

博士学位論文

キチンオリゴマー蛍光標識法の改良と
酸性ほ乳類キチナーゼの機能
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 bd15003

氏名 脇田 悟誌

指導教員 小山 文隆 教授

目次

第 I 章 序論	4
第 1 節 キチンとキトサン	5
第 2 節 キチナーゼ	7
第 3 節 ほ乳類キチナーゼ	8
第 4 節 キチン・キトサンオリゴマー	9
第 5 節 研究目的	10
第 II 章 キチンオリゴマー蛍光標識法の改良：生体組織 pH 条件下における酸性ほ乳類キチナーゼの加水分解特性	12
第 1 節 研究目的	12
第 2 節 実験材料と方法	13
大腸菌でのマウス AMCCase の発現と精製	13
マウス AMCCase の酵素活性測定	13
コロイダルキチンの調製法	13
マウス AMCCase によるコロイダルキチン, (GlcNAc) ₆ の分解	14
Jackson 法によるキチンオリゴマーの蛍光標識法	14
Jackson 法の改良	14
HPLC を用いた AMCCase による (GlcNAc) ₆ 分解産物の分析	15
第 3 節 結果	16
pH 5.0~8.0 における pH 依存的な蛍光標識産物の解析	16
GlcNAc オリゴマーの検出のための改良 FACE 法	17
蛍光標識に対する緩衝液の影響	17
改良 FACE 法での GlcNAc オリゴマーの定量性	18
改良 FACE 法を用いた AMCCase のキチナーゼ活性の再評価	18
弱酸性および中性条件下における AMCCase のキチン分解性	19

HPLC または FACE を用いた GlcNAc オリゴマーの検出.....	19
第 4 節 考察.....	21
第 III 章 生体内 pH 条件下におけるマウス酸性ほ乳類キチナーゼの糖転移活性 ...	32
第 1 節 研究目的	32
第 2 節 実験材料と方法	33
大腸菌組換えマウス AMCase の発現	33
マウス AMCase による GlcNAc オリゴマーの分解と FACE 法によるキチン分解 産物の解析.....	33
人工基質を用いた AMCase キチン加水分解活性と糖転移活性の測定.....	33
FACE 法による AMCase キチン加水分解活性と糖転移活性の測定	34
第 3 節 結果.....	35
pH 依存的糖転移産物の検出	35
酸性から中性条件下におけるマウス AMCase 糖転移活性の発現	35
人工基質 4-NP-(GlcNAc) ₂ , 4-MU-GlcNAc による糖転移活性の証明	36
FACE 法を用いたマウス AMCase の糖転移活性の解析.....	37
第 4 節 考察.....	39
第 IV 章 総合考察	46
第 V 章 結論.....	51
参考文献.....	52
謝辞	61

第 I 章 序論

この研究は、糖の高感度検出法である Fluorophore-Assisted Carbohydrate Electrophoresis (FACE) 法によるキチンオリゴマーの解析法の確立と、その方法を応用した酸性ほ乳類キチナーゼの生体内条件下における機能を明らかにした。

初めに、従来の実験法とその解析結果を示し、その結果に対する問題点を提示した。問題点を解決するため、原因の解明と新たな解析法の開発に着手した。また解析法が有用であるかを検討し、改良解析法として確立した。その改良解析法は、簡便かつ高感度にキチンオリゴマーの分離、検出、定量を可能にする。その後、生体内の条件を模した pH 2.0~pH 7.0 条件下において、酸性ほ乳類キチナーゼの機能解析を行った。

酸性ほ乳類キチナーゼは、様々な生体内組織で発現し、酵素活性を有している。最近、この酵素は消化酵素として食物消化に関わることが報告された。しかしながら、消化系組織以外で発現するこの酵素がどのように機能しているのかよくわかっていない。

