

博士學位論文

氏名（本籍）	木村 将大（東京）
学位の種類	博士（工学）
学位記番号	博甲第158号
学位授与年月日	令和 2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	組換えマウスキチナーゼの 機能比較に関する研究

論文審査委員	主査 小山 文隆
	副査 今村 保忠
	〃 南雲 紳史
	〃 大野 尚仁（東京薬科大学）
	〃
	〃
	〃

博士学位論文

組換えマウスキチナーゼの
機能比較に関する研究

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 bd17002

氏名 木村 将大

指導教員 小山 文隆 教授

目次

第 I 章 序論.....	5
第 1 節 キチン	5
第 2 節 キチナーゼ	6
第 3 節 ほ乳類キチナーゼ	6
第 4 節 ほ乳類キチナーゼの生物・医学的役割	7
第 5 節 <i>Serratia marcescens</i> キチナーゼ	8
第 6 節 研究目的	9
第 II 章 マウスキトトリオンダーゼの大腸菌ペリプラズム空間での発現とその特性 解析	11
第 1 節 研究目的	11
第 2 節 実験材料と方法	13
ほ乳類細胞用発現ベクターの構築	13
大腸菌用発現ベクターの構築	15
大腸菌で発現した Chit1-V5-His の可溶性と不溶性画分の調製	18
大腸菌の培養液，ペリプラズム空間，可溶性と不溶性画分からの Protein A-Chit1- V5-His の調製	21
HiTrap Q HP カラムによる Protein A-Chit1-V5-His の精製	24
タンパク質濃度，SDS-PAGE と Western blotting での組換えタンパク質の解析 ..	24
酵素化学的解析とキチン結合活性の解析	25
Chit1-V5-His の CHO 細胞での一過性発現と培養液からの精製	26
Protein A-Chit1-V5-His によるキチン基質の分解	26
第 3 節 結果	28

pET システムを用いて大腸菌の細胞質でのマウス Chit1 の発現	28
大腸菌のペリプラズム空間における可溶性 Protein A-Chit1-V5-His 融合タンパク質の発現	30
大腸菌と CHO 細胞で発現した組換え Chit1 のキチナーゼ活性の比較	34
Protein A-Chit1-V5-His の特性解析	36
Protein A-Chit1-V5-His のキチンビーズへの結合	36
Protein A-Chit1-V5-His は、高分子量キチンと GlcNAc オリゴマーを分解する ..	39
酸性と中性条件下での Chit1 によるキチン基質の分解	41
第 4 節 考察	43
第 III 章 マウスキトリオシダーゼと酸性ほ乳動物キチナーゼのキチン分解特性の直接比較と相乗効果の決定	50
第 1 節 研究目的	50
第 2 節 実験材料と方法	51
ほ乳類キチナーゼの発現ベクターの構築	51
大腸菌で発現するための <i>Serratia</i> ChiB ベクターの設計	51
<i>Serratia</i> ChiB-V5-His, Protein A-Chit1-V5-His と Protein A-AMCase-V5-His の調製	52
タンパク質濃度, SDS-PAGE, Western blotting およびキチン分解活性	52
キチナーゼによるキチン基質の分解	53
Chit1 と AMCase の混合液による (GlcNAc) ₄ とコロイダルキチンの分解	54
統計分析	54
第 3 節 結果	55
大腸菌で発現した Chit1, AMCase および <i>Serratia</i> ChiB の精製	55
4-NP-(GlcNAc) ₂ と比色分析を用いた Chit1, AMCase および <i>Serratia</i> ChiB のキチン分解活性の比較	57
4-NP-(GlcNAc) ₂ と FACE 法を用いたキチン分解活性の評価	61

(GlcNAc) ₄ と FACE 法を用いた様々な pH でのキチン分解活性の比較.....	63
高分子量キチン基質を用いた様々な pH での活性の比較	65
pH 5.0 および 7.0 でのキチン基質に対する Chit1 と AMCase の混合状態での分 解.....	67
第 4 節 考察.....	70
第 IV 章 総合考察.....	74
第 V 章 結論	77
参考文献.....	79
謝辞	86

第 I 章 序論

第 1 節 キチン

キチンは、*N*-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc) が β -1,4 結合した重合体で、寄生虫のミクロフィラリアの鞘や真菌の細胞壁、昆虫や甲殻類の外骨格の主要な構成成分である (図 I.1)。このように、キチンは様々な生物に存在するので、自然界においてセルロースの次に豊富に存在するバイオマスである。しかし、キチンは高等植物やほ乳類において合成されていない [1, 2]。

キチンは、3 種類の異なる結晶形態をとる。それらは、 α -、 β -、 γ -キチンとよばれている。 α -キチンは、最も一般的なキチン鎖の形状である。キチン鎖は、逆平行配列で配置されており、キチン鎖の分子間及び分子内の水素結合が密に形成されている。 α -キチンは甲殻類、 β - および γ -キチンは無脊椎動物で多く見られる。

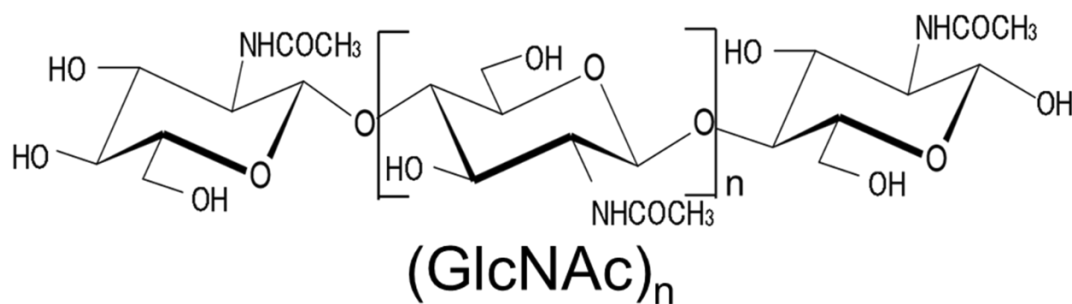


図 I.1. キチンの構造

第 2 節 キチナーゼ

キチナーゼ (EC 3.2.1.14) は、キチンの β -1,4 グリコシド結合を加水分解する [3, 4]。キチナーゼは細菌類、真菌類、線虫、節足動物など様々な生物が合成している。キチン含有生物は、その生体防御やキチンを炭素や窒素のエネルギー源として利用している [2, 4-5]。

キチナーゼは、糖質関連酵素データベース [The Carbohydrate Active enZymes Database (CAZy), <http://www.cazy.org/>] で、グリコシド結合を加水分解する酵素 (Glycoside Hydrolase : GH) として分類されている。CAZy は、各種糖質関連酵素をアミノ酸配列の類似性を基に分類し、その三次元構造と酵素の特性に関連する情報を提供している。CAZy システムは、同一または類似酵素の基質特異性など、機能の推定に有益である [6]。キチナーゼは GH18 と GH19 ファミリーに分類されている。GH18 酵素は、保存されている触媒ドメインのアミノ酸配列に類似性があり、 $(\beta/\alpha)_8$ -バレル (Triosephosphate isomerase [TIM] バレル) の基本構造を持つ一群のグループである。

キチナーゼは GlcN 間のグリコシド結合を特異的に加水分解するキトサナーゼと区別されている。

第 3 節 ほ乳類キチナーゼ

マウスとヒトでは、二種類の活性を有するキチナーゼ、キトトリオシダーゼ (chitotriosidase, Chit1) と酸性ほ乳動物キチナーゼ (acidic mammalian chitinase, AMCase) がマウスとヒトで同定されている [2, 5, 7]。両酵素は細菌のキチナーゼに相同性を示し、GH18 ファミリーに分類される。このファミリーには、構

造的にキチナーゼと似ているが、キチナーゼ活性を持たないキチナーゼ様タンパク質 (chitinase-like proteins) も含まれる [5, 6, 8-10]。

Chit1 は、精製、クローニングされた最初のほ乳類キチナーゼであり、ヒトにおいて活性化マクロファージや好中球によって合成される [11-13]。Chit1 レベルは、常染色体劣性のリソソーム蓄積症であるゴーシェ病患者の血漿中で、約 1,000 倍上昇する [11]。

Chit1 は 11 個の exon から構成されている。ヒト Chit1 遺伝子の exon 10 における 24 bp の重複によって、Chit1 は活性を有する酵素の生成ができない [14]。多くの人種において、この変異のホモ接合体の割合が約 5% である。そのため、Chit1 活性が欠損しているヒトは、人種を超えて、少なからず認められる。Acidic mammalian chitinase (AMCase) は、常染色体劣性遺伝性の Chit1 欠損の白人でキチナーゼ活性が検出されたことをきっかけに発見された。AMCase はその等電点が酸性を示すことからこの酵素は命名された [15, 16]。この経緯から、AMCase は Chit1 の代償的役割があると考えられている。これらのほ乳類キチナーゼは、キチンを含む病原菌や寄生虫に対する生体防御に関わると考えられている [2, 5]。

Chit1 と AMCase は、分子量 (MW) 約 50 kDa の分泌タンパク質である [13, 15]。それらは、N 末端触媒ドメイン (catalytic domain, CatD) および C 末端キチン結合ドメイン (chitin-binding domain, CBD) からなる。Chit1 と AMCase は、GH18 に属している。

第 4 節 ほ乳類キチナーゼの生物・医学的役割

Chit1 と AMCase は同じ組織や細胞でも発現している。Chit1 はマウスの胃、眼、肺で高発現しており、一方で、AMCase は胃、顎下腺、肺で発現して

いる [17]。加えて、両酵素は単球とマクロファージで発現し、リソソームに存在するか細胞外に分泌される [18]。それぞれの mRNA レベルはこれらの細胞において異なるサイトカインによって制御される [19]。活性化したマクロファージにおける Chit1 の発現レベルは AMCase のそれよりも高いが、一方で、リポ多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 処理した単球では低い [19]。

Chit1 と AMCase は、異なる病理学的状態においてそれらの発現が増加するため、注目を集めている [7, 11 20-27]。Chit1 レベルは、常染色体劣性リソソーム蓄積症であるゴーシェ病患者の血漿中で約 1,000 倍増加する [11]。加えて、Chit1 レベルは、アテローム性動脈硬化症 [20]、糖尿病 [21]、嚢胞性線維症 [22]、慢性閉塞性肺疾患 (COPD) [23] などの慢性炎症性疾患やアルツハイマー病 [24] や喫煙者 [25] で変化する。一方、AMCase mRNA およびタンパク質レベルの有意な増加が、喘息マウスモデルならびにアレルギー性肺炎の抗原誘導マウスモデルにおいて検出された [26, 27]。当研究室の Ohno らは、AMCase はマウスの胃と腸の条件下で主要なプロテアーゼに耐性の糖質分解酵素として機能することを示した [28]。これまでに、両酵素の発現レベルは研究されてきたが、両酵素に適した条件でのそれらの機能は不明な点が多い。さらに、関連疾患の病因および生理学的状態に関するほ乳類キチナーゼの寄与は、明らかになっていない。

第 5 節 *Serratia marcescens* キチナーゼ

Serratia marcescens は高いレベルでキチナーゼを生産するグラム陰性菌である [29]。それはキチン分解を理解するための細菌モデルとして認識されており、3 種類のキチナーゼ、キチナーゼ A (*Serratia* ChiA)、キチナーゼ B (*Serratia* ChiB) およびキチナーゼ C (*Serratia* ChiC) を発現する [30-32]。これらのキチ

ナーゼは、キチン分解およびキチン分解酵素系の分子的機構の解明において先駆的な役割を果たしてきた [33-38]。 *Serratia* ChiA, ChiB と ChiC は、高分子量キチン基質と共にインキュベートすると相乗効果を示す [30, 31]。 *Serratia* ChiA と ChiB の組み合わせでは分解活性が各キチナーゼ単独の分解活性の合計値よりも約 2 倍に増加した。このように、 *Serratia marcescens* は構造や性質の異なるキチナーゼを生産することによって、効率的なキチン分解を可能にしていると考えられている。

第 6 節 研究目的

前述の通り Chit1 と AMCase は、生体内において特定の疾患と関与していると考えられている。しかし、Chit1 と AMCase の発現の増加や生理作用のメカニズムについて、いまだ不明な点が多い。

本研究では、特定の病理学的条件下で過剰発現された Chit1 と AMCase が、異なる役割をもつと仮説を立てた。Chit1 と AMCase の生物医学的な役割の解明には、精製酵素を用いた詳細な解析が必要である。そのため、簡便で容易に組換えタンパク質を取得する方法の確立が必要であった。大腸菌は、維持が簡便で、迅速かつ安価で、容易に組換えタンパク質の生成量を調整することができる。本学位論文では、まず最初にマウス Chit1 を可溶性タンパク質として宿主大腸菌で発現させ、クロマトグラフィーを用いて精製酵素を取得することを目的とした。取得した精製酵素を用いてマウス Chit1 の至適条件や各種キチン基質に対する反応性等の性質を明らかにすることを目的とした。Chit1 と AMCase は胃や肺などの同じ組織や免疫細胞で発現している。Chit1 と AMCase の発現レベルは研究されているが、両酵素の機能を直接比較した研究はない。次に、本学位論文では、比色分析と Fluorophore-Assisted Carbohydrate

Electrophoresis (以下, FACE と略) 法 [41-43] 法を組み合わせ, 人工および天然のキチン基質を用いて, Chit1 と AMCase を, 先駆的役割を果たしてきた細菌キチナーゼである *Serratia marcescens* Chitinase B (*Serratia* ChiB)と直接比較し, 両酵素の性質を客観的に評価することを目的とした [42, 43]。さらに, 本研究は, Chit1 を AMCase と共に存在する生体内の様々な条件下で各種キチン基質に作用させ, その産物を解析することで酵素機能の特性を比較すること, さらに相乗効果の有無を明らかにすることを目的とした。

第 II 章 マウスキトリオンダーゼの大腸菌ペリプラズム空間での発現とその特性解析

第 1 節 研究目的

Chit1 の生物医学的な役割の研究推進のためには、精製酵素を用いた詳細な解析が必要である。そのため、簡便で容易に組換えタンパク質を取得する方法の確立が必要であった。第 II 章では、最初にマウス Chit1 を可溶性タンパク質として宿主大腸菌で発現させ、クロマトグラフィーを用いて精製酵素を取得することを目的とした。ほ乳類の遺伝子を原核生物で発現すると高次構造形成や活性への影響が懸念される。そのため、動物細胞で発現した組換えタンパク質と同等の機能を有する酵素を大腸菌から取得することを目的とした。次に、取得した精製酵素を用いてマウス Chit1 の至適条件や各基質に対する反応性等の性質を調べ、マウス Chit1 の生化学的役割を明らかにすることを目的とした。

本研究では、生体内条件下におけるマウス Chit1 の機能解析のため、マウス Chit1 を Protein A-Chit1-V5-His の組換え融合体タンパク質を可溶性タンパク質として宿主大腸菌のペリプラズム空間で発現させ、二種のクロマトグラフィーで精製した。この方法は、Kashimura らが、マウス AMCase を Protein A と V5 エピトープ、(His)₆ タグ (V5-His) を付加した組換えタンパク質 (Protein A-AMCase-V5-His) として大腸菌のペリプラズム空間で発現できることを報告した方法 [39,40] に準じて行った。

本章では、大腸菌で発現した Protein A-Chit1-V5-His と CHO 細胞で発現した Chit1-V5-His の比活性を測定した。本研究では Protein A-Chit1-V5-His の酵素学的機能を明らかにするため、至適 pH、至適温度、pH 安定性、キチン結

合活性を 4-nitrophenyl *N, N'*-diacetyl- β -D-chitobioside [4-NP-chitobioside, 4-NP-(GlcNAc)₂] を用いて決定した。その後, Chit1 を各種キチン基質に経時的に作用させ, その生成物の還元末端を蛍光標識し, 電気泳動で分離する Fluorophore-Assisted Carbohydrate Electrophoresis (FACE) 法で分析した。最後に, Chit1 を各種キチン基質に pH 2.0-8.0 の範囲で作用させ, どのような分解活性を有するか検討した。

第 2 節 実験材料と方法

ほ乳類細胞用発現ベクターの構築

鋳型とするマウス胃 total cDNA は、マウス total RNA マスターパネル (Clontech Laboratories 社) から得たマウス胃 total RNA を使用し、Ohno らが報告した方法で合成した [17]。マウス胃 total cDNA を鋳型として、マウス Chit1 cDNA (GenBank accession number AY458654.1 nucleotides 229-1620) を、KOD Plus DNA ポリメラーゼ (Toyobo 社) と EcoRI と XhoI 制限酵素認識部位をそれぞれ付加したプライマー (Sigma-Aldrich 社) を用いた PCR によって増幅した。PCR は、以下の 2 種類のプライマーを用いて行った。フォワードプライマー (5'-CATGGAATTCGGAACAAGTTGTAGAGCTCTCGGCT-3') は、6 塩基の EcoRI 認識配列 (下線部) と Chit1 cDNA の塩基配列と一致する 25 塩基の Chit1 配列を含み、リバープライマー (5'-GTGACCTCGAGCGCTCCAGGTACAACATTTGCAAG-3') は XhoI 認識配列 (下線部) と Chit1 cDNA の塩基配列に相補的な配列を含む。リバープライマーは、pcDNA3.1/V5-His C ベクター (Invitrogen 社) 内の V5 エピトープタグ (V5) とヒスチジンタグ (His) の読み枠フレームと一致するよう設計した。なお、両プライマーには、PCR 産物の制限酵素による効率的な切断のため、4-5 塩基を余分に付加してある。PCR 産物は、Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega 社) を用いて精製し、EcoRI と XhoI で切断した。DNA 断片は 1.5% アガロースゲルで分離、精製し、pcDNA3.1/V5-His C ベクターを同様に切断して作成したベクターにクローニングした。構築した pcDNA3.1/pre-Chit1-V5-His の全塩基配列は、Eurofins Genomics 社に依頼して確認した (図 II. 1)。

A. Pre-Chit1-V5-His

493 amino acids 54,447 dalton

MVQSLAWAGVMTLLMVQWGSAAKLVCYLTNWSQYRTEAVRFFPRDVPN
LCTHVIFAFAAGMDNHQLSTVEHNDELLYQELNSLKTKNPKLKTLLAVGGW
TFGTQKFTDMVATASNRQTFVKSALSFLRTQGFDGLDLDFEFPGGGRGSPTV
DKERFTALIQDLAKAFQEEAQSSGKERLLLLTAAVPSDRGLVDAGYEVDKIA
QSLDFINLMAYDFHSSLEKTTGHNSPLYKRQGESGAAAEQNVDAAVTLWLQ
KGGTPASKLILGMPTYGRSFTLASSSDNGVGAPATGPGAPGPYTKDKGVLAY
YEACSWKERHRIEDQKVPYAFQDNQWVSFDDVESFKAKAAYLKQKGLGG
AMVWVLDLDDFKGSFCNQGYPYPLIRTLRQELNLPSETPRSPEQIPEPRPSS
MPEQGPSPGLDNFCQGKADGVYPNPGDESTYYNCGGGRLFQQSCPPGLVF
RASCKCCTWS**ARGHPFEGKPIP****NPLLGLDSTRTGHHHHHH**

B. Mature Chit1-V5-His

473 amino acids 52,186 dalton

AKLVCYLTNWSQYRTEAVRFFPRDVPNLCTHVIFAFAAGMDNHQLSTVEHN
DELLYQELNSLKTKNPKLKTLLAVGGWTFGTQKFTDMVATASNRQTFVKS
ALSFLRTQGFDGLDLDFEFPGGGRGSPTVDKERFTALIQDLAKAFQEEAQSS
GKERLLLLTAAVPSDRGLVDAGYEVDKIAQSLDFINLMAYDFHSSLEKTTGH
NSPLYKRQGESGAAAEQNVDAAVTLWLQKGGTPASKLILGMPTYGRSFTLAS
SSDNGVGAPATGPGAPGPYTKDKGVLAYYEACSWKERHRIEDQKVPYAFQ
DNQWVSFDDVESFKAKAAYLKQKGLGGAMVWVLDLDDFKGSFCNQGYPY
PLIRTLRQELNLPSETPRSPEQIPEPRPSSMPEQGPSPGLDNFCQGKADGVYP
NPGDESTYYNCGGGRLFQQSCPPGLVFRASCKCCTWS**ARGHPFEGKPIP****NPLLGLDSTRTGHHHHHH**

図 II. 1. Pre-Chit1-V5-His と 成熟-Chit1-V5-His の推定アミノ酸配列と分子量
アミノ酸配列は、図 II. 8A の模式図と同じ色を使用した。濃い青はマウス
Chit1, 青はマウス成熟 Chit1, 緑は V5-His 配列を示す。

大腸菌用発現ベクターの構築

シグナル配列を除去するために、pcDNA3.1/pre-Chit1-V5-His を鋳型として KOD Plus DNA ポリメラーゼと EcoRI と SalI 制限酵素認識部位を付加したプライマーを使用した PCR で成熟 Chit1-V5-His cDNA を増幅した。フォワードプライマー (5'-CGCGGATGAATTCGAGCAAACTGGTCTGCTACCTCACCAA-3') は、Chit1 cDNA と T7 Tag の C 末端領域の塩基配列を有す。リバースプライマー (5'-AGGGGTCGACTAGAAAGGCACAGTCGAGGCTGATCA-3') は SalI 認識部位と pcDNA3.1/V5-His C ベクター の相補配列を含む。

