

氏名（本籍） <sup>かし</sup> <sup>むら</sup> <sup>あき</sup> <sup>のり</sup> 榎村 昭 徳（東京都）  
 学位の種類 博士（工学）  
 学位記番号 博甲 第133号  
 学位授与の要件 学位規則 第4条 第1項  
 学位授与年月日 平成27年3月31日  
 学位論文題目 マウス酸性ほ乳キチナーゼの大腸菌での発現系の開発  
 論文審査委員 主査 小山 文 隆  
 副査 今村 保 忠  
 南 雲 紳 史  
 佐 藤 光 史  
 平 秀 晴（岩手大学名誉教授・工学院大学非常勤講師）

## 論文要旨

### 目次

#### 第I章 序論

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

#### 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
- 第2節 実験材料と実験方法
- 第3節 実験結果
- 第4節 考察
- 第5節 要約

#### 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
- 第2節 実験方法
- 第4節 考察
- 第5説 要約

#### 第IV章 総合考察

#### 第V章 結論

#### 参考文献

#### 謝辞

#### 第I章 序論

##### キチンとキチナーゼ

キチンは、N-アセチル-D-グルコサミンが $\beta$ -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。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。

キチナーゼは、キチンの $\beta$ -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。

##### 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。両酵素は糖質加水分解酵素のファミリー18に属し、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し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。

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ゴーシェ病で顕著に上昇する。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。

もう一つのほ乳類キチナーゼである AMCase 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, AMCase) と命名された。AMCaseは50kDaの酵素で、主として、マウスの胃と肺で発現している。他のキチナーゼは低いpHで不活性になるが、AMCaseは低いpH条件下でも失活しない。マウス AMCase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。

##### 研究目的

AMCase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 AMCase 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。そして、

AMCase 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。さらに AMCase の発現は、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。

最近、当研究室の Ohno らは AMCase 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。これらのことは、AMCase 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 AMCase の病態生理学的機能については大部分が不明瞭である。

その機能を明らかにするために大腸菌で融合タンパク質としてマウス AMCase を発現することを目的として、発現系の確立とその産物の解析を行った。

## 第Ⅱ章 マウス AMCase の大腸菌での発現とその性質 序論

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。AMCase 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、AMCase 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。そこで、マウス AMCase を Protein A, V5 エピトープ、(His) 6 との融合タンパク質 (ProteinA-AMCase-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に *Staphylococcus* 属の短縮型 Protein A との融合タンパク質として、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 を使用した。AMCase 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予想される。

## 実験結果

今回、N 末端に Protein A, C 末端に V5 エピトープと (His)6 タグを融合させた活性のある AMCase (Protein A-AMCase-V5-His) のペリプラズム空間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* 由来 Protein A プロモーター、Protein A のシグナル配列と短縮型 Protein A 持つ発現ベクターである pEZZ18 に組み込み、発現を試みた。発色性合成基質である 4-nitrophenyl N,N'-diacetyl- $\beta$ -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 度だった。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 度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- $\beta$ -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-mouse 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。

## 考察

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 AMCase を生成することが出来た。本実験の場合、発現した Protein A-AMCase-V5-His の大部分は、大腸菌のペリプラズム画分に存在した。そして、組み換えタンパク質が、pH 1~3 での酸安定性を示した。この酸耐性のおかげで、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。

この研究の目的は、大腸菌で作成したマウス AMCase と CHO 細胞で発現したマウス AMCase の酵素としての性質を比較することだった。pH 依存性と酸安定性に関して、大腸菌で発現した AMCase の酵素特性は天然キチナーゼ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。

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な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との間で保存されていることやペリプラズム発現のためかもしれない。

このように、大腸菌で発現した Protein A-mouse 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。

### 第三章 大腸菌で発現した AMCase の触媒ドメインの性質

#### 序論

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 を生化学的に解析するため、前章で、マウス AMCase を Protein A, V5 エピトープと (His) 6 タグ (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。大腸菌で生産した AMCase 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 AMCase 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。しかし、マウス AMCase のキチン消化における CatD と CBD の機能的な役割、特に高分子量結晶質のキチン質とエビの殻の消化、については解明されていない。

