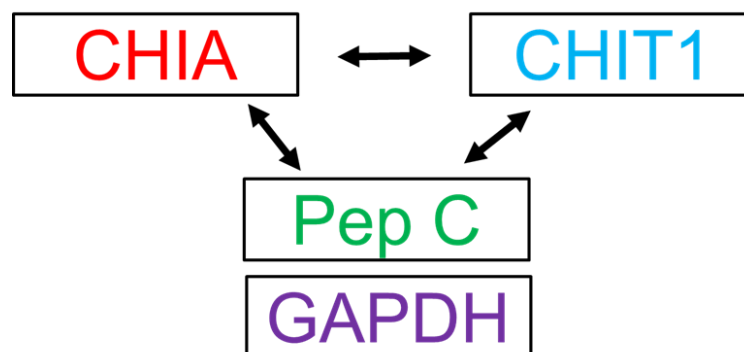


図 2.3. 四つの遺伝子発現レベルを比較するための研究方針

CHIA と CHIT1 の発現レベルの比較。GAPDH と Pep C を対照遺伝子として使用した (Pep C は胃のみ)。GAPDH は、ほぼすべての組織や細胞で常に高いレベルで発現しているハウスキーピング遺伝子である。Pep C は、胃粘膜の主要成分である。これら二つの対照遺伝子を用いて、カニクイザル組織での CHIA と CHIT1 の遺伝子発現レベルを評価した。

カニクイザル組織における CHIT1 と CHIA の発現

設計した標準 DNA を用いて、サルの組織から抽出された Total RNA を逆転写し、qPCR システムで解析し、Total RNA 10 ng あたりの分子数として、発現レベルを示した (図 2.4)。

CHIA mRNA は胃で高いレベルで検出された。次いで脳、脾臓、骨格筋で高かった (図 2.4.A)。CHIT1 mRNA レベルが 1 番高かったのは、肺であった。次いで脳、脾臓、胃、骨格筋で高かった (図 2.4.B)。その他の組織においても、CHIA と CHIT1 mRNA は、低いレベルではあったが、発現が検出された。

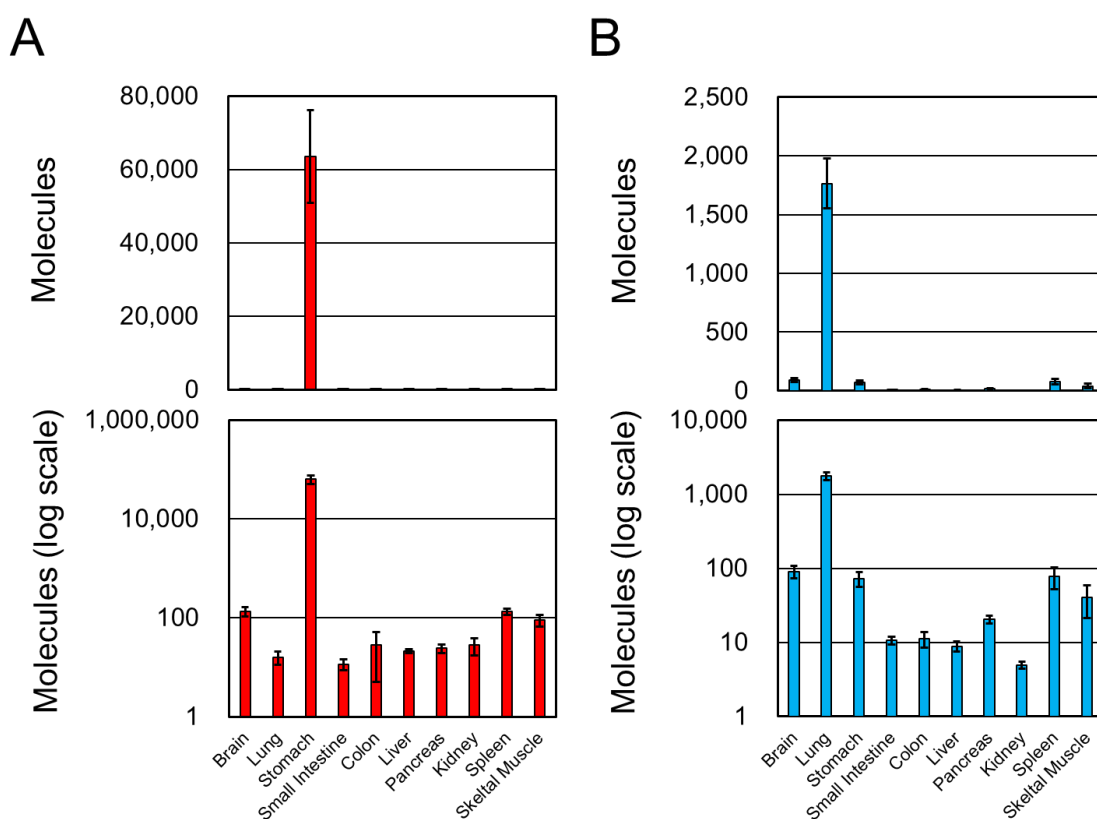


図 2.4. カニクイザル組織における CHIA と CHIT1 mRNA の発現

カニクイザル組織における CHIA (A) と CHIT1 (B) mRNA の定量。カニクイザル 10 組織における両キチナーゼ mRNA レベルは、カニクイザル標準 DNA を用いた qPCR を用いて測定した。得られたすべての値は、Total RNA 10 ng あたりの分子数で縦軸に表した。グラフの値は、三回測定した平均値で示した。上段は実測値、下段は log スケールである。

肺と胃組織での CHIA と CHIT1 の mRNA レベル

前述の通り、CHIA は胃で圧倒的に多く発現していて、CHIT1 mRNA は肺で高く発現していた (図 2.4)。多くのほ乳類キチナーゼに関わる病態生理学的な研究は、胃

と肺について行われている。従って、キチナーゼと対照遺伝子 (GAPDH, Pep C) の発現レベルを胃と肺において比較した。

カニクイザル胃組織において、GAPDH の発現レベルを 1.0 としたとき、それぞれ、CHIA は 9, CHIT1 は 0.01, Pep C は 40 となった (図 2.5.A)。CHIA の mRNA レベルは、Pep C には及ばないものの GAPDH よりも高いレベルで発現していた。

一方、肺においては、GAPDH の発現レベルを 1.0 としたとき、それぞれ、CHIA は 0.002, CHIT1 は 0.2 となった (図 2.5.B)。CHIT1 の mRNA レベルは GAPDH よりも低かったものの、ほとんどのカニクイザルの組織において発現している CHIA よりも高く発現していた。

これらの結果は、CHIA と CHIT1 がそれぞれ胃と肺において高いレベルに発現していることを示した。

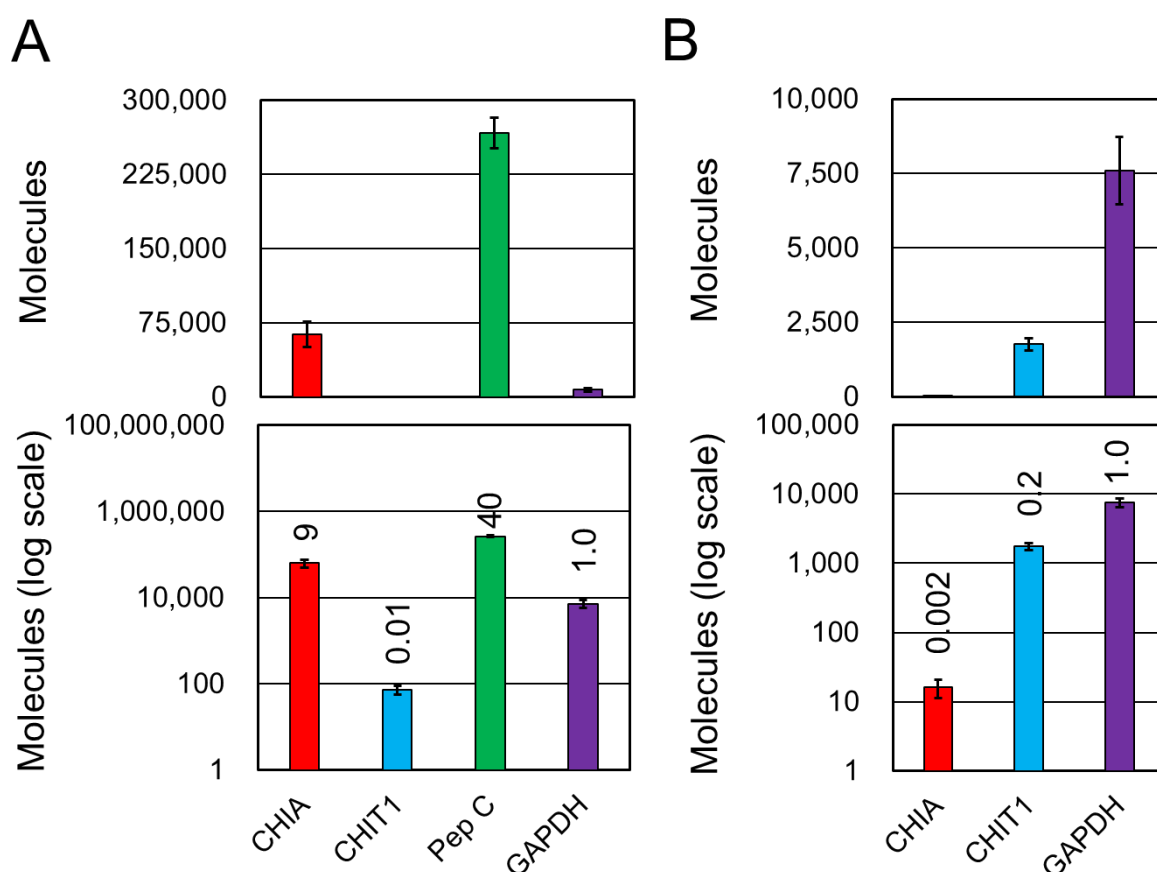


図 2.5. 肺と胃組織における CHIA と CHIT1 そして対照遺伝子 mRNA の分析

カニクイザルの胃 (A) と肺 (B) における、四つの遺伝子の発現レベルを測定した。得られたすべての値は、Total RNA 10 ng あたりの分子数で縦軸に表した。GAPDH の発現レベルを 1.0 としたとき、それぞれの遺伝子の相対発現レベルをバーの上に示した。グラフの値は、三回測定した平均値で示した。上段は実測値、下段は log スケール。

サル、マウス、ヒト胃組織におけるキチナーゼ遺伝子と対照遺伝子 mRNA レベルの比較

次に、サル、マウス、ヒトの胃と肺の遺伝子発現解析の種間比較を行った。サル-マウス-ヒトハイブリッド標準 DNA を用いて発現レベルの定量と比較を行った。胃組織の定量結果は、図 2.6 に示した。

CHIA, CHIT1 とともに、最も高い発現レベルを示したのはマウスであった。次いで、サル、ヒトであった。GAPDH mRNA 発現には、種間で大きな差はなかった。Pep C については、マウスで最も高く、次いで、サル、ヒトであった。GAPDH mRNA レベルを、1.0 としたとき、相対発現量はそれぞれ、マウス Chia は 20, サル CHIA は 9, ヒト CHIA は 0.007, マウス Chit1 は 0.07, サル CHIT1 は 0.01, ヒト CHIT1 は 0.002 であった (図 2.6)。サル、マウスの胃における CHIA の発現は、ヒトの胃より高かった。

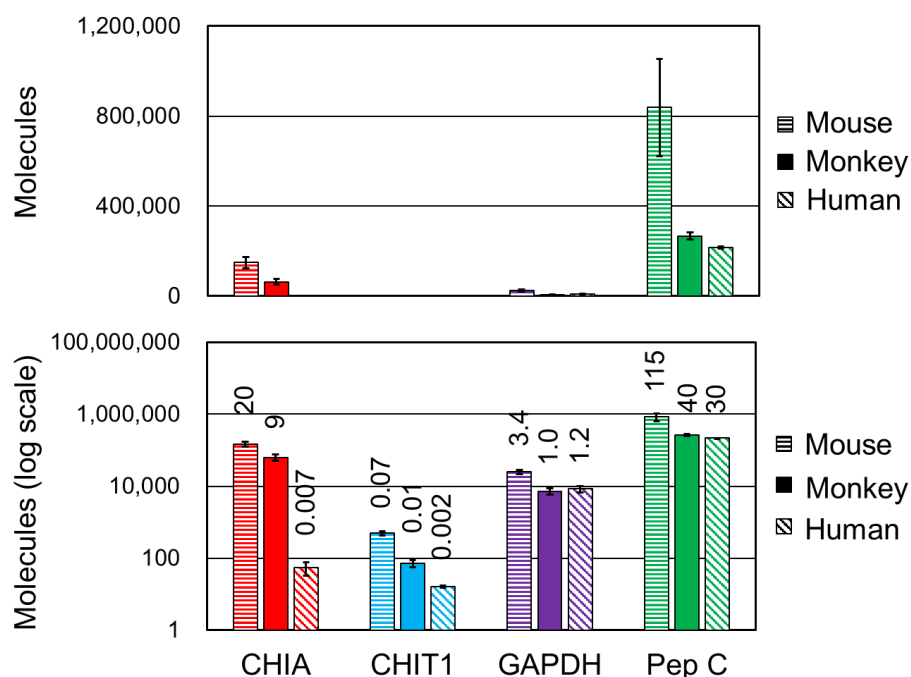


図 2.6. サル、マウス、ヒト胃組織での発現レベルの解析

CHIA, CHIT1, GAPDH, Pep C の発現レベルを測定した。ボーダーのバー: マウス組織, 塗りつぶしのバー: サル組織, 斜線のバー: ヒト組織。サル GAPDH の発現レベルを 1.0 とした。バーの上の数字はサル GAPDH と比較したときの相対発現レベルを示す。グラフの値は、三回測定した平均値で示した。上段は実測値, 下段は log スケール。

サル、マウス、ヒト肺組織におけるキチナーゼ遺伝子と対照遺伝子 mRNA レベルの比較

肺組織における定量データを 図 2.7 に示す。GAPDH mRNA 発現には、種間で大きな

な差はなかった。

GAPDH mRNA レベルを、1.0 としたとき、相対発現レベルはそれぞれ、マウス Chia は 0.2, サル CHIA は 0.002, ヒト CHIA は 0.006, マウス Chit1 は 0.02, マウス Chit1 は 0.2, ヒト CHIT1 は 0.01 であった (図 2.7)。CHIA の mRNA レベルはマウスが最も高く、次いでヒト, サルの順で高かった。CHIT1 mRNA レベルはマウスとヒトよりもサルで高かった。

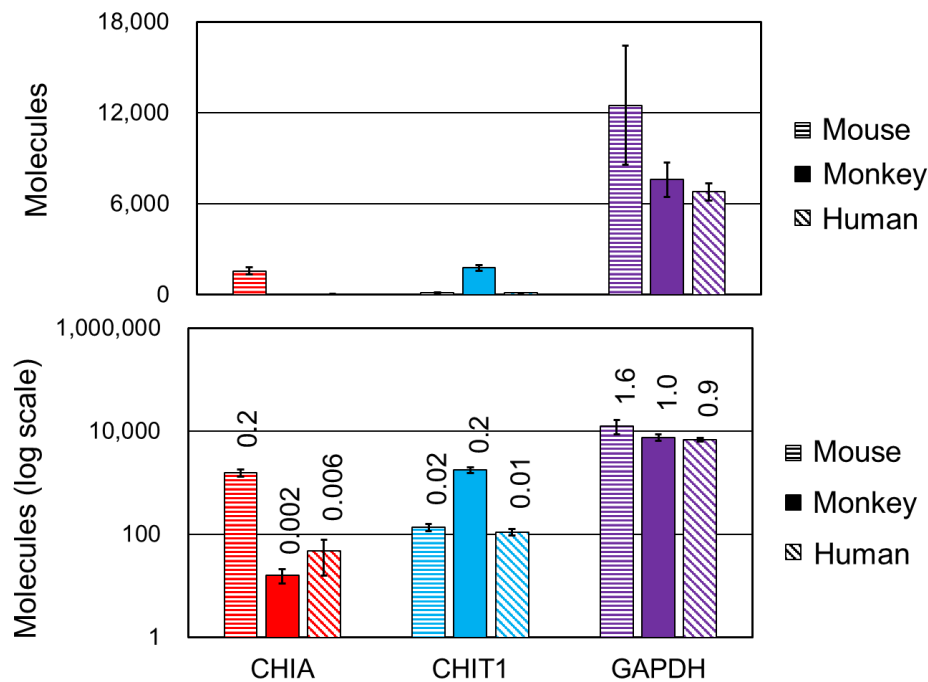


図 2.7. サル, マウス, ヒト肺組織での発現レベルの解析

CHIA, CHIT1, GAPDH の発現レベルを測定した。ボーダーのバー: マウス組織, 塗りつぶしのバー: サル組織, 斜線のバー: ヒト組織。サル GAPDH の発現レベルを 1.0 とした。バーの上の数字はサル GAPDH と比較したときの相対発現レベルを示す。グラフの値は, 三回測定した平均値で示した。上段は実測値, 下段は log スケール。