大腸菌発現ベクターである pET-21d (Novagen 社) を EcoRI と SalI で切断し、T4 DNA リガーゼ (Toyobo 社) を使用して、同様に制限酵素処理した成熟 Chit1-V5-His cDNA と連結し、pET-21d/Chit1-V5-His を構築した (図 II. 2)。

Protein A-融合タンパク質の発現のため、フォワードプライマー (5'-CATGGAATTCGGCAAACTGGTCTGCTACCTCACC-3') は EcoRI 認識部位と Chit1 cDNA を含み、Protein A の C 末端領域と読み枠フレームが一致するように設計した。このフォワードプライマーと、上記、SalI 認識部位と pcDNA3.1/V5-His C ベクターの相補配列を持つリバースプライマーを使用して、PCR 増幅を行い、成熟 Chit1-V5-His cDNA を得た。Protein A 融合発現ベクター pEZZ18 (GE Healthcare 社) を EcoRI と SalI で切断し、T4 DNA リガーゼを用いて成熟 Chit1-V5-His cDNA と連結し、pEZZ18/pre-Protein A-Chit1-V5-His を構築した。それらのプラスミド DNA を大腸菌 BL21 (DE3) (Takara Bio) に導入した (図 II. 3)。

Chit1-V5-His

489 amino acids 53,961 dalton

MASMTGGQQMGRIRIRAKLVCYLTNWSQYRTEAVRFFPRDVPNLCTHVI
FAFAGMDNHQLSTVEHNDELLYQELNSLKTKNPKLKTLLAVGGWTFGTQK
FTDMVATASNRQTFVKSALSFLRTQGFDGLDLDFEFPGGGRGSPTVDKERFT
ALIQDLAKAFQEEAQSSGKERLLLTAAVPSDRGLVDAGYEVDKIAQSLDFIN
LMAYDFHSSLEKTTGHNSPLYKRQGESGAAAEQNVDAAVTLWLQKGT
PASKLILGMPTYGRSFTLASSSDNGVGAPATGPGAPGPYTKDKGVLAYYEACSW
KERHRIEDQKVPYAFQDNQWVSFDDVESFKAKAAYLKQKGLGGAMVWVL
DLDDFKGSFCNQGPYPLIRTLRQELNLPSETPRSPEQIPEPRPSSMPEQG
PS PGLDNFCQGKADGVYPNPGDESTYINC GGGRLFQQSCPPGLVFRASCKCC
TWS**ARGHPFEGKPIP**N**LLGLDSTRTGHHHHHH**

図 II. 2. Chit1-V5-His の推定アミノ酸配列と分子量

アミノ酸配列は、図 II. 6A の模式図と同じ色を使用した。濃いピンクは T7 Tag 配列、青はマウス成熟 Chit1、緑は V5-His 配列である。

A. Pre-Protein A-Chit1-V5-His

636 amino acids 70194 dalton

MKKKNIYSIRKLGVGIASVTLGTLISGGVTPAANA**AQHDEAVDNKFNKEQ**
QNAFYEILHLPNLNEEQRNAFIQSLKDDPSQSANLLAEAKKLND**AQAPKVD**
NKFNKEQQNAFYEILHLPNLNEEQRNAFIQSLKDDPSQSANLLAEAKKLND
AQAPKVDANSAKLVCYLTNWSQYRTEAVRFFPRDVPNLCTHVIFAFA**GMD**
NHQLSTVEHNDELLYQELNSLKTKNPKLKTLLAVGGWTFGTQKFTDMVAT
ASNRQTFVKSALSFLRTQGFGLDLDFEPPGGRGSPTVDKERFTALIQDLA
KAFQEEAQSSGKERLLLTAAPPSDRGLVDAGYEVDKIAQSLDFINLMAYDF
HSSLEKTTGHNSPLYKRQGESGAAAEQNVDAAVTLWLQKGT**PASKLILGM**
PTYGRSFTLASSDNGVGAPATGPGAPGPYTKDKGVLAYYEACSWKERHRI
EDQKVYPYAFQDNQWVSFDDVESFKAKAAYLKQKGLGGAMVWVLDLDDF
KGSFCNQGPYPLIRTLRQELNLPSETPRSP**EIQIPEPRSSMPEQGPSPGLDN**
FCQGKADGVYPNPGDESTYYNCGGGRLFQQSCPPGLVFRASCKCCTWSAR
GHPFEGKPIP**NLLGLDSTRTGHHHHHH**

B. Mature Protein A-Chit1-V5-His

600 amino acids 66,568 dalton

AQHDEAVDNKFNKEQQNAFYEILHLPNLNEEQRNAFIQSLKDDPSQSANLL
AEAKKLND**AQAPKVDNKFNKEQQNAFYEILHLPNLNEEQRNAFIQSLKDD**
PSQSANLLAEAKKLND**AQAPKVDANS**AKLVCYLTNWSQYRTEAVRFFPRDV
DPNLCTHVIFAFA**GMDNHQLSTVEHNDELLYQELNSLKTKNPKLKTLLAVG**
WTFGTQKFTDMVATASNRQTFVKSALSFLRTQGFGLDLDFEPPGGRGS
PTVDKERFTALIQDLAKAFQEEAQSSGKERLLLTAAPPSDRGLVDAGYEV
KIAQSLDFINLMAYDFHSSLEKTTGHNSPLYKRQGESGAAAEQNVDAAVTL
WLQKGT**PASKLILGMPTYGRSFT**LASSDNGVGAPATGPGAPGPYTKDKG
VLAYYEACSWKERHRIEDQKVYPYAFQDNQWVSFDDVESFKAKAAYLKQK
GLGGAMVWVLDLDDFKGSFCNQGPYPLIRTLRQELNLPSETPRSP**EIQIPEP**
RPSSMPEQGPSPGLDNFCQGKADGVYPNPGDESTYYNCGGGRLFQQSCPP
GLVFRASCKCCTWSARGHPFEGKPIP**NLLGLDSTRTGHHHHHH**

図 II. 3. Protein A-Chit1-V5-His の推定アミノ酸配列と分子量

アミノ酸配列は、図 II. 7A の模式図と同じ色を使用した。濃い青は Protein A のシグナル配列、黄色は短縮型 Protein A、青はマウス成熟 Chit1、緑は V5-His 配列である。

大腸菌で発現した Chit1-V5-His の可溶性と不溶性画分の調製

形質転換した大腸菌を 100 µg/mL アンピシリンを含む 1 L LB 培地中で、37°C で培養した。OD₆₆₀ = 0.6 となった時点で、終濃度 1 mM になるよう isopropyl β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) を添加し、3 時間誘導培養した。培養液を 5,000 x g で 4°C、20 分間遠心して集菌し、菌体をプロテアーゼ阻害剤 (Complete, Roche 社) を含む 20 mM Tris-HCl (pH 7.6), 0.5 M NaCl 溶液 20 mL に懸濁し、氷上で 10 分間、超音波処理した (抽出画分)。この大腸菌破碎液を 15,000 x g で 4°C、20 分間、遠心分離し、その上清と沈澱を回収した (上清：菌体内可溶性画分、沈殿：菌体内不溶性画分)。

菌体内可溶性画分は、20 mM Tris-HCl (pH 7.6), 0.5 M NaCl で平衡化した Ni セファロース (GE Healthcare 社) カラムに供した。その後、カラムを、10 倍量の 0.05 M イミダゾールを含む 20 mM Tris-HCl (pH 7.6), 0.5 M NaCl で洗浄し、0.5 M イミダゾールを含む 20 mM Tris-HCl (pH 7.6), 0.5 M NaCl で組換えタンパク質を溶出した。キチナーゼ活性を有する画分を TS 緩衝液 [20 mM Tris-HCl (pH 7.6), 150 mM NaCl] で平衡化した PD10 (GE Healthcare 社) で脱塩した。

菌体内不溶性画分は、8 M 尿素とプロテアーゼ阻害剤を含む 20 mM Tris-HCl (pH 7.6), 0.5 M NaCl 溶液に懸濁し、4°C、30 分間放置し、可溶化した。その後、15,000 x g で 4°C、20 分間、遠心分離し、その上清を回収した (可溶化不溶性画分)。尿素で可溶化した組換えタンパク質のリフォールディングと精製は、Ni セファロースカラム内で行った。可溶化した画分は、Ni セファロースカラムに供し、カラムを 10 倍量の 8 M 尿素を含む 20 mM Tris-HCl (pH 7.6), 0.5 M NaCl で洗浄した。樹脂は 10 倍量の 0.05 M イミダゾールを含む 20 mM Tris-HCl (pH 7.6), 0.5 M NaCl で洗浄し、特異的に結合したタンパク質を

0.5 M イミダゾールを含む 20 mM Tris-HCl (pH 7.6), 0.5 M NaCl で溶出した。

その後、上記のように PD10 で脱塩した (図 II. 4)。

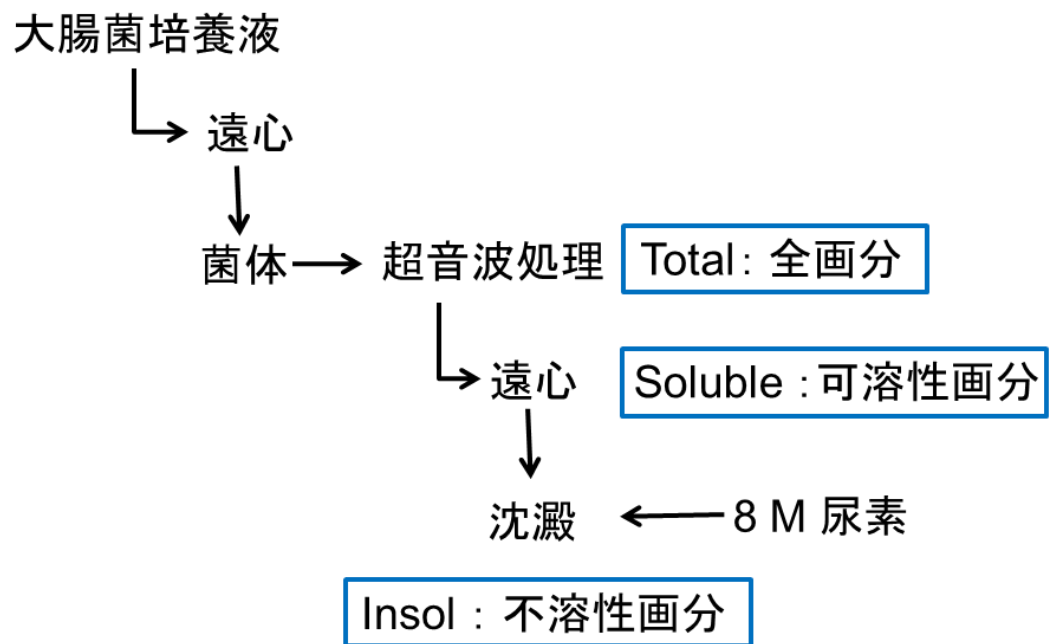


図 II. 4. Chit1-V5-His の調製方法

形質転換した大腸菌からの Chit1-V5-His の調製方法のフローチャート。

大腸菌の培養液，ペリプラズム空間，可溶性と不溶性画分からの **Protein A-Chit1-V5-His** の調製

大腸菌からの組換えタンパク質の調製は，基本的に，Kashimura らが報告した方法で行った [39]。形質転換した大腸菌を，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，遠心分離した培養培地はそのまま Ni セファロースカラムに供した。次に，残った菌体を高張溶液 [20% sucrose, 20 mM Tris-HCl (pH 7.6), 0.5 mM EDTA, プロテアーゼ阻害剤 (Complete, Roche 社)] 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 20 分間遠心分離を行った。さらに，残った菌体を低張溶液 [20 mM Tris-HCl (pH 7.6), プロテアーゼ阻害剤] を 120 mL 添加し，懸濁後，さらに 30 分間氷上で静置した。その後，4°C，15,000 x g で 20 分間遠心分離を行った。以上の上清を合わせ，ペリプラズム画分 1 / 浸透圧処理画分 (Peri 1) とした。上記処理後の沈殿は，高張液 [20% sucrose, 20 mM Tris-HCl (pH 7.6), 0.5 mM EDTA, プロテアーゼ阻害剤] 30 mL に再懸濁した。リゾチームを添加し，37°C，20 分間インキュベートし，4°C，15,000 x g で 20 分間遠心分離し，上清を回収した。さらに，低張液 [20 mM Tris-HCl (pH 7.6), プロテアーゼ阻害剤] 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 20 分間の遠心分離し，上清を回収したと (ペリプラズム画分 2 / リゾチーム画分) (Peri 2)。そして，これらの上清をプールした。それらに，NaCl を終濃度 500 mM，MgSO₄ を終濃度 2 mM なるようにそれぞれ加え，溶液の粘性を減少させるため，短時間超音波処理を行った。次に，浸透圧処理後の大腸菌の沈殿をプロテアーゼ阻害剤 (Complete, Roche 社) を含む 20 mM Tris-HCl (pH 7.6)，0.5 M NaCl 溶液に懸濁し，超音波処理し，4°C，15,000 x g で 20 分間遠心分離し，上清をプールした。その後，上記のように不溶性画分

を取得した。これらの 5 つの画分を上記の方法と同様に Ni セファロースカラムで精製し，PD10 で脱塩した (図 II. 5)。

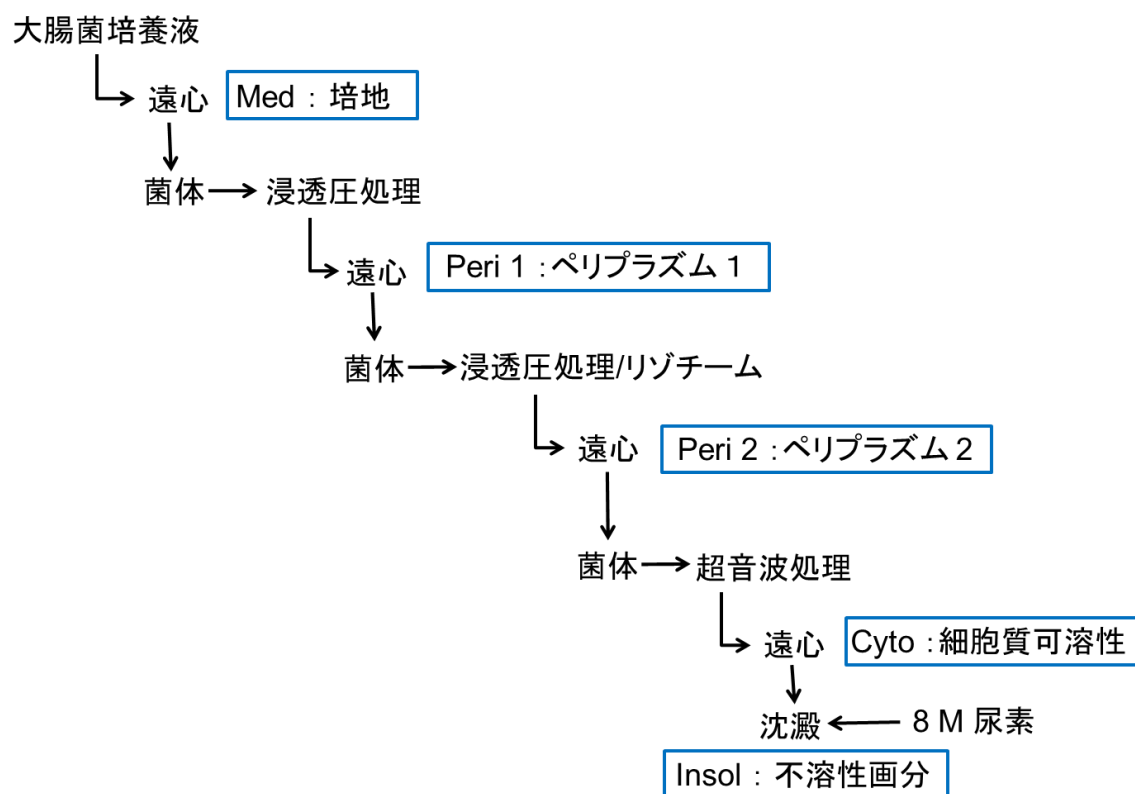


図 II. 5. Protein A-Chit1-V5-His の調製方法

形質転換した大腸菌からの ProteinA-Chit1-V5-His の調製方法のフローチャート。

HiTrap Q HP カラムによる Protein A-Chit1-V5-His の精製

ペリプラズム空間由来の 1 と 2 画分を混合し、20 mM Tris-HCl (pH 7.6), 0.5 M NaCl で平衡化した Ni セファロースカラムに供した。カラムは 10 倍量の 0.05 M イミダゾールを含む 20 mM Tris-HCl (pH 7.6), 0.5 M NaCl で洗浄し、特異的に結合した組換えタンパク質を 0.5 M イミダゾールを含む 20 mM Tris-HCl (pH 7.6), 0.5 M NaCl で溶出した。ピーク画分は、10 倍量の 20 mM Tris-HCl (pH 7.6) で希釈し、同様の緩衝液で平衡化した HiTrap Q HP (GE Healthcare 社) に供した。カラムは、10 倍量の 20 mM Tris-HCl (pH 7.6) で洗浄し、0-1.0 M NaCl の直線濃度勾配で溶出した。キチナーゼ活性のある画分を、上記のように PD10 で脱塩した。

タンパク質濃度、SDS-PAGE と Western blotting での組換えタンパク質の解析

タンパク質濃度は、標準物質としてウシ血清アルブミンを使用し、Protein Assay kit (Bio-Rad 社) を用いたブラッドフォード法 [44] で決定した。取得したタンパク質画分は、SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) で解析した。ゲル中のタンパク質は、Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBB, Sigma-Aldrich 社) で染色し、可視化した。分離したタンパク質を polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane (Immobilon-P, Merck Millipore 社) に転写し、V5 抗体 [anti-V5-HRP monoclonal antibody (Invitrogen 社)] と Peroxidase AffiniPure F (ab')₂ Fragment Donkey Anti-Mouse IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch 社) と反応させた。目的タンパク質に結合した抗体を Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Merck Millipore 社) を用い検出し、Luminescent Image Analyzer

(ImageQuant LAS 4000, GE Healthcare 社) で解析した。分子量マーカーとして All Blue molecular weight marker (Bio-Rad 社) を使用した。

酵素化学的解析とキチン結合活性の解析

融合タンパク質のキチナーゼ活性は、すでに報告されている方法に従って [39, 40], 人工基質 4-nitrophenyl *N, N'*-diacetyl- β -D-chitobioside [4NP-(GlcNAc)₂] (Sigma-Aldrich 社) を用いて測定した。それぞれの反応は、3 回行った ($n=3$)。活性測定は、4 種類の緩衝液 (McIlvaine 緩衝液, 0.1 M Gly-HCl 緩衝液, Clark 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 炭酸ナトリウム溶液を反応液に 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、McIlvaine 緩衝液 (pH 5.0) 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。

キチン結合解析は、Kashimura らが報告した方法に従い、pH 2.0, 5.0, 7.0 の McIlvaine 緩衝液 を使用して行った [40]。Protein A-Chit1-V5-His と Protein A-V5-His を pH 2.0, 5.0, 7.0 の McIlvaine 緩衝液と混合した。その混合液は McIlvaine 緩衝液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 倍量の同じ緩衝液で洗浄し、5 倍量の McIlvaine 緩衝液でそれぞれ洗浄した。洗浄後、それぞれ 10 倍量の McIlvaine 緩衝液で pH を調整した。結合タンパク質は、8 M 尿素を含む McIlvaine 緩

衝液で溶出した。結合と非結合画分は、SDS-PAGE で分離し、V5 抗体を用いた Western blotting で分析した。

Chit1-V5-His の CHO 細胞での一過性発現と培養液からの精製

CHO-K1 細胞 (CCL61, ATCC) を、10% ウシ胎仔血清 (Biowest 社) を含む Minimum Essential Medium (MEM) 培地 (Invitrogen 社) 中で培養した。CHO 細胞に Lipofectamine plus (Invitrogen 社) を用いて Chit1-V5-His 発現プラスミドをトランスフェクションした。48 時間後、培地を回収した。培地に分泌された Chit1-V5-His は、20 mM Tris-HCl (pH 7.6), 0.5 M NaCl で平衡化した Ni セファロースに結合させた。結合した Chit1-V5-His は、0.5 M イミダゾールを含む 20 mM Tris-HCl (pH 7.6), 0.5 M NaCl で溶出し、上記のように PD10 で脱塩した。

Protein A-Chit1-V5-His によるキチン基質の分解

結晶性キチンはエビの殻から精製された α キチン (Sigma-Aldrich 社) を使用した。コロイダルキチン（コロイド状にすることで酵素との反応性を上げ、定量的な結果を得やすい基質）の調製は、既に報告されている方法で行った [14]。