私は、特定の病理学的条件下で過剰発現された酸性ほ乳類キチナーゼが、特異的分解産物を生成し得ると仮定し、FACE 法を用いて生体内でのキチンオリゴマーの生成を検討した。初めに、既報の FACE 法をキチンオリゴマーに特化した解析法に改良した。特に、この解析法は酸性から中性領域で有効に使えるように改良した。一般的な酵素反応で用いられる緩衝液中でも非常に高感度に微量のキチンオリゴマーを検出でき、定量も可能とした。これを活かして、酸性から中性領域におけるキチン分解産物の分析を系統的に行った。

第 1 節 キチンとキトサン

キチンは *N*-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc) が β -1, 4 結合した重合体で、ほとんどの溶媒に不溶である (図 I. 1) [1]。キチンは、甲殻類および昆虫の外骨格、寄生線虫の鞘および真菌類の細胞壁の主要成分である。キチンは細胞内においてキチンシンセターゼにより合成され、強固な結晶体となる。それらキチン含有生物は、様々な成育環境条件や宿主の抗寄生虫/病原体免疫反応から身を守るためキチンを用いている [2]。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 [3]。

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 [4]。 α -キチンは、最も一般的なキチン鎖の形状である。 α -キチンは、逆平行配列で配置されており、キチン鎖の分子間および分子内の水素結合が密に形成されている。これにより、 α -キチンは、強固な構造をとり、水中で膨潤することがない [5-7]。

β -キチンは、キチン鎖が平行配列で配置されている。これにより、 β -キチンは、小分子を組み込むことで、様々な結晶性複合体を形成する [8]。 β -キチンは、高い水和度と強固な分子密度をもった柔軟性の高いキチン質となる [9]。そして、 γ -キチンは、平行鎖と逆平行鎖が混合した構造となっており、 β -キチンと同様に柔軟性の高いキチン質となる。

このように、キチンは、3 種類の異なる構造をとる。 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。

キトサンは glucosamine (GlcN) が β -1, 4 結合した重合体で、希酸に可溶である。キトサンは、主に、キチンを濃アルカリで反応させ、脱アセチル化することで生成される。また、自然界において、脱アセチル化酵素によりキチンの一部が脱アセチル化されている。キチン脱アセチル化酵素は真菌 *Mucor rouxii*

で最初に発見された [10]。さらに、その酵素は、細胞壁の合成に伴い、キチンを部分的にキトサンへと変換する。以来、いくつかの真菌類由来キチン脱アセチル化酵素が報告されている。

キチンとキトサンは、生体適合性、生分解性、非毒性、吸着性などの優れた特性を有するため、食品、化粧品、医療、農業などの広い分野での機能性材料として多数の用途がある [11]。キチン、キトサンおよびその誘導体は、創傷治癒効果が見られ [12]、また組織の再分化、細胞培養、抗菌剤、保水成分として機能することが報告されている [13, 14]。キチンとキトサンは、これらの優れた機能により、医療目的として、抗炎症剤、抗酸化剤、抗高血圧剤、抗凝固剤、抗腫瘍剤、抗がん剤、抗菌剤、抗糖尿病薬などが提案されている [12, 13, 14, 15]。

キチンとキトサンは、中性での溶解度が低い高分子量ポリマーである。この性質は、食品、化粧品、医療、農業の分野での使用に対する潜在的な障害になっている。しかし、これらの障害は、モノマーやオリゴマーを用いることで解決できると考えられている [22]。

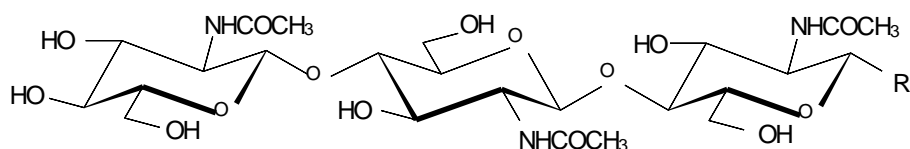


図 I.1. キチンの構造モデル

第 2 節 キチナーゼ

キチナーゼは、キチンの β -1,4 グリコシド結合を加水分解する酵素である。キチナーゼは、キチン鎖を内部または非還元末端から分解し、GlcNAc 単量体、二量体やオリゴ糖を生成する [22]。