サル, マウス, ヒトの胃および肺におけるキチナーゼ発現レベルとその活性

次に, 合成基質 4-MU-(GlcNAc)₂ を用いて, タンパク質発現レベルとして, 胃および肺組織におけるキチナーゼ活性を測定した。この基質は, CHIA および CHIT1 両酵素により分解され, 蛍光物質 4-MU を遊離する。CHIA と CHIT1 で, キチナーゼ活性の pH 特性は異なる。マウス Chia は pH 2.0 で高い活性を示し [7,45], ヒト CHIA は pH 2.0-pH 5.0 で最大活性を示した [22,46]。マウスおよびヒト CHIT1 は, pH 5.0 付近で最も高い活性を示した [47,48]。CHIT1 とは対照的に, CHIA は pH 2.0 条件下でも活性保持する。これらの知見を参考に, 組織抽出液中の CHIA と CHIT1, 二つの酵素のキチナーゼ活性を区別した。

pH 2.0 条件下では、マウスとサルの胃抽出液から強力なキチナーゼ活性が検出されたが、ヒトの胃組織抽出液からは低い活性しか検出されなかった (図 2.8.A)。上述のように、CHIT1 は pH 2.0 で不活性であるため、これらキチナーゼ活性は CHIA に起因するものであると考えられる。pH 5.0 では、サルの胃抽出液のキチナーゼ活性がマウス胃抽出液よりも高かった。サルの CHIA は pH 5.0 で最も高い活性を示すことが報告されているため [12]、このデータは胃組織の CHIA mRNA レベルの結果と一致している (図 2.6)。

肺組織に関しては、pH 2.0 条件下でキチナーゼ活性はマウスで最も高く、続いてサルであったが、ヒトの肺からは検出されなかった。胃組織と同様に、これは CHIA によるキチナーゼ活性であると考えられる。予想通り、サルの肺では pH 5.0 でのキチナーゼ活性が pH 2.0 での活性よりも高く、pH 2.0 でのヒト肺抽出液の活性を上回っていた (図 2.8.B)。これらの結果は、肺組織抽出液のキチナーゼ活性レベルが肺組織の CHIT1 mRNA レベルと一致していることを示す (図 2.7)。

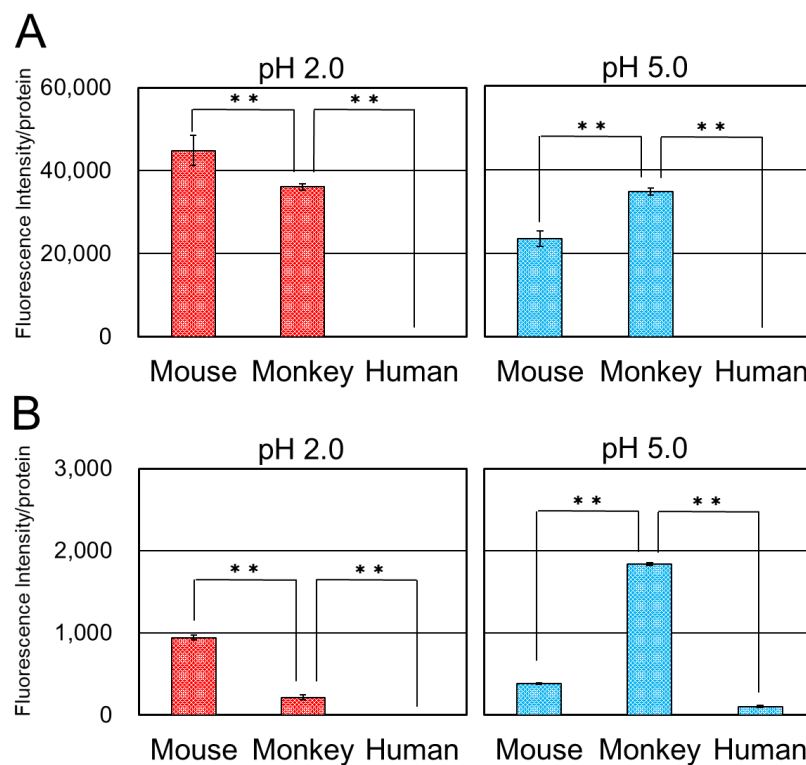


図 2.8. サル、マウス、ヒトの胃および肺組織におけるキチナーゼ活性

サル、マウス、ヒトの胃組織 (A) および肺組織 (B) 抽出液におけるキチナーゼ活性。合成蛍光基質 4-MU-(GlcNAc)₂ を使って活性を検出した。pH 2.0 と pH 5.0 でキチナーゼ活性を縦軸に示した。組織タンパク質 16 μ g あたりの活性を蛍光強度で示した。全てのグラフの値は、三回測定した平均値で示した。** $p < 0.01$

第4節 考察

カニクイザルは、生物・医学的研究において重要な非ヒト霊長類モデルである [38]。しかし、カニクイザルを含むサルにおける、キチナーゼの遺伝子発現解析をはじめとする詳細な生化学的解析はこれまで行われてこなかった。本章では、カニクイザルにおけるキチナーゼの遺伝子発現解析を行った。そして、サルにおける遺伝子発現レベルを評価するため、得られた結果をマウスおよびヒトと比較した。

CHIA mRNA は、主にカニクイザルの胃で発現していた (図 2.4.A)。その発現レベルは、GAPDH よりも高いレベルで発現し、胃粘膜の主成分である Pep C の発現レベルに匹敵していた。一方、サルの肺では、CHIT1 が GAPDH に近いレベルで発現していた。したがって、CHIA はサルの胃、CHIT1 はサルの肺における主要な転写産物であった (図 2.5.B)。

qPCR を用いて、サル-マウス-ヒト間で遺伝子発現解析を行った。マウスとサルの胃では大量に CHIA が発現されていたが、ヒトでは発現レベルが非常に低かった (図 2.6)。また、胃および肺組織抽出液中の酵素のキチナーゼ活性の測定を行ったところ、mRNA 発現レベルが反映されており、マウスおよびサルの胃からは強力なキチナーゼ活性を検出したが、ヒトの胃組織抽出液からは検出されなかった (図 2.8.A)。

マウスとブタとニワトリの Chia は、胃と腸でプロテアーゼ耐性を有した消化酵素として機能することが報告されている [45,49,50]。最近の研究では、昆虫を食べる動物において、CHIA の発現と昆虫摂取量に関連があることが示唆されている [51,52]。カニクイザルとマウスは雑食性の動物で、キチン含有生物を摂食する。

強いキチナーゼ活性は、pH 2.0 条件下においてマウスとサルの両方の胃で検出されたが、ヒトでは検出されなかった (図 2.8.A)。サル CHIA は pH 5.0 付近で最も活性が高いため [33]、サル胃抽出液中の活性は pH 5.0 のマウス胃抽出液よりも高かった。サルの胃の pH は、摂食後 pH 5.0 から pH 7.0 の間の中性範囲付近にシフトする [53]。カニクイザルの CHIA は、マウス、ブタ、トリ、マーモセットの Chia と同様に、胃で消化酵素として機能する可能性がある [45,49-50,54]。一方、ヒトの胃のキチナーゼ活性が低かったことから、摂食行動は CHIA の発現レベルに影響を与え、特定の生物のキチン消化率の決定に関与することが示唆されている [55]。

今回の研究では、肺ではサルとヒトの CHIA mRNA の発現パターンが類似しているのに対し、マウス CHIA mRNA レベルが両方の霊長類と比較して高いことを示した (図 2.7)。これらの結果から、CHIA は喘息を含む肺の疾患に関連していることが知られているため、この疾患の病状に関連する研究では、サルはマウスよりも有用な動物モデルになる可能性がある [19-22]。ただし、ヒトと比較してサル CHIA の 50 倍高い活性は、常に考慮する必要がある [40]。また、サルの肺抽出液から最も高いキチナーゼ活性が検出された (図 2.8.B)。これは、CHIT1 によるキチナーゼ活性であると考えられる。Chia は、マウスにおいて、気道に蓄積する環境由来のキチンの分解および線維化促進性サイトカインの発現の調節といった役割を果たすことが報告

されている [23]。サルの肺の CHIT1 は、マウスの肺の Chia と同様に、吸入真菌などのキチン含有生物に対する生物学的防御として機能している可能性がある。一方、ヒトにおいては肺におけるキチナーゼ活性が非常に低かった。生息環境の浮遊菌の量など衛生状態が、肺におけるキチナーゼ活性を利用した生体防御の有無に影響する可能性が考えられる。

カニクイザルはマウスとヒトの間に位置する。したがって、カニクイザルは、薬理学および病理学の分野で、マウスよりもヒトの状態をより再現するモデル動物として利用される。本研究結果では、CHIA と CHIT1 の遺伝子発現パターンは、サル、マウス、ヒトの間で異なることを明らかにした。これらのデータは、特定の疾患の実験をする際、動物モデルを選択するのに重要な情報である。

これらの結果は、特に、動物モデルを利用するヒトの病気に関連する病態生理学的研究において、キチナーゼの生物・医学的機能を理解する上でのヒントを提供する。カニクイザルのキチナーゼの機能を解明することは、薬剤開発や病態生理学的研究の進歩のためにも必要である。さらに、本章では、カニクイザル CHIA は胃で大量に発現していることが明らかになり、その活性が非常に強いことが示唆された。

第5節 要約

本章では、カニクイザルにおけるキチナーゼの遺伝子発現解析を行った。次に、サルにおける遺伝子発現レベルを客観的に評価するため、得られた結果をマウスおよびヒトと比較した。

まず、キチナーゼ遺伝子が高いレベルで発現している組織を特定するために、カニクイザル主要 10 組織におけるキチナーゼの mRNA レベルを、qPCR システムを用いて解析した。CHIA は胃で、CHIT1 は肺で特異的に発現しており、CHIA mRNA はカニクイザルの胃において主要な転写物であることが分かった。

次に、カニクイザルの胃における CHIA mRNA の発現レベルを評価するために、サル、マウス、ヒトでの遺伝子発現レベルの種間比較を行った。カニクイザルの胃における CHIA mRNA レベルは、マウスの胃における Chia の発現レベルに匹敵していた。このことから、カニクイザルは胃で CHIA を大量に発現していると判断した。

さらに、カニクイザルの胃における CHIA mRNA の高い発現レベルが、タンパク質レベルでも認められるかどうかを検討した。サル、マウス、ヒトの胃組織および肺組織抽出液のキチナーゼ活性を測定した。その結果、キチナーゼ mRNA レベルの種間差は、基本的に、キチナーゼ活性レベルの差に反映されていた。また、CHIA が大量に発現していたカニクイザルの胃組織から非常に強いキチナーゼ活性が検出された。

これらのことから、カニクイザル CHIA は強いキチナーゼ活性を有する可能性が強く示唆された。

第3章 カニクイザル酸性キチナーゼの酵素化学的性質の解析

第1節 序論

CHIA は、喘息を含めた炎症性の疾患に関連することが知られている [12-22]。CHIA 欠損マウスを使用した研究では、CHIA が環境由来のキチン含有生物から肺を保護することが示されている [23]。当研究室では、マウス、ニワトリ、ブタ、マーモセットの CHIA がそれぞれの消化器系における主要なプロテアーゼ耐性をもった消化酵素であることを明らかにした [45,49-50,54]。さらに、雑食性動物においては、CHIA は発現も高く活性が低いことを報告されている [55]。第2章では、カニクイザルにおいて CHIA が胃組織で大量に発現しており、その活性が強いことが示唆された。本章では、カニクイザル CHIA を組換えタンパク質として大腸菌で発現し、よく研究されているマウス Chia と比較し、酵素化学的性質を詳細に調べた。

第2節 実験材料と実験方法

大腸菌用発現ベクターの構築

サルまたはマウスの胃の Total RNA を使用し、Ohno らが報告した方法で逆転写し、cDNA を調製した [56,57]。カニクイザル CHIA およびマウス Chia の cDNA のコード領域を、KOD Plus DNA ポリメラーゼ (Toyobo 社) および BamHI または XhoI の制限部位を付加したオリゴヌクレオチドプライマー (Eurofins Genomics 社) (表 3.1) を用いて PCR 法で増幅した。PCR 産物は Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega 社) を用いて精製し、BamHI および XhoI で制限酵素処理した後、T4 DNA リガーゼ (Toyobo 社) を使用して、pEZZ18/pre-ProteinA-mouse Chia-V5-His と同様な部位にクローニングした [57]。得られたプラスミド DNA の完全長の塩基配列は、シーケンス (Eurofins Genomics 社) により確認した。プラスミド DNA で大腸菌細胞 DH-5α (Toyobo 社) を形質転換し、pre-ProteinA- monkey CHIA or mouse Chia-V5-His を取得した。

表 3.1. サル CHIA およびマウス Chia 発現ベクターの構築に用いたプライマー

Primer	Sequence
Monkey CHIA BamHI Fw	CGCGGAACCCGGATCCGTACCAGCTGACATGCTACTTCTCCA
Monkey CHIA XhoI Rv	GTGACCTCGAGCCCAGCTGCAGCAGGAGCAGGAGGCT
Mouse Chia EcoRI Fw	CATGGAATTCGTACAATCTGATATGCTATTTTACC
Mouse Chia SalI_BGH Rv	AGGGGTCGACTAGAAAGGCACAGTCGAGGCTGATCA

サル CHIA とマウス Chia の調製

プラスミド DNA (pEZZ18/pre-ProteinA-CHIA-V5-His) で、形質転換された大腸菌 BL21 [DE3] (Merck Millipore 社) で、pre-Protein A-monkey CHIA-V5-His または pre-Protein A-mouse Chia-V5-His を発現させた。形質転換された大腸菌 BL21/DE3 (Novagen 社) は、100 µg/mL アンピシリンを含む LB 培地 3 L で、37°C、18 時間培養した。大腸菌を 4°C で 20 分間、7,000 µg で遠心分離して回収した。プロテアーゼ阻害剤 (Complete, Roche 社) を含む TS buffer [20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl 溶液 (pH 7.6)] 20 mL に懸濁し、氷上で 10 分間、超音波処理で破碎した。この大腸菌破碎液を 15,000 x g で、4°C、20 分間遠心分離し、その上清を回収した。回収した可溶性画分 (上清) 中の組換えタンパク質を、IgG セファロースカラム (GE Healthcare 社) に供した [57]。タンパク質含有画分は、TS buffer で平衡化した PD MidiTrap G-25 (GE Healthcare 社) を使用して脱塩した。

SDS PAGE とウエスタンブロッティング、SYPRO Ruby, ザイモグラフィーでの組換えタンパク質の解析およびタンパク質濃度の決定

取得したサル CHIA とマウス Chia は、Standard SDS-polyacrylamide gel electrophoresis [PAGE], ウエスタンブロッティングを用いて解析した。分子量マーカーとして All Blue molecular weight marker All Blue molecular weight marker (Bio Rad 社) を使用した。分離されたタンパク質を polyvinylidene fluoride [PVDF] membrane (Merck Millipore 社) に転写し、V5-HRP モノクローナル抗体 (Invitrogen 社) でプローブした。発光イメージアナライザー [ImageQuant LAS 4000] (GE Healthcare 社) を使用して分析および定量した。

また、SYPRO Ruby 染色 (Thermo Fisher Scientific 社) を行った。取得した組換えタンパク質の濃度は、標準物質にウシ血清アルブミンを用いたブラッドフォード法に基づいたタンパク質アッセイ (Bio-Rad 社) により決定した。

さらに、0.1% エチレンジグリコールキチン (Wako 社) を含んだ SDS-PAGE ゲルを用いてザイモグラフィー分析を行った。サンプルは、SDS 添加および熱変性をせずにロードした。電気泳動後、先行研究の手順に従い、Calcofluor white M2R (Sigma-Aldrich 社) を使用してゲルを染色した [30]。ゲルは、発光イメージアナライザーを使用して分析した。

キチナーゼ活性の測定

4-nitrophenyl *N,N'*-diacetyl-β-D-chitobioside [4NP-(GlcNAc)₂] (Sigma-Aldrich 社) を 200 µM の濃度で使用して、先行研究と同様な方法で、キチナーゼ活性を測定した [57]。それぞれの反応は、三回行った。サル CHIA およびマウス Chia の酵素反応は、Gly-HCl buffer (pH 1.0-pH 3.0) または McIlvaine buffer (0.1µM クエン酸, 0.2 µM

Na₂HPO₄; pH 2.0-pH 8.0) 中および 30°C -70°C 条件下で、1 時間インキュベートし測定した。放出された 4-Nitrophenol (4-NP) の吸光度を 405 nm で測定した。4-NP のモル吸光係数を 17,700 M⁻¹cm⁻¹ とし、酵素ユニット (U) は、各 pH, 37°C 条件下で 1 分あたりに 4-NP-(GlcNAc)₂ から遊離した 1 μmol の 4-NP として定義した。

pH 安定性を評価するために、0°C, 37°C, 65°C で、0.1 M Gly-HCl buffer (pH 1.0-pH 3.0) と McIlvaine buffer (pH 2.0-pH 8.0) 条件下で、サル CHIA を 1 時間インキュベートした。上記の通りインキュベーションした後、pH 5.0 (McIlvaine buffer) で残存活性を測定した。

熱安定性の評価では、McIlvaine buffer 中 (pH 5.0) で、30°C-70°C で、サル CHIA を 30 分間インキュベートした。氷冷した後、上述のように pH 5.0 (McIlvaine buffer) で残存活性を測定した。

高分子キチンの分解

基質として P-キチン [P-CHITN] (megazyme 社) を使用した。すべての酵素反応は、pH 2.0, pH 5.0, pH 7.0 条件下、サル CHIA と基質を含む全量 50 μL でインキュベートした。基質の終濃度は、1 mg/reaction である。緩衝液、基質を含む反応液に各酵素を添加することで反応を開始し、反応液を 37°C, 50°C, 65°C で 1 時間インキュベートした。分解産物は先行研究の手順に従い [58], 蛍光標識法を用いた糖電気泳動法 [FACE] により標識および分離した。酵素反応液に 5 μL の酢酸を加え、還元末端を fluorophore 8-aminonaphthalene-1,3,6-trisulphonic acid [ANTS] (Sigma-Aldrich 社) で共有結合的に標識した。PAGE によって分離し、生じた蛍光誘導物質を蛍光イメージャーで解析した。標準物質として、N-acetyl chitooligoaccharides (Seikagaku 社) を使用した。