基質として、結晶性キチン (終濃度 2 mg/reaction), コロイダルキチン (終濃度 2 mg/mL) そして (GlcNAc)₃₋₆ (終濃度 200 μ M) を用い、McIlvaine 緩衝液 (pH 5.0) 中、Protein A-Chit1-V5-His を加え、全量 50 μ L で、37°C で 10 分、1 時間、16 時間の酵素反応を行った。

組換え Chit1 の pH 依存性は、4NP-(GlcNAc)₂, (GlcNAc)₃, (GlcNAc)₆ (終濃度 200 μ M) とコロイダルキチン (終濃度 2 mg/mL) を基質として、pH 2.0-8.0

の McIlvaine 緩衝液 中で 37°C で 30 分間インキュベートすることで、評価した。

Chit1 によって生成されたキチン断片は、Jackson によって報告された方法に従い分析した [41]。具体的には、酵素反応液に 5 μ L の酢酸を加え、還元末端を 8-aminonaphthalene-1,3,6-trisulphonic acid (ANTS, Invitrogen 社) で共有結合的に標識し、生じた蛍光誘導物質を高分解能 PAGE によって分離し、蛍光イメージャーで解析した。GlcNAc オリゴマー (Seikagaku Corporation 社) を標準物質として使用した。

第 3 節 結果

pET システムを用いて大腸菌の細胞質でのマウス Chit1 の発現

pET システムは IPTG により発現誘導された T7 RNA ポリメラーゼが、pET ベクターの T7 プロモーターを認識し、その下流に導入された目的タンパク質配列を強力に発現させるシステムである。また、多くの細菌キチナーゼの発現で pET システムが利用されてきた。本研究では、最初に、pET システムを利用し、マウス Chit1-V5-His を宿主大腸菌 BL21 (DE3) での発現を試みた (図 II. 2, 図 II. 6A)。全大腸菌抽出液から可溶性と不溶性画分を分離し、SDS-PAGE を行い、次に Coomassie Brilliant Blue (CBB) 染色と Western blotting で、それぞれを解析した。可溶性および不溶性画分の両方から Chit1-V5-His を検出できたが、発現した組換えタンパク質の大部分は不溶性画分に存在していた (図 II. 6B, 図 II. 6C)。

次に、可溶性、不溶性画分からの組換え酵素の精製を試みた。組換え酵素は His-tag を利用した アフィニティークロマトグラフィー (Ni セファロース樹脂) によって可溶性画分から精製した (図 II. 6D)。一方、不溶性画分の Chit1-V5-His は 8 M 尿素で可溶化し、Ni セファロースに結合させ、その後、リフォールディングを施し、溶出した。脱塩後、それぞれのキチナーゼ活性を測定したところ、可溶性画分よりも不溶性画分に高い活性が認められた (図 II. 6E)。pET ベクターを用いて大腸菌で発現させた場合、可溶性画分にもキチナーゼ活性を持つタンパク質が得られたが、発現したタンパク質の多くが不溶性となることが明らかになった。つまり、細胞質で発現した大部分の Chit1-V5-His は封入体と呼ばれる不溶性の凝集体を形成しているものと考えられる。

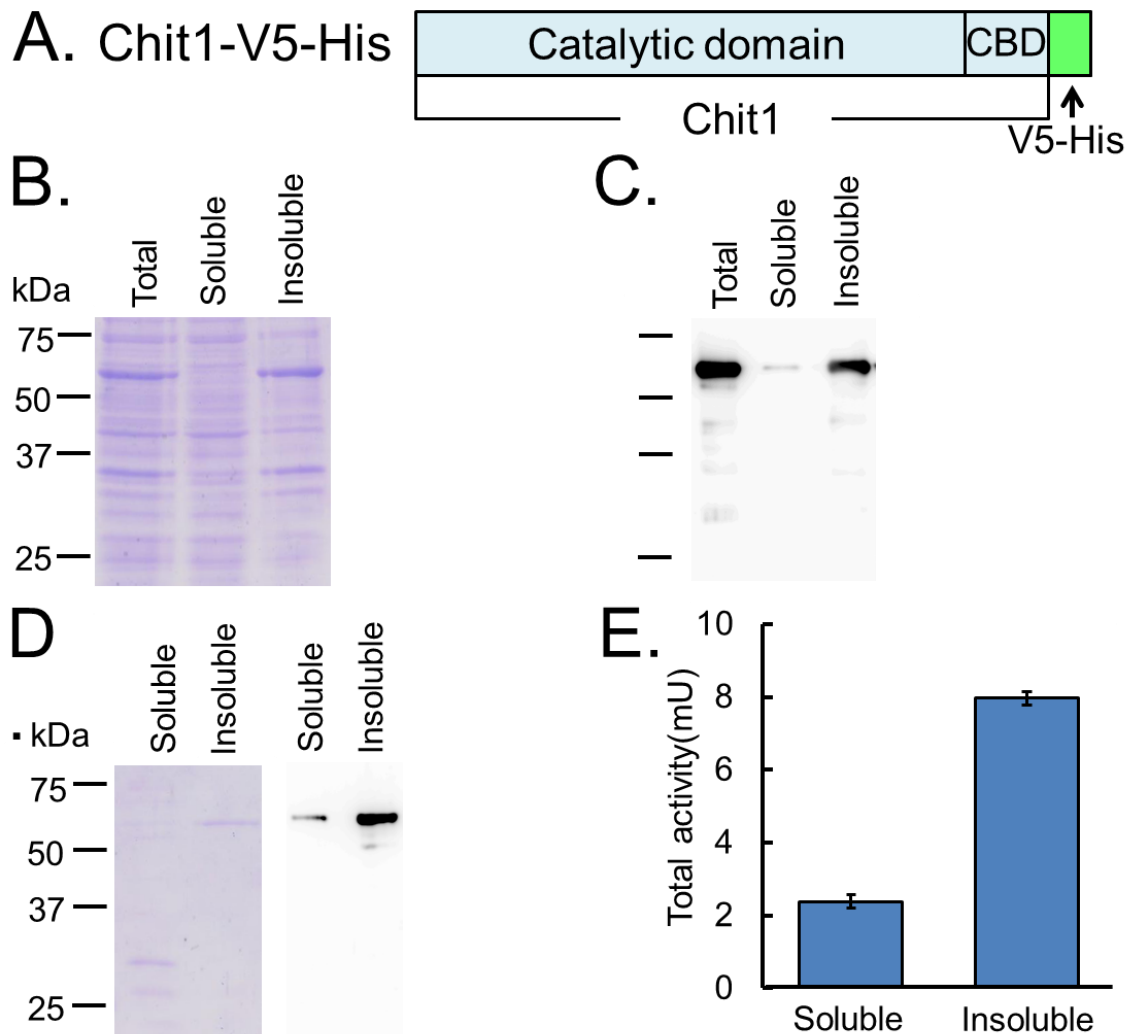


図 II. 6. pET 系を使用した大腸菌の細胞質でのマウス Chit1 の発現

(A) 大腸菌で発現したマウス成熟 Chit1-V5-His の模式図。マウス Chit1 は、N 末端側に触媒ドメイン (catalytic domain, CatD)、C 末端側にキチン結合ドメイン (chitin binding domain, CBD) からなる分子量約 50 kDa の分泌タンパク質である。(B) 大腸菌からの全抽出液、可溶性と不溶性画分に存在する組換えタンパク質の 10% SDS-PAGE を行った。ゲル中のタンパク質は、CBB 染色で可視化した。(C) タンパク質は、SDS-PAGE を行い、その後、PVDF 膜へ転写した。組換えタンパク質の Western blotting 解析は、V5 抗体を使用した。(D) 可溶性と不溶性画分の Chit1-V5-His 解析。組換えタンパク質は、Ni セファロースによって可溶性画分から分離した。不溶性画分の Chit1-V5-His は、8 M 尿素で可溶化し、Ni セファロース結合時リフォールディング操作を行った。(E) 可溶性、不溶性画分から精製した組換えタンパク質のキチナーゼ活性を比較した。実験材料と方法に記載したように、McIlvaine 緩衝液 (pH 5.0) を使用し、全量 50 μ L で 37°C、30 分間で反応させた。

大腸菌のペリプラズム空間における可溶性 Protein A-Chit1-V5-His 融合タンパク質の発現

マウス Chit1 を可溶性タンパク質として取得するため、黄色ブドウ球菌由来のシグナル配列付の短縮型 Protein A (ZZ ドメイン) が N 末端側に付加される pEZZ18 ベクターを発現ベクターとして用いることにした [45]。この発現系では、pre-Protein A-Chit1-V5-His (図 II. 3A と図 II.7A) が、Protein A プロモーター制御下で、IPTG 等の誘導物質なしに、穏やかに発現し、大腸菌のペリプラズム空間、その後、培地に成熟 Protein A-Chit1-V5-His (図 II. 3B) が分泌されると想定される [45]。pEZZ18/pre-Protein A-Chit1-V5-His で形質転換した大腸菌を培養した後、培地、ペリプラズム画分、細胞質画分、そして不溶性画分を取得した。それぞれの画分を、Ni セファロース樹脂を使用して発現した融合タンパク質を分離し、キチナーゼ活性を調べた。不溶性画分も、8 M 尿素を使用して可溶化し、Ni セファロース上で組換えタンパク質のリフォールディングと精製を行い、キチナーゼ活性を測定した。

大腸菌のペリプラズム画分 [ペリプラズム画分 1/ 浸透圧処理 (Peri 1) とペリプラズム画分 2/ リゾチーム (Peri 2) 画分] に、全体のキチナーゼ活性の 90% が認められた。培地、細胞質可溶性画分は、全体のキチナーゼ活性のそれぞれ 0.02% と 7% であった。不溶性画分の存在率は全体の約 1% となり、低い値であった (表 II. 1)。

次に、Ni セファロースを使用して分離した 5 つの画分の Protein A-Chit1-V5-His を、SDS-PAGE と CBB 染色で解析した。融合タンパク質 (67 kDa; 図 II. 3B) の多くはペリプラズム画分 (Peri 1 と Peri 2) に検出され、次に細胞質画分で検出された。しかし、培地には相当するバンドは検出されなかった (図

II. 7B)。次に、V5 抗体 を使用した Western blotting によって解析したところ、推定分子量に相当する特異的なバンドが認められた (図 II. 3B と図 II. 7C)。不溶性画分の組換えタンパク質の移動度の遅いバンドの分子量は、シグナル配列を含む pre-Protein A-Chit1-His の推定値と一致した (図 II. 3A, 図 II. 7B と 7C)。これらの結果は、活性を有するキチナーゼの大部分が、可溶性の融合タンパク質として、大腸菌のペリプラズム画分に存在することを示した (図 II. 7B と 7C; 表 II. 1)。

ペリプラズム画分から Ni セファロースカラムで分離した Protein A-Chit1-V5-His を、陰イオン交換クロマトグラフィー (HiTrap Q HP カラム) を用いてさらに精製した (図 II. 7D)。ピーク画分 (図 II. 7D, 太線) を SDS-PAGE で分離し、CBB 染色 と Western blotting で解析したところ、どちらも単一バンドが認められた (図 II. 7E)。Protein A-Chit1-V5-His は、*in vitro* の酵素実験が可能な高純度で十分な量の Protein A-Chit1-V5-His を精製できた。

A. Pre-Protein A-Chit1-V5-His

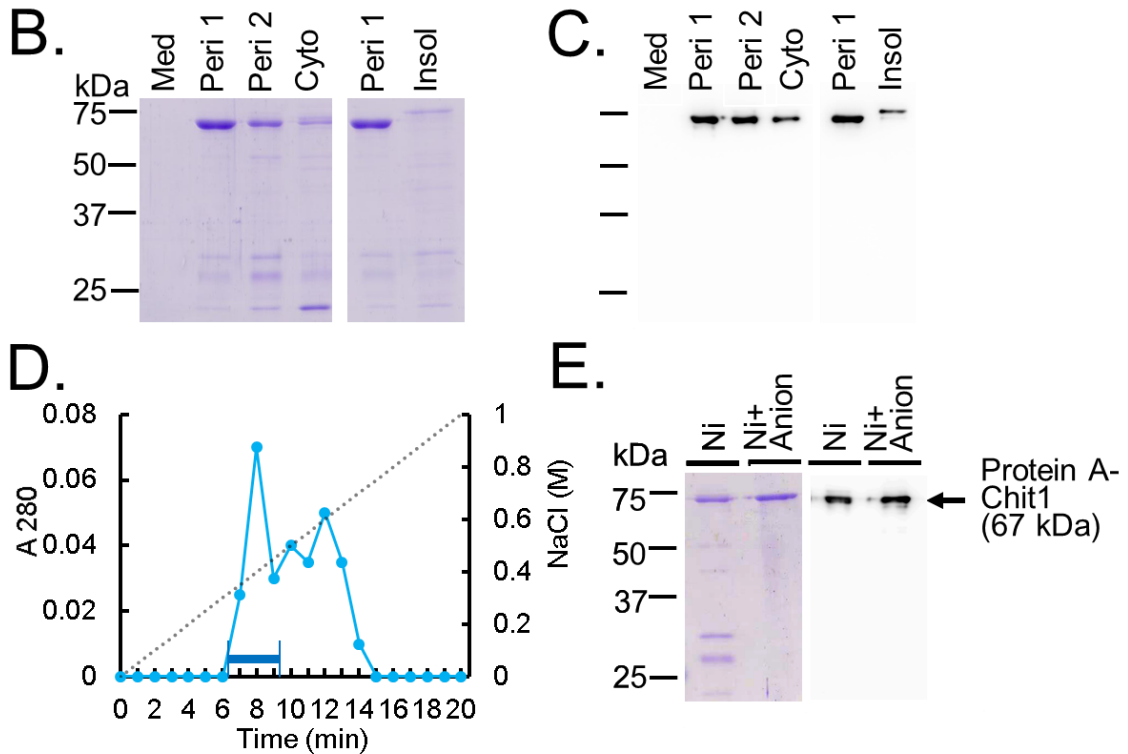
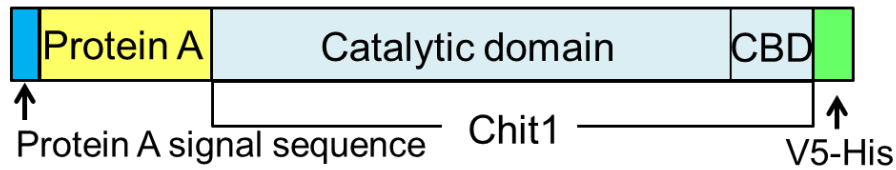


図 II. 7. 融合タンパク質 Protein A-Chit1-V5-His の大腸菌ペリプラズム空間での発現

(A) 大腸菌で発現した融合タンパク質 Protein A-Chit1-V5-His の模式図。(B) 大腸菌からの培地 (Med), ペリプラズム画分 (Peri 1 と Peri 2), 細胞質可溶性画分 (Cyto) と不溶性画分 (Insol) の組換えタンパク質の 10% SDS-PAGE 解析。(C) V5 抗体を用いた組換えタンパク質の Western blotting 解析。(D) Hitrap Q HP カラムを使用した Protein A-Chit1-V5-His のクロマトグラム。結合したタンパク質は、0-1.0 M NaCl の直線濃度勾配で溶出した。最初のピーク (太線で囲った領域) を分取した。(E) Ni セファロース, 次いで Hitrap Q HP カラムを使用して精製したタンパク質画分の SDS-PAGE 解析。精製したタンパク質は、電気泳動し、CBB 染色で可視化した。Western blotting は、anti-V5-HRP antibody で行った。

表 II. 1. 大腸菌で発現した **Protein A-Chit1-V5-His** のキチナーゼ活性の細胞内分布

Fraction	Total activity (mU)	Distribution (%)
Medium	0.1	0.02
Periplasm 1 (Peri 1)	116.2	25.46
Periplasm 2 (Peri 2)	302.1	66.21
Cytoplasm	33.5	7.34
Insoluble	4.5	0.98

大腸菌と CHO 細胞で発現した組換え Chit1 のキチナーゼ活性の比較

大腸菌で発現した Protein A-Chit1-V5-His と CHO 細胞で発現した Chit1-V5-His のキチナーゼ活性を比較した。CHO 細胞での発現のため、Chit1 前駆体 cDNA の全コード領域をほ乳類発現ベクター pcDNA3.1/V5-His にクローニングした。この発現系では、N 末端にシグナル配列を有する pre-Chit1-V5-His が発現し、培地中に成熟 Chit1-V5-His が分泌される (図 II. 1A と図 II. 8A)。CHO 細胞で発現した Chit1-V5-His のキチナーゼ活性を、4NP-(GlcNAc)₂ を基質として、pH 2.0-10.0 の範囲で 37°C、30 分間反応させることで測定した。CHO 発現酵素は、pH 5.0-6.0 で最大活性を示し、酸性条件 (pH 4.0) や、中性条件 (pH 7.0-8.0) ではそれより低い活性であった (図 II. 8B)。

次に、両酵素の 4NP-(GlcNAc)₂ に対するキチナーゼ活性が同程度になるように試料を調整し V5 抗体、Western blotting で酵素量を比較した (図 II. 7A と 8A)。両 Chit1 の酵素のシグナル強度は同等であった (図 II. 8C と 8D)。この結果は、CHO 細胞で発現した Chit1-V5-His と大腸菌で生成した Protein A-Chit1-V5-His の比活性が同等であることを示す。

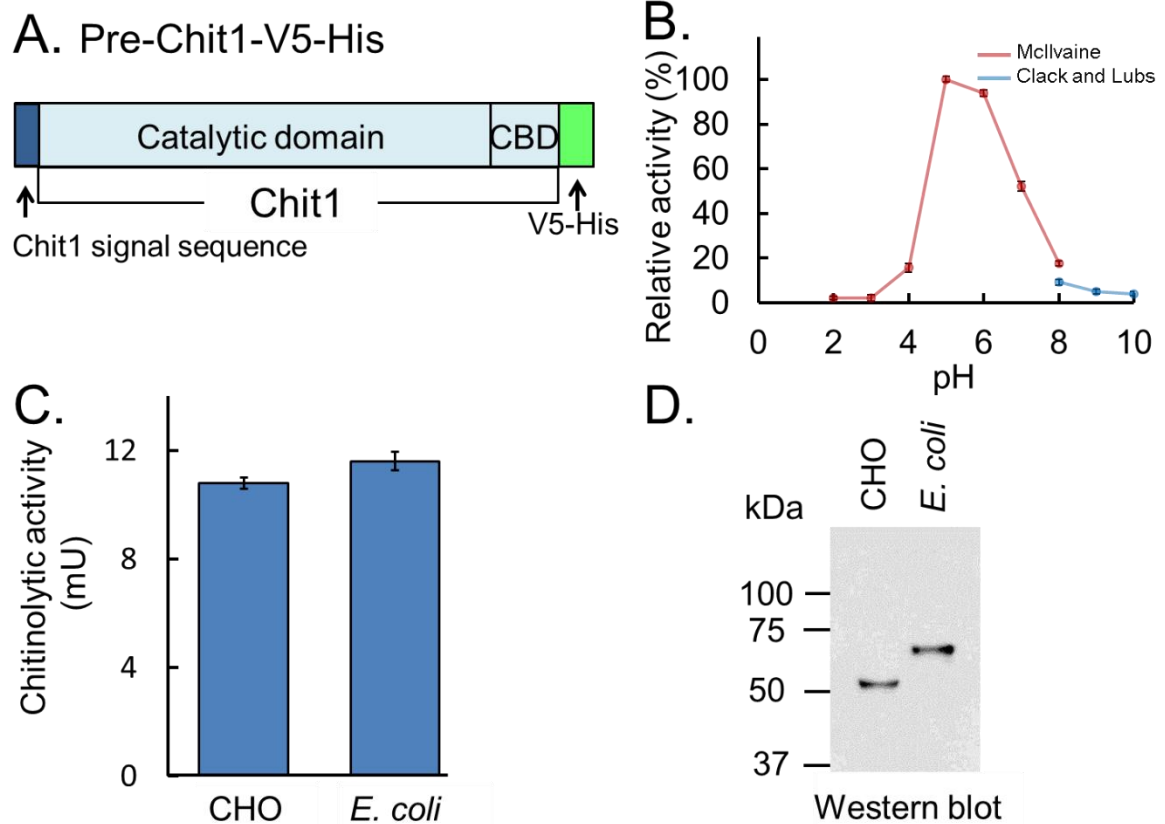


図 II. 8. 大腸菌と CHO 細胞で発現したマウス Chit1 のキチナーゼ活性の比較

(A) CHO 細胞で発現した pre-Chit1-V5-His の模式図。(B) Chit1-V5-His の pH 依存性。(C) CHO 細胞と大腸菌から調製した酵素のキチナーゼ活性を McIlvaine 緩衝液 (pH 5.0) を含む全量 50 μ L 系で 37°C, 30 分間測定し、両酵素のキチナーゼ活性を同等になるように調整した。V5 抗体 を使用した Western blotting で解析した。(D) 同様のキチナーゼ活性になるように調整した酵素は V5 抗体 を使用した Western blotting で解析した。大腸菌で発現した Protein A-Chit1-V5-His の分子量は、Chit1-V5-His より大きく、52 kDa と 67 kDa に同等のシグナルを与えた。