すべてのキチン含有生物は、キチナーゼを発現し、キチンのリモデリングを行っている [16, 17]。他方、キチンを有していない生物においてもキチナーゼを合成していることが報告されている。ウイルス [18]、細菌類 [19]、真菌類 [20]、昆虫 [21]、高等植物 [22, 23] およびほ乳類 [24] など、広範囲の生物がキチナーゼを合成している。

キチナーゼは、キチン鎖の分解に加え、他の目的のためにも利用されている。例えば、いくつかの細菌種は、エネルギー源として利用できる GlcNAc 単量体を最終的に生成するためにキチナーゼを合成していると考えられている [1, 19]。また、植物はキチンを合成していないが、キチナーゼを発現し、真菌類などのキチン含有病原体に対する防御として用いている [22, 23]。

キチナーゼは、グリコシド結合を加水分解する酵素 (Glycoside Hydrolase : GH) で、糖質関連酵素データベース [The Carbohydrate Active enZymes Database (CAZy), <http://www.cazy.org/>] で分類されている。CAZy は、各種糖質関連酵素をアミノ酸配列の相同性を基に分類し、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 [25]。キチナーゼは GH18 と GH19 ファミリーに分類されている。キチナーゼは GlcNAc 間のグリコシド結合を特異に加水分解する活性を有し、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

ほ乳類はキチンを合成しない。しかし、マウスとヒトは、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) とよばれる二種の活性を持つキチナーゼを発現する [24, 26]。Chit1 は、クローニング、精製された最初のほ乳類キチナーゼである [27, 28]。AMCase は、Chit1 の次に発見されたほ乳類キチナーゼで、その酸性領域での等電点により命名された [29]。

Chit1 と AMCase は、GH18 ファミリーに属している。GH18 酵素は、触媒ドメイン上で保存されているアミノ酸配列に類似性が有り、 $(\beta/\alpha)_8$ -バレル (TIM バレル) の基本構造を持つ一群のグループである。また、ほ乳類キチナーゼは細菌類キチナーゼと高い配列相同性を示す。このファミリーには、キチナーゼに構造が似ているがキチナーゼ活性を欠損しているキチナーゼ様タンパク質 (chitinase-like proteins) も含まれている [26]。

ほ乳類キチナーゼは特定の疾患との研究により大きく注目されている。ヒト AMCase では、一塩基多型 (single nucleotide polymorphism, SNPs) に基づく AMCase variants が同定されており [30, 31]、それら AMCase の特定の多型と気管支喘息との連関が報告されている [31, 32]。またマウス AMCase は、喘息モデルマウスおよびアレルギー性肺炎誘導モデルマウスにおいて発現が顕著に増加することが報告されている。さらに、免疫応答に関連する特定の病理学的条件下で AMCase の発現が増加することが報告されている [33, 34]。そのほかにも、AMCase は眼 [35, 36] および胃の疾患に関与することが示されている [37, 38]。また、AMCase mRNA が、胃の他に、肺や唾液腺で高度に発現することが示されている。

消化系との関連について、AMCase mRNA は、マウスの胃において最も高いレベルで発現されている [29, 39]。AMCase の発現レベルは、胃液の主要な消化酵素ペプシンの前駆体であるペプシノーゲンに匹敵する。最近、当研究室の大野らは、AMCase が、マウス消化系で、プロテアーゼ耐性の主要な糖質分解酵素であることを報告した [40]。