そこで、マウス AMCase 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。

#### 実験結果

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- $\beta$ -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 あるいは pH 7.6 の条件でキチンビーズに結合し、pH 2.0 で 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。

#### 考察

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 と類似しており、N

末領域の CatD と C 末領域の CBD からなる。Tjoelker らは、ヒト Chit1 を COS-1 細胞で発現し、CBD 領域を生化学的手法で同定し、CatD と CBD の性質を明らかにした。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。

生産された CatD は、IgG セファロースで迅速に回収できた。本章において、組換え CatD の 4-nitrophenyl N,N'-diacetyl- $\beta$ -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 が同等であることを示している。しかし、CatD は、完全長 AMCase と比較すると、結晶性キチンとエビの殻の分解において、効率が少し低いことを示していた。

*Serratia marcescens* 2170 は、キチナーゼ C1 と C2 を産生する。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 protease による分解除去によって生じることが報告されている。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。

#### 第四章 総合考察

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合成し、分泌する。AMCase は、ペプシンにドメインの連結部分で 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、この可能性は AMCase でもあり得る。

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。

#### 第五章 結論

マウス AMCase を大腸菌で Protein A と V5-His との融合タンパク質として発現、精製することに成功した。

この組換え酵素を使って、至適が pH 2 の極酸性で、至適温度が 54 度である等の諸性質を明らかにした。そして、この大腸菌組換え体が、培養細胞組換え体と同等の酵素活性、特異性を有していることを示した。さらに、完全長 AMCcase から触媒ドメインだけを抜き出して大腸菌で同様に発現することにも成功した。この組換え触媒ドメインは完全長 AMCcase とほぼ同等のキチン分解特性を有していた。したがって、完全長 AMCcase と触媒ドメインには、大腸菌においても、酵素活性発現に必要な高次構造を形成できる分子である。これらの AMCcase の性質は、工学的にこの酵素を利用可能であることを示している。

AMCcase の生化学的な特性解析には多量の機能的な酵素タンパク質を必要とする。本研究で開発した大腸菌組換えタンパク質は、AMCcase の構造と機能的関係、さらには生物医学的機能を明らかにする研究に有効である。

## 論文審査要旨

キチンは、N-アセチル-D-グルコサミン (GlcNAc) が  $\beta$ -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。

キチナーゼは、キチンの  $\beta$ -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。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。

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 (AMCcase) の二種類が同定されている。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。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。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。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。もう一つのほ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。AMCcase は 50kDa の酵素で、主として、マウスの胃で高い発現をしている。

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。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。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。AMCcase の発現は、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。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。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。

榎村昭徳君は、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を得ることを目的とし、マウス AMCcase 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。

今回、彼は、大腸菌で N 末端に Protein A、C 末端に V5 epitope と (His) 6tag を融合させた活性のある AMCcase (Protein A-AMCcase-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 AMCcase 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- $\beta$ -D-chitobioside を用いて測定したキチナーゼ活性で、最も多く Protein A-AMCcase-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-AMCcase-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 であることも示した。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 まで熱安定性を示した。さらに、大腸菌組換え AMCcase の 4-nitrophenyl N,N'-diacetyl- $\beta$ -D-chitobioside に対するキチナーゼ活性は、CHO 細胞で発現させた AMCcase に匹敵した。さらに、組換え AMCcase はキチンビーズに結合し、コロイダルキチンを分解し、主に GlcNAc 二量体を遊離することを明らかにした。このように、大腸菌で発現した Protein A-AMCcase-V5-His 融合タンパク質は、CHO 細胞で発現した AMCcase に相当するキチナーゼ活性を備えていることを示した。

マウス AMCcase 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。AMCcase 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 AMCCase 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- $\beta$ -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 AMCCase とほぼ同等であることを示した。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 二量体を生成することを明らかにした。したがって、マウス AMCCase 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と思われる。これらの結果は、AMCCase 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明らかにした。

樫村君の組換え AMCCase とその CatD が様々な病気における AMCCase の生体病理学的役割の解明、新薬の開発につながるような特異的阻害剤の研究に使用することができる。

以上のことから、本論文は博士 (工学) の学位請求論文として充分価値があるものと認められる。