Protein A-Chit1-V5-His の特性解析

大腸菌で発現したマウス Chit1 の性質を明らかにするために、4NP-(GlcNAc)₂ を基質とし、pH 2.0-10.0 の範囲で、37°C、30 分間の条件で、Protein A-Chit1-V5-His の活性を測定した。組換え酵素は pH 5.0-6.0 で最大活性を示し、酸性条件 (pH 4.0) や、中性条件 (pH 7.0-8.0) ではそれより低い活性であった (図 II. 9A)。このように、大腸菌で発現した Protein A-Chit1-V5-His の pH 依存性は、CHO 細胞で発現した Chit1-V5-His (図 II. 8B) や COS-1 で発現した Chit1-His [16, 46] の pH 依存性の結果と類似していた。

酵素活性に対する温度の影響は、McIlvaine 緩衝液 (pH 5.0) 中 30°C-58°C の温度の範囲で、4NP-(GlcNAc)₂ と 15 分間反応させることで解析した。組換え Chit1 の酵素活性は、温度の上昇とともに 50°C まで増加した。その後、急激に減少した (図 II. 9B)。

次に、組換え Chit1 の pH 安定性を検討した。4 種類の緩衝液を使用し、酵素を様々な pH 中、氷上で 1 時間プレインキュベートし、処理後の酵素活性を、37°C、pH 5.0 の条件で解析した。1 時間のプレインキュベート後、組換え Chit1 は、広い pH 範囲 (pH 5.0-11.0) でキチナーゼ活性を保持していたが、pH 5.0 以下ではキチナーゼ活性が低下した (図 II. 9C)。以上のことから、大腸菌で発現した Chit1 は弱酸性からアルカリ性の条件で安定であることが分かった。

Protein A-Chit1-V5-His のキチンビーズへの結合

完全長の Chit1 は、C 末端側にキチン結合領域 (chitin binding domain, CBD) を有している (図 II. 7A)。Protein A-Chit1-V5-His のキチンへの結合性を調べるため、キチンビーズカラムを用いて調べた。Protein A-Chit1-V5-His と、コント

ロールとして Protein A-V5-His [39, 40] を用い、これらの混合液を、pH 2.0, 5.0, 7.0 の条件下に平衡化したキチンビーズカラムに供した。キチンビーズに結合したタンパク質は、8 M 尿素で溶出した [15]。

すべての pH 条件下において、添加したほとんどの Protein A-Chit1-V5-His がキチンビーズ結合画分に検出され、Protein A-V5-His は素通り画分に検出された (図 II. 9D)。これらの結果は、大腸菌で発現した Protein A-Chit1-V5-His が、pH 2.0 でキチナーゼ活性を失っているのにも関わらず、pH 2.0-7.0 でキチンビーズに結合することを示した。

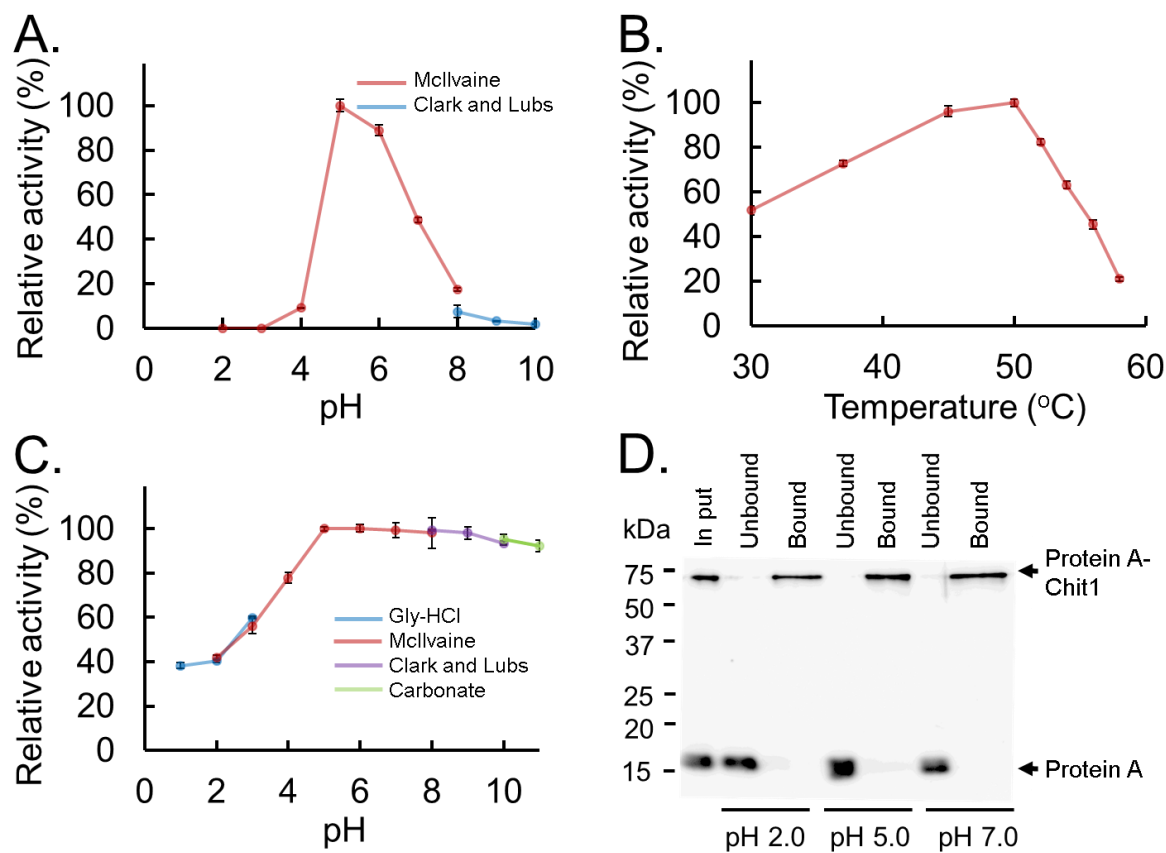


図 11.9. 大腸菌で発現した Chit1 の性質

(A) pH 依存性, (B) 温度依存性, (C) pH 安定性と (D) Protein A-Chit1-V5-His のキチンビーズへの結合性を示す。キチナーゼ活性 (A-C) は、実験方法に記載したように行った。値は実験のそれぞれの系で得た最大活性を百分率で表した。エラーバーは、実験を 3 回行い、平均 \pm 標準偏差で表した。(D) Protein A-Chit1-V5-His と Protein A-V5-His を混合し、キチンビーズカラムに供した。キチンビーズへの結合は、実験方法に記載したように、pH 2.0, 5.0, 7.0 で行った。キチンカムへの結合、非結合画分を V5 抗体を使用した Western blotting で解析した。

Protein A-Chit1-V5-His は、高分子量キチンと **GlcNAc** オリゴマーを分解する

Protein A-Chit1-V5-His のキチナーゼ活性の性質を詳細に解析するため、**Protein A-Chit1-V5-His** をキチン (結晶性とコロイダル) と $(\text{GlcNAc})_{3-6}$ に作用させた。分解産物の還元末端は、ANTS で標識し、修飾した蛍光誘導体を PAGE によって分離した [15, 39-43]。

組換え Chit1 を高分子基質である結晶性キチンとコロイダルキチンに、Chit1 の至適条件である pH 5.0 で 10 分、1 時間、そして 16 時間作用させた。Chit1 は、両基質から主として $(\text{GlcNAc})_2$ を生成し、低いシグナル強度で $(\text{GlcNAc})_3$ と $(\text{GlcNAc})_4$ を生じた (図 II. 10A と 10B)。

次に、低分子量の **GlcNAc** オリゴマー $[(\text{GlcNAc})_6, (\text{GlcNAc})_5, (\text{GlcNAc})_4, (\text{GlcNAc})_3]$ に対する反応性を調べた。 $(\text{GlcNAc})_6$ と $(\text{GlcNAc})_5$ においては、まず、 $(\text{GlcNAc})_3$ と $(\text{GlcNAc})_2$ が生成したが、16 時間反応で $(\text{GlcNAc})_3$ は分解され、 $(\text{GlcNAc})_2$ のみとなった (図 II. 10C と 10D)。 $(\text{GlcNAc})_4$ では、 $(\text{GlcNAc})_2$ を生成した (図 II. 10E)。 $(\text{GlcNAc})_4$ と異なり、 $(\text{GlcNAc})_3$ を基質とした際、1 時間の分解でも基質のみ $[(\text{GlcNAc})_3]$ が多く認められ、16 時間反応で $(\text{GlcNAc})_2$ が検出できた (図 II. 10F)。この分解様式の違いは、 $(\text{GlcNAc})_3$ と他のオリゴマー間での基質特異性の違いを反映している。

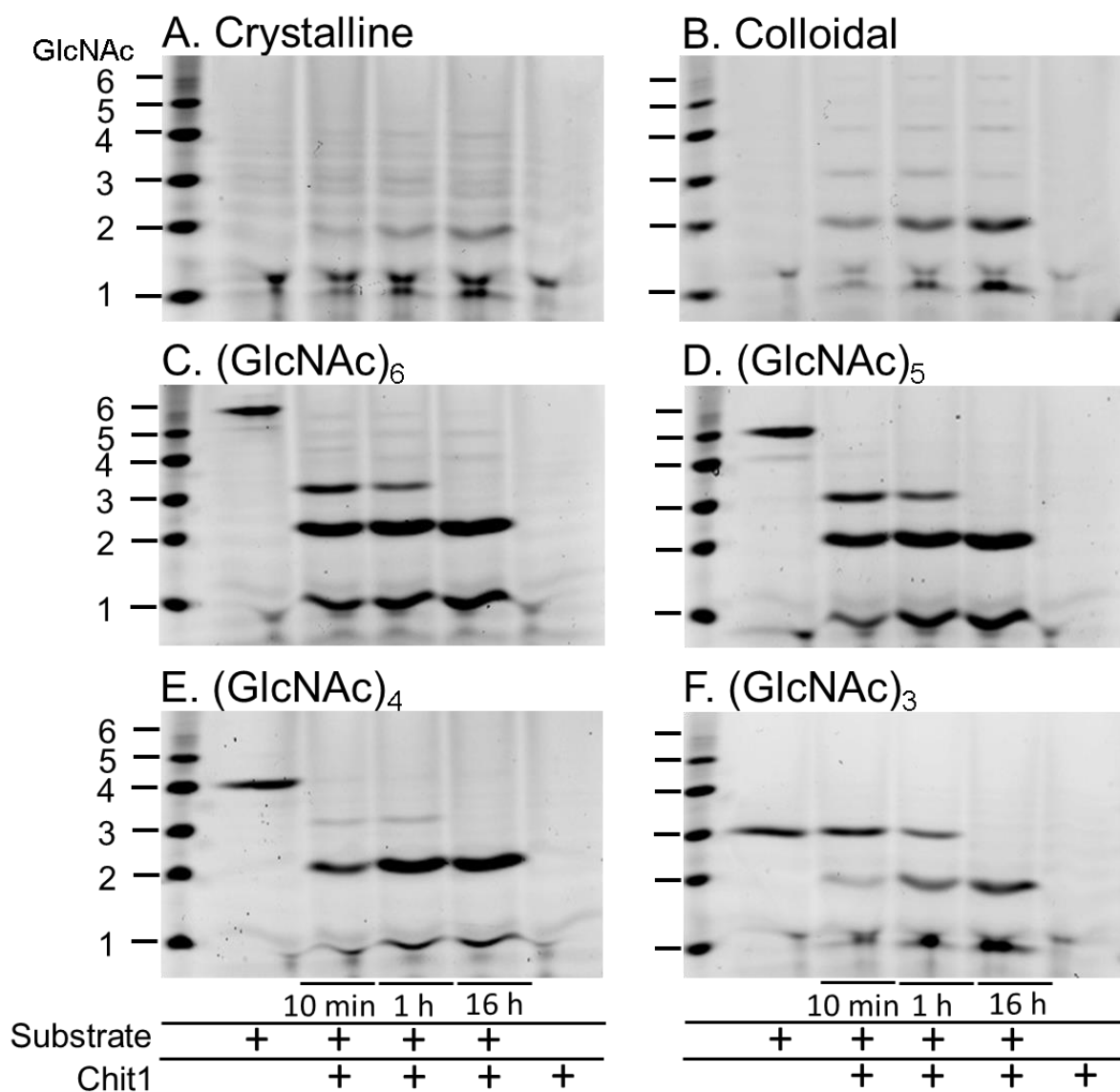


図 II. 10. 組換え Chit1 による結晶性，コロイダルキチンと低分子量 GlcNAc オリゴマーの分解

各基質を McIlvaine 緩衝液 (pH 5.0) 中で，37°C で 10 分，1 時間，16 時間反応した。組換えタンパク質によって生成されたキチン断片をフルオロフォアで標識し，電気泳動で分離し，蛍光イメージャーで解析した。標準物質としてキチンオリゴマーを左側に示した。Protein A-Chit1-V5-His は，キチン基質から，主として (GlcNAc)₂ 断片を生成した。(A) 結晶性キチン，(B) コロイダルキチン，(C) (GlcNAc)₆，(D) (GlcNAc)₅，(E) (GlcNAc)₄，(F) (GlcNAc)₃。

酸性と中性条件下での Chit1 によるキチン基質の分解

(GlcNAc)₃ を基質として分解した結果と同様に、(GlcNAc)₆ と (GlcNAc)₅ から生成された (GlcNAc)₃ は、Chit1 による分解に対し抵抗性を示した。このことをさらに明らかにするため、人工基質である 4NP-(GlcNAc)₂ も使用して、組換え Chit1 の分解挙動を評価した。4NP-(GlcNAc)₂ は、構造的に (GlcNAc)₃ と類似しているため、それらの分解挙動は類似するものと推定した。

組換え Chit1 を、4NP-(GlcNAc)₂、(GlcNAc)₃、コロイダルキチン、そして (GlcNAc)₆ を pH 2.0-8.0 の範囲で 37°C、30 分間反応させ、その分解産物を FACE 法で解析した。

4NP-(GlcNAc)₂ の Chit1 による分解結果は、pH 5.0 と pH 6.0 では (GlcNAc)₂ のシグナルが強く、pH 7.0 と pH 8.0 の高い pH では、シグナル強度が減少した (図 II. 11A)。これらの結果は、4NP-(GlcNAc)₂ の分解結果と一致した (図 II. 9A)。(GlcNAc)₃ の分解結果は、(GlcNAc)₃ が Chit1 分解抵抗性を持つことを示した (図 II. 11B)。この結果は、コロイダルキチンと (GlcNAc)₆ 分解でも同様であった (図 II. 11C と 11D)。しかし、4NP-(GlcNAc)₂ と (GlcNAc)₃ に比べ、コロイダルキチンや (GlcNAc)₆ の分解では、pH 4.0 から 8.0 までの範囲でより効率良く (GlcNAc)₂ が生成された (図 II. 11C と 11D)。

これらの結果から、Chit1 は、高分子量基質に対し、pH 4.0-8.0 で (GlcNAc)₂ を生成できることが明らかになった。一方で、これは、これまで使用してきた 4NP-(GlcNAc)₂ の分解では (GlcNAc)₂ 生成レベルが、pH 7.0 と pH 8.0 において過小評価されていたことを示している。重要なことは、pH 7.0 と 8.0 における (GlcNAc)₂ の生成レベルの増加は、Chit1 が生理的な条件下でも機能することを示す。

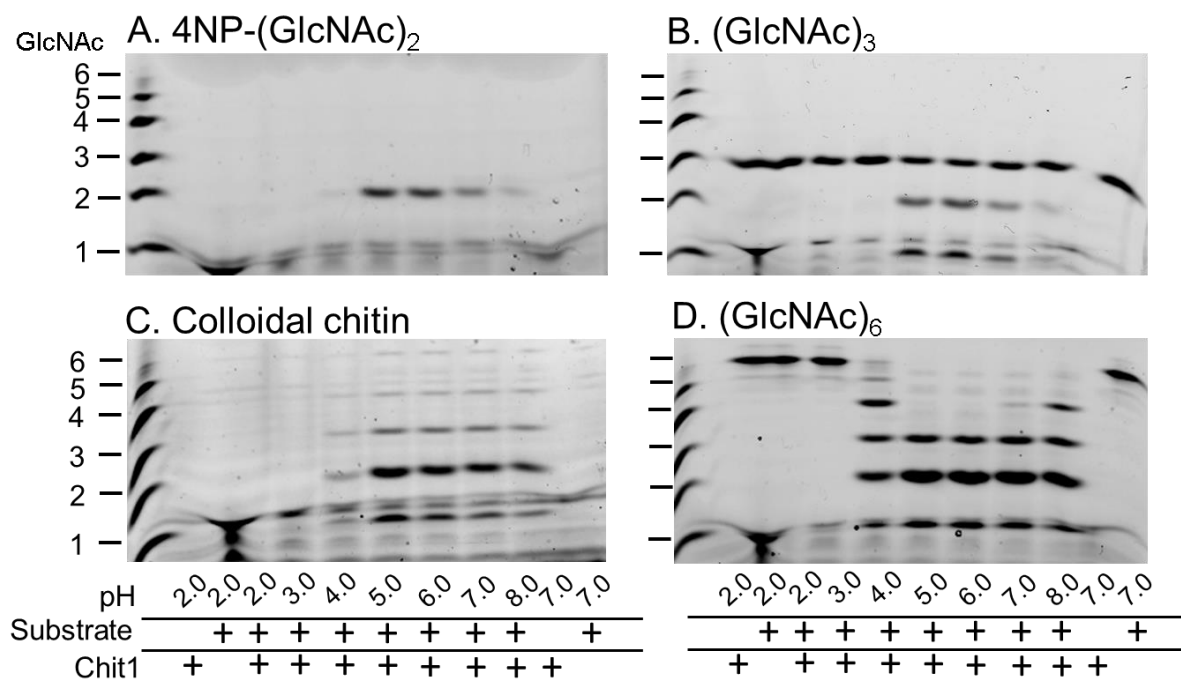


図 11. 組換えタンパク質による pH 依存的なキチンの分解

Chit1 は、pH 2.0-8.0 で、各基質と 37°C で 30 分間反応を行い、その後、フルオロフォアで標識し、PAGE で分離、イメージャーで解析した。標準物質としてキチンオリゴマーを左側に示した。(A) 4NP-(GlcNAc)₂, (B) (GlcNAc)₃, (C) コロイダルキチン, (D) (GlcNAc)₆。

第 4 節 考察

Chit1 は、ゴーシェ病、COPD、アルツハイマー病や嚢胞性線維症などの炎症を伴う疾患において重要な役割があると考えられている [11, 21-,25, 47]。しかし、マウスやヒトにおけるその病態生理学的な機能の詳細は、未だ明らかにされていない。Chit1 の生化学的な研究のためには、活性を有する酵素が一定量以上必要である。現在、Chit1 の構造や生化学的研究は、ほ乳類培養細胞や酵母の発現系による組換え酵素によるものである [16, 26, 48, 49]。大腸菌は、維持が簡便で、迅速かつ安価で、容易に組換えタンパク質の生成量を調整することができる。本研究で、ほ乳類細胞で発現した Chit1-V5-His のキチナーゼ活性に匹敵する比活性を持つ、可溶性の Protein A-Chit1-V5-His を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、組換え Chit1 は、弱酸性から中性条件下で、キチン基質を効率よく分解することを明らかにした。

本研究では、最初に、大腸菌タンパク質発現系の主流である pET 発現システムを利用し、成熟 Chit1-V5-His を大腸菌の細胞質に発現した。細胞質で発現した Chit1-V5-His のほとんどが不溶性画分に回収された (図 II. 6B, 6C と 6D)。His-tag が付加された組換えタンパク質の多くは、大腸菌破碎後に遠心分離すると沈殿に回収されることが知られている [50]。実際、当研究室の研究で、細菌 *Caulobacter crescentus* CB15 のグルコアミラーゼは、大腸菌の pET 発現システムで発現すると封入体を形成した [51]。本研究で、黄色ブドウ球菌由来の Protein A の IgG 結合ドメイン (ZZ) を有する Protein A 遺伝子融合ベクター pEZZ18 ベクター [45] を使用した。この大腸菌発現システムでは、多くの組換えタンパク質発現の成功例が報告されている [52-54]。当研究室では、既に、pEZZ18 ベクターを利用して、大腸菌において機能的なグルコアミラーゼとマウス AMCase の発現を報告している [39, 51]。本研究では、同様の

大腸菌発現系を使用して活性を有する Protein A-Chit1-V5-His を発現することが出来た。

目的の組換えタンパク質には Protein A 由来のシグナル配列が付加されているため、融合タンパク質は、培地中に分泌されることが期待された。しかし、発現した多くの Protein A-Chit1-V5-His は大腸菌のペリプラズム画分に存在していた (図 II. 7 と 表II. 1)。図 II. 8B と 9A に示すように、CHO 細胞で発現した Chit1-V5-His と大腸菌で発現した Protein A-Chit1-V5-His は COS-1 細胞で発現したタンパク質と同様の至適 pH を示した [16, 46]。このように、ペリプラズム空間に発現した Chit1 は、動物細胞のマウス Chit1 の構造と同じ三次構造を形成しやすいと考えられる。この結果は、Protein A が付加されても Chit1 がその一次構造から適切な三次構造を形成できることを示している。キチナーゼファミリー特有の配列 [9] やペリプラズム空間での発現は、キチナーゼが正しくフォールディングされる条件なのかもしれない。