第 3 節 実験結果

大腸菌における組換え融合タンパク質の発現

大腸菌で pEZZ18 システムを使用して融合タンパク質 (Protein A-mouse Chia-V5-His) としてマウス Chia を調製したことは以前に報告されている [57]。本研究では、同じ手法でカニクイザル CHIA を発現した (図 3.1 および 図 3.2.A)。Protein A-monkey CHIA-V5-His および Protein A-mouse Chia-V5-His の推定サイズはともに 68 kDa である。

組換えサル CHIA およびマウス Chia 酵素を SDS-PAGE で分析した後、V5-HRP モノクローナル抗体を使用してウェスタンブロッティングを行った。その結果、タンパク質はそれぞれ約 68 および 55 kDa のメジャーバンドとマイナーバンドとして検出された (図 3.2.B)。両者のバンド強度はサル CHIA とマウス Chia の間で等しく (図 3.3), ザイモグラフィーではそれらすべてがキチナーゼ活性を有することを明らかに

した (図 3.2.C)。これは、得られたタンパク質サンプルが、完全長 (68 kDa) およびトランケートされたタンパク質 (55 kDa) 両方を含むことを示す。

また、SYPRO Ruby で染色し (図 3.2.D)、発現したサル CHIA およびマウス Chia に含まれるウエスタンブロッティングで検出されないバンドを検出した。上述のとおり、キチナーゼ活性を有する約 55 kDa のバンドは、トランケートされた CHIA と見なした。また SYPRO Ruby 染色により検出された 55 kDa 付近のバンドは、キチナーゼ活性のない CHIA とは無関係のタンパク質を含んでいた可能性が考えられる。IgG セファロースに供し、Protein A-monkey CHIA-V5-His および Protein A-mouse Chia-V5-His を取得した後、陰イオン交換クロマトグラフィーに供し、組換えタンパク質のさらなる精製を試みた。しかし、タンパク質の収量が著しく減少したにも関わらず、混入したタンパク質は依然認められた。この研究では、サル CHIA およびマウス Chia は、混合タンパク質として調製された標品を使用した。

Protein A-Monkey CHIA-V5-His 617 amino acids, 68,488 dalton

AQHDEAVDNKFNKEQQNAFYIELHLPNLNNEEQRNAFIQSLKDDPSQSANLLAEAKKLNDQA
PKVDNKFNKEQQNAFYIELHLPNLNNEEQRNAFIQSLKDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPKVD
ANSSSVPGDPYQLTCYFSNWAQYRPGGLGRFMPDDIDPCLCTHLIYAFAGMQNNKITTIEWND
VTLYQAFNGLKNKNSQLKTLLAIGGWNFGTAPFTAMVSTPANRQTFINSVIEFLRQYEFDGL
DFDWEYPGSRGSPSQDKHLFTVLVQETREAFEQEAKQSNKPRLLVTAAVAAGISTIQSGYEI
PQLSQYLDYIHVMTYDLHGPEWEGYTGENSPYKYPTDTGSNAYLNVDYAINYWKNNGAPAEEK
LIVGFPAYGHTFLLSNPSDHGIGAPTTGPGPAGPYTRESGFWAYYEICTFLKNGATEVWEAN
EDVPYAYKGNELGYDNTKSFQIKADWLKKNFGGAMVWAIIDDDFTGTFCEGKFPLITTL
KDALGLQSTSCKAPAPITPITEAPVTGVSVSHSGSSGGSPDSEFCANKANGLYPDPTDKNA
FYNCANGKTFIQHCQAGLVFEASCCSWARGHPFEGKPIPNPLLGLDSTRTGHHHHHH

Protein A-Mouse Chia-V5-His 609 amino acids, 67,629 dalton

AQHDEAVDNKFNKEQQNAFYIELHLPNLNNEEQRNAFIQSLKDDPSQSANLLAEAKKLNDQA
PKVDNKFNKEQQNAFYIELHLPNLNNEEQRNAFIQSLKDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPKVD
ANSYNLICFYFTNWAQYRPGGLGSFKPDDINPCLCTHLIYAFAGMQNNEITTIEWNDVTLYKAF
NDLKNRNSKLKTLLAIGGWNFGTAPFTTMVSTSQNRQTFITSVIKFLRQYGFDDGLDLWEYP
GSRGSPQDKHLFTVLVKEMREAFEQEAIENRPRMLVTAAVAGGISNIQAGYEIPELSKYL
DFIHVMTYDLHGSEWEGYTGENSPYKYPTETGSNAYLNVDYVMNYWKNNGAPAEEKLIVGFPE
YGHTFILRNPSDNGIGAPTSGDGPAGPYTRQAGFWAYYEICTFLRSGATEVWDASQEVYAY
KANEWLGYDNIKSFVKAQWLKQNNFGGAMIWAIIDDDFTGSFCDQGKFPLTSTLNKALGIS
TEGCTAPDVPSEPVTTTPPGSGSGGGSSGGSSGGSGFCADKADGLYPVADDRNAFWQCINGIT
YQQHCQAGLVFDTSNCNCNWPARGHPFEGKPIPNPLLGLDSTRTGHHHHHH

図 3.1. 発現した組換えサル CHIA と組換えマウス Chia の推定アミノ酸配列と分子量
アミノ酸配列は、図 3.2. の模式図と同じ色を使用した。ここでは、Protein A のシグナル配列が除去された成熟タンパク質の推定アミノ酸配列を示した。黄色が Protein A、ピンクがサル CHIA、オレンジがマウス Chia、緑が V5- エピトープと His tag の配列である。

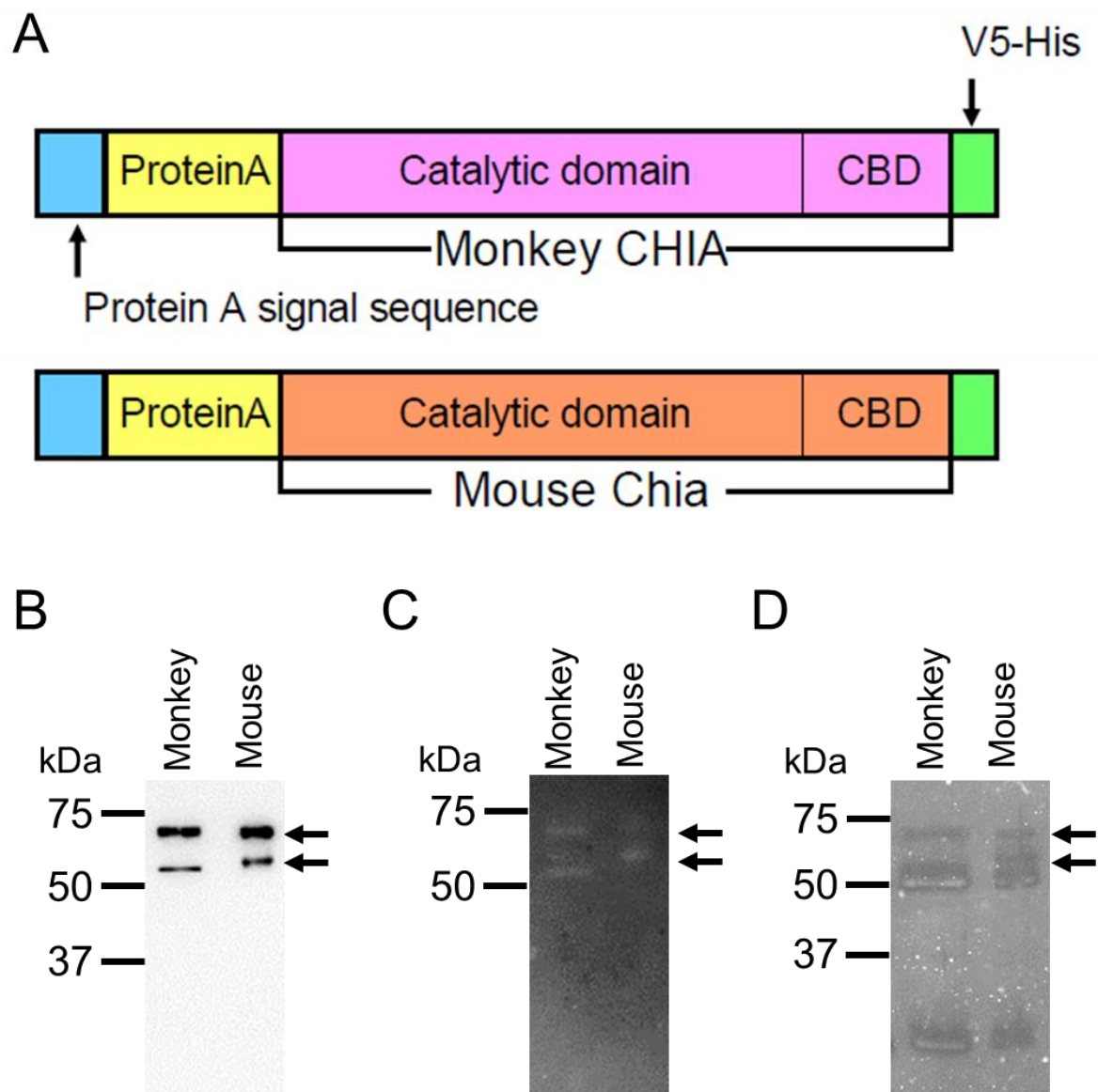


図 3.2. 大腸菌における組換えサル CHIA とマウス Chia の発現

(A) 模式図は、大腸菌で発現したサル CHIA とマウス Chia の組換え融合タンパク質を表す(Protein A-monkey CHIA or mouse Chia-V5-His)。Protein A-monkey CHIA or mouse Chia-V5-His の推定分子サイズは 68 kDa である。(B) Anti-V5 抗体を使用したウェスタンブロッティングによる組換えタンパク質の分析。(C) サル CHIA およびマウス Chia のザイモグラム。(D) SYPRO Ruby 染色。

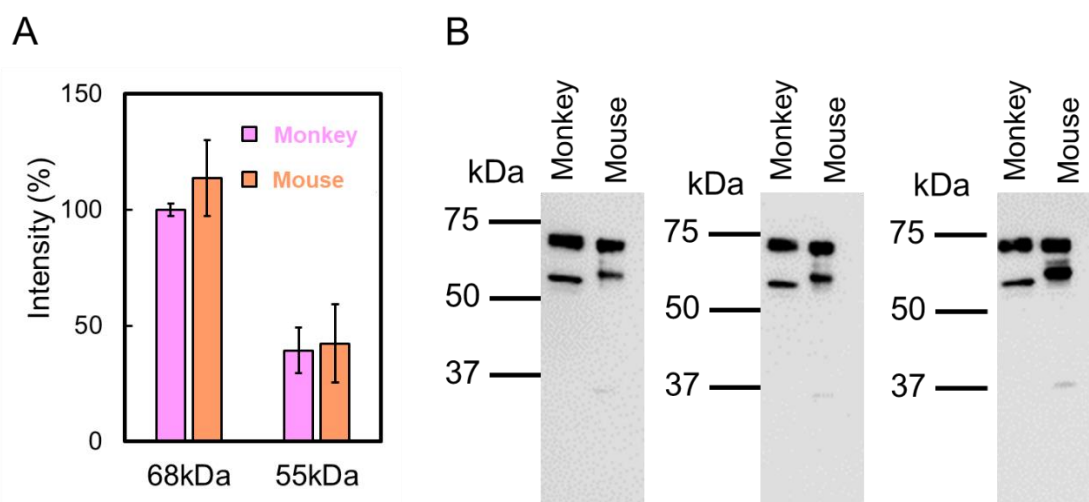


図 3.3. タンパク質の定量 (図 3.2.B. に関連)

組換えサル CHIA およびマウス Chia を SDS-PAGE で分離し、図 3.2.B. のとおり、ウエスタンブロットティングで解析した。定量結果は、68kDa のサル CHIA のシグナル強度は 100% に設定し、相対値で示した。グラフの値は、三回測定した平均値で示した。(A) は定量結果、(B) は定量したウエスタンブロットティングの結果を示す。

サル CHIA の pH 依存性およびマウス Chia との比較

大腸菌で発現したサル CHIA の機能を理解するために、まず、合成発色基質の 4-NP-(GlcNAc)₂ を使用して、キチナーゼ活性を明らかにした。0.1 M Gly-HCl (pH 1.0-3.0) または McIlvaine buffer (pH 2.0-8.0) 中のそれぞれの pH 条件下で、37°C、60 分間、反応させた。サル CHIA およびマウス CHIA は、それぞれ濃度が 33 ng/μL および 36 ng/μL のものを使用した。

最大活性は pH 5.0 で検出され、pH 1.0-pH 6.0 条件下で非常に高いキチナーゼ活性を示し、pH 7.0 でも活性を保持していた (図 3.4.A)。pH 5.0 におけるサル CHIA のキチナーゼ活性レベルを 100% としたとき、pH 2.0 (Gly-HCl)、pH 2.0 (McIlvaine)、および pH 7.0 (McIlvaine) それぞれのキチナーゼ活性レベルは、62%、52%、31% であった。また、大腸菌組換えサル CHIA は、カンクイザルの胃組織抽出液中の天然酵素と非常によく似た特性を有していた [56]。

マウス Chia と比較したとき、サル CHIA はすべての条件下でより高い活性を示した。サル CHIA (pH 5.0) とマウス Chia (pH 2.0) の最大活性には 3 倍の違いがあり、pH 5.0 におけるサル CHIA の活性は 182 U/μg、pH 2.0 におけるマウス Chia の活性は 58 U/μg であった (図 3.4.B)。さらに、サル CHIA は、マウス Chia よりも、pH 2.0、pH 5.0、pH 7.0 でそれぞれ、2 倍、16 倍、10 倍活性が高かった。したがって、サル CHIA のキチナーゼ活性は、これまでに報告された他の動物の CHIA とは異なる [45,49-50,54-56]。また、活性の強さは大きく異なるが、pH 依存性の特徴はヒト CHIA とかなり類似していた [22,40,46]。

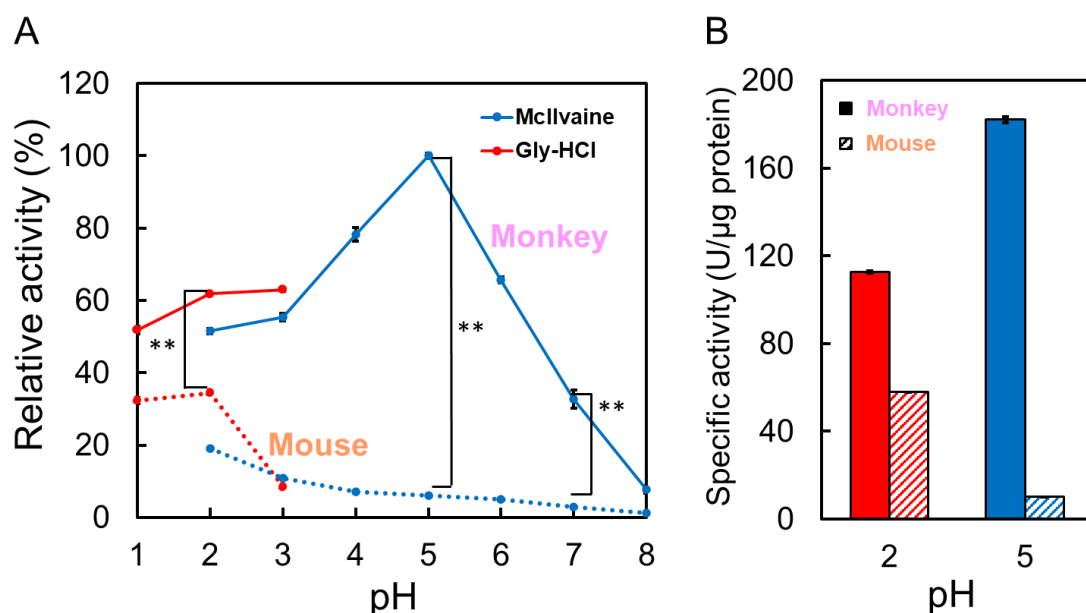


図 3.4. サル CHIA の至適 pH およびマウス Chia との比較

サル CHIA とマウス Chia のキチナーゼ活性は、4-NP-(GlcNAc)₂ を用いて測定した。実線: サル CHIA, 点線: マウス Chia。キチナーゼ活性は、Gly-HCl buffer (pH 1.0-pH 3.0) または McIlvaine buffer (pH 2.0-pH 8.0) を用いて、37°C, 60 分の条件で、測定した (A)。赤: Gly-HCl buffer, 青: McIlvaine buffer。pH 5.0 でのサル CHIA 活性レベルを 100% に設定した場合の相対活性を示した。(B) 比活性を示し、両酵素の至適 pH 条件 (pH 5.0: サル CHIA, pH 2.0: マウス Chia) で、サル CHIA とマウス Chia を比較した。キチナーゼ活性は、ブランク補正した。グラフの値は、三回測定した平均値で示した。** $p < 0.01$ 。

サル CHIA の温度依存性およびマウス Chia との比較

酵素活性に対する温度の影響を明らかにするために、pH 2.0, pH 5.0, pH 7.0 (McIlvaine buffer), 60 分間、30°C-80°C でキチナーゼ活性を測定した。結果は、65°C, pH 5.0 条件下でのサル CHIA の活性を 100% としたときの相対活性を示す。

pH 2.0 条件下で、サル CHIA は、55°C で最も活性が高かった (図 3.5.A)。pH 5.0 では、温度が上昇するとともにサル CHIA の酵素活性も上昇し、65°C で最大に達した後、その後徐々に低下した (図 3.5.B)。pH 7.0 では、37°C でもっとも活性が高かった (図 3.5.C)。サル CHIA とマウス Chia の温度依存性のより詳細な特徴を図 3.6 に示した。pH 2.0 では、サル CHIA は 65°C で高い活性を示したが、マウス Chia は 60°C から活性が著しく低下した。pH 5.0 では、最大活性と比較して、サル CHIA は 70°C (約 80%) でも高い活性を維持した。pH 7.0 では、サル CHIA の活性は 50°C から低下したが、マウス Chia は 50°C でもその活性を保持していた。