酵素化学的な性質として、組換えマウス AMCase およびその触媒ドメインは、pH 2.0 で高い活性を示し、主に (GlcNAc)₂ を生成することが示されている。また、弱酸性から中性 pH (pH 5.0~7.0) の条件でも低いキチナーゼ活性を示すことが報告されている [29, 41, 42]。

以上のように AMCase は、ほ乳類における生体内の様々な組織において発現し、特定の疾患への関与や消化酵素としての機能が報告されている。しかし、AMCase の疾患への関与のメカニズムは分かっていない。また、AMCase の酵素学的な研究は活性の至適条件である強酸性での研究が多く報告されているが、弱酸性から中性条件での研究は十分に調べられていない。

私は、特定の疾患と AMCase がどのように関与しているかを明らかにするためには、AMCase が発現する生体内条件下における酵素学的な機能について研究する必要があると考えた。

第 4 節 キチン・キトサンオリゴマー

キチン・キトサンオリゴマー (*N*-acetyl-chitooligosaccharides) は化学的または酵素的に調製することができる。キチン・キトサンオリゴマーは、キトサンから、酸加水分解で初めて生成された。その後の研究で、キチン・キトサンオリゴマーは、加熱、マイクロ波、超音波、ガンマ線、など様々な方法で調製されている。一方、酵素加水分解によるオリゴマーの調製は、化学的方法より穏や

かな条件下で反応が行われるため、注目されている。これらのオリゴマーは、抗がんおよび抗炎症性を有することが示されている。

私は、AMCase を研究する上で、このようなキチン・キトサンオリゴマーが生体内で生成すれば、様々な生理作用を示すのではないかと考えた。

第 5 節 研究目的

前述の通り AMCase は、生体内において食物消化や特定の疾患と関与していると考えられている。しかし、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。

私は、特定の病理学的条件下で過剰発現された AMCase が、これまでの報告と異なる分解産物を生成しうるとの仮説を立てた。本学位論文では、pH 2.0~8.0 の条件下でキチン基質と AMCase をインキュベートした後、オリゴマーの還元末端を蛍光物質で標識し、電気泳動により解析する Fluorophore-Assisted Carbohydrate Electrophoresis (以下、FACE と略) 法 [43] を用いてキチナーゼ活性および分解産物を分析した。FACE 法は、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) や核磁気共鳴 (NMR) と比較しても、非常に高感度であり、微量のオリゴマーも検出、定量が可能である。

本研究は、胃における強酸性条件あるいは肺や唾液腺などの中性条件において、AMCase を各種キチン基質に作用し、その産物を解析することで、酵素機能の特性を明らかにすることを目的とした。この研究の過程で、解析に用いた FACE 法を改良し、キチンオリゴマーに特化した検出、定量法の確立を行った。そして、AMCase の機能解析として生体内条件下での分解活性と糖転移活

性を検討した。この研究成果は、キチンオリゴマーの検出と AMCase の酵素機能の解析に貢献する。

第 II 章 キチンオリゴマー蛍光標識法の改良：生体組織 pH 条件

下における酸性ほ乳類キチナーゼの加水分解特性

第 1 節 研究目的

私は、生体内条件下におけるマウス AMCase の機能解析のため、ケンブリッジ大学の Peter Jackson が報告したキチンオリゴマー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) 法で産物を分析した [43]。

本章では、マウス AMCase を pH 2.0~8.0 の条件下で、キチン基質とインキュベートした後、FACE 法で解析した。この方法は、非常に高感度であり、微量のキチンオリゴマーの検出も可能である [29, 43]。

私は、キチン基質を AMCase で分解した際、主要な分解産物である GlcNAc 二量体 [(GlcNAc)₂] が生成し、それに加え、遅い移動度を持つ副産物が、pH 依存的に生成されることを見いだした。しかし、その副産物は酵素による分解産物ではなく、蛍光標識反応における副産物であった。そこで、蛍光標識法を改良し、キチンオリゴマーの検出に特化した改良 FACE 法の確立を目指した。その後、改良 FACE 法の有用性として、他の緩衝液での影響や HPLC との定量比較を行った。最後に、改良 FACE 法を用いて、AMCase が pH 2.0~8.0 の範囲で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