大腸菌と CHO 細胞で発現した Chit1 の 1 L 培養当たりの回収率をキチナーゼ活性で比較した (表 II. 2)。大腸菌で発現した Chit1 の回収率は、CHO 細胞で発現した Chit1 ほど良い結果は得られなかった。Protein A プロモーターの転写活性は穏やかであるため、可溶性タンパク質として発現したマウス Chit1 の収量はそれ程高くならなかったと考えられる [45]。生化学的解析のためにより多くのタンパク質が必要になる場合、本研究の大腸菌の発現系では、培養液の量を増やすことで十分量の組換え Chit1 を容易に取得できる。

表 II.2. 大腸菌と CHO 細胞で発現した組換え Chit1 の全キチナーゼ活性の比較

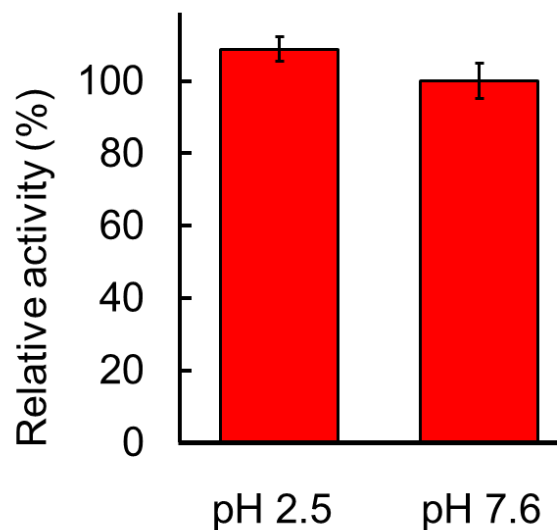
Fraction	Total activity (mU)
Periplasm 1 (Peri 1)	116.2
CHO-expressed Chit1	451.9

大腸菌で発現した Protein A-Chit1-V5-His と CHO 細胞で発現した Chit1-V5-His のキチナーゼ活性は実験材料と方法に記述したように測定した。

マウス AMCase 融合タンパク質 (Protein A-AMCase-V5-His) は、少量だが大腸菌の培地に存在した [39]。しかし、マウス Chit1 融合タンパク質 (Protein A-Chit1-V5-His) は培地には分泌されなかった。これは、AMCase と Chit1 は、同じ GH18 ファミリー酵素であるが、分子構造に違いがあり、その結果、大腸菌での組換えタンパク質の局在分布が異なったことを示唆している [5, 9]。

組換えマウス AMCase は pH 1-3 の強酸性で安定性を示すため、IgG セファロースを用いたアフィニティークロマトグラフィーで精製が可能であった [39, 40]。IgG セファロースに結合したタンパク質は、0.1 M Gly-HCl (pH 2.5) で溶出した。この方法は、強酸性条件下で安定なタンパク質のみに使用できる。図 II. 12 に示すように、Chit1 は AMCase と異なり、pH 2.5 で 10 分間保持すると活性が 40% 減少した。Chit1 は pH 4 以下で不安定であるため、本研究では IgG セファロースを用いた精製を行わず、Ni セファロースと HiTrap Q カラムによって精製した (図 II. 7E)。Ni セファロースと HiTrap Q カラムを用いた精製プロトコルは、Chit1 のような酸性で不安定なタンパク質の精製に有効である。

A. AMCase



B. Chit1

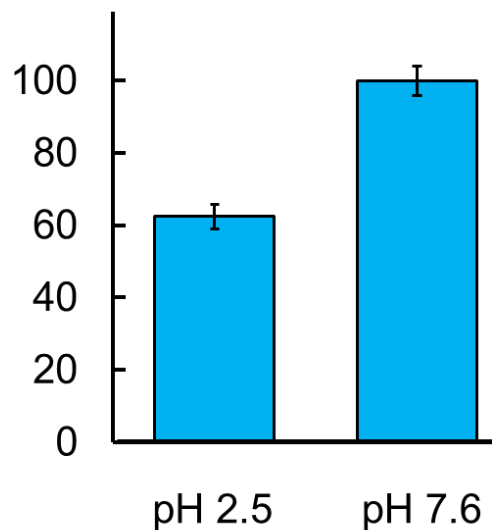


図 II. 12. AMCase と Chit1 のキチナーゼ活性に対する pH 2.5 処理の影響
Protein A-AMCase-V5-His (A) と Protein A-Chit1-V5-His (B) は 0.1 M Gly-HCl (pH 2.5) に室温で 10 分間インキュベーションし, 1 M Tris-HCl (pH 7.6) で中和した。そして, それぞれの至適条件でキチナーゼ活性を測定した。

最近、当研究室は、Chit1 mRNA がマウスの胃で高いレベルで合成されていることを報告した [17]。組換え Chit1 は、氷上で 1 時間、pH 5.0-11.0 で処理してもキチナーゼ活性を完全に保持していた。しかし、pH 2.0 では、その活性は減少した (図 II. 9C)。これに対し、組換え Chit1 は pH 2.0 でキチンビーズに結合した (図 II. 9D)。これらの結果は、Chit1 がマウスの胃の環境下において、レクチンのようにキチン基質に結合できる可能性がある。

Chit1 は、pH 5.0 において、結晶性とコロイダルキチン、そして GlcNAc オリゴマーを分解し、主として (GlcNAc)₂ を生成した。Chit1 は 37°C, 1 時間で (GlcNAc)₆ と (GlcNAc)₅ を分解し、主として、(GlcNAc)₂ と (GlcNAc)₃ を生成し、16 時間後では後者を分解して (GlcNAc)₂ と GlcNAc を生成した。また、Chit1 は (GlcNAc)₄ から (GlcNAc)₂ を効率的に生成した。この結果は、基質特異性として、Chit1 は、より大きなオリゴマーと高分子量キチン基質を優先的に分解することを示した。

(GlcNAc)₆ と (GlcNAc)₅ から生成した (GlcNAc)₃ は、相対的に酵素による分解に抵抗性を示した。これは、Chit1 固有の (GlcNAc)₃ に対する分解特性と言える。Chit1 を用いて、キチナーゼ活性の測定のための人工基質として一般的に使用される 4NP-(GlcNAc)₂ の分解挙動を FACE 法で解析した。4NP-(GlcNAc)₂ では、(GlcNAc)₃ と同様に、pH 5.0-6.0 で強い (GlcNAc)₂ シグナルを、pH 7.0-8.0 で弱いシグナルを認めた (図 II. 11A と 11B)。これに対し、コロイダルキチンと (GlcNAc)₆ は pH 4.0, 7.0, 8.0 においても分解され、多量の (GlcNAc)₂ シグナルを検出できた (図 II. 11C と 11D)。このことから、Chit1 は、pH 4.0-8.0 の間で、特に、pH 7.0 と 8.0 でもキチン基質を分解し、(GlcNAc)₂ を生成できることを示した。

組換えマウス Chit1 は、リソソーム内の pH 環境に近い pH 5.0 において安定で、最大活性を持つ (図 II. 9A と 9C)。マクロファージのリソソーム内には、完全長 50 kDa の Chit1 と、それが分解された 39 kDa が認められている [12]。この章では、Chit1 が、中性から弱酸性条件下でキチン基質を分解できることを示した。以上の結果から、この酵素は、生体内の生理的条件下で、重要な役割と機能を持つ可能性がある。Chit1 は目において高く発現しており、キチン含有微生物に対する生体防御機能として働くと考えられている [55]。さらに、Chit1 のキチナーゼ活性は、アテローム性動脈硬化症の疾患患者の血清で増加していることが報告されている。この酵素の活性は、アテローム性動脈硬化症に対する保護的な役割を有することが示されており、局所的なキチナーゼ活性の増強がアテローム性動脈硬化症の新たな治療法の開発に繋がるかもしれない [56]。Chit1 の酵素特性のさらに詳細な解析が必要である。

第 III 章 マウスキトリオシダーゼと酸性ほ乳動物キチナーゼの キチン分解特性の直接比較と相乗効果の決定

第 1 節 研究目的

Chit1 と AMCase は同じ組織や細胞でも発現している。Chit1 はマウスの胃，眼，肺で高発現しており，一方で，AMCase は胃，顎下腺，肺で発現している[17]。加えて，両酵素は単球やマクロファージで発現し，一部はリソソームに存在し，他は細胞外に分泌される [18]。両酵素の発現レベルは研究されているが，両酵素に適した条件下でのそれらの機能は不明な点が多い。さらに，関連疾患の病因および生理学的状態に関するほ乳類キチナーゼの寄与は，明らかになっていない。

第 II 章では，マウス Chit1 を融合タンパク質 Protein A-Chit1-V5-His として大腸菌で発現させ，二つのクロマトグラフィーで精製する方法を確立した。また，第 II 章において，大腸菌で発現した Chit1 は，CHO 細胞で発現した Chit1 と同等の機能を有し，生体内条件で機能することを見出した。

本章では，Chit1 と AMCase のキチン分解特性を *Serratia* ChiB と直接比較することで，客観的に Chit1 と AMCase の特性を明らかにすること，また，Chit1 と AMCase が共に存在する条件下で，相乗効果を示すかどうかを明らかにすることを目的とした。本章では，比色分析と FACE 法を組み合わせ，人工および天然のキチン基質を用いて，Chit1 と AMCase のキチン分解特性を *Serratia* ChiB と直接比較した [42, 43]。最後に，本章では，生体内条件で天然のキチン基質に Chit1 と AMCase を組み合わせて作用させ，相乗効果を示すかを検証した。

第 2 節 実験材料と方法

ほ乳類キチナーゼの発現ベクターの構築

pEZZ18/pre-Protein A-Chit1-V5-His は第 II 章にて，報告した方法と同様に発現した (第 II 章. 第 2 節 実験材料と方法)。AMCase は Kashimura らの報告した方法で，融合タンパク質 pEZZ18/pre-Protein A-AMCase-V5-His を調製した [39, 40, 57]。

大腸菌で発現するための *Serratia* ChiB ベクターの設計

ChiB-V5-His 融合タンパク質 (図 III.1A) を発現させるために，*Serratia* ChiB DNA は *Serratia marcescens* Bizio (*Serratia marcescens* 株 CDC 3100-71) [ATCC 27137, American Type Culture Collection 社 (ATCC)] ゲノム DNA を購入し，ChiB 遺伝子を KOD Plus DNA ポリメラーゼ (Toyobo 社) および EcoRI と XhoI 制限酵素認識部位を，それぞれ付加したプライマー (Eurofins Genomics 社) を用いた PCR によって増幅した。V5-His 配列を付加するために，PCR 産物を EcoRI および XhoI で切断し，pEZZ18/Chit1-V5-His ベクターの同じ部位にサブクローニングした [57]。次に，PCR によって pEZZ18/pre-Protein A-ChiB-V5-His に EcoRI および NotI の制限酵素認識部位を付加した。リバープライマーは pET-21d ベクター (Merck Millipore 社) の V5-His の N 末端領域と読み枠が合うように設計した [57]。PCR は 6 塩基の EcoRI 認識配列 (下線) および ChiB DNA (Gene ID: 23389259) に対応する 25 塩基の *Serratia* ChiB の配列からなるフォワードプライマー (5'-
CGCGGATGAATTCGATCCACACGCAAAGCCGTTATTGGGT-3') と NotI 認識配列 (下線) と V5-His 認識配列を含むリバープライマー (5'-
GAGTGCGGCCGCTAGACAGTCGAGGCTGAT-3') を用いて行った。両プライ

マーは制限酵素部位の効率的な切断のために、余分な 4-7 塩基 (太字) を含んでいる。PCR 産物は、Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega 社) を用いて精製し、EcoRI と NotI で切断した。DNA 断片は 1.5% アガロースゲルで分離、精製し、pET-21d ベクターを同様に切断して作成したベクターにクローニングした。得られたプラスミド DNA (the pET-21d/ChiB-V5-His) の全塩基配列は、Eurofins Genomics 社に依頼して確認した。

***Serratia* ChiB-V5-His, Protein A-Chit1-V5-His と Protein A-AMCase-V5-His の調製**

大腸菌からの *Serratia* ChiB-V5-His の調製は、第 II 章で記載した方法と同様 (第 II 章. 第 2 節 実験材料と方法) に実施し、Ni セファロースで精製した [57]。溶出したタンパク質を 20 mM Tris-HCl (pH 8.6) に対し透析し、同じ緩衝液で平衡化した HiTrap Q HP カラム (GE Healthcare 社) に供した。カラムを 10 倍量の 20 mM Tris-HCl (pH 8.6) で洗浄し、0-1.0 M NaCl の直線濃度勾配で溶出した。

大腸菌からの Protein A-AMCase-V5-His と Protein A-Chit1-V5-His の調製は、第 II 章で記載した方法と同様 (第 II 章. 第 2 節 実験材料と方法) に行い、Ni セファロースと HiTrap Q HP column で精製した [39, 40, 57]。

タンパク質濃度, SDS-PAGE, Western blotting およびキチン分解活性

タンパク質濃度, SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) および Western blotting は、第 II 章にて記載した方法 (第 II 章. 第 2 節 実験材料と方法) で行った [57]。

キチン分解活性は第 II 章で記載した方法と同様に合成発色基質である 4-nitrophenyl *N,N'*-diacetyl- β -D-chitobioside [4-NP-(GlcNAc)₂, Sigma-Aldrich 社] を終濃度 200 μ M で使用した [39, 40, 57]。反応は 1 M 炭酸ナトリウム 20 μ L で停止させた。遊離した 4-NP を 405 nm での分光測定で検出した。4-NP のモル吸光係数は 17,700 M⁻¹ cm⁻¹ としてユニット (U) を計算した。1 酵素ユニット (U) は、各 pH で 37°C で、1 分間に 4-NP-(GlcNAc)₂ から 4-NP を 1 μ mol 遊離する酵素量、と定義した。4-NP-(GlcNAc)₂ 加水分解の初期速度は 37°C で反応を 3 回行った。

4-NP-(GlcNAc)₂ における速度論的パラメーター、 K_M と V_{max} は、ミカエリス-メンテン速度論モデルを想定して Sakaguchi らが報告したように、0.05 ~ 1.6 mM の範囲で計算した [58]。

キチナーゼによるキチン基質の分解

本実験は、第 II 章に記載した方法と同様 (第 II 章. 第 2 節 実験材料と方法) に、4-NP-(GlcNAc)₂, (GlcNAc)₄ と コロイダルキチン基質を使用した [57]。キチナーゼ活性は、4-NP-(GlcNAc)₂ (終濃度 200 μ M) と (GlcNAc)₄ (終濃度 200 μ M) を各酵素 (2.1 pmol) と共に 37°C で、McIlvaine 緩衝液中でそれぞれ 30 分もしくは 1 分間インキュベートすることにより測定した。高分子基質であるコロイダルキチン (終濃度 2 mg/mL) からの分解生成物を検出するために、反応は各酵素 (10 pmol) を 37°C で、同様の緩衝液中で 30 分間インキュベートした。遠心濃縮器 [Centrifugal Concentrator CC-105 (TOMY 社)] を用いて反応液を直ちに真空下で凍結乾燥した。これらの反応で生成されたキチン断片は、第 II 章にて、報告した方法と同様 (第 II 章. 第 2 節 実験材料と方法) に Jackson [41] と Wakita らによって改良された方法 [42] に従い fluorophore

8-aminonaphthalene-1,3,6-trisulphonic acid (ANTS, Thermo Fisher Scientific 社) に共有結合的還元末端を標識し、結果として生じた蛍光発色物質は PAGE によって分離した。GlcNAc オリゴマー (Seikagaku Corporation 社) を標準物質として使用した。

Chit1 と AMCase の混合液による (GlcNAc)₄ とコロイダルキチンの分解

本実験は Chit1 と AMCase を組み合わせ、(GlcNAc)₄ とコロイダルキチンを分解した。Chit1 と AMCase は 1 : 1, 1 : 2 または 2 : 1 のモル比で混合した。反応混合液は pH 5.0 と 7.0 で 37° C, 30 分間インキュベートした。分解生成物を FACE 法により分析した。

統計分析

キチン分解活性は、Student's t-test を使用して比較した。

第 3 節 結果

大腸菌で発現した Chit1, AMCase および *Serratia* ChiB の精製

本実験では第 II 章に記載した方法と同様 (第 II 章. 第 2 節 実験材料と方法) に CHO 細胞で発現させた組換え酵素と同等の有効性を示す融合タンパク質マウス AMCase と Chit1 (Protein A-Chit 1 -V5 -His と Protein A-AMCase-V5 -His) を pEZZ18 システムを用いて大腸菌で発現させた (図 III. 1A)。

Serratia ChiB は多くの研究において融合タンパク質として大腸菌で発現されている。本研究では pET システムを用いて融合タンパク質 (T7 tag-ChiB-V 5-His) を発現させた (図 III. 1A)。

第 II 章では, Protein A-Chit1-V5-His を Ni セファロースカラムで分離し, 次いで HiTrap Q HP カラムで精製が出来ることを示した [34]。本章では Protein A-AMCase-V5-His と ChiB-V5-His の単離に同様の方法を用いた。精製酵素 (2.1 pmol) は SDS-PAGE, 次いで Coomassie Brilliant Blue (CBB) 染色もしくは V5 抗体を用いた Western blotting で分析した (図 III. 1B)。

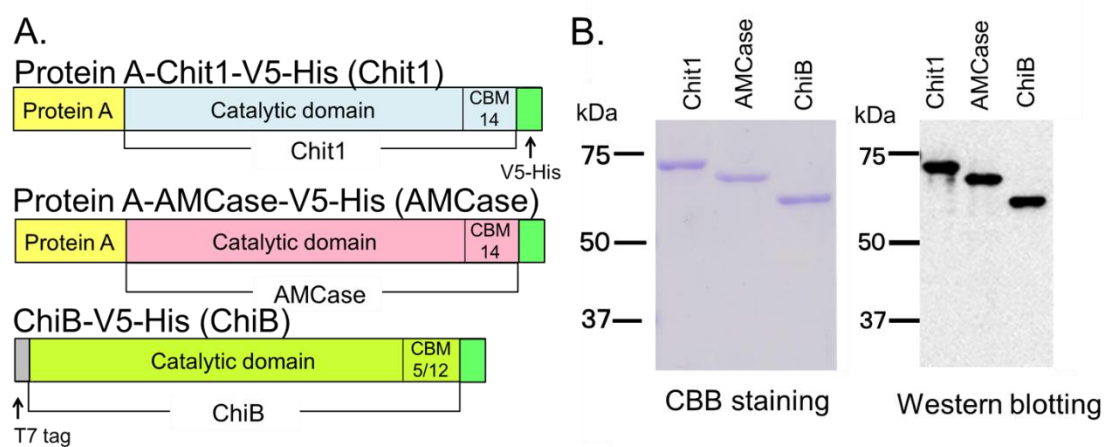


図 III. 1. Protein A と V5-His の融合タンパク質としての大腸菌での Chit1, AMCase および *Serratia* ChiB の生成

(A) 大腸菌で発現したマウス成熟 Protein A-Chit1-V5-His, Protein A-AMCase-V5-His, および ChiB-V5-His の模式図。マウス Chit1, AMCase および *Serratia* ChiB は、N 末端に触媒ドメイン (CatD) および C 末端にキチン結合ドメイン (CBD) が含まれる。(B) Ni セファロースカラム, 次いで Hitrap Q HP カラムを用いて精製した融合タンパク質の SDS-PAGE 分析。同量の精製タンパク質を電気泳動し, CBB 染色で視覚化した。タンパク質サンプルは, V5 抗体を用いた Western blotting によって分析した。

4-NP-(GlcNAc)₂ と比色分析を用いた Chit1, AMCase および *Serratia* ChiB のキチン分解活性の比較

マウスキチナーゼは、胃 (pH 2.0)、免疫細胞のライソゾーム (pH 5.0)、眼や肺、その他の組織 (pH 7.0) で発現する [17]。

各融合タンパク質のキチン分解活性は 4-NP-(GlcNAc)₂ 基質を用いて pH 1.0-10.0 の範囲で反応させ、遊離した 4-NP イオンの吸光度を 405 nm で測定した (図 III. 2A)。Chit1 は pH 5.0 と 6.0 で最も高い活性を示し、pH 2.0-3.0 では活性を示さず、中性 (pH 7.0-8.0) もしくはより酸性 (pH 4.0) の条件で活性が低下した (図 III. 2B, 青色)。AMCase は pH 2.0 (Gly-HCl 緩衝液) で最も高い活性を示し、pH 3.0-8.0 でより低い活性を示した (図 III. 2B, 赤)。一方、*Serratia* ChiB の活性は、pH 4.0-6.0 で最も高く、より酸性 (pH 3.0) もしくは中性条件 (pH 7.0-8.0) で低下し、pH 2.0 で活性は検出できなかった (図 III. 2B, 緑色)。これらの結果 (表 III. 1) は、以前に報告されているデータ [23, 24, 34, 35] と一致した。最大活性の強さは以下の通りである : AMCase (pH 2.0) > *Serratia* ChiB (pH 5.0) > Chit1 (pH 5.0)。