このように、サル CHIA 活性は高温条件下で特に強かった。このサル CHIA の活性をマウス Chia と比較したところ、カンクイザル CHIA は、pH 2.0, pH 5.0, pH 7.0 のすべての温度条件下でマウス Chia よりも活性が高かった。

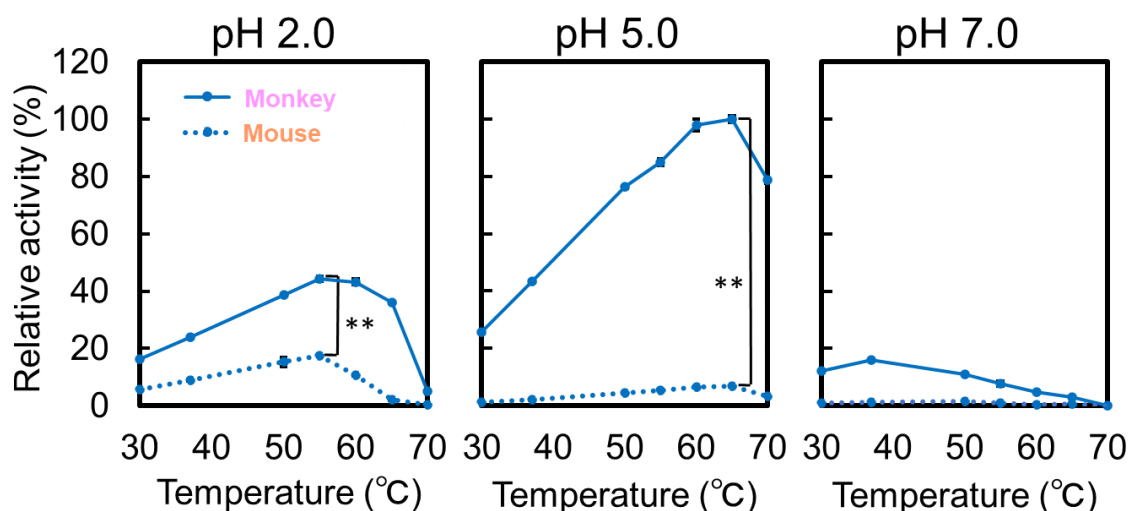


図 3.5. サル CHIA の至適温度およびマウス Chia との比較

pH 2.0, pH 5.0, pH 7.0 における至適温度。実線: サル CHIA, 点線: マウス Chia。キチナーゼ活性は, McIlvaine buffer を用いて, 60 分間, 30°C -80°C の条件で, 測定した。キチナーゼ活性は, pH 5.0, 65°C でのサル CHIA 活性レベルを 100% に設定した場合の相対活性を示しており, ブランク補正した。グラフの値は, 三回測定した平均値で示した。** $p < 0.01$ 。

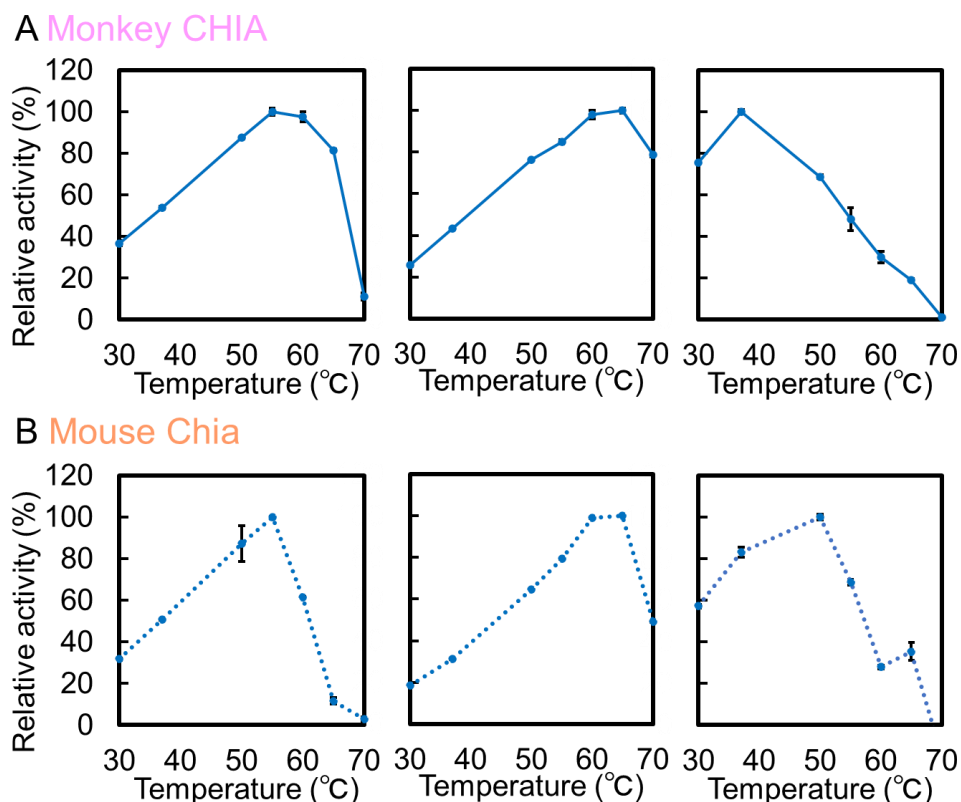


図 3.6. Monkey CHIA と Mouse Chia の至適温度

(A) Monkey CHIA: 実線, (B) Mouse Chia: 点線。各 pH 条件下での Monkey CHIA または Mouse Chia の最大活性をそれぞれ 100% に設定したときの相対活性で示した。

サル CHIA の pH 安定性

次に、サル CHIA の pH 安定性を解析した。組換え CHIA は、buffer (Gly-HCl buffer, McIlvaine buffer) を用いてさまざまな pH 条件下で 60 分間、0°C、37°C、65°C でインキュベートした。インキュベーションした後、酵素活性を 37°C、pH 5.0、60 分の条件でキチナーゼ活性を測定した。それぞれの活性は、実験で最も高い残存活性を 100% としたときの相対値で示した。図 3.7.左 に示すように、サルの CHIA は酸と塩基への耐性を示した。サル CHIA は、0°C での広い pH 条件下 (pH 1.0-pH 8.0) における 1 時間のプレインキュベーションで安定であり、キチナーゼ活性の減少はみられなかった。

一方、37°C では、酸と中性 (pH 1.0-pH 7.0) で安定であった (図 3.7.中央)。65°C では、サル CHIA は強酸 (pH 1.0-pH 2.0) で失活したが、pH 3.0 条件下では、失活しなかった (図 3.7 右)。したがって、大腸菌で発現させたサル CHIA は、酸性条件下で強力な安定性を持つことが分かった。

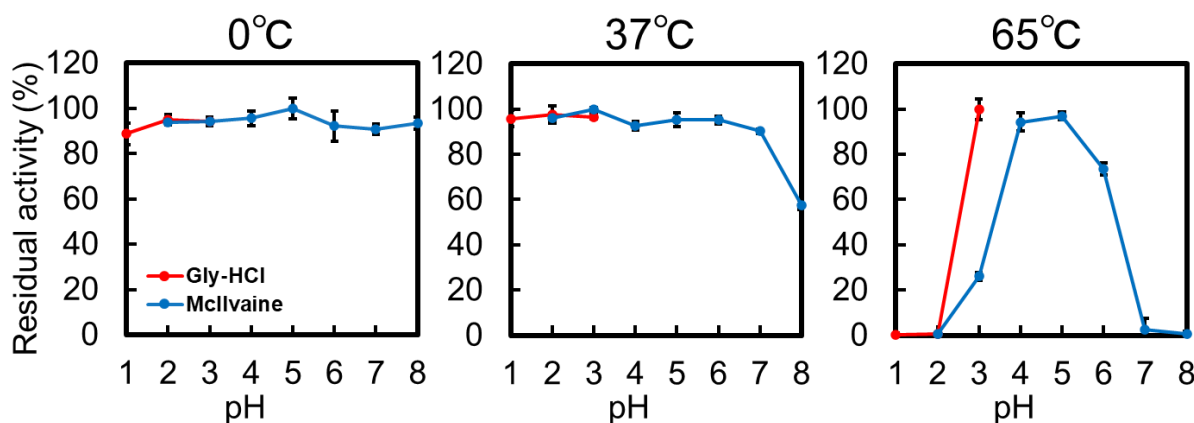


図 3.7. サル CHIA の pH 安定性。

サル CHIA を 1 時間、0°C、37°C、65°C で、Gly-HCl buffer (pH 1.0-pH 3.0) と McIlvaine buffer (pH 2.0-pH 8.0) 中にインキュベートした。赤: Gly-HCl buffer, 青: McIlvaine buffer。示した pH にプレインキュベーションした後、残存活性を pH 5.0 (サル CHIA の至適 pH, McIlvaine buffer) 条件下で測定した。キチナーゼ活性は、最も高いサル CHIA 活性レベルを 100% に設定した場合の相対活性を示しており、ブランク補正した。グラフの値は、三回測定した平均値で示した。

サル CHIA の温度安定性

次に、pH 2.0、pH 5.0、pH 7.0 でサル CHIA を 30°C-70°C で 30 分間プレインキュベートした後、キチナーゼ活性測定を行い、サル CHIA の熱安定性を評価した。残存活性は、発色基質 4-NP-(GlcNAc)₂ を使用して 37°C、pH 5.0、60 分間で測定した。それぞれの実験の最も高い残存活性を 100% としたときの数値で示した。pH 2.0 で

は、サル CHIA は 55°C まで安定で、60°C でのプレインキュベーション後の残存活性は 60% であった (図 3.8.左)。一方、pH 5.0, pH 7.0 では、サル CHIA は、pH 5.0 で 70°C まで安定であった (図 3.8.中央)。さらに、80°C でのプレインキュベーション後の残存活性は、pH 5.0 では、それぞれ 31% だった。pH 7.0 においては、40°C まで安定であった (図 3.8.右)。サル CHIA は、30°C-70°C で安定であった。

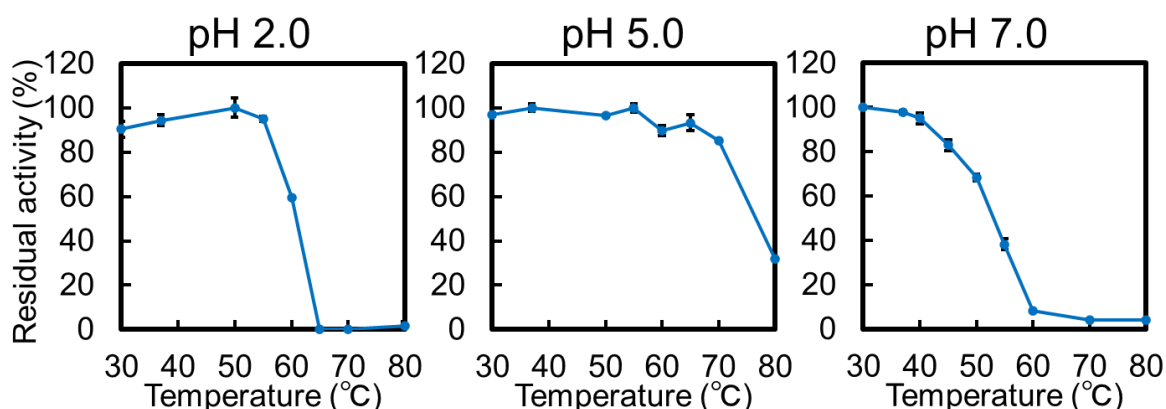


図 3.8. サル CHIA の温度安定性

pH 2.0, pH 5.0, pH 7.0 (McIlvaine buffer) 条件下で、サル CHIA を 15 分間、30°C-80°C に、インキュベートした。赤: Gly-HCl buffer, 青: McIlvaine buffer。氷冷後、残存活性を pH 5.0 (サル CHIA の至適 pH, McIlvaine buffer) 条件下で測定した。キチナーゼ活性は、最も高いサル CHIA 活性レベルを 100% に設定した場合の相対活性を示しており、ブランク補正した。グラフの値は、三回測定した平均値で示した。

サル CHIA とマウス Chia による高分子キチンの分解

次に、高分子キチン (P-キチン) を基質として、pH 2.0, pH 5.0, pH 7.0 (McIlvaine buffer) および 37°C, 50°C, 65°C 条件下で、サル CHIA またはマウス Chia とインキュベートした。分解産物は、蛍光標識法を用いた糖電気泳動法 (FACE) によって分析した [58]。各 pH および温度条件下で酵素によって生成された (GlcNAc)₂ および (GlcNAc)₃ を定量した (図 3.9)。サル CHIA の分解産物のピーク (65°C, pH 5.0, (GlcNAc)₂) を 100% にしたときの相対値で示した。37°C および 50°C では、pH 2.0 および pH 5.0 両条件下において、サル CHIA により多くの (GlcNAc)₂ が生成された (図 3.9.A)。このように、サル CHIA の至適 pH 条件が pH 5.0 であるにも関わらず、pH 2.0 で多くの分解産物が生成された。一方、65°C では、(GlcNAc)₂ および (GlcNAc)₃ の生成量は、pH 5.0 条件下でピークに達した (図 3.9.B)。(GlcNAc)₃ は、サル CHIA とマウス Chia の両酵素のキチン分解で生成されたが、(GlcNAc)₂ の生成量には及ばなかった。すべての条件下で、サル CHIA はマウス CHIA よりも効率的にキチンを分解した。

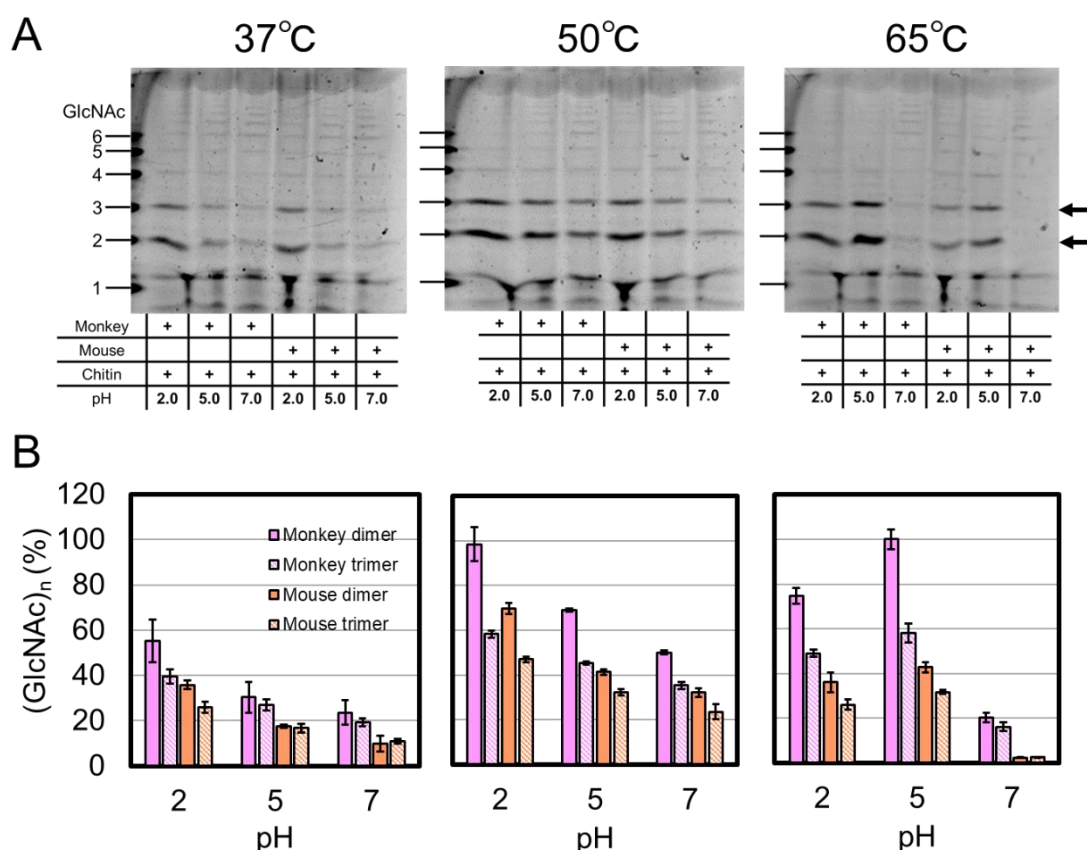


図 3.9. サル CHIA とマウス Chia によるコロイダルキチンの分解

(A) コロイダルキチンをサル CHIA またはマウス Chia と、pH 2.0, pH 5.0, pH 7.0 および 37°C, 50°C, 65°C でインキュベートした。生成された分解産物は FACE 法を用いて解析した。左端のレーンに、キチンオリゴ糖のマーカーを示す。(B) (GlcNAc)₂ と (GlcNAc)₃ の定量データ。ピンク: サル CHIA, オレンジ: マウス Chia。サル CHIA の最大の分解産物量 (pH 5.0, 65°C) を 100% に設定したときの相対値で示した。グラフの値は、三回測定した平均値で示した。

第 4 節 考察

キチナーゼは、さまざまな病態生理学的状態に関わるとされ、注目を集めている [12-24]。本研究では、カニクイザル CHIA の強力な酵素活性と pH および熱安定性を示した。

サル CHIA は pH 5.0 で最も強い活性を示し、pH 1.0-pH 7.0 で活性を保持していた (図 3.4.A)。第 2 章で、CHIA がカニクイザルの胃で大量に発現していることを明らかにした。サル CHIA の pH に関する酵素活性の特徴は、カニクイザルの胃の pH 条件に適合していると考えられる。サルの胃の pH は、食後 pH 2.0 から pH 5.0-pH 7.0 にシフトすることが知られている [53]。