大腸菌でのマウス AMCase の発現と精製

Kashimura らが報告した，融合タンパク質 Protein A-AMCase-V5-His を実験に用いた [41, 42]。融合タンパク質は，大腸菌 BL21 (DE3) (Novagen 社) を用いて発現し，IgG Sepharose カラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーで精製した。

マウス AMCase の酵素活性測定

キチン分解活性は，合成発色基質 4-nitrophenyl *N,N'*-diacetyl- β -D-chitobioside (4-NP-chitobioside, Sigma-Aldrich 社) を用いて測定した。遊離した 4-nitrophenol を吸光度 405 nm で測定した。4-Nitrophenol のモル吸光係数は $17,700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ としてユニット (U) を計算した。1 酵素ユニット (U) は，Gly-HCl 緩衝液 (pH 2.0) で 37°C，1 分間に 4-nitrophenyl *N,N'*-diacetyl- β -D-chitobioside から 4-nitrophenol を $1 \mu\text{mol}$ 遊離する酵素量，と定義した [41]。

コロイダルキチンの調製法

コロイダルキチンは，エビ外殻キチン (Sigma-Aldrich 社) より調製した。12 M HCl 80 mL を 4°C 以下に冷却し，攪拌しながら粉末キチン 2 g を少量ずつ加えた。徐々に加温し，37°C，30 分間反応させた。その後，未溶解のキチンをグラスウールで吸引ろ過した。ろ液は 4°C 以下に冷却した純水 800 mL 中に注ぎ込み，激しく攪拌した。その後，4°C で一晩放置し，ガラスフィルターを用いキチンを集め，懸濁液が pH 5.0 以上になるまでろ過洗浄を行った。

マウス AMCase によるコロイダルキチン, (GlcNAc)₆ の分解

すべての酵素反応は基質にコロイダルキチン (終濃度 1 mg/mL), または (GlcNAc)₆ (0.2 μmol/mL) (Seikagaku Corporation 社) を用い, 酵素として組換えマウス AMCase (0.8 mU または 0.1 mU) を用い, McIlvaine 緩衝液 (0.1 M citric acid と 0.2 M Na₂HPO₄ の混合液; pH 2.0~pH 8.0) 条件下において全量 50 μL で, 37°C, 1 時間反応した。

Jackson 法によるキチンオリゴマーの蛍光標識法

分子量マーカーのキチンオリゴマー [(GlcNAc)₁₋₆] または酵素反応で生成したキチンオリゴマーは Jackson により報告された方法 (Jackson 法) に従い [43], 還元末端を fluorophore 8-aminonaphthalene-1,3,6-trisulphonic acid (ANTS, Invitrogen 社) で標識し, 40% polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) で分離し, Luminescent Image Analyzer (ImageQuant LAS 4000, GE Healthcare 社) を用いて定量した。撮影条件は (撮影タイプ : 高精度, 感度 : 高解像度, 露光時間 : 1 秒, 励起光 : 312 nm) で統一した。

Jackson 法の改良

酵素反応した試料を凍結乾燥し, その後 0.2 M ANTS-2.6 M acetic acid, 1.0 M NaCNBH₃-dimethyl sulfoxide (DMSO) をそれぞれ 5 μL 加え溶解した。そして, 17.5 M acetic acid を 5 μL 加え, 37°C で 16 時間反応した。その反応液に 1 M NaOH を 15 μL 添加することで中和し, loading buffer を 15 μL 加えた後, PAGE により分離し, Luminescent Image Analyzer で解析した。