さらに、本実験では、4-NP-(GlcNAc)₂ との各酵素の定常状態の速度論パラメーターを決定した (表 III. 2)。加水分解反応は、ミカエリス-メンテン速度論モデルに従った。37°C で、Chit1 (McIlvaine 緩衝液の pH 5.0)、AMCase (Gly-HCl 緩衝液の pH 2.0 と McIlvaine 緩衝液の pH 5.0) および *Serratia* ChiB (McIlvaine 緩衝液の pH 5.0) の k_{cat} 値は、それぞれ、 0.2 s^{-1} , 1.0 s^{-1} , 0.3 s^{-1} と 0.6 s^{-1} であった。また、それらの K_M 値は、それぞれ $82.2 \text{ }\mu\text{M}$, $117.5 \text{ }\mu\text{M}$, $146.2 \text{ }\mu\text{M}$ および $89.9 \text{ }\mu\text{M}$ であった (表 III. 2)。このように、Chit1 と AMCase の速度論パラメーターは異なった。

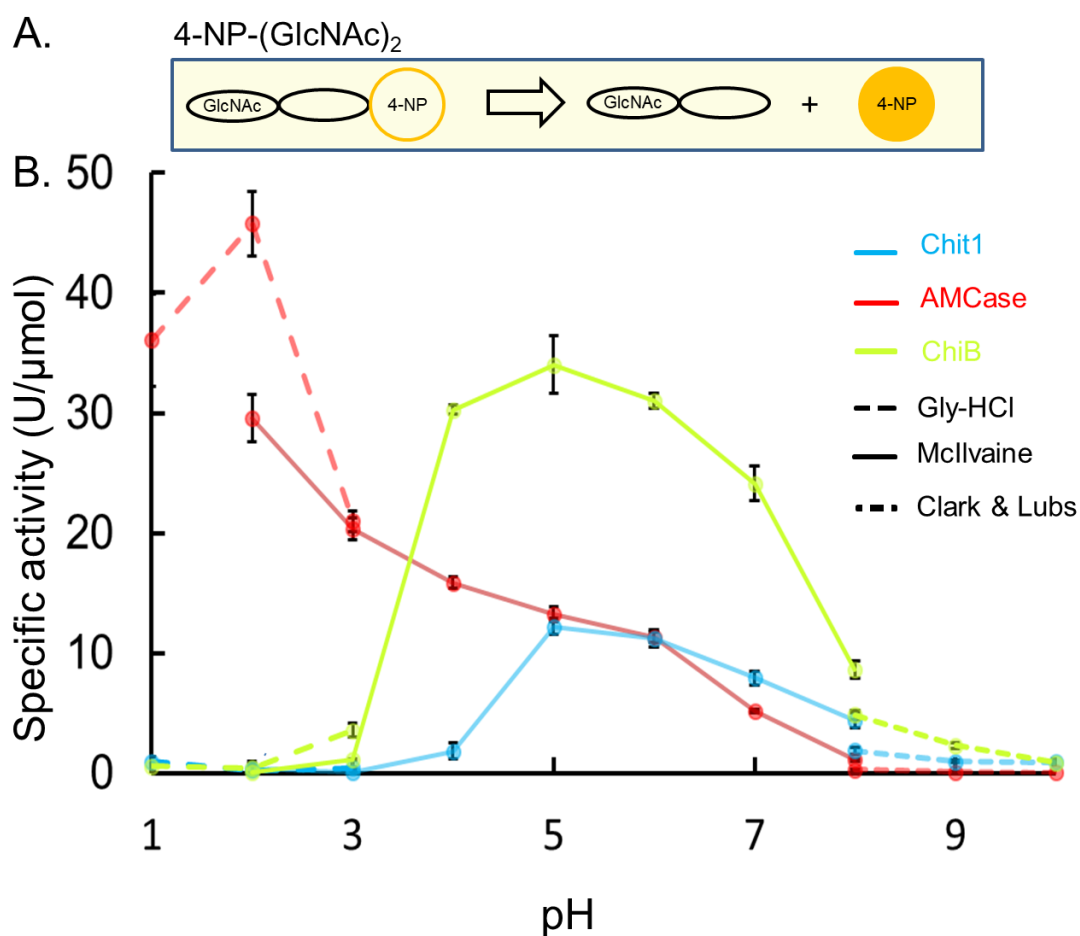


図 III. 2. 比色法を用いた Chit1, AMCase および *Serratia* ChiB のキチン分解活性の特性評価

(A) $4\text{-NP}-(\text{GlcNAc})_2$ から放出された 4-NP イオンの吸光度を 405 nm で測定した。(B) Chit1 (青), AMCase (赤), *Serratia* ChiB (緑) のキチン分解活性は、全量 50μL で Gly-HCl 緩衝液 (pH 1.0-3.0), McIlvaine 緩衝液 (pH 2.0-8.0) および Clark and Lubs 緩衝液 (pH 8.0-10.0) 中、37°C で 30 分間で測定した。エラーバーは、実験を 3 回行い、平均 ± 標準偏差で表した。

表 III. 1. 比色法と FACE 法の比活性の比較

Enzymes	pH	2.0 (Gly-HCl)		2.0 (McIlvaine)		5.0		7.0	
Chit1	colorimetric	0.00	0.00	0.00	0.00	12.20	±0.70	7.91	±0.60
	FACE	0.00	0.00	0.00	0.00	11.20	±0.05	5.62	±0.05
AMCase	colorimetric	45.80	±2.68	29.57	±2.01	13.22	±0.59	5.14	±0.12
	FACE	38.47	±0.08	20.33	±0.10	9.63	±0.16	4.48	±0.04
ChiB	colorimetric	0.00	0.00	0.00	0.00	34.02	±2.37	24.11	±1.44
	FACE	0.00	0.00	0.00	0.00	28.37	±0.34	21.15	±0.11

4-NP-(GlcNAc)₂ を用いた比色法と FACE 法の比活性の比較

表 III. 2. 4NP-(GlcNAc)₂ のキチナーゼの速度論パラメーターの比較

Enzymes	k_{cat} (s ⁻¹)		K_{M} (μM)		$k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ (s ⁻¹ μM^{-1})	pH	Temp (°C)
AMCase	1.0	± 0.012	117.5	± 6.8	0.008	2.0	37
AMCase	0.3	± 0.001	146.2	± 1.9	0.002	5.0	37
Chit1	0.2	± 0.001	82.2	± 0.3	0.002	5.0	37
<i>Serratia</i> ChiB	0.6	± 0.008	89.9	± 3.7	0.007	5.0	37

Chit1, AMCase および *Serratia* ChiB の 37°C, 至適 pH での速度論パラメーター。

4-NP-(GlcNAc)₂ と FACE 法を用いたキチン分解活性の評価

FACE 法は、ポリアクリルアミドゲル上の人工および天然のキチン基質からの分解生成物を検出するのに簡便で、定量的かつ非常に高感度な方法である [41, 42]。図 III. 3A は、4-NP-(GlcNAc)₂ から遊離し、続いて ANTS に標識された分解産物の模式図を示す [42, 43, 57]。

Chit1 および *Serratia* ChiB は、pH 5.0 と 7.0 で基質を (GlcNAc)₂ に分解することができ (図 III. 3B と 3D)、一方、AMCase は pH 2.0, 5.0 または 7.0 で (GlcNAc)₂ を、pH 5.0 と 7.0 で (GlcNAc)₃ を生成した (図 III. 3C)。図 III. 3E はこれらの実験の定量結果を示す。Chit1 と *Serratia* ChiB は、pH 5.0、続いて pH 7.0 で高い活性を示し、pH 2.0 では活性を示さなかった。予想していたように、キチナーゼ活性は AMCase (pH 2.0), *Serratia* ChiB (pH 5.0), Chit1 (pH 5.0) の順で高かった (図 III. 3E と表 III. 1)。pH 5.0 と 7.0 での Chit1 の活性は、これらの pH 条件下での AMCase の活性に匹敵した。Chit1 の pH 依存性は *Serratia* ChiB のそれと類似していた。このように、FACE 法によって得られた結果は比色分析の結果と同様であった (表 III. 1)。

加えて、AMCase により 4-NP-(GlcNAc)₂ から生成された (GlcNAc)₃ は (図 III. 3B)、Wakita らの最近の報告 [43] と一致し、この現象は Chit1 および *Serratia* ChiB の存在下では検出されなかった。このように、この条件下で糖転移活性を示すのは AMCase のみだった。

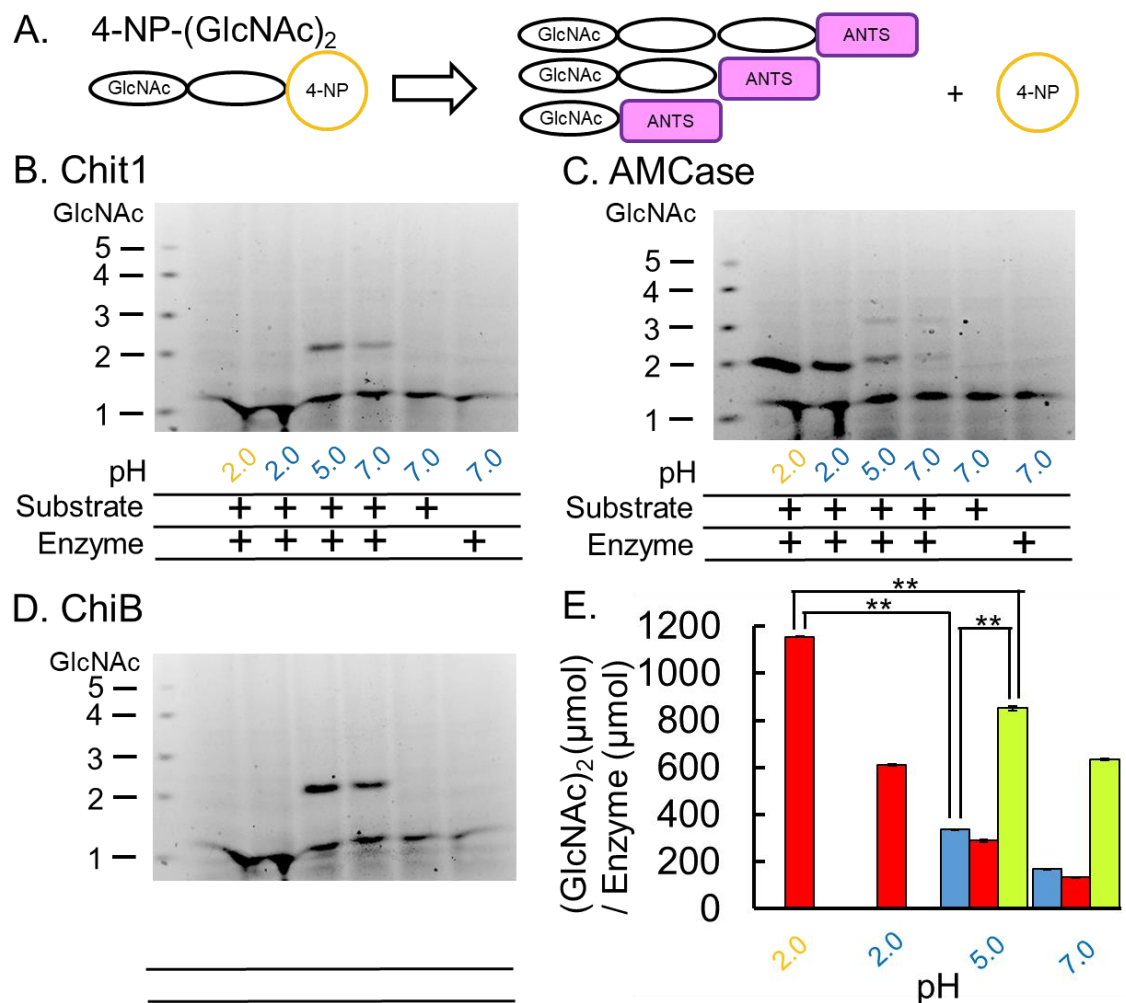


図 III. 3. FACE 法を用いた Chit1, AMCase および *Serratia* ChiB のキチン分解活性の特徴づけ

(A) 4-NP-(GlcNAc)₂ から放出され、ANTS で標識された分解生成物の概略図。Chit1 (B), AMCase (C) および *Serratia* ChiB (D) のキチナーゼ活性は、Gly-HCl 緩衝液 (pH 2.0) (オレンジ), McIlvaine 緩衝液 (pH 2.0, 5.0, 7.0) (濃い青)。37°C で 30 分間反応させた後、ANTS で標識し、PAGE で分離した。キチンオリゴマーは、標準として左に示す。(E) 各 pH で生成された (GlcNAc)₂ の定量データ。(B)-(D) の結果から推定された蛍光強度。Chit1, 青; AMCase, 赤; *Serratia* ChiB, 緑。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

(GlcNAc)₄ と FACE 法を用いた様々な pH でのキチン分解活性の比較

次に、本実験では基質として (GlcNAc)₄ を使用した (図 III. 4A)。各酵素における FACE 法のバンドパターン (図 III. 4B-D) は、図 III. 3 の結果と類似していた。pH 5.0 および 7.0 での Chit1 の活性は AMCase の活性より低かった。最大活性の強さは以下の通りである : AMCase (pH 2.0) \approx *Serratia* ChiB (pH 5.0) > Chit1 (pH 5.0) (図 III. 4E)。

4-NP-(GlcNAc)₂ を用いた実験では、Chit1 の pH 依存性は *Serratia* ChiB のそれと同様であった。pH 2.0 での AMCase の最大活性は、pH 5.0 での *Serratia* ChiB のそれよりも高かった (図 III. 2 と 3)。pH 5.0 と 7.0 での Chit1 の活性は AMCase の活性と同等であった (図 III. 2 と 3)。このように、pH 5.0 と 7.0 における Chit1 および AMCase の比活性は、4-NP-(GlcNAc)₂ (図 III. 2 と 3) と (GlcNAc)₄ (図 III. 4) とで異なっていた。これらの違いは、合成および天然の低分子量基質に対する Chit1 と AMCase の反応性が異なることを示唆している。

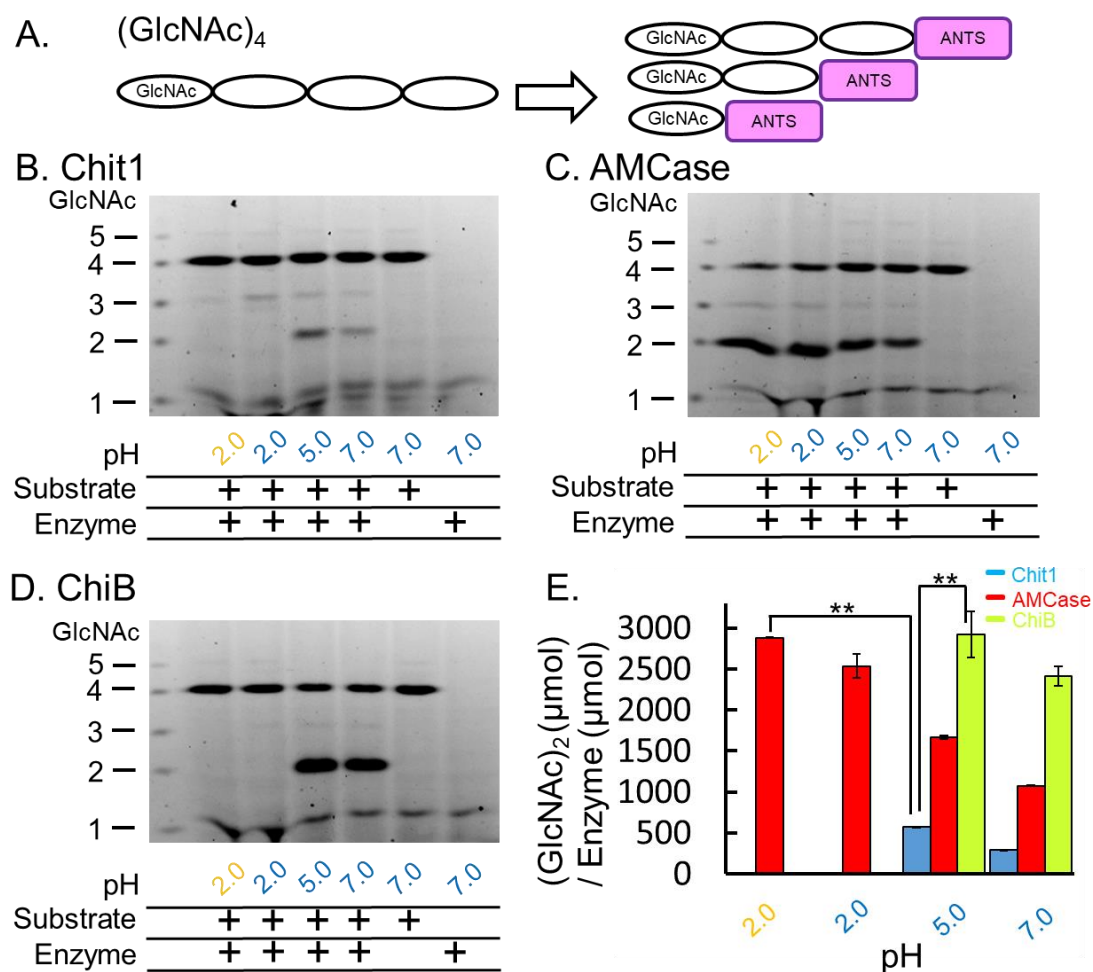


図 III. 4. Chit1, AMCase および *Serratia* ChiB による pH 2.0, 5.0 および 7.0 での (GlcNAc)₄ の分解

(A) (GlcNAc)₄ から放出され, ANTS で標識された分解生成物の概略図。Chit1 (B), AMCase (C) および *Serratia* ChiB (D) のキチナーゼ活性は, Gly-HCl 緩衝液 (pH 2.0) (オレンジ), McIlvaine 緩衝液 (pH 2.0, 5.0, 7.0) (濃い青)。37°C で 30 分間反応させた後, ANTS で標識し, PAGE で分離した。キチンオリゴマーは, 標準として左に示す。(E) 各 pH で生成された (GlcNAc)₂ の定量データ。(B)-(D) の結果から推定された蛍光強度。Chit1, 青; AMCase, 赤; *Serratia* ChiB, 緑。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

高分子量キチン基質を用いた様々な pH での活性の比較

FACE 法により得られた高分子基質であるコロイダルキチン (図 III. 5A) に対する Chit1 と *Serratia* ChiB の分解パターン (図 III. 5B と D) は、以前の実験 (図 III. 3 と 4) と類似していた。AMCase は pH 2.0, 5.0 および 7.0 で (GlcNAc)₂ を生成した (図 III. 5C)。pH 5.0 で AMCase によって生成された (GlcNAc)₂ の量は、pH 2.0 (McIlvaine 緩衝液) での AMCase の活性より高かった (図 III. 5E)。

最大活性の強さは以下の通りである : AMCase (pH 2.0) > *Serratia* ChiB (pH 5.0) > Chit1 (pH 5.0) (図 III. 5E)。上記の実験と同様に、pH 5.0 と 7.0 における Chit1 の活性は AMCase の活性よりも低かった。Chit1 の pH 依存性は *Serratia* ChiB のそれと類似していた。pH 5.0 での AMCase の活性は、同じ pH での *Serratia* ChiB のそれに匹敵した。

AMCase の活性は、低分子と高分子基質に対して異なるパターンを示した (図 III. 4 と 5)。また、pH 5.0 で AMCase がコロイダルキチンから生成した (GlcNAc)₂ の量は、pH 2.0 (McIlvaine 緩衝液) でのそれより高かった。対照的に、低分子と高分子基質に対する Chit1 の活性はいずれの pH でもほとんど変化しなかった。このように、異なる基質に対する分解産物の変化は、AMCase と Chit1 が様々な pH 条件下で異なる性質を持つことを示した。