それぞれの至適 pH 条件下における活性を比較したとき、サル CHIA はマウス Chia よりも 3 倍活性が高く (図 3.4), サル CHIA の活性はすべての pH 条件下で、マウス Chia よりも

高かった (図 3.4 および 図 3.5)。CHIA の発現および活性レベルは、肉食性および草食性の動物と比較して、雑食性の動物ではるかに高い [35]。サル CHIA はヒト CHIA より、50 倍活性が高いことが報告されている [40]。しかし、サル CHIA の pH 依存性の特徴は、ヒト CHIA と類似していた [22,40,46]。

サル CHIA は、至適 pH 条件 (pH 5.0) において、65°C で最も高い活性を示し、体温 (37°C) よりも高い高温条件下 (50°C-70°C) で高い活性を示した (図 3.5)。この特徴は高分子キチン基質の分解においても認められた (図 3.9)。プロリン残基が保存されていない α -グルコシダーゼが、他の α -グルコシダーゼよりも熱安定性が大幅に低かったことから、プロリン残基がタンパク質の熱安定性に影響を与えるということが報告されている [59]。プロリンのピリジン環が、隣接するアミノ酸残基の自由度を下げることが知られている。サル CHIA はマウス Chia よりもプロリン残基が多いことから、強固な熱耐性を獲得したと考えられる。さらに、この酵素の安定性は、強酸性条件下でもみられた (図 3.7 および 図 3.8)。本研究では、サル CHIA の詳細な酵素特性を明らかにし、不活化の条件も特定した。

高分子キチンを基質としたとき、37°C および 50°C においてサル CHIA は、至適 pH 条件の pH 5.0 よりも pH 2.0 条件下でより多くの分解産物を生成した (図 3.9)。サル CHIA を含む CHIA タンパク質の活性中心 (DXXDXDXE モチーフ) は、酸性条件での基質結合と触媒作用に不可欠な役割を果たしていると考えられており、187 番目の His が酸性条件における活性化に関与しているとされている [60]。高分子キチン分解と人工発色基質分解におけるキチナーゼ活性の特性の差の理由はまだ明らかにされていない。

キトオリゴ糖は、特定の代謝性疾患に関与しており、さまざまな抗腫瘍および抗炎症活性を有することが報告されている [27-29]。本章では、サル CHIA のキチナーゼ活性は、広範囲の pH および温度条件下で高く、酸耐性および熱安定性を示した。これらの結果は、カニクイザル CHIA が農学および医学領域におけるキトオリゴ糖生産のための酵素の一つの選択肢となる可能性を示した。

第 5 節 要約

本章では、カニクイザル CHIA を組換えタンパク質として大腸菌で発現し、よく研究されているマウス Chia と比較し、酵素化学的性質を詳細に調べた。

まず、カニクイザル CHIA の pH 依存性を検討した。カニクイザル CHIA は、37°C 条件における至適が pH 5.0 であり、pH 2.0, pH 7.0 条件下においても強いキチナーゼ活性を有していた。カニクイザル CHIA は、マウス Chia よりも、pH 2.0 においては 2 倍、pH 5.0 においては 16 倍、pH 7.0 においては 10 倍活性が強かった。また、両酵素の至適条件下におけるキチナーゼ活性 (カニクイザル CHIA: pH 5.0, マウス Chia: pH 2.0) を比較したところ、カニクイザル CHIA が 3 倍の強さの活性を示した。以上の結果から、すべての pH 条件下においてカニクイザル CHIA の活性はマウス Chia よりも高いことが分かった。次に、カニクイザル CHIA の温度依存性を検討し

たところ、pH 5.0 条件下における至適温度は 65°C であった。pH 2.0 においては、マウス Chia は 55°C で最大活性を示し、そこから活性の強さが減少しているのに対し、カニクイザル CHIA は 65°C でも高いキチナーゼ活性を保持していた。さらに、酸耐性を有し、pH 5.0 においては 70°C まで安定であった。

最後に、カニクイザル CHIA で高分子キチン (P-キチン) の分解を行い、FACE 法で解析した。カニクイザル CHIA、マウス Chia はともに、高分子キチンを分解し、主に (GlcNAc)₂ を生成した。カニクイザル CHIA は、高温条件下 (50°C および 65°C) でより高いキチン分解活性を示した。また、すべての条件下でマウス Chia よりも、より多くの分解産物を生成した。カニクイザル CHIA の高分子キチンに対する活性は、低分子人工発色基質に対する活性と同様の特徴を示した。

このように、カニクイザル CHIA が様々な条件下で強い活性を有する頑強な酵素であることを明らかにした。

第4章 カニクイザル酸性キチナーゼによるキチンおよびキトサンの分解

第1節 序論

キチンまたはキトサンが分解されて生成するキトオリゴ糖には、抗菌、抗腫瘍、抗炎症作用や薬物伝達などの生理活性が報告されている [28-30]。キトオリゴ糖を得る方法は、化学処理による分解と酵素による加水分解が知られている [31,32]。ほ乳類由来の酵素を使用したキトオリゴ糖の調製は、生物医学的領域における利用の際に、安全性とプロセス制御の単純さの観点から、価値を高める可能性が考えられる [33]。第3章では、カニクイザル CHIA が様々な条件下で強い活性を有する頑強な酵素であることを明らかにした。そこで、生理活性をもつことが知られているキトオリゴ糖の生産へのカニクイザル CHIA の利用を検討した。本章では、カニクイザル CHIA による高分子基質分解の条件検討を行い、キチンおよびキトサン (キチンの脱アセチル化体) を分解したときに生成されるキトオリゴ糖を解析した。

第2節 実験材料と実験方法

大腸菌用発現ベクターの構築

サル CHIA は、第3章にて報告した pEZZ18/pre-ProteinA-monkey CHIA-V5-His を発現ベクターとして用いた (第3章. 第2節 実験材料と方法)。

組換えサル CHIA サルの調製と SDS PAGE とウエスタンブロッティングによる解析

SDS polyacrylamide gel electrophoresis PAGE およびウエスタンブロッティングは、第3章にて記載した方法で行った (第3章. 第2節 実験材料と方法)。

高分子キチンおよびキトサン基質の分解

基質として、三種類のキチン (結晶性 α -キチン, コロイダルキチン, P-キチン) と二種類のキトサン (ブロック型キトサン, ランダム型キトサン) を使用した。エビ殻キチン由来の結晶性 α -キチンは、Sigma-Aldrich 社から購入した。コロイダルキチンは、先行研究で結晶性 α -キチンから調製されたものを使用した [57]。P-キチンは高分子キチン [P-CHITN] (Megazyme 社) を使用した。脱アセチル化度 (Degrees of deacetylation, DD) 69% のブロック型キトサン (不均一に脱アセチル化) はフナコシ株式会社からの供与品を使用した。ランダム型キトサン (DD 70%) は、FLEXICHEM 社から購入した。基質 (1 mg/reaction) を、pH 2.0 または pH 5.0 (McIlvaine buffer) 条件下で、組換えサル CHIA と全量 50 μ L の反応液中で、50°C で、1, 3, 5, 24, 48, 72 時間インキュベートした。分解産物の解析は、第3章にて記載した方法で行った

(第3章. 第2節 実験材料と方法)。

第3節 実験結果

高温条件下におけるサル CHIA のキチン分解

生体内条件 (37°C) と高温条件 (50°C) でのキチン分解性を比較した。pH 5.0 (McIlvaine buffer) 条件下, 37°C または 50°C で, 結晶性 α -キチンをサル CHIA とインキュベートした (図 4.1.A および 図 4.1.B)。反応は, 1, 5, 24 時間で行った。サル CHIA は, 結晶性 α -キチンを分解し, 主に (GlcNAc)₂ を生成した。生成された (GlcNAc)₂ を定量したところ, 37°C よりも 50°C 条件下で, 分解産物量が多かった。1 時間 および 5 時間のキチン分解における (GlcNAc)₂ の生成量は, 50°C での反応で 37°C 反応の約 2 倍だった。24 時間の分解でも, (GlcNAc)₂ は 37°C より 50°C で明らかに多く検出された。

次に, 50°C における, サル CHIA による結晶性 α -キチンの分解産物量の経時変化を調べた (図 4.1.C および 図 4.1.D)。反応は, それぞれ, 1, 3, 5, 24, 48, 72 時間で行い, 生成された (GlcNAc)₂ を定量した。分解産物量は, 1 時間から 72 時間まで増加し続け, 長時間反応でより多くの分解産物を得ることができた。これは, サル CHIA が不活性化することなく, 高温条件下で長時間キチンを分解し続けることを示した。

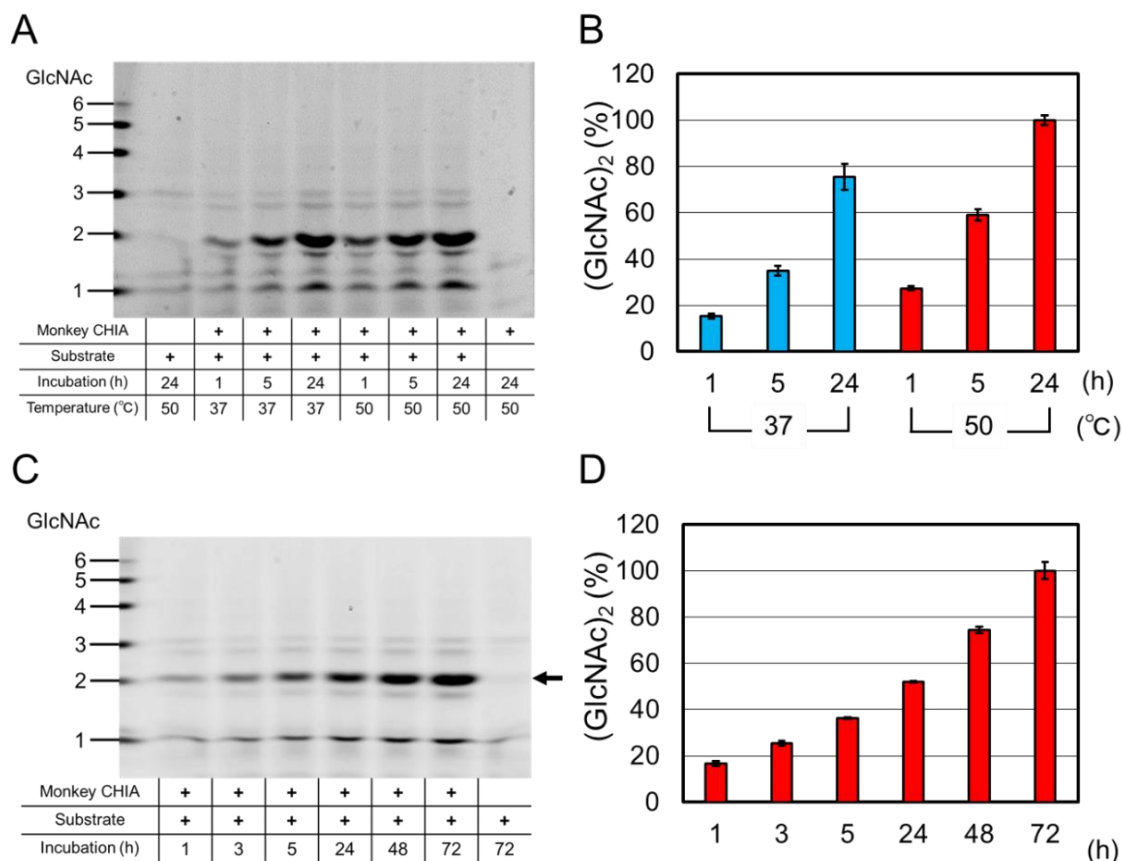


図 4.1. 高温条件下におけるサル CHIA のキチン分解

(A) 37°C および 50°C での結晶性 α -キチンの分解結果。pH 5.0, 37°C または 50°C 条件下で、結晶性 α -キチンとサル CHIA を 1, 5, 24 時間インキュベートした。(B) 各温度, 各時間の分解により主に生成された (GlcNAc)₂ の定量結果。(C) 50°C におけるキチン分解産物量の経時変化。50°C 条件下で、結晶性 α -キチンとサル CHIA を 1, 3, 5, 24, 48, 72 時間インキュベートした。(D) 各時間の分解により生成された (GlcNAc)₂ の定量結果。どちらも得られた分解産物を FACE 法で分析した。左端のレーンに、キチンオリゴ糖のマーカーを示す。(B) および (D) の結果は、(A) および (C) の各バンドを定量し、相対値で示した。グラフの値は、三回測定した平均値で示した。

サル CHIA によるキチン基質の分解

サル CHIA によるキチン分解で生成される分解産物を FACE 法で解析した。キチン基質をサル CHIA と、pH 2.0 または pH 5.0 および 50 °C 条件下でインキュベートした。キチン基質には、結晶性 α -キチン、コロイダルキチン、P-キチンを使用した。反応時間は、1, 3, 5, 24, 48, 72 時間で行った。サル CHIA は、pH 2.0 および pH 5.0 条件下で、すべてのキチン基質から (GlcNAc)₂ を主に生成した (図 4.2)。

結晶性 α -キチンの分解では、pH 5.0 における分解で長時間反応になるにつれ、分解産物が増加した (図 4.2.A)。pH 2.0 よりも pH 5.0 条件下で、(GlcNAc)₂ を多く生成した。

コロイダルキチンの分解では、pH 2.0 および pH 5.0 の両条件下で、サル CHIA によって生成される (GlcNAc)₂ は、反応とともに増加した (図 4.2.B)。サル CHIA は、pH 2.0 よりも pH 5.0 条件下で、わずかに多く分解産物を生成した。

P-キチンの分解からは、他のキチン基質と同様に (GlcNAc)₂ が主に生成されたが、(GlcNAc)₃ もわずかに検出された。P-キチンの分解産物は、他のキチン基質よりも圧倒的に多く、pH 2.0 および pH 5.0 で、大量の (GlcNAc)₂ が生成された。

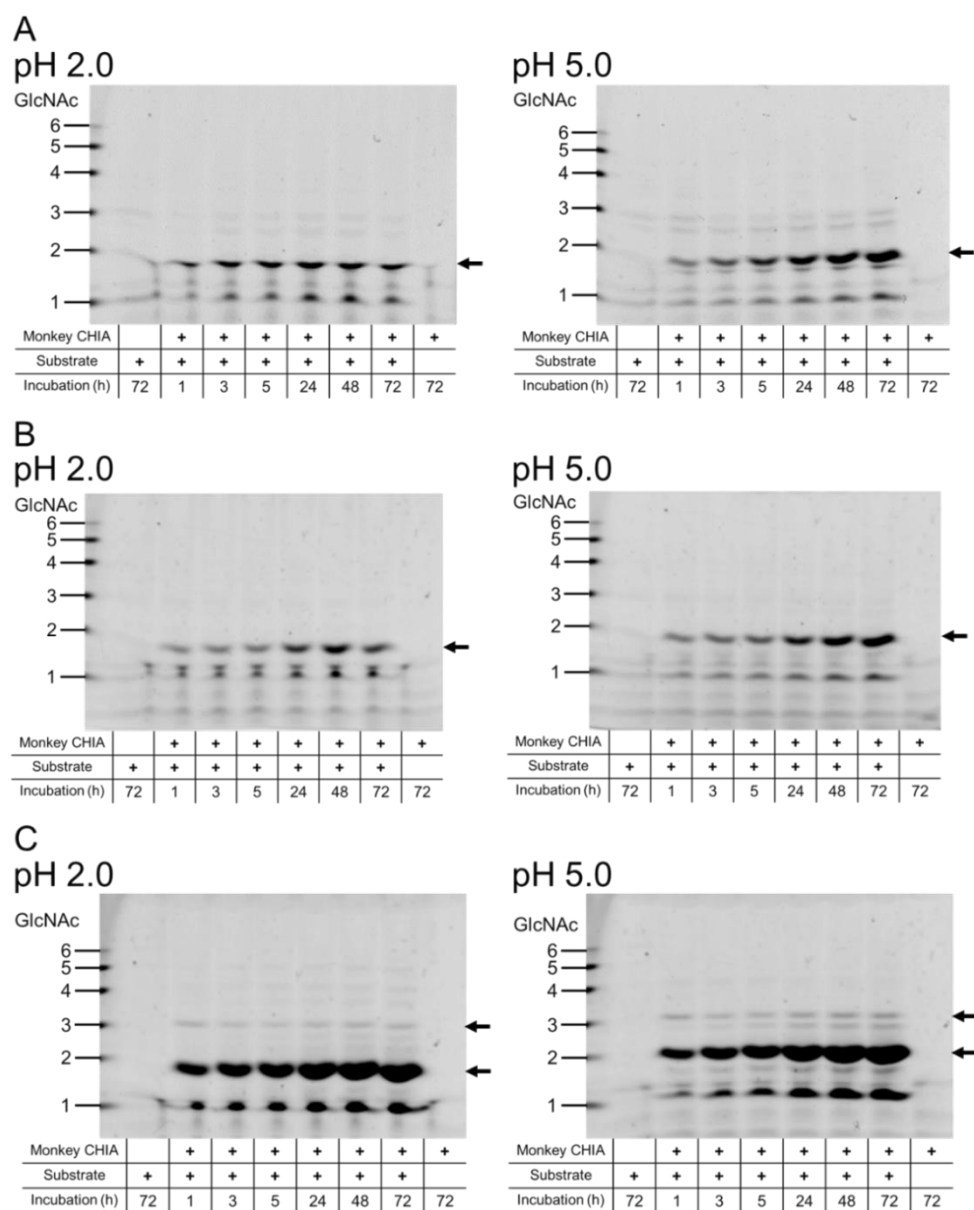


図 4.2. サル CHIA によるキチン基質の分解

キチン基質を、pH 2.0 または pH 5.0, 50°C 条件下で、サル CHIA と 1, 3, 5, 24, 48, 72 時間インキュベートした。基質として結晶性 α -キチン (A), コロイダルキチン (B), P-キチン (C) を使用した。得られた分解産物は FACE 法で分析した。左端のレーンに、キチンオリゴ糖のマーカを示す。