HPLC を用いた AMCase による (GlcNAc)₆ 分解産物の分析

(GlcNAc)₆ (0.6 μmol/mL) を，マウス AMCase (4.2 mU) を用い，McIlvaine 緩衝液 (pH 2.0 または pH 7.0) あるいは 30 mM Tris-HCl (pH 7.0) の条件下において全量 300 μL で，37°C，1 時間反応した。生成された GlcNAc オリゴマーは Kazami らの報告 [44] に従いゲル濾過クロマトグラフィー (GPC) により分離した。

第 3 節 結果

pH 5.0~8.0 における pH 依存的な蛍光標識産物の解析

これまで、マウス AMCase は人工発色基質の 4-nitrophenyl *N,N*-diacetyl-chitobioside [4-NP-(GlcNAc)₂] に対する分解活性が pH 2.0 で最も高く、酸性~中性条件 (pH 3.0~7.0) で、pH 上昇とともに徐々に減少することが報告されている [41, 42]。

AMCase が pH に依存し、異なるキチン分解産物を生成するかどうかを検討するため、McIlvaine 緩衝液を用い、pH 2.0~8.0 の条件でコロイダルキチンまたは (GlcNAc)₆ を基質として酵素反応を行った。そして、Jackson により報告されている FACE 法 [43] を用いて産物の解析を行った。

AMCase は、酸性条件下でコロイダルキチンを分解し、主として (GlcNAc)₂ を生成した (図 II. 1A, 短い矢印)。AMCase のコロイダルキチンに対する加水分解活性は、pH を上昇させると低下したが、pH 6.0 まで認められた (図 II. 1A)。このことは、組換え AMCase は、広い pH 範囲で、高分子量キチン基質を分解することができることを示す。pH 5.0~8.0 で生成された産物には、(GlcNAc)₂ の他に、GlcNAc オリゴマーマーカと移動度が異なるバンドも認められた (図 II. 1A, 長い矢印)。

AMCase は低分子量キチン基質である (GlcNAc)₆ を分解し、主として (GlcNAc)₂ を生成した (図 II. 1B, 小さい矢印)。さらに、pH 4.0 以上で、移動度の遅いバンドを検出した (図 II. 1B, 大きい矢印)。これらの結果は、AMCase による分解産物の pH 依存的変化、あるいは、FACE 反応での副産物の pH 依存的生成の可能性を示唆した。

GlcNAc オリゴマーの検出のための改良 FACE 法

次に、AMCase の非存在下、McIlvaine 緩衝液を用い、pH 2.0 または 7.0 で、GlcNAc オリゴマーの蛍光標識反応で遅い移動度を示す生成物が得られるかどうかを検討した。pH 2.0 処理の場合、GlcNAc オリゴマーマーカーから予想される移動度にバンドが認められ、移動度の遅いバンドは認められなかった (図 II. 2A, 左右)。これに対し、pH 7.0 でインキュベーションすると、各 GlcNAc オリゴマーについて、2 種類のバンドが得られた (図 II. 2A, 中央および右)。蛍光標識反応を pH 7.0 で行った場合、GlcNAc オリゴマーの移動度の遅いバンドが認められた (図 II. 2A)。さらに、pH 2.0 (図 II. 2A) と比較して、pH 7.0 での蛍光標識効率の低下が認められた。以上の結果は、McIlvaine 緩衝液を用い、pH 5.0~8.0 の条件下で酵素反応から直接得られた GlcNAc オリゴマーを Jackson 法で蛍光標識する際に生じる可能性を示す。

次に、中性 pH での副産物の生成を抑制することを試みた。蛍光試薬で標識する前に濃酢酸で反応溶液を酸性化すると、両方の条件ですべてのオリゴマーについて単一バンドとなった (図 II. 2B)。このように、蛍光標識前に、反応液を濃酢酸で酸性化することで、副産物の形成が抑制された。