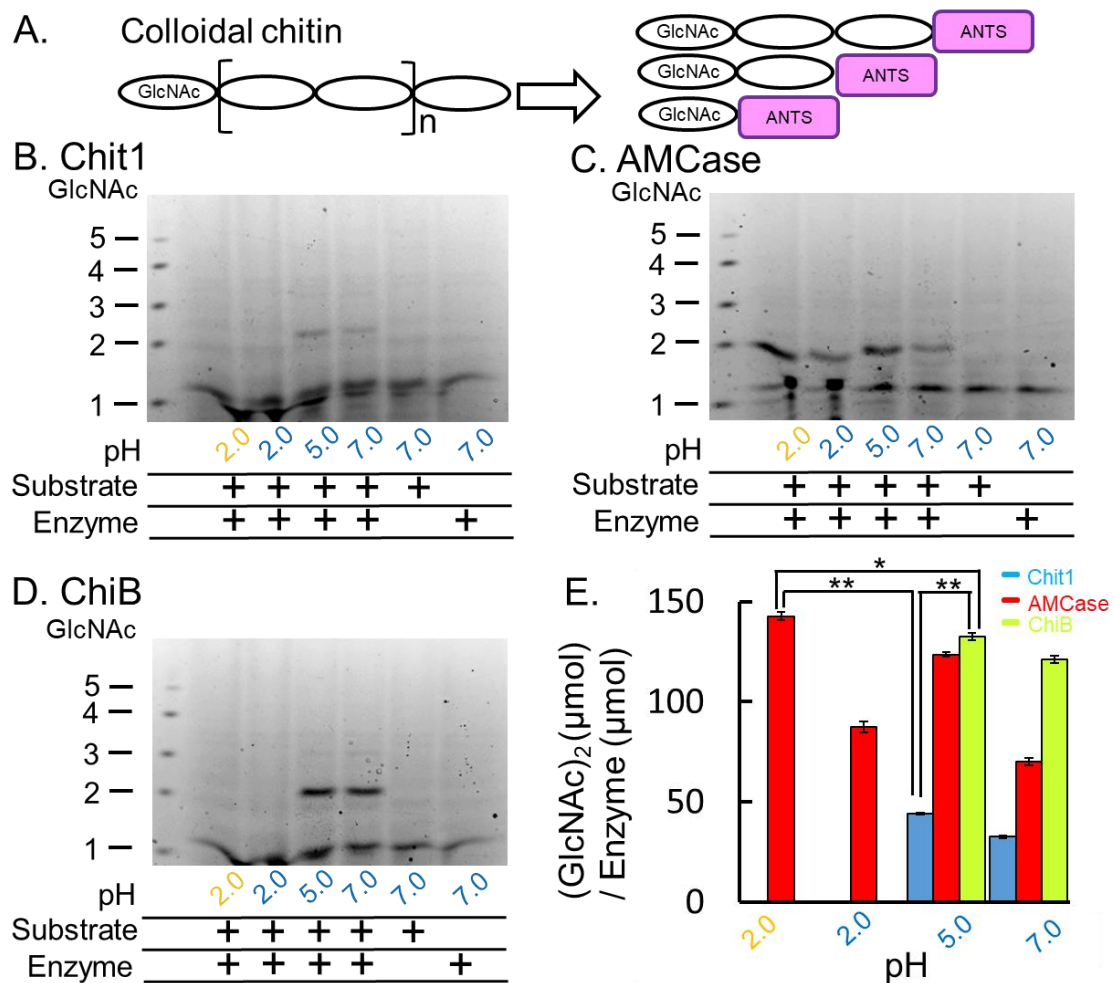


図 III. 5. Chit1, AMCase および *Serratia* ChiB による pH 2.0, 5.0 および 7.0 でのコロイダルキチンの分解

(A) コロイダルキチンから放出され、ANTS で標識された分解生成物の概略図。Chit1 (B), AMCase (C) および *Serratia* ChiB (D) のキチナーゼ活性は、Gly-HCl 緩衝液 (pH 2.0) (オレンジ), McIlvaine 緩衝液 (pH 2.0, 5.0, 7.0) (濃い青)。37°C で 30 分間反応させた後、ANTS で標識し、PAGE で分離した。キチンオリゴマーは、標準として左に示す。(E) 各 pH で生成された (GlcNAc)₂ の定量データ。(B)-(D) の結果から推定された蛍光強度。Chit1, 青; AMCase, 赤; *Serratia* ChiB, 緑。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

pH 5.0 および 7.0 でのキチン基質に対する Chit1 と AMCase の混合状態での分解

Serratia ChiA と ChiB はキチン分解において相乗効果があることが報告されている [30, 31]。マウス Chit1 と AMCase は単球やマクロファージに発現しており、ライソゾーム (pH 5.0) に存在するか、細胞外 (pH 7.0) に分泌される。Chit1 と AMCase は様々な組織や細胞で共に存在するが、これらの酵素の相乗効果については知られていない。以前に相乗効果が報告された *Serratia* [30, 31] と *Alteromonas* sp. strain O-7 chitinases [59] の方法に従い、本実験では Chit1 と AMCase を組み合わせ、37°C で、pH 5.0 と 7.0 での (GlcNAc)₄ およびコロイダルキチンからの分解産物を分析した。その結果、どちらの pH でも、両酵素の混合液は (GlcNAc)₄ を分解したが、Chit1 と AMCase の組み合わせでは分解活性が各キチナーゼ単独の分解活性の合計値と同等、もしくは若干低い値を示し、相乗効果を観察できなかった (図 III. 6)。同様に、コロイダルキチンの分解においても、両酵素の相乗作用は検出されなかった (図 III. 7)。この結果は、細菌のキチナーゼとは対照的に、Chit1 と AMCase の間に相乗効果がないことを示している。このことは、Chit1 と AMCase が様々な pH 条件下で独立的に作用することを示唆している。

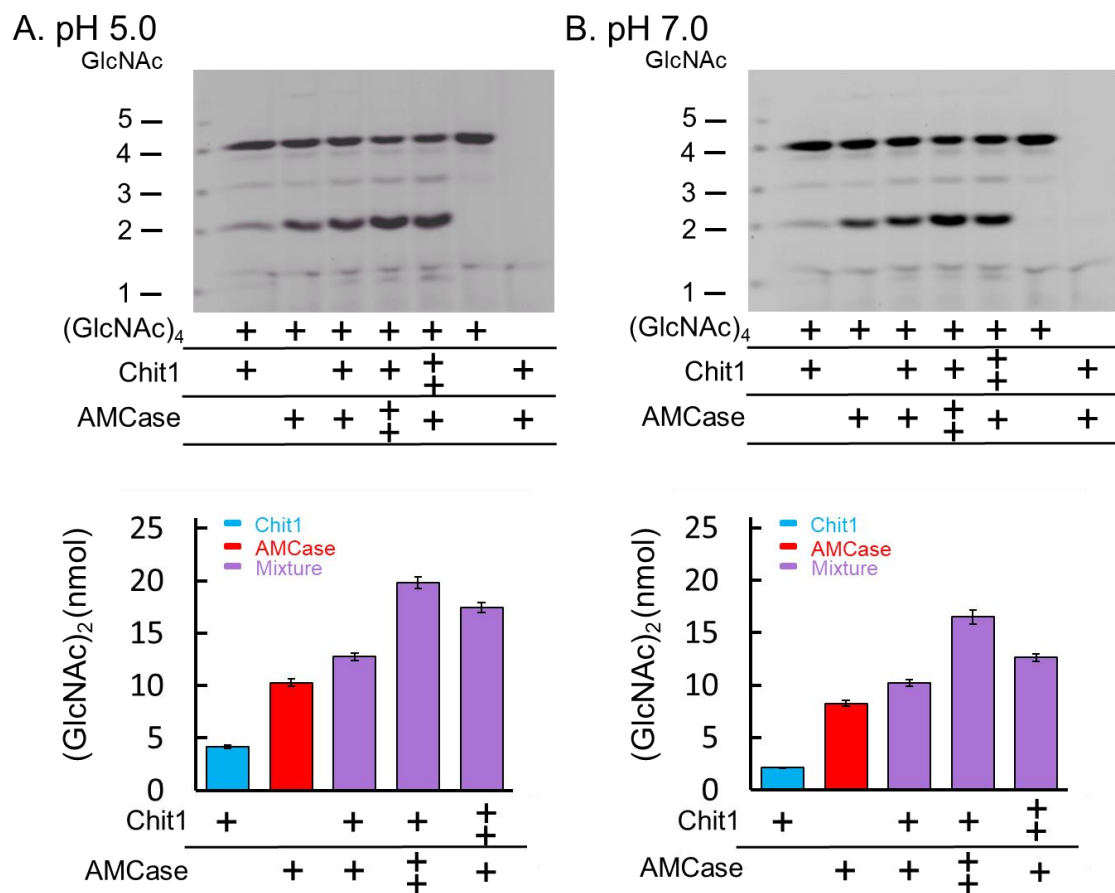


図 III. 6. pH 5.0 および 7.0 での Chit1 と AMCase の組み合わせによる (GlcNAc)₄ の分解。

(GlcNAc)₄ を、pH 5.0 (A) または pH 7.0 (B) で異なる比率の Chit1 と AMCase の混合液と共にインキュベートした。図 III. 4. に記載したように生成物を分析した。

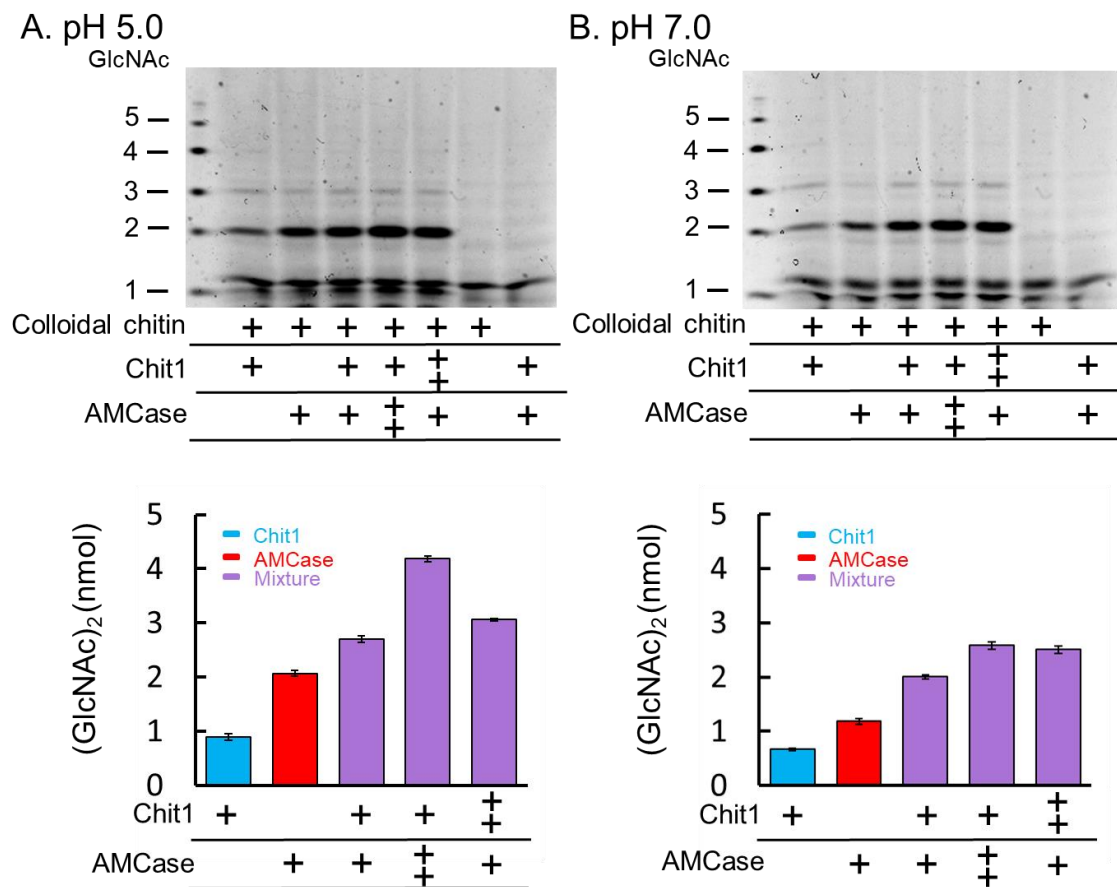


図 III. 7. pH 5.0 および 7.0 での Chit1 と AMCase の組み合わせによるコロイダルキチンの分解。

コロイダルキチンを、pH 5.0 (A) または pH 7.0 (B) で異なる比率の Chit1 と AMCase の混合液と共にインキュベートした。図 III. 5. に記載したように生成物を分析した。

第 4 節 考察

Chit1 と AMCase の発現レベルは、それぞれの特定の病理学的状態において変化する。そのため、両酵素はしばしば炎症性疾患の有用なバイオマーカーとなる [7, 60, 61]。Chit1 と AMCase は様々な組織や細胞に共存している。しかし、Chit1 と AMCase が生理的条件下で相互作用を示すかどうかは依然として不明であった。加えて、GH18 属の酵素のキチナーゼ活性は、キチン基質および pH などのいくつかの要因によって影響を受け、変化する。本章では Chit1 と AMCase の類似点と相違点、および相乗効果を明らかにするために、両酵素が共に存在する生体内の pH 条件における酵素学的性質を直接比較し、それらの相互作用を分析した。

pH 2.0, 5.0 と 7.0 でのキチン分解活性は、比色分析 (図 III. 2) および FACE 法 (図 III. 3 と表 III. 1) において基本的に類似した。このように、比色分析と FACE 法との組み合わせは、以前に Wakita が記載したようにキチン分解活性および糖転移活性を特徴付けるのに有効かつ信頼性がある [42, 43, 57]。

Eide らは、ヒト Chit1 が (GlcNAc)₄ を分解し、主に (GlcNAc)₂ を生成することを HPLC 分析により明らかにしている [62]。また、わずかながら、(GlcNAc)₃ の生成が検出された。本章の研究において、FACE 法は、マウス Chit1 が (GlcNAc)₄ を分解して、主として (GlcNAc)₂ と中程度のレベルの (GlcNAc)₃ を生成することを明らかにした (図 III. 4B)。

酵素もしくは基質の非存在下でも存在する GlcNAc 単量体に対応するバンド (図 III. 3-7) は、以前に報告されたように、反応溶液中の人工産物由来である可能性がある。そこで、FACE 法での単量体の識別および検出は困難であると考えられる。

Krokeide らは、4-NP-(GlcNAc)₂ を使用した場合、*Serratia* ChiB の k_{cat} と K_M がそれぞれ 1.4 s^{-1} と $181 \mu\text{M}$ であり、一方、天然基質 (GlcNAc)₄ を使用した値は、それぞれ 28 s^{-1} と $4 \mu\text{M}$ であることを報告した [63]。彼らは、人工基質を用いて決定した *Serratia* ChiB の速度論的パラメーターが、天然基質を用いて得られたパラメーターとは完全に異なることを示している。本章の結果は、基質として (GlcNAc)₄ を用いた *Serratia* ChiB の活性が、4-NP-(GlcNAc)₂ を用いたものよりも高いことを示した。このことは、人工および天然の基質に対する *Serratia* ChiB の挙動が、Krokeide らが報告した傾向と類似していることを示唆した。

Chit1 はよく研究されているほ乳類キチナーゼである [48, 49, 60, 62, 64-66]。カンジダ症およびアスペルギルス症の好中球減少症マウスモデルへの組換えヒト Chit1 の補充は生存率を高めた [67]。このように、ヒトとマウス Chit1 の基本的な機能は同じであることが示唆されている。本章の結果では、Chit1 の最大活性は AMCase の最大活性より低かった。しかし、Chit1 は病的状態において発現レベルを増加させ、肺マクロファージおよび好中球によって分泌されることによって十分に機能すると考えられる。

AMCase はマウス胃組織において高度に発現される消化酵素であり、そして pH 2.0 において最も高い活性を示す [15-17, 39, 40, 68]。最近、AMCase およびそのトリ相同体である Chia が、マウス、ニワトリ、ブタおよびコモンマーモセットにおいて胃や腸の条件下で主要なプロテアーゼ耐性の糖質分解酵素として機能することが報告されている [28, 69-71]。

Chit1 は、肺で、感染症に対する生物学的生体防御として機能する。AMCase は、マウスの肺上皮細胞に分泌され、気道でのキチン分解に寄与することが報告されている [5]。Chit1 および AMCase の発現レベルは、COPD や

アレルギー性喘息などのさまざまな慢性炎症性疾患では変化する [23, 72]。本章の研究で、酸性から中性の条件下で、Chit1 と AMCase が異なるキチン分解特性を持つことを示した。加えて、pH 7.0 での高分子基質に対する AMCase の活性は、Chit1 のそれよりも高かった。このように、Chit1 と AMCase の役割は、肺を含む pH 7.0 の組織では異なることが示唆された [19]。

Serratia ChiB はよく特徴付けられたキチナーゼであり、*Serratia* ChiA と相乗効果を示すことが報告されている [30, 31]。マウス Chit1 と AMCase の酵素的性質を *Serratia* ChiB と比較することにより、キチン分解特性とそれらの相乗効果を客観的に評価することができる。最初に本研究では、人工および天然のキチン基質を用いて、Chit1 と AMCase の酵素学性質を *Serratia* ChiB と直接比較した。低分子および高分子基質に対する AMCase の活性は各 pH で異なっていたが、Chit1 の活性はほとんど変化しなかった (図 III. 2, 3, 4 および 5)。さらに、4-NP-(GlcNAc)₂ を用いた条件で、糖転移活性は AMCase のみ検出された (図 III. 3)。このように、Chit1 と AMCase は様々な pH 条件でキチン分解活性や糖転移活性など異なる性質を持っている。このことから、Chit1 と AMCase の性質は生理的条件下で異なることが示唆された。

Serratia marcescens は、ChiA, ChiB, ChiC, キトビアーゼ、および溶解性多糖モノオキシダーゼキチン結合タンパク質 [32] などの酵素を含むキチン分解系を持ち、キチンをエネルギー源に分解する。*Serratia* ChiA と ChiB はキチン分解を効率的に行うための相乗効果を示す [30, 31]。同様の相乗効果が

Alteromonas sp. strain O-7 chitinases 株でも観察されている [59]。マウス Chit1 および AMCase は単球およびマクロファージで発現され、ライソゾーム (pH 5.0) に存在し、末梢組織の細胞外 (pH 7.0) に分泌される。この研究では、細菌キチナーゼとは対照的に、基質の分子量もしくは pH 条件にかかわらず、

Chit1 と AMCase の相乗効果を検出できなかった。このことは、 Chit1 と AMCase が生理学的条件下で相乗効果を持たないことを示唆している。

第 IV 章 総合考察

Chit1 と AMCase は、慢性炎症性疾患において重要な役割があると考えられている [11, 21-,27, 47]。しかし、それらの疾患に関する Chit1 と AMCase の病態生理学的な機能の詳細は、未だ明らかになっていない部分が多い。Chit1 と AMCase の生化学的な研究のためには、活性を有する酵素が一定量以上必要である。これまでの Chit1 と AMCase の生化学的研究は、ほ乳類培養細胞や酵母の発現系による組換え酵素によるものであった [16, 26, 48, 49]。

Kashimura らが、マウス AMCase を Protein A と V5 エピトープ、(His)₆ タグ (V5-His) を付加した組換えタンパク質 (Protein A-AMCase-V5-His) として大腸菌のペリプラズム空間で発現できることを報告した [39,40]。本研究では、ほ乳類細胞で発現した Chit1-V5-His のキチナーゼ活性に匹敵する比活性を持つ、可溶性の Protein A-Chit1-V5-His をペリプラズム空間に発現する大腸菌発現系を確立した [57]。この大腸菌発現系は、維持が簡便で、迅速かつ安価で、容易に Chit1 や AMCase の生成量を調整することができる。このように、大腸菌を用いた発現系と精製プロトコルを用いることで安定的に Chit1 と AMCase を取得でき、両酵素のさらなる機能解明に貢献できる。

Chit1 は AMCase と異なり、pH 2.5 で 10 分間保持すると活性が 40% 減少した (図 II. 12)。Chit1 は pH 4.0 以下で不安定であるため、本研究では IgG セファロースを用いた精製を行わず、Ni セファロースと HiTrap Q カラムによって夾雑タンパク質を除去した (図 II. 7E)。Ni セファロースと HiTrap Q カラムを用いた精製プロトコルは、Chit1 のような酸性で不安定なタンパク質の精製に有効であると考えられる。第 III 章ではこの精製プロトコルにより Chit1 の他に AMCase と *Serratia* ChiB の精製に成功している(図 III. 1)。

肺では、Chit1 は感染症に対する生物学的生体防御として機能する。AMCase はマウスの肺上皮細胞に分泌され、気道でのキチン分解に寄与することが報告されている [3]。Chit1 および AMCase の発現レベルは、COPD やアレルギー性喘息などのさまざまな慢性炎症性疾患では変化する [16, 56]。本章の研究で、酸性から中性の条件下で、Chit1 と AMCase が異なるキチン分解特性を持つことを示した。加えて、pH 7.0 での高分子基質に対する AMCase の活性は、Chit1 のそれよりも高かった。このように、Chit1 と AMCase の役割は、肺を含む pH 7.0 の組織では異なることが示唆された [12]。

マウス Chit1 と AMCase の酵素的性質を、よく特徴付けられたキチナーゼである *Serratia* ChiB と比較することにより、キチン分解特性とそれらの相乗効果を客観的に評価した。第 III 章では、人工および天然のキチン基質を用いて、Chit1 と AMCase のキチン分解特性を *Serratia* ChiB と直接比較した。人工基質、低分子および高分子基質に対する AMCase の分解活性は各 pH で変化した。Chit1 の分解活性はあまり変化しなかった (図 III. 2, 3, 4 および 5)。また、4-NP-(GlcNAc)₂ を用いた条件で、糖転移活性は AMCase のみで検出された (図 III. 3)。このように、Chit1 と AMCase はキチン分解活性や糖転移活性など異なる性質を持っている。このことから、Chit1 と AMCase の性質は生理的条件下で異なることが示唆された。