サル CHIA によるキトサン基質の分解

キトサンは、キチンの脱アセチル化体である [61]。不均一に脱アセチル化されたキトサンをブロック型キトサン，均一に脱アセチル化されたものをランダム型キトサンと呼ぶ [25,26]。ミールワームの幼虫またはハエの羽を，トリ，ブタ，マーモセットの胃腸条件で処理すると，キトオリゴ糖が検出されている [45,49-50,54]。また，マウス Chia によるランダム型キトサンの分解で，生理活性を有するキトオリゴ糖を効率よく入手できることも報告されている [37]。

キトサン基質をサル CHIA と，pH 5.0 (MacIlvaine buffer) および 50°C 条件下で，1，3，5，24，48，72 時間インキュベートした。脱アセチル化度が 69% のブロック型キトサンと，脱アセチル化度が 70% のランダム型キトサンを分解した。サル CHIA は，キトサンからさまざまなキトオリゴ糖を生成した (図 4.3)。両キトサン基質の分解において，分解産物量は pH 5.0 よりも pH 2.0 条件下で多かった。

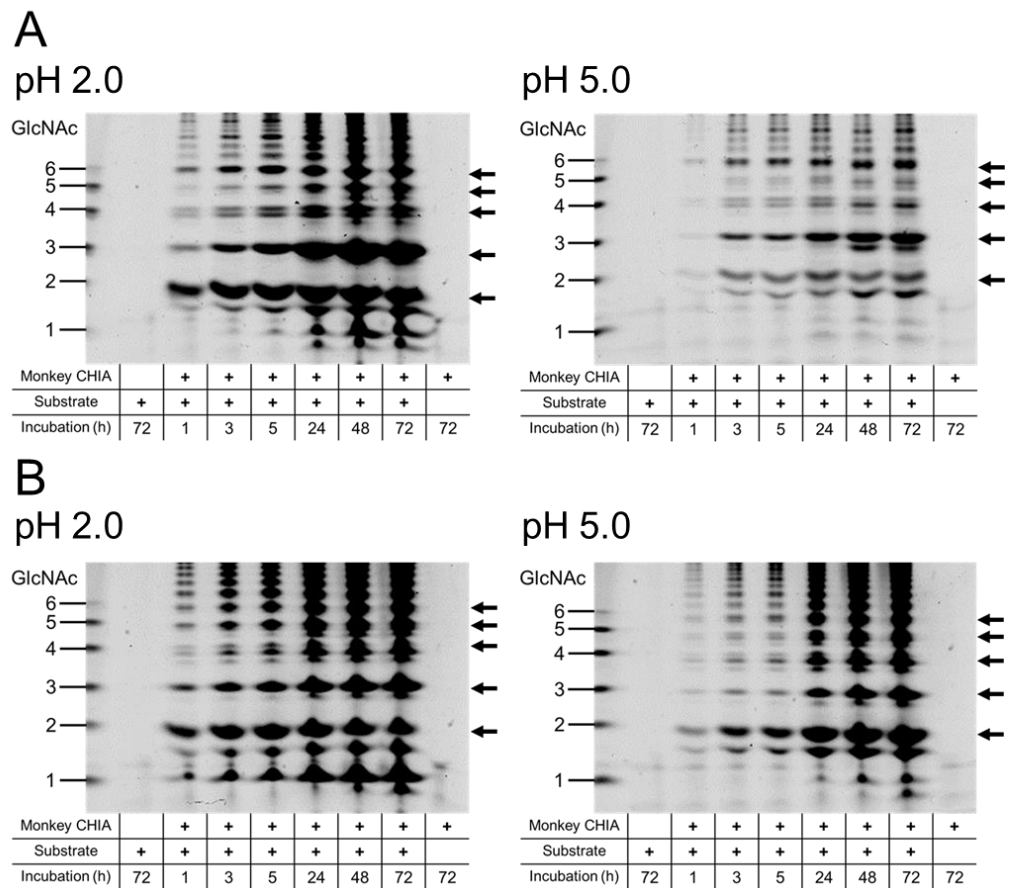


図 4.3. サル CHIA によるキトサン基質の分解

キトサン基質を，pH 2.0 または pH 5.0，50°C 条件下で，サル CHIA と 1，3，5，24，48，72 時間インキュベートした。基質としてブロック型キトサン (A) とランダム型キトサン (B) を使用した。得られた分解産物を FACE 法で分析した。左端のレーンに，キチンオリゴ糖のマーカーを示す。

サル CHIA のブロック型キトサン の分解について、pH 2.0 では、主に (GlcNAc)₂ を生成し、次いで、(GlcNAc)₆, (GlcNAc)₃ が多く生成された。pH 5.0 では、(GlcNAc)₃ が主に生成され、次いで (GlcNAc)₆, (GlcNAc)₂ が多く生成された(図 4.3.A)。pH 2.0 では、長時間反応で他のキトオリゴ糖も多量に検出された。pH 2.0 および pH 5.0 両条件下において、反応時間が長くなるにつれて、より多くの分解産物が生成された。サル CHIA のブロック型キトサン分解による分解産物生成のパターンは、pH 2.0 と pH 5.0 条件下で異なっていた。

ランダム型キトサンの分解について、短時間反応で、pH 2.0 条件下では主に (GlcNAc)₂ と (GlcNAc)₃ を生成し、pH 5.0 条件下では (GlcNAc)₂ と (GlcNAc)₆ を主に生成した (図 4.3.B)。両 pH 条件下ともに、長時反応で、他のキトオリゴ糖も大量に生成した。ランダム型キトサンの分解産物量は、ブロック型キトサンに比べて圧倒的に多かった。

サル CHIA によりキチンおよびキトサンから生成されたキトオリゴ糖の比較

最後に、同条件下で三種類のキチンと二種類のキトサンを分解した。基質は、pH 5.0 (McIlvaine buffer) および 50°C 条件下で、72 時間インキュベートした。各基質からの分解産物量を比較した (図 4.4.A および 図 4.4.B)。分解産物は、キチンよりもキトサンから多く得られた。(GlcNAc)₂ は、結晶性 α -キチンおよびコロイダルキチンよりも P-キチンの分解で圧倒的に多く生成された。キトサンは、ブロック型よりもランダム型の分解で分解産物が多く検出された。サル CHIA による各基質の分解から得られるキトオリゴ糖を図 4.4 に示した。すべてのキチンおよびキトサン基質から、(GlcNAc)₂ が多く得られた。サル CHIA によるキトサン分解では多様な分解産物が生成された。また、分解産物の生成パターンは基質によって異なった。さらに、すべてのキチンおよびキトサンの分解産物は、高温条件下での長時間のインキュベーションで増加した。

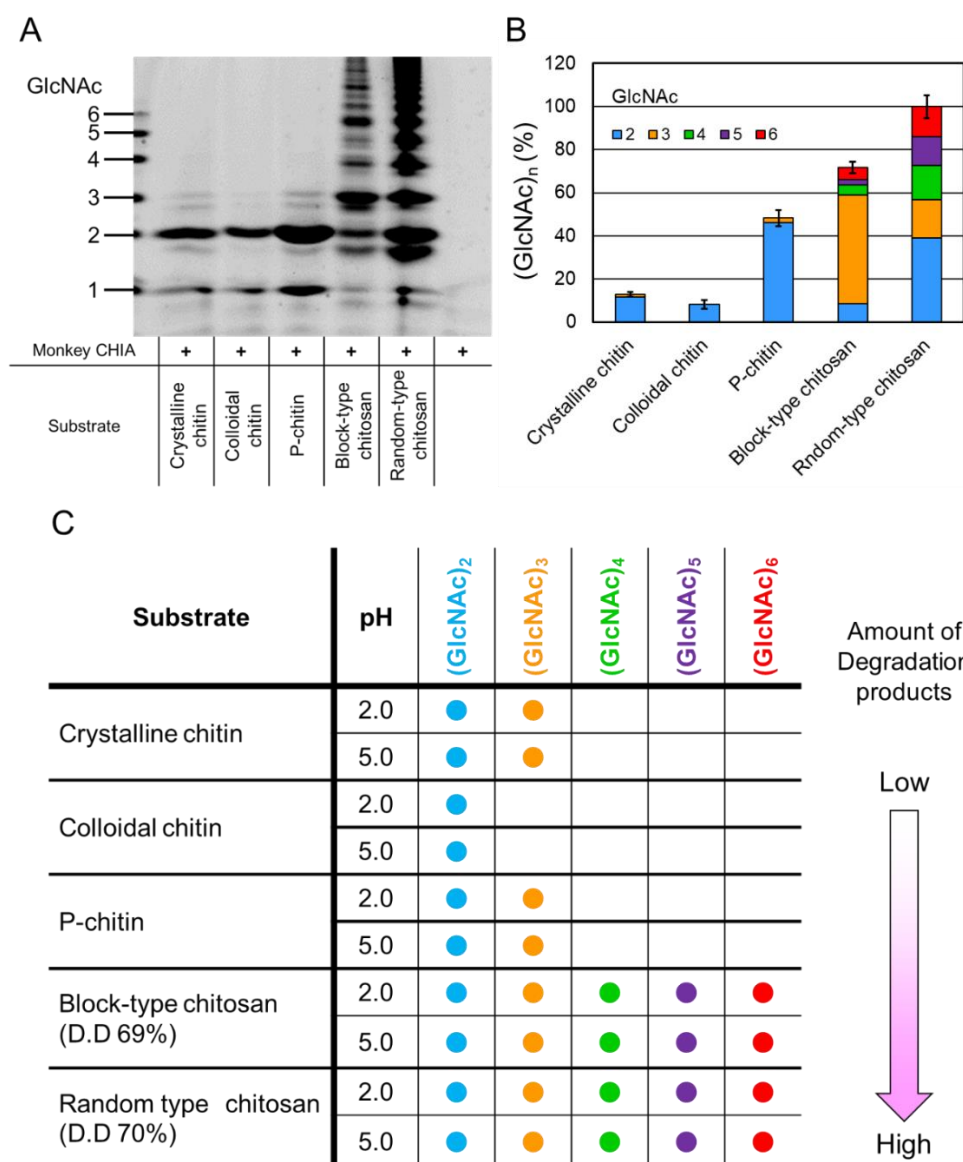


図 4.4. サル CHIA によるキチンおよびキトサンで生成されるキトオリゴ糖

五種類の基質を、pH 5.0、50°C 条件下で、サル CHIA と 72 時間インキュベートした。基質には、三種類のキチン（結晶性 α -キチン、コロイダルキチン、P-キチン）と二種類のキトサン（ブロック型キトサン、ランダム型キトサン）を使用した。(A) キチンおよびキトサンの分解結果を示した。得られた生成物を FACE 法で分析した。左端のレーンに、キチンオリゴ糖のマーカーを示す。(B) 各基質の分解により生成されたキトオリゴ糖の定量結果。(A) の各バンドを定量し、相対値で示した。グラフの値は、三回測定した平均値で示した。(C) キチンおよびキトサンの分解によって生成されたキトオリゴ糖。生成されたキトオリゴ糖は丸で示した。

第4節 考察

キチンは地球上で二番目に豊富な多糖であり、キトサンはその脱アセチル化誘導体である [61-64]。キトオリゴ糖は、医学領域では抗菌、抗腫瘍、抗炎症作用や薬物伝達といった生理活性をもち、農学領域ではバイオ肥料の植物成長刺激剤として重要な役割を果たすことが報告されている [27-30,65-66]。キトオリゴ糖の生成には、化学処理または酵素による加水分解が知られている [31,32]。酵素処理によるキトオリゴ糖の調製は、安全性とプロセス制御の面で、生成されるキトオリゴ糖の価値を高めるとされ注目されている [33]。

カニクイザル CHIA は、酸性条件下において、37°C よりも高温条件 (50°C) でキチンとキトサンをより効率的に分解することを示した (図 4.1.A および 図 4.1.B)。カニクイザル CHIA によるキチンおよびキトサンの分解について、72 時間までの長時間のインキュベーションの後、より多くの多様なキトオリゴ糖が生成された (図 4.2 および 図 4.3)。さらに、サル CHIA は、P-キチンとランダム型キトサンの分解でより多くの (GlcNAc)₂ とキトオリゴ糖を生成した (図 4.4)。このように、酸性および高温条件下でのカニクイザル CHIA によるキチンおよびキトサンの分解は、(GlcNAc)₂ およびキトオリゴ糖を効果的に生成した。さらに、反応時間, pH, 温度, 基質の変更により、キチンおよびキトサンの分解パターンは制御され、特定のオリゴマーの取得が可能であることが示唆された。

分解する基質の構造の違いにより、生成されるキトオリゴ糖の違いが認められた。脱アセチル化度の違いは、生成される分解産物に影響した。 α -キチンよりも脱アセチル化度が高い β -キチンからは、より多くの分解産物が生成されたことが報告されている [37,67]。このことから、脱アセチル化度に依存し、三種のキチン基質においても分解産物量に差が生じたと考えられる (図 4.2 および 図 4.4)。さらに、マウス Chia による分解産物がブロック型キトサンとランダム型キトサンで大きく異なることを報告した [37]。ブロック型キトサンは、高度に脱アセチル化された領域 (GlcN-rich 領域) を持っている。一方、ランダム型キトサンでは、GlcNAc および GlcN が散在している。サル CHIA も GlcNAc に富む領域を優先的に分解しており、ランダム型キトサンからより多様なサイズのキトオリゴ糖を生成していると考えられる。したがって、ブロック型キトサンとランダム型キトサンで異なる GlcNAc/GlcN 比率のキトオリゴ糖が生成され、それが分解産物の生成量にも影響していると考えた (図 4.3 および 図 4.4)。

本研究では、キチンとキトサンから生成されたキトオリゴ糖を FACE 法で解析した。この手法は、Wakita らがキトオリゴ糖の分析、定量のために開発した [58]。キトオリゴ糖の FACE 法による解析ではいくつかの利点がある。それらは、操作が簡便で、感度が高く、定量性があり、実験コストが低いことである。本実験では、FACE 法を使用して非常に少量のオリゴ糖を検出し、定量した。ただし、FACE 法では GlcNAc/GlcN 比率を含む詳細なキトオリゴ糖の構造を分析することはできない。

今後の応用利用を考えたとき、質量分析 (MS) および核磁気共鳴 (NMR) 分光法を組み合わせた分解産物の構造分析が必要となるだろう。

先行研究では、ほ乳類や鳥類におけるさまざまな Chia が報告されている [7, 45, 49-50, 54, 68]。それらの Chia 酵素と比較したとき、サル CHIA には三つの優れた点がある。一つ目は、サル CHIA は、広い pH 条件下で非常に強い活性を有するほ乳類キチナーゼであること [69]。二つ目は、高温条件下においても不活性化せず、キチンを効率的に $(\text{GlcNAc})_2$ に分解したこと (図 4.1)。三つ目は、サルの CHIA は、pH 2.0 だけでなく pH 5.0 条件下でもキチンおよびキトサン基質を分解して、 $(\text{GlcNAc})_2$ とキトオリゴ糖を生成したこと (図 4.2 および 図 4.3)。このように、サル CHIA はキチンとキトサンからキトオリゴ糖を生成する酵素として優れた特性を有していた。

マウスは雑食性動物であり、マウス Chia は胃で高く発現されるプロテアーゼ耐性をもつ酵素で、キチンとキトサンを分解することができる [37, 41, 45]。最近、*Pichia pastoris* におけるマウス Chia の発現とその工業的な利用についての研究が報告された [70]。組換えマウス Chia の収量を改善し、組換えマウス Chia が $(\text{GlcNAc})_2$ の生産に有用であることが報告されている。カニクイザルも雑食性動物であり、カニや昆虫などのキチン含有生物を食す。サル CHIA はマウス Chia よりも強いキチナーゼ活性を有し、幅広い pH 条件下での活性保持と熱安定性を示すことが報告されている [69]。このように、カニクイザル CHIA は、マウス Chia と同等もしくはそれ以上に、pH 2.0 および pH 5.0 といった強酸性および弱酸性条件下において、高温条件下でキチンとキトサンを効果的に分解すると考えられる。カニクイザル CHIA においても、収量の向上は課題の一つである。

キトオリゴ糖は、農学領域では植物の成長を促進することが報告されている。低分子量のキチンオリゴ糖 $(\text{GlcNAc})_{2-4}$ による、シロイヌナズナにおける植物の成長・発達、炭素および窒素の代謝に関連する遺伝子誘導が報告されている [65]。カニクイザル CHIA は、酸性および高温条件下でキチンとキトサンから $(\text{GlcNAc})_2$ とキトオリゴ糖を効率的に生成した (図 4.2 および 図 4.3)。さらに、キトオリゴ糖には塩分ストレス下でコムギの成長を促進することも報告されている [66]。特に、 $(\text{GlcNAc})_{6-8}$ はより強い活性を示した。カニクイザル CHIA によるブロック型キトサンおよびランダム型キトサンの分解で、 $(\text{GlcNAc})_6$ は多量に生成された (図 4.3)。