この改良法を、pre-acidification 法と呼ぶことにする。

蛍光標識に対する緩衝液の影響

次に、(GlcNAc)₁₋₆ の蛍光標識に対するキチン分解活性の生化学的評価に一般的に使用される緩衝系の影響を調べた。これまで使用していた McIlvaine 緩衝液での結果では、改良法により均一なバンドを与えた (図 II. 3A)。さらに、中性条件下で一般的なリン酸、Tris-HCl でも同様の結果を得た (図 II. 3B)。さらに、Good's buffers として生体内条件で用いられる MES, PIPES, HEPES およ

び MOPS について、それぞれの濃度を 150 mM で用い、中性条件下で検討した。

蛍光標識する前に濃酢酸で処理することで、いずれの緩衝液でも均一なバンドを与えた (図 II. 3C)。以上のことから、私の改良 FACE 法は、使用した緩衝系に関係なく使用が可能で、中性領域での産物の解析に有用であることが分かった。

改良 FACE 法での GlcNAc オリゴマーの定量性

(GlcNAc)₂ の定量性を評価するため、pH 7.0 での (GlcNAc)₂ 量と蛍光強度間の直線性を検討した。改良 FACE 法の直線性は、0.1~50 nmol まで認められた (図 II. 4A, 4B)。改良 FACE 法を用いた pH 7.0 における (GlcNAc)₂ の検出に対し、酢酸添加による定量性への影響は認められなかった。したがって、本改良法は、pH 7.0 で行われるキチン分解反応後の GlcNAc オリゴマーの定量が可能である。

改良 FACE 法を用いた AMCase のキチナーゼ活性の再評価

改良 FACE 法を用いて、AMCase のキチナーゼ活性を再評価した。pH 2.0~8.0 の McIlvaine 緩衝液を用い、コロイダルキチンを基質に、AMCase (0.8 mU) と 1 時間インキュベートした。AMCase は、主として、(GlcNAc)₂ を生成した (図 II. 5A)。次に、pH 2.0~8.0 の McIlvaine 緩衝液中で、AMCase を (GlcNAc)₆ と 1 時間インキュベートすると、主に (GlcNAc)₂ (図 II. 5B) が生成した。

弱酸性および中性条件における AMCase のキチン分解性

上記の結果は、AMCase が、弱酸性から中性条件において、比較的高いキチン分解活性を有し、コロイダルキチンおよび (GlcNAc)₆ を分解できることを示している。この結果をさらに詳細に検証するため、AMCase 量 (0.1 mU) を調整し、(GlcNAc)₆ または 4-NP-(GlcNAc)₂ を用いて、pH 2.0~8.0, 37°C で 1 時間反応し、キチン分解特性を評価した。

Pre-acidification 法で蛍光標識した反応産物を FACE 法により解析した。

AMCase は、pH 2.0~5.0 で主に (GlcNAc)₂ および (GlcNAc)₃ を生成し、pH 6.0 で第二の至適活性を示し、pH 8.0 まで活性が認められた (図 II. 6A)。AMCase の 4-NP-(GlcNAc)₂ を用いた分光学的分析では、405 nm での吸光度が、pH 2.0 で最大に達し、より中性の pH (pH3.0~7.0) で減少することが分かった (図 II. 6B)。原理が異なる両分析法が同様の結果を示したが、FACE 分析では、pH 6.0 でより顕著な第二の至適活性を検出することができた (図 II.6C)。

この結果は、AMCase が、pH 2.0~8.0 の条件下でキチン基質を分解し、(GlcNAc)₂ を生成することを示している。これらの結果は、pre-acidification 法を用いた FACE 分析が、発色基質である 4-NP-(GlcNAc)₂ を用いた分光学的な分析よりもはるかに高感度であることを示している。以上の結果は、AMCase が胃だけでなく、肺および唾液腺などの組織においてもキチン基質を分解できることを示している。