Serratia marcescens や *Alteromonas* sp. strain O-7 chitinases 株などの細菌キチナーゼは相乗効果を有することが知られている [30, 31, 59]。Chit1 と AMCase は様々な組織や細胞に共存している。マウス Chit1 および AMCase は単球およびマクロファージで発現され、ライソゾーム (pH 5.0) に存在し、末梢組織の細胞外 (pH 7.0) に分泌される。キチン含有生物から生体を守るには効率よくキチンを分解することが望ましいと考えられる。しかし、Chit1 と AMCase が生

理的条件下で相互作用を示すかどうかは依然として不明であった。第 III 章に示すように、基質の分子量もしくは pH 条件にかかわらず、Chit1 と AMCase の相乗効果を検出できなかった。これらの結果は、Chit1 と AMCase が生理学的条件下で相乗効果を持たないことを示唆している。

大腸菌を用いた発現系と精製プロトコルを用いることで安定的に Chit1 と AMCase を取得でき、さらなる機能解明に貢献できる。以上の報告は、Chit1 と AMCase が生体内条件下では異なる性質を持つことを示唆している。また、Chit1 と AMCase が相乗効果を示さないことから、病態生理学的条件において非常に重要な役割をそれぞれが独立して果たすことを示唆している。これらの結果は生体内で Chit1 と AMCase が独立して機能することを示し、病態生理学的な条件におけるほ乳類キチナーゼの酵素機能の解明において重要な知見となる。

第 V 章 結論

本研究では、まず Chit1 を融合タンパク質として大腸菌で発現させ、精製する方法を確立した。その後 Chit1 と AMCase をよく特徴付けられている細菌キチナーゼである *Serratia* ChiB と酵素機能を直接的に比較した。最後に、Chit1 と AMCase の相乗効果の有無を検証した。

本研究では、最初に、C 末端側に V5 エピトープタグと (His)₆ タグを付加し (マウス成熟 Chit1-V5-His) を、大腸菌を宿主として発現させた。発現した Chit1-V5-His の大半は、不溶性タンパク質であった。次に、N 末端側に Protein A を付加した融合タンパク質 (Protein A-Chit1-V5-His) として大腸菌での発現を試みた。その結果、ペリプラズム空間に可溶性タンパク質として発現でき、二つのクロマトグラフィーで精製することができた。大腸菌で発現した Protein A-Chit1-V5-His と CHO 細胞で発現した Chit1-V5-His の比活性は、ほぼ同等だった。このように、本研究は、安定的に取得できる大腸菌を用いた Protein A-Chit1-V5-His の発現系と精製プロトコルを確立し、この組換えタンパク質が動物細胞で発現した Chit1-V5-His と同等の機能を有することを明らかにした。

次に、比色解析と FACE 法を組み合わせ、人工および天然のキチン基質の分解におけるマウス Chit1 と AMCase のキチン分解特性を *Serratia* ChiB と直接比較した。Chit1 と AMCase は酸性から中性の条件でキチン分解特性において異なる動態を示した。pH 2.0 では、AMCase の活性は Chit1 の活性よりも高く、*Serratia* ChiB の活性よりも強いが、もしくは同等であった。異なる基質を使用した場合の分解産物の変化は、AMCase と Chit1 が様々な pH 条件下で異なる性質を持つことを示した。

最後に、キチン基質に Chit1 と AMCase の両方を作用させ、それらの相乗効果を決定した。その結果、いくつかの細菌キチナーゼに関する知見とは対照的に、両酵素が相互に干渉せず、相乗効果を示さなかった。この結果は、Chit1 と AMCase が生理学的条件下で相乗効果がないことを示唆した。

本学位論文は、マウスキチナーゼの大腸菌での発現系と精製方法を確立し、生命工学的に新規の知見を提供し、将来的に、医学領域においても影響を与えるものである。

参考文献

1. Khoushab F, Yamabhai M. Chitin research revisited. *Mar Drugs*. 2010;8:1988-2012.
2. Bueter CL, Specht CA, Levitz SM. Innate sensing of chitin and chitosan. *PLoS Pathog*. 2013;9:e1003080.
3. Koch BE, Stougaard J, Spaink HP. Keeping track of the growing number of biological functions of chitin and its interaction partners in biomedical research. *Glycobiology*. 2015;25:469-82.
4. Wysokowski M, Petrenko I, Stelling AL, Stawski D, Jesionowski T, Ehrlich H. Poriferan chitin as a versatile template for extreme biomimetics. *Polymers*. 2015;7:235-65.
5. Lee CG, Da Silva CA, Dela Cruz CS, Ahangari F, Ma B, Kang MJ, et al. Role of chitin and chitinase/chitinase-like proteins in inflammation, tissue remodeling, and injury. *Annu Rev Physiol*. 2011;73:479-501.
6. Cantarel BL, Coutinho PM, Rancurel C, Bernard T, Lombard V, Henrissat B. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Res*. 2009;37:D233-8.
7. Van Dyken SJ, Locksley RM. Chitins and chitinase activity in airway diseases. *J Allergy Clin Immunol*. 2018;142:364-9.
8. Henrissat B. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J*. 1991;280 (Pt 2):309-16.
9. Bussink AP, Speijer D, Aerts JM, Boot RG. Evolution of mammalian chitinase(-like) members of family 18 glycosyl hydrolases. *Genetics*. 2007;177:959-70.
10. Kawada M, Hachiya Y, Arihiro A, Mizoguchi E. Role of mammalian chitinases in inflammatory conditions. *Keio J Med*. 2007;56:21-7.
11. Hollak CE, van Weely S, van Oers MH, Aerts JM. Marked elevation of plasma chitotriosidase activity. A novel hallmark of Gaucher disease. *J Clin Invest*. 1994;93:1288-92.
12. Renkema GH, Boot RG, Muijsers AO, Donker-Koopman WE, Aerts JM. Purification and characterization of human chitotriosidase, a novel member of the chitinase family of proteins. *J Biol Chem*. 1995;270:2198-202.
13. Boot RG, Renkema GH, Strijland A, van Zonneveld AJ, Aerts JM. Cloning of a cDNA encoding chitotriosidase, a human chitinase produced by macrophages. *J Biol Chem*. 1995;270:26252-6.
14. Boot RG, Renkema GH, Verhoek M, Strijland A, Blik J, de Meulemeester TM, et

- al. The human chitotriosidase gene. Nature of inherited enzyme deficiency. *J Biol Chem.* 1998;273:25680-5.
15. Boot RG, Blommaert EF, Swart E, Ghauharali-vander Vlugt K, Bijl N, Moe C, et al. Identification of a novel acidic mammalian chitinase distinct from chitotriosidase. *J Biol Chem.* 2001;276:6770-8.
 16. Boot RG, Bussink AP, Verhoek M, de Boer PA, Moorman AF, Aerts JM. Marked differences in tissue-specific expression of chitinases in mouse and man. *J Histochem Cytochem.* 2005;53:1283-92.
 17. Ohno M, Tsuda K, Sakaguchi M, Sugahara Y, Oyama F. Chitinase mRNA levels by quantitative PCR using the single standard DNA: acidic mammalian chitinase is a major transcript in the mouse stomach. *PLoS One.* 2012;7:e50381.
 18. Kanneganti M, Kamba A, Mizoguchi E. Role of chitotriosidase (chitinase 1) under normal and disease conditions. *J Epithel Biol Pharmacol.* 2012;5:1-9.
 19. Di Rosa M, De Gregorio C, Malaguarnera G, Tuttobene M, Biazzo F, Malaguarnera L. Evaluation of AMCase and CHIT-1 expression in monocyte macrophages lineage. *Mol Cell Biochem.* 2013;374:73-80.
 20. Artieda M, Cenarro A, Ganan A, Jerico I, Gonzalvo C, Casado JM, et al. Serum chitotriosidase activity is increased in subjects with atherosclerosis disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:1645-52.
 21. Sonmez A, Haymana C, Tapan S, Safer U, Celebi G, Ozturk O, et al. Chitotriosidase activity predicts endothelial dysfunction in type-2 diabetes mellitus. *Endocrine.* 2010;37:455-9.
 22. Livnat G, Bar-Yoseph R, Mory A, Dagan E, Elias N, Gershoni R, et al. Duplication in CHIT1 gene and the risk for Aspergillus lung disease in CF patients. *Pediatr Pulmonol.* 2014;49:21-7.
 23. Letuve S, Kozhich A, Humbles A, Brewah Y, Dombret MC, Grandsaigne M, et al. Lung chitinolytic activity and chitotriosidase are elevated in chronic obstructive pulmonary disease and contribute to lung inflammation. *Am J Pathol.* 2010;176:638-49.
 24. Watabe-Rudolph M, Song Z, Lausser L, Schnack C, Begus-Nahrman Y, Scheithauer MO, et al. Chitinase enzyme activity in CSF is a powerful biomarker of Alzheimer disease. *Neurology.* 2012;78:569-77.
 25. Seibold MA, Donnelly S, Solon M, Innes A, Woodruff PG, Boot RG, et al. Chitotriosidase is the primary active chitinase in the human lung and is modulated by genotype and smoking habit. *J Allergy Clin Immunol.* 2008;122:944-50 e3.
 26. Zhu Z, Zheng T, Homer RJ, Kim YK, Chen NY, Cohn L, et al. Acidic mammalian

- chitinase in asthmatic Th2 inflammation and IL-13 pathway activation. *Science*. 2004;304:1678-82.
27. Reese TA, Liang HE, Tager AM, Luster AD, Van Rooijen N, Voehringer D, et al. Chitin induces accumulation in tissue of innate immune cells associated with allergy. *Nature*. 2007;447:92-6.
 28. Ohno M, Kimura M, Miyazaki H, Okawa K, Onuki R, Nemoto C, et al. Acidic mammalian chitinase is a proteases-resistant glycosidase in mouse digestive system. *Sci Rep*. 2016;6:37756.
 29. Monreal J, Reese ET. The chitinase of *Serratia marcescens*. *Can J Microbiol*. 1969;15:689-96.
 30. Brurberg MB, Nes IF, Eijsink VG. Comparative studies of chitinases A and B from *Serratia marcescens*. *Microbiology*. 1996;142 (Pt 7):1581-9.
 31. Suzuki K, Sugawara N, Suzuki M, Uchiyama T, Katouno F, Nikaidou N, et al. Chitinases A, B, and C1 of *Serratia marcescens* 2170 produced by recombinant *Escherichia coli*: enzymatic properties and synergism on chitin degradation. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2002;66:1075-83.
 32. Vaaje-Kolstad G, Horn SJ, Sorlie M, Eijsink VG. The chitinolytic machinery of *Serratia marcescens*--a model system for enzymatic degradation of recalcitrant polysaccharides. *FEBS J*. 2013;280:3028-49.
 33. Tuveng TR, Hagen LH, Mekasha S, Frank J, Arntzen MO, Vaaje-Kolstad G, et al. Genomic, proteomic and biochemical analysis of the chitinolytic machinery of *Serratia marcescens* BJL200. *Biochim Biophys Acta*. 2017;1865:414-21.
 34. Sugimoto H, Nakamura K, Nishino Y, Idezawa Y, Fujinuma A, Suzuki K, et al. Differences in the roles of the two surface-exposed tyrosine residues, Y240 and Y481, of *Serratia marcescens* chitinase B during processive degradation of crystalline chitin. *J Gen Appl Microbiol*. 2015;61:255-61.
 35. Igarashi K, Uchihashi T, Uchiyama T, Sugimoto H, Wada M, Suzuki K, et al. Two-way traffic of glycoside hydrolase family 18 processive chitinases on crystalline chitin. *Nat Commun*. 2014;5:3975.
 36. Nakagawa YS, Eijsink VG, Totani K, Vaaje-Kolstad G. Conversion of alpha-chitin substrates with varying particle size and crystallinity reveals substrate preferences of the chitinases and lytic polysaccharide monooxygenase of *Serratia marcescens*. *J Agric Food Chem*. 2013;61:11061-6.
 37. Toratani T, Shoji T, Ikehara T, Suzuki K, Watanabe T. The importance of chitinase and N-acetylglucosamine (GlcNAc) uptake in N,N'-diacetylchitobiose [(GlcNAc)₂] utilization by *Serratia marcescens* 2,170. *Microbiology*. 2008;154:1326-32.

38. Vaaje-Kolstad G, Westereng B, Horn SJ, Liu Z, Zhai H, Sorlie M, et al. An oxidative enzyme boosting the enzymatic conversion of recalcitrant polysaccharides. *Science*. 2010;330:219-22.
39. Kashimura A, Okawa K, Ishikawa K, Kida Y, Iwabuchi K, Matsushima Y, et al. 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*. 2013;8:e78669.
40. Kashimura A, Kimura M, Okawa K, Suzuki H, Ukita A, Wakita S, et al. Functional Properties of the Catalytic Domain of Mouse Acidic Mammalian Chitinase Expressed in *Escherichia coli*. *Int J Mol Sci*. 2015;16:4028-42.
41. Jackson P. 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*. 1990;270:705-13.
42. Wakita S, Kimura M, Kato N, Kashimura A, Kobayashi S, Kanayama N, et al. Improved fluorescent labeling of chitin oligomers: Chitinolytic properties of acidic mammalian chitinase under somatic tissue pH conditions. *Carbohydr Polym*. 2017;164:145-53.
43. Wakita S, Kobayashi S, Kimura M, Kashimura A, Honda S, Sakaguchi M, et al. Mouse acidic mammalian chitinase exhibits transglycosylation activity at somatic tissue pH. *FEBS Lett*. 2017;591:3310-8.
44. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248-54.
45. Lowenadler B, Jansson B, Paleus S, Holmgren E, Nilsson B, Moks T, et al. A gene fusion system for generating antibodies against short peptides. *Gene*. 1987;58:87-97.
46. Zheng T, Rabach M, Chen NY, Rabach L, Hu X, Elias JA, et al. Molecular cloning and functional characterization of mouse chitotriosidase. *Gene*. 2005;357:37-46.
47. Mack I, Hector A, Ballbach M, Kohlhauf J, Fuchs KJ, Weber A, et al. The role of chitin, chitinases, and chitinase-like proteins in pediatric lung diseases. *Mol Cell Pediatr*. 2015;2:3.
48. Fusetti F, von Moeller H, Houston D, Rozeboom HJ, Dijkstra BW, Boot RG, et al. Structure of human chitotriosidase. Implications for specific inhibitor design and function of mammalian chitinase-like lectins. *J Biol Chem*. 2002;277:25537-44.

49. Eide KB, Norberg AL, Heggset EB, Lindbom AR, Varum KM, Eijsink VG, et al. Human chitotriosidase-catalyzed hydrolysis of chitosan. *Biochemistry*. 2012;51:487-95.
50. Yang Z, Zhang L, Zhang Y, Zhang T, Feng Y, Lu X, et al. Highly efficient production of soluble proteins from insoluble inclusion bodies by a two-step-denaturing and refolding method. *PLoS One*. 2011;6:e22981.
51. Sakaguchi M, Matsushima Y, Nankumo T, Seino J, Miyakawa S, Honda S, et al. Glucoamylase of *Caulobacter crescentus* CB15: cloning and expression in *Escherichia coli* and functional identification. *AMB Express*. 2014;4:5.
52. Tiwary E, Gupta R. Extracellular expression of keratinase from *Bacillus licheniformis* ER-15 in *Escherichia coli*. *J Agric Food Chem*. 2010;58:8380-5.
53. Kumari A, Gupta R. Extracellular expression and characterization of thermostable lipases, LIP8, LIP14 and LIP18, from *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol Lett*. 2012.
54. Oyama F, Hashino K, Oyama R, Kato I, Titani K. 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*. 1993;114:813-9.
55. Hall AJ, Morroll S, Tighe P, Gotz F, Falcone FH. Human chitotriosidase is expressed in the eye and lacrimal gland and has an antimicrobial spectrum different from lysozyme. *Microbes Infect*. 2008;10:69-78.
56. Kitamoto S, Egashira K, Ichiki T, Han X, McCurdy S, Sakuda S, et al. Chitinase inhibition promotes atherosclerosis in hyperlipidemic mice. *Am J Pathol*. 2013;183:313-25.
57. Kimura M, Wakita S, Ishikawa K, Sekine K, Yoshikawa S, Sato A, et al. Functional properties of mouse chitotriosidase expressed in the periplasmic space of *Escherichia coli*. *PLoS One*. 2016;11:e0164367.
58. Sakaguchi M, Shimodaira S, Ishida SN, Amemiya M, Honda S, Sugahara Y, et al. Identification of GH15 Family Thermophilic Archaeal Trehalases That Function within a Narrow Acidic-pH Range. *Appl Environ Microbiol*. 2015;81:4920-31.
59. Orikoshi H, Nakayama S, Miyamoto K, Hanato C, Yasuda M, Inamori Y, et al. Roles of four chitinases (chia, chib, chic, and chid) in the chitin degradation system of marine bacterium *Alteromonas* sp. strain O-7. *Appl Environ Microbiol*. 2005;71:1811-5.
60. Di Rosa M, Malaguarnera L. Chitotriosidase: A New Inflammatory Marker in Diabetic Complications. *Pathobiology*. 2016;83:211-9.
61. Cho SJ, Weiden MD, Lee CG. Chitotriosidase in the Pathogenesis of Inflammation,

- Interstitial Lung Diseases and COPD. *Allergy Asthma Immunol Res.* 2015;7:14-21.
62. Eide KB, Lindbom AR, Eijsink VG, Norberg AL, Sorlie M. Analysis of productive binding modes in the human chitotriosidase. *FEBS Lett.* 2013;587:3508-13.
 63. Krokeide IM, Synstad B, Gaseidnes S, Horn SJ, Eijsink VG, Sorlie M. Natural substrate assay for chitinases using high-performance liquid chromatography: a comparison with existing assays. *Anal Biochem.* 2007;363:128-34.
 64. Fadel F, Zhao Y, Cousido-Siah A, Ruiz FX, Mitschler A, Podjarny A. X-Ray Crystal Structure of the Full Length Human Chitotriosidase (CHIT1) Reveals Features of Its Chitin Binding Domain. *PLoS One.* 2016;11:e0154190.
 65. Verwer PE, Notenboom CC, Eadie K, Fahal AH, Verbrugh HA, van de Sande WW. A Polymorphism in the Chitotriosidase Gene Associated with Risk of Mycetoma Due to *Madurella mycetomatis* Mycetoma--A Retrospective Study. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015;9:e0004061.
 66. Stockinger LW, Eide KB, Dybvik AI, Sletta H, Varum KM, Eijsink VG, et al. The effect of the carbohydrate binding module on substrate degradation by the human chitotriosidase. *Biochim Biophys Acta.* 2015;1854:1494-501.
 67. van Eijk M, van Roomen CP, Renkema GH, Bussink AP, Andrews L, Blommaert EF, et al. Characterization of human phagocyte-derived chitotriosidase, a component of innate immunity. *Int Immunol.* 2005;17:1505-12.
 68. Ohno M, Togashi Y, Tsuda K, Okawa K, Kamaya M, Sakaguchi M, et al. 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.* 2013;8:e67399.
 69. Tabata E, Kashimura A, Wakita S, Ohno M, Sakaguchi M, Sugahara Y, et al. Gastric and intestinal proteases resistance of chicken acidic chitinase nominates chitin-containing organisms for alternative whole edible diets for poultry. *Sci Rep.* 2017;7:6662.
 70. Tabata E, Kashimura A, Wakita S, Ohno M, Sakaguchi M, Sugahara Y, et al. Protease resistance of porcine acidic mammalian chitinase under gastrointestinal conditions implies that chitin-containing organisms can be sustainable dietary resources. *Sci Rep.* 2017;7:12963.
 71. Tabata E, Kashimura A, Uehara M, Wakita S, Sakaguchi M, Sugahara Y, et al. High expression of acidic chitinase and chitin digestibility in the stomach of common marmoset (*Callithrix jacchus*), an insectivorous nonhuman primate. *Sci Rep.* 2019;9:159.
 72. Seibold MA, Reese TA, Choudhry S, Salam MT, Beckman K, Eng C, et al.

Differential enzymatic activity of common haplotypic versions of the human acidic mammalian chitinase protein. J Biol Chem. 2009;284:19650-8.

謝辞

研究活動全般にわたり格別なる御指導と御高配を賜りました小山文隆教授に甚大なる謝意を表します。

本質的理解の助けとなるご指導・ご助言を何度もいただきました菅原康里元准教授，坂口政吉准教授に深く感謝を致します。

原著論文作成に際して多くの協力，助言，指摘を賜りました Peter O. Bauer 博士，大野尚仁教授，山中大輔助教に深く感謝いたします。

本学位論文の副査を担当していただき，貴重な御教示を賜りました今村保忠教授，南雲紳史教授に心より感謝申し上げます。

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，博士課程に進学する機会を与えてくださり，ありとあらゆる場面で私を温かく見守り続けてくれた家族に深く感謝いたします。