ニワトリ Chia またはブタ Chia によるキチン含有性物であるミールワームの殻またはハエの羽を分解したとき、キトオリゴ糖が検出された [49-50]。天然および組換えのブタ Chia はキトサンを分解してキトオリゴ糖を生成した [67]。さらに、マウス Chia は、ブロック型キトサンより、ランダム型キトサンからより多様なキトオリゴ糖を生成することが示された [37]。カニクイザル CHIA も、キトサンを分解し多様なキトオリゴ糖を多量に生成した (図 4.3)。また、これらの結果から、カニクイザルにおいても、部分的にキチンが脱アセチル化されたキトサンの CHIA による分解が生体内で起こることで、キトオリゴ糖が生成される可能性が考えられる。さらに、

キトオリゴ糖には、抗菌、抗腫瘍、抗炎症効果、薬物伝達などの生理活性が知られている [27-30]。重合度が 10 未満のキトオリゴ糖は、一般的に水溶性であり、幅広い領域で価値を有する物質であるとされている。これらのことから、カニクイザル CHIA を使用して生成されたキトオリゴ糖は、動物において生物医学的用途に使用できることが考えられる。本章では、医療目的のキトオリゴ糖の生産にカニクイザル CHIA を利用することを提案する (図 4.5)。

CHIA は喘息と肺線維症に関連するとされており、ヒト CHIA の R61M 置換は喘息に作用することが報告されている [21]。ヒトにおける CHIA の発現レベルは非常に低く、そのキチン分解活性も非常に低いことが明らかにされている [22,42]。ヒト CHIA のキチナーゼ活性はマウス Chia よりもはるかに低い、R61M 置換をヒト CHIA に導入すると活性が高まる [22]。Chia 欠損マウスを使用した研究では、キチンが気道に蓄積し、肺線維症を引き起こすことを示した [13]。一方、Chia のトランスジェニック過剰発現は、症状を改善した [23]。これらのデータは、キチナーゼ活性がヒトの肺の喘息と肺線維症に強く関与していることを示唆した。カニクイザル CHIA はヒト CHIA との相溶性が高いため、キトオリゴ糖生産への利用のみならず、肺疾患における投与治療の酵素としての可能性をもつことが考えられる (図 4.5)。

本章では、カニクイザル CHIA が高温条件下でキチンとキトサンからキトオリゴ糖を効率的に産生することを示した。さらに、カニクイザル CHIA によるキチンおよびキトサンの分解から生成されるキトオリゴ糖を明らかにした。これらの結果は、カニクイザル CHIA が農学および医学領域におけるキトオリゴ糖を生産において有望な酵素であることを示す。

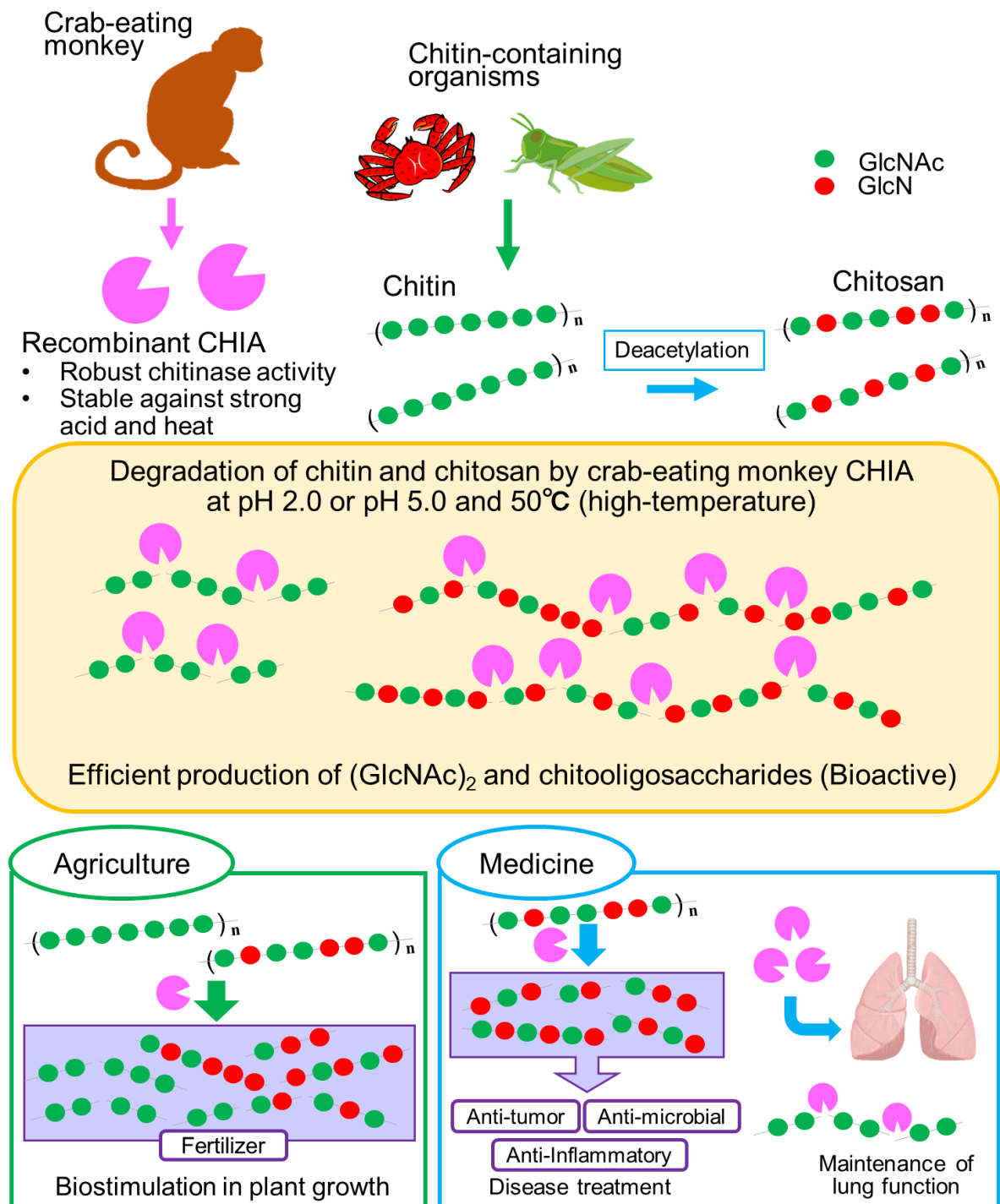


図 4.5. 高温条件下でのサル CHIA による効率的なキチンおよびキトサンの分解

カニクイザル CHIA は、高温条件下でキチンおよびキトサン基質を効率的に分解し、キトオリゴ糖を生成した。高温条件における基質分解は効率を高めた。サル CHIA は、キチンを (GlcNAc)₂ に分解し、キトサンからは多様なキトオリゴ糖を生成した。カニクイザル CHIA は、**農学**および**医学**領域で利用可能なキトオリゴ糖を生産するための有望な酵素である。

第5節 要約

本章では、カニクイザル CHIA による高分子基質分解の条件検討を行い、キチンおよびキトサン (キチンの脱アセチル化体) を分解したときに生成されるキトオリゴ糖を解析した。生理活性をもつことが知られているキトオリゴ糖の生産へのカニクイザル CHIA の利用可能性を検討した。

まず、カニクイザル CHIA に 70°C までの熱耐性があつたことから、高分子基質分解の温度条件を検討した。カニクイザル CHIA は、至適 pH 条件である pH 5.0 において、生体内条件 (37°C) よりも高温条件下 (50°C) でより多くの分解産物を生成した。さらに、50 °C における長時間反応でも、カニクイザル CHIA は失活することなく基質分解を続けた。

次に、50°C, pH 2.0 または pH 5.0 条件下で、結晶性 α -キチン、コロイダルキチン、P-キチン、ブロック型キトサン、ランダム型キトサン五種類の基質をカニクイザル CHIA を用いて分解し、FACE 法で解析した。

キチン基質からは、主に (GlcNAc)₂ が生成された。どのキチン基質に関しても、反応時間の増加と共に、分解産物量が増加した。キチン基質に関しては、P-キチンでより多くの分解産物が生成された。

キトサン基質からは、多様なキトオリゴ糖が生成された。どのキチン基質に関しても、反応時間と共に、分解産物量が増加し、さらに、得られるキトオリゴ糖のパターンも変化した。分解するキトサン基質の種類、pH 条件が得られるキトオリゴ糖の差に影響した。また、キトサン基質に関しては、ランダム型キトサンでより大量な分解産物が生成された。

このように、カニクイザル CHIA によるキチンおよびキトサンの分解では、高温条件下における反応でより多くのキトオリゴ糖を得ることができた。また、得られる分解産物のパターンは、分解する基質および pH 条件により、異なることが明らかになった。以上のことから、カニクイザル CHIA のキトオリゴ糖生産における有用性を示し、その利用の際に必要な情報を提供した。

第5章 総合考察

キチンは、地球上で二番目に多く存在する多糖で、未利用バイオマスである [1,2,61-64]。キチンとその脱アセチル化体のキトサンが分解されるとキトオリゴ糖が生成される [61]。そのキトオリゴ糖には、農学領域における植物成長刺激作用、医学領域における抗菌、抗腫瘍、抗炎症作用といった幅広い領域での生理活性が報告されている [27-30,65-66]。キトオリゴ糖の生成には、化学処理または酵素による加水分解法が知られており [31,32]、生物医学的用途におけるキトオリゴ糖の調製は、安全性とプロセス制御の観点から、酵素により生成されることでキトオリゴ糖価値が高まるとされる [33]。本研究では、キトオリゴ糖生産における有望な酵素としてカニクイザル CHIA に着目し、遺伝子発現および酵素特性の解析を行った。

CHIA は、ほ乳類キチナーゼの一つであり、その発現と活性および遺伝的変異が喘息に関連することから注目されている [12,19-22]。Chia 欠損マウスにおいて、老齢化マウスでは線維性肺疾患が発症したことから、気道において正常な肺機能保持のための重要な役割を果たし、疾患を予防することが明らかにされた [23,71]。また、雑食性の動物における CHIA は活性と発現が高く、胃においてプロテアーゼ耐性もつ消化酵素として働くことも報告されている [45,49-50,54]。

そこで、私は、名前の通り「カニ」を食す雑食動物のカニクイザルは、「胃において高いレベルで CHIA を発現しており、その酵素活性は非常に強いのではないか」と考えた。

カニクイザルは、薬の安全性、効果を確認するための医薬品開発の臨床試験の前段階の過程でよく使用される非ヒト霊長類動物モデルの一つである [38]。しかし、カニクイザルにおける遺伝子および酵素を含む生物・医学的な情報は不足している [38,40]。

カニクイザルにおいて、CHIA を含むキチナーゼの遺伝子発現解析および CHIA の酵素特性を解析することは、カニクイザル CHIA の応用利用の検討だけではなく、生体内における CHIA の機能的役割の解明のための手がかりやカニクイザルを利用した生化学的実験において重要なデータを提供することができるだろうと考えた。

第2章では、qPCR を用いて、カニクイザルにおけるキチナーゼ遺伝子発現解析を行った。他の雑食動物と同様に [45,49-50,54]、CHIA mRNA は、主にカニクイザルの胃で発現していた (図 2.4.A)。その発現レベルは、GAPDH よりも高く、胃粘膜の主成分である Pep C に匹敵していたことから、CHIA はサル胃における主要な転写産物であった (図 2.5.A)。さらに、そのサル CHIA の発現レベルを評価するために、サル-マウス-ヒト間で遺伝子発現解析を行った。大量発現が報告されているマウス CHIA [41,42] と同等に、サルは胃で CHIA を発現していた (図 2.6)。しかし、ヒトでは非常に低かった。肺ではサルとヒトの CHIA mRNA の発現パターンが類似しているのに対し、マウス CHIA mRNA レベルが両方の霊長類と比較して有意に高いこと

を示した(図 2.7)。サルの肺抽出液から最も高いキチン分解活性が検出された(図 2.8.B)。このように、キチナーゼ遺伝子発現は種により異なっていた。これらの結果は、特定の疾患の実験をする際、動物モデルを選択するのに重要な情報であり、動物モデルを介した実験の種間におけるデータの取り扱いには注意が必要であることを示した。さらに、この mRNA 発現レベルの種間差は、サル、マウス、ヒトの胃および肺のキチナーゼ活性の種間差に反映されていた(図 2.8)。また、CHIA が大量に発現していたサルの胃からは、非常に強い活性が検出されたことから、サル CHIA が非常に強い活性を有することが示唆された。

第 3 章では、第 2 章で胃における大量発現が明らかにされたサル CHIA の酵素化学的性質の解析を行った。まず、pH 依存性を検討したところ、サル CHIA は pH 5.0 で最も強い活性を示し、pH 1.0-pH 7.0 で活性を保持していた(図 3.4.A)。また、その活性は、マウス Chia よりも非常に高かった(図 3.4.B)。至適温度についても、至適 pH 条件(pH 5.0)下では、65°C と非常に高く、pH 2.0 および pH 5.0 条件下では、高温条件下(50°C-70°C)でより高い活性を示した(図 3.5)。また、サル CHIA の活性はすべての pH 条件下で、マウス Chia よりも高かった(図 3.4 および 図 3.5)。さらに、酸耐性であること(図 3.6)、pH 2.0 および pH 5.0 条件下では熱安定性をもつこともわかった(図 3.7)。本研究では、サル CHIA の詳細な酵素特性を明らかにし、不活化の条件も特定した。このように、サル CHIA のキチナーゼ活性は、広範囲の pH および温度条件下で高く、酸耐性および熱安定性を示し、工業利用におけるサル CHIA の有用性を高めた。さらに、詳細な性質を明らかにすることで応用利用の際の条件検討に必要な情報を提供した。

第 4 章では、第 3 章で工業利用の可能性が見出されたサル CHIA がキトオリゴ糖生産のための酵素として有望であるかを検討した。サル CHIA が熱に対する耐性を有することから、高温条件下の分解によるキトオリゴ糖生成の効率化を考えた 37°C と 50°C 条件下における、結晶性 α -キチンの分解産物量を比較した。サル CHIA は、ほ乳類の酵素であるにもかかわらず、50°C でより効率的に結晶性 α -キチンを分解した(図 4.1.A および 図 4.1.B)。さらに、サル CHIA による結晶性 α -キチンの分解産物は、失活することなく 1 時間から 72 時間まで増加しつづけた(図 4.1.C および 図 4.1.D)。この結果に基づき、50°C 条件下において、サル CHIA で様々なキチン基質とキトサン基質を分解した。すべてのキチン基質から、サル CHIA は (GlcNAc)₂ を主に生成した(図 4.2)。キトサンの分解では、様々な長さのキトオリゴ糖が得られた(図 4.3)。また、キチンとキトサンから得られた分解産物の量と種類を比較した(図 4.4)。得られたキトオリゴ糖のパターンや産物量は、分解の基質、pH 条件、反応時間に依存していた。これらの結果は、高温条件によるサル CHIA のキトオリゴ糖生成の効率化を示し、サル CHIA の応用利用の際の基質選択や条件検討に必要な情報を提供した。

CHIA で最も活性が高いとされていたマウス Chia よりも明らかに活性を示した本研究の結果からは、カンクイザル CHIA が最も強いキチナーゼ活性を有していると結論づけた。カニやエビなどの甲殻類の殻の主要構成成分がキチンであり、脱皮で

はキチンが分解されることから、これらの生物がもつキチナーゼは非常に高い活性を有する可能性も考えられる。バナメイエビについては、NCBI のデータベースに chitinase (accession number ROT65546.1) が登録されていた。このキチナーゼは、カニクイザル CHIA および カニクイザル CHIT1 双方と、類似性が約 60%、同一性が約 40% であった。工業、医療、農業の領域におけるキチナーゼの利用のための甲殻類のキチナーゼの研究は有望であると考えられる。

本研究では、まず、カニクイザルにおいて、CHIA の遺伝子発現解析および酵素特性の解析を行った。そこで、サル CHIA の『非常に強い活性を有し幅広い条件下でその活性を保持する』という優れた性質に着目し、キトオリゴ糖生成への利用の検討を行った。本研究では、未利用バイオマスであるキチンの有効利用のために、キトオリゴ糖生産へのカニクイザル CHIA の利用を提案した。また、非ヒト霊長類であるカニクイザルにおいて、様々な疾患や生理現象に関わる CHIA の詳細な遺伝子発現および酵素特性を明らかにした。これは、生体内における CHIA の機能解明の手がかりとなり得る。このように本研究では、農学、医学、工学と幅広い領域の発展に貢献するデータを提供した。

第6章 結論

本研究では、カニクイザル CHIA の遺伝子発現および酵素化学的性質の解析を行った。

まず、CHIA mRNA がカニクイザルの胃で特異的に発現していることを明らかにした。CHIA はカニクイザルの胃における主要な転写物であり、その発現レベルはマウスおよびヒトにおけるキチナーゼの発現と比較しても高かった。このことから、カニクイザルは胃で CHIA を大量に発現していることが分かった。

次に、カニクイザル CHIA を大腸菌組換えタンパク質として発現し、その酵素化学的性質を明らかにした。カニクイザル CHIA は、マウス Chia に比べ、幅広い pH および温度条件下で強い活性を有し、pH 安定性、熱耐性をもつ、頑強な酵素であることを明らかにした。また、高分子キチンに対してもその優れたキチン分解特性を示した。これらのことから、カニクイザル CHIA は様々な条件下で強い活性を有する優れた酵素であることが分かった。

最後に、カニクイザル CHIA の工業利用への可能性を検討した。カニクイザル CHIA が熱耐性を示したことから、高温条件下での高分子基質分解を検討した。カニクイザル CHIA は、37°C (霊長類の体温) よりも高温 (50°C) 条件下で多量に分解産物を生成した。カニクイザル CHIA のキチン・キトサン分解により得られるキトオリゴ糖は、分解する基質の種類、pH 条件により、異なることを明らかにした。これらのことは、カニクイザル CHIA を利用した効率的なキトオリゴ糖の生産が可能であることを示した。

以上の研究成果は、「カニクイザル CHIA は幅広い pH 条件下で高い活性を有する頑強な酵素」であることと、「カニクイザル CHIA のキトオリゴ糖生産への応用」の可能性を示した。本研究成果は、膨大に存在するバイオマス資源であるキチンの利用において、カニクイザル CHIA が有望な酵素であることを強く示唆した。

参考文献

1. Khoushab F, Yamabhai M (2010) Chitin research revisited. *Mar Drugs* **8**: 1988-2012.
2. Lee CG, Da Silva CA, Dela Cruz CS, Ahangari F, Ma B, Kang MJ, He CH, Takyar S, Elias JA. (2011) Role of chitin and chitinase/chitinase-like proteins in inflammation, tissue remodeling, and injury. *Annu Rev Physiol* **73**: 479-501.
3. Hamid R, Khan MA, Ahmad M, Ahmad MM, Abdin MZ, Musarrat J, Javed S (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.
5. Boot RG, Blommaert 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.
6. 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.
7. Henrissat B (1991) A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* **280**: 309-316.
8. Bussink AP, Speijer D, Aerts JM, Boot RG (2007) Evolution of mammalian chitinase(-like) members of family 18 glycosyl hydrolases. *Genetics* **177**: 959-970.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. Zhu Z, Zheng T, Homer RJ, Kim YK, Chen NY, Cohn L, Hamid Q, Elias JA (2004) Acidic mammalian chitinase in asthmatic Th2 inflammation and IL-13 pathway activation. *Science* **304**: 1678-1682.
13. Reese TA, Liang HE, Tager AM, Luster AD, Rooijen NV, Voehringer D, Locksley RM (2007) Chitin induces accumulation in tissue of innate immune cells associated with allergy. *Nature* **447**: 92-96.
14. 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.

15. Musumeci M, Aragona P, Bellin M, Maugeri F, Rania L, Bucolo C, Musumeci S (2009) Acidic mammalian chitinase in dry eye conditions. *Cornea* **28**: 667-672.
16. Bucolo C, Musumeci M, Musumeci S, Drago F (2011) Acidic mammalian chitinase and the eye: implications for ocular inflammatory diseases. *Front. Pharmacol.* **2**: 43.
17. Cozzarini E, Bellin M, Norberto L, Polese L, Musumeci S, Lanfranchi G, Paoletti MG (2009) CHIT1 and AMCase expression in human gastric mucosa: correlation with inflammation and *Helicobacter pylori* infection. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **21**: 1119-1126.
18. Nookaew I, Thorell K, Worah K, Wang S, Hibberd ML, Sjövall H, Pettersson S, Nielsen J, Lundin SB (2013) Transcriptome signatures in *Helicobacter pylori*-infected mucosa identifies acidic mammalian chitinase loss as a corpus atrophy marker. *BMC Med. Genomics* **6**: 41
19. Bierbaum S, Nickel R, Koch A, Lau S, Deichmann KA, Wahn U, Superti-Furga A, Heinzmann A (2005) Polymorphisms and haplotypes of acid mammalian chitinase are associated with bronchial asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **172**: 1505-1509.
20. Chatterjee R, Batra J, Das S, Sharma SK, Ghosh B (2008) Genetic association of acidic mammalian chitinase with atopic asthma and serum total IgE levels. *J. Allergy Clin. Immunol.* **122**: 202-208.
21. Seibold MA, Reese TA, Choudhry S, Salam MT, Beckman K, Eng C, Atakilit A, Meade K, Lenoir M, Watson HG, Thyne S, Kumar R, Weiss KB, Grammer LC, Avila P, Schleimer RP, Fahy JV, Rodriguez-Santana J, Rodriguez-Cintron W, Boot RG, Sheppard D, Gilliland FD, Locksley RM, Burchard EG (2009) Differential enzymatic activity of common haplotypic versions of the human acidic Mammalian chitinase protein. *J. Biol. Chem.* **284**: 19650-19658.
22. Okawa K, Ohno M, Kashimura A, Kimura M, Kobayashi Y, Sakaguchi M, Sugahara Y, Kamaya M, Kino Y, Bauer PO, Oyama F (2016) Loss and Gain of Human Acidic Mammalian Chitinase Activity by Nonsynonymous SNPs. *Mol. Biol. Evol.* **33**: 3183-3193.
23. Van Dyken SJ, Liang HE, Naikawadi RP, Woodruff PG, Wolters PJ, Erle DJ, Locksley RM (2017) Spontaneous chitin accumulation in airways and age-related fibrotic lung disease. *Cell* **169**: 497-509
24. Vannella KM, Ramalingam TR, Hart KM, de Queiroz Prado R, Sciruba J, Barron L, Borthwick LA, Smith AD, Mentink-Kane M, White S, Thompson RW, Cheever AW, Bock K, Moore I, Fitz LJ, Urban JF Jr, Wynn TA (2016) Acidic chitinase primes the protective immune response to gastrointestinal nematodes. *Nat. Immunol.* **17**: 538-544.
25. Sannan T, Kurita K, Iwakura Y (1976) Studies on chitin, 2. Effect of deacetylation on solubility. *Die Makromol. Chem. Macromol. Chem. Phys.* **177**: 3589-3600.

26. Kurita K, Sannan T, Iwakura Y (1977) Studies on chitin, 4. Evidence for formation of block and random copolymers of *N*-acetyl-D-glucosamine and D-glucosamine by hetero- and homogeneous hydrolyses. *Macromol. Chem. Phys.* **178**: 3197-3202.
27. Chien RC, Yen MT, Mau JL (2016) Antimicrobial and antitumor activities of chitosan from shiitake stipes, compared to commercial chitosan from crab shells. *Carbohydr. Polym.* **138**: 259-264.
28. Shen KT, Chen MH, Chan HY, Jeng JH, Wang YJ (2009) Inhibitory effects of chitooligosaccharides on tumor growth and metastasis. *Food Chem. Toxicol.* **47**: 1864-1871.
29. Qiao Y, Bai XF, Du YG (2011) Chitosan oligosaccharides protect mice from LPS challenge by attenuation of inflammation and oxidative stress. *Int. Immunopharmacol.* **11**:121-127.
30. Park JH, Saravanakumar G, Kim K, Kwon IC (2010) Targeted delivery of low molecular drugs using chitosan and its derivatives. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **62**: 28-41.
31. Kazami N, Sakaguchi M, Mizutani D, Masuda T, Wakita S, Oyama F, Kawakita M Sugahara Y (2015) A simple procedure for preparing chitin oligomers through acetone precipitation after hydrolysis in concentrated hydrochloric acid. *Carbohydr. Polym.* **132**: 304-310.
32. Dahiya N, Tewari R, Hoondal GS (2006) Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **71**: 773-82.
33. Roncal T, Oviedo A, Lopez de Armentia I, Fernandez L, Villaran MC (2007) High yield production of monomer-free chitosan oligosaccharides by pepsin catalyzed hydrolysis of a high deacetylation degree chitosan. *Carbohydr. Res.* **342**: 2750-2756.
34. Du C, Jiang S, Jiang S, Zhou Y, Zhang G (2019) A *Bacillus pumilus* originated beta-*N*-acetylglucosaminidase for chitin combinatory hydrolysis and exploration of its thermostable mechanism. *Int. J. Biol. Macromol.* **132**: 1282-1289.
35. Oyeleye A, Normi YM (2018) Chitinase: diversity, limitations, and trends in engineering for suitable applications. *Biosci. Rep.* **38**: 4.
36. Barad BA, Liu L, Diaz RE, Basilio R, Van Dyken SJ, Locksley RM, Fraser JS (2020) Differences in the chitinolytic activity of mammalian chitinases on soluble and insoluble substrates. *Protein Sci.* **29**: 966-977.
37. Wakita S, Sugahara Y, Nakamura M, Kobayashi S, Matsuda K, Takasaki C, Kimura M, Kida Y, Uehara M, Tabata E, Hiraoka K, Seki S, Matoska V, Bauer PO, Oyama F (2021) Mouse acidic chitinase effectively degrades random-type chitosan to chitooligosaccharides of variable lengths under stomach and lung tissue pH conditions. *Molecules* **26**: 6706.
38. Huh JW, Kim YH, Park SJ, Kim DS, Lee SR, Kim KM, Jeong KJ, Kim JS, Song BS, Sim

- BW, Kim SU, Kim SH, Chang KT (2012) Large-scale transcriptome sequencing and gene analyses in the crab-eating macaque (*Macaca fascicularis*) for biomedical research. **BMC Genomics** **13**: 163.
39. Ilham K, Rizaldi, Nurdin J, Tsuji Y (2017) Status of urban populations of the long-tailed macaque (*macaca fascicularis*) in west sumatra, indonesia. **Primates** **58**: 295-305.
 40. Krykbaev R, Fitz LJ, Reddy PS, Winkler A, Xuan D, Yang X, Fleming M, Wolf SF (2010) Evolutionary and biochemical differences between human and monkey acidic mammalian chitinases. **Gene** **452**: 63-71.
 41. 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.
 42. Ohno M, Togashi Y, Tsuda K, Okawa K, Kamaya M, Sakaguchi M, Sugahara Y, Oyama F (2014) 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.
 43. 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.
 44. Kageyama T (2002) Pepsinogens, progastricsins, and prochymosins: Structure, function, evolution, and development. **Cell Mol. Life Sci.** **59**: 288-306.
 45. Ohno M, Kimura M, Miyazaki H, Okawa K, Onuki R, Nemoto C, Tabata E, Wakita S, Kashimura A, Sakaguchi M, Sugahara Y, Nukina N, Bauer PO, Oyama F (2016) Acidic mammalian chitinase is a proteases-resistant glycosidase in mouse digestive system. **Sci. Rep.** **6**: 37756.
 46. Chou YT, Yao S, Czerwinski R, Fleming M, Krykbaev R, Xuan D, Zhou H, Brooks J, Fitz L, Strand J (2006) Kinetic characterization of recombinant human acidic mammalian chitinase. **Biochemistry** **45**: 4444-4454.
 47. Kimura M, Wakita S, Ishikawa K, Sekine K, Yoshikawa S, Sato A, Okawa K, Kashimura A, Sakaguchi M, Sugahara Y, Yamanaka D, Ohno N, Bauer PO, Oyama F (2016) Functional Properties of Mouse Chitotriosidase Expressed in the Periplasmic Space of *Escherichia coli*. **PLoS One** **11**: e0164367.
 48. Kimura M, Watanabe T, Sekine K, Ishizuka H, Ikejiri A, Sakaguchi M, Kamaya M, Yamanaka D, Matoska V, Bauer PO, Oyama F (2020) Comparative functional analysis between human and mouse chitotriosidase: Substitution at amino acid 218 modulates the chitinolytic and transglycosylation activity. **Int. J Biol. Macromol.** **164**: 2895-2902
 49. Tabata E, Kashimura A, Wakita S, Ohno M, Sakaguchi M, Sugahara Y, Kino Y, Matoska

- V, Bauer PO, Oyama F (2017) Gastric and intestinal proteases resistance of chicken acidic chitinase nominates chitin-containing organisms for alternative whole edible diets for poultry. *Sci. Rep.* **7**: 6662.
50. Tabata E, Kashimura A, Wakita S, Ohno M, Sakaguchi M, Sugahara Y, Imamura Y, Seki S, Ueda H, Matoska V, Bauer PO, Oyama F (2017) Protease resistance of porcine acidic mammalian chitinase under gastrointestinal conditions implies that chitin-containing organisms can be sustainable dietary resources. *Sci. Rep.* **7**: 12963.
 51. Strobel S, Roswag A, Becker NI, Trenczek TE, Encarnacao JA (2013) Insectivorous bats digest chitin in the stomach using acidic mammalian chitinase. *PLoS One* **8**: e72770.
 52. Janiak MC, Chaney ME, Tosi AJ (2018) Evolution of acidic mammalian chitinase genes (chia) is related to body mass and insectivory in primates. *Mol. Biol. Evol.* **35**: 607–622.
 53. Kondo H, Shinoda T, Nakashima H, Watanabe T, Yokohama S (2003) Characteristics of the gastric pH profiles of unfed and fed cynomolgus monkeys as pharmaceutical product development subjects. *Biopharm. Drug Dispos.* **24**: 45–51.
 54. Tabata E, Kashimura A, Uehara M, Wakita S, Sakaguchi M, Sugahara Y, Yurimoto T, Sasaki E, Matoska V, Bauer PO, Oyama F (2019) High expression of acidic chitinase and chitin digestibility in the stomach of common marmoset (*Callithrix jacchus*), an insectivorous nonhuman primate. *Sci. Rep.* **9**: 159.
 55. Tabata E, Kashimura A, Kikuchi A, Masuda H, Miyahara R, Hiruma Y, Wakita S, Ohno M, Sakaguchi M, Sugahara Y, Matoska V, Bauer PO, Oyama F (2018) Chitin digestibility is dependent on feeding behaviors, which determine acidic chitinase mRNA levels in mammalian and poultry stomachs. *Sci. Rep.* **8**: 1461.
 56. Uehara M, Tabata E, Ishii K, Sawa A, Ohno M, Sakaguchi M, Matoska V, Bauer PO, Oyama F (2018) Chitinase mRNA levels determined by qPCR in crab-eating monkey (*Macaca fascicularis*) tissues: Species-specific expression of acidic mammalian chitinase and chitotriosidase. *Genes* **9**: 244.
 57. 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**: e78669.
 58. Wakita S, Kimura M, Kato N, Kashimura A, Kobayashi S, Kanayama N, Ohno M, Honda S, Sakaguchi M, Sugahara Y, Bauer PO, Oyama F (2017) Improved fluorescent labeling of chitin oligomers: Chitinolytic properties of acidic mammalian chitinase under somatic tissue pH conditions. *Carbohydr. Polym.* **164**: 145–153.

59. Muslin EH, Clark SE, Henson CA (2002) The effect of proline insertions on the thermostability of a barley alpha-glucosidase ***Protein Eng.* 15:** 29-33.
60. 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.
61. Juang RS, Shao HJ (2002) A simplified equilibrium model for sorption of heavy metal ions from aqueous solutions on chitosan. ***Water Res.* 36:** 2999-3008.
62. Wysokowski M, Petrenko, I.; Stelling, A. L.; Stawski, D.; Jesionowski, T.; Ehrlich, H., Poriferan chitin as a versatile template for extreme biomimetics. ***Polymers* 2015, 7,** 235-265.
63. Koch BE, Stougaard J, Spaink HP (2015) Keeping track of the growing number of biological functions of chitin and its interaction partners in biomedical research. ***Glycobiology* 25:** 469-482.
64. Bueter CL, Specht CA, Levitz SM (2013) Innate sensing of chitin and chitosan. ***PLoS Pathog.* 9:** e1003080.
65. Winkler AJ, Dominguez-Nunez JA, Aranaz I, Poza-Carrion C, Ramonell K, Somerville S, Berrocal-Lobo M (2017) Short-Chain Chitin Oligomers: Promoters of Plant Growth. ***Mar. Drugs* 15:** 40.
66. Zhang X, Li K, Liu S, Zou P, Xing R, Yu H, Chen X, Qin Y, Li P (2017) Relationship between the Degree of Polymerization of Chitooligomers and Their Activity Affecting the Growth of Wheat Seedlings under Salt Stress. ***J. Agric. Food Chem.* 65:** 501-509.
67. Tabata E, Wakita S, Kashimura A, Sugahara Y, Matoska V, Bauer PO, Oyama F (2019) Residues of acidic chitinase cause chitinolytic activity degrading chitosan in porcine pepsin preparations. ***Sci. Rep.* 9:** 15609.
68. Ma JE, Li LM, Jiang HY, Zhang XJ, Li J, Li GY, Chen JP (2018) Acidic mammalian chitinase gene is highly expressed in the special oxyntic glands of *Manis javanica*. ***FEBS Open Bio.* 8:** 1247-1255.
69. Uehara M, Tabata E, Okuda M, Maruyama Y, Matoska V, Bauer PO, Oyama F (2021) Robust chitinolytic activity of crab-eating monkey (*Macaca fascicularis*) acidic chitinase under a broad pH and temperature range. ***Sci. Rep.* 11:** 15470.
70. Du C, Zhao X, Song W, He N, Jiang S, Zhou Y, Zhang G (2021) Combined strategies to improve the expression of acidic mammalian chitinase in *Pichia pastoris* for the production of *N, N'*-diacetylchitobiose. ***Biochem. Engineering J.* 167:** 107907.
71. Van Dyken SJ, Locksley RM. (2018) Chitins and chitinase activity in airway diseases. ***J. Allergy Clin. Immunol.* 142:** 364-369.

謝辞

本研究は工学院大学 先進工学部 生命化学科で行われました。本研究を行うにあたり、多くの方々にご協力頂きました。

指導教員である小山文隆教授には、豊富な知識および経験の下、熱心なご指導と適切なご助言、ご指導賜りました。心より感謝申し上げます。

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、松野研司教授、早稲田大学澤村直哉教授に厚く感謝いたします。

実験に関するご指導、ご助言を何度もいただきました菅原康里准教授、坂口政吉准教授に心から御礼申し上げます。

高崎千夏修士、田畑絵理博士、脇田悟誌博士、大野美紗博士には、実験に関するご指導をはじめとする原著論文作成におけるご助言やご協力など、多大なるお力添えをいただきました。心より感謝いたします。

また、ジョンズ・ホプキンス大学の澤明教授、石井一裕博士には、米国での生活のサポートや実験のご指導を賜りました。感謝申し上げます。

原著論文作成に際して多くのご助言、ご指摘を賜りました Peter O. Bauer 博士に深く感謝いたします。

私が研究室にいる間、共に実験を行い、助けてくださった研究室の皆様、有難うございました。

最後に、博士後期課程への進学を可能にし、進学後も不自由なく研究に集中できるようサポートしつつ、私を見守り続けてくれた家族に感謝します。