HPLC または FACE を用いた GlcNAc オリゴマーの検出

次に、HPLC または FACE を用いて、強酸性および中性条件下での (GlcNAc)₆ の AMCase による分解を評価した。最初に、AMCase を用いて McIlvaine の緩衝液中で (GlcNAc)₆ を分解し、210 nm において吸光度を有す

る生成物を HPLC で分析した。しかし、HPLC の解析では (GlcNAc)₄₋₆ の位置で溶出する緩衝液由来のピークが検出された (図 II.8)。これは、210 nm で吸光度を有する McIlvaine 緩衝液中のクエン酸塩およびリン酸塩が原因と考えられた。これに対し、改良 FACE 法では、適切な (GlcNAc)₂ および (GlcNAc)₃ シグナルを検出した。

そこで、緩衝液系を Gly-HCl (pH2.0) および Tris-HCl (pH7.0) に変更した。これらの緩衝液系が、pH 2.0 での弱いピークを除いて予想される (GlcNAc)₂ ピークの周辺での顕著なピークが存在しないことを最初に確認した (図 II.9)。これらの緩衝系を用いて、HPLC および改良 FACE 法で、キチン分解産物を分析した。その結果、図 II. 5、図 II. 6 と同等の結果を HPLC で示すことができた。このことは、AMCase が強酸性および中性条件で (GlcNAc)₂ を生成することを示している (図 II. 7A および B)。FACE 法での分析では、従来の HPLC (図 II. 7C および D) と比較して、改良 FACE 法の感度が非常に高い (pmol 量) ため、10 倍希釈サンプルを使用した。これらの結果から、FACE 法は非常に感度が高く、キチンオリゴマーの検出と定量に有効であり、AMCase は生理的条件下で (GlcNAc)₂ を生成すると結論した。

第 4 節 考察

AMCase は、マウスの胃で大量に合成され [29, 39, 45], 活性の至適が pH 2.0 である [29, 41]。これまでの研究で、天然のキチン基質を用い、AMCase が pH 2.0 で主に (GlcNAc)₂ を生成すると報告されている [29, 41]。また、AMCase は、マウスの胃と腸の条件下で、消化酵素として機能することが示されている [40]。

これまでの遺伝子発現解析により、AMCase mRNA は、胃以外にも、肺や唾液腺などの組織においても高レベルで発現されることが報告されている [39]。キチンオリゴマーは、ほ乳類細胞において、様々な生理活性を有することが知られている [46, 47]。さらに、キチンとキトサンの両方のオリゴマーには抗がん活性および抗炎症活性が報告されている [48, 49]。マウス AMCase は人工基質を用いた活性測定の結果、pH 2.0 で最も活性が高く、pH の上昇とともに徐々に低下するが、pH 8.0 まで活性があることが示されている [29, 41]。私は、病理学的条件下で、AMCase が過剰発現され、胃の状態とは異なる分解産物を生成する可能性を考えた。

オリゴマー検出のために広く使用されている Jackson 法 [43] は、目的分子の還元末端を標識し、続いて PAGE で分離し、蛍光イメージャーで解析する。キチナーゼに関する研究では、通常、広範囲に pH を設定できる McIlvaine 緩衝液（クエン酸/リン酸緩衝系）が用いられる。この緩衝液は、揮発性で、キチン分解産物を直接蛍光標識すると問題が二つあった。

本章において、「副産物」が、AMCase によるキチン分解産物に由来するものではなく、キチンオリゴマーの蛍光標識中 (図 II. 1) に、pH 5.0~8.0 で生成されることを明らかにした。その pH 条件において、もう一点重要な問題は、

pH 2.0 と比較して、より高い pH での標識効率が低下することであった (図 II. 2A)。

これらの問題を解決するため、pH 2.0~8.0 の酵素反応で生成される GlcNAc オリゴマーの還元末端を効率的に標識できる改良 FACE 法の開発を試みた。そして、蛍光標識の直前に濃酢酸により試料を酸性化することで副産物の生成を抑制することができた。この場合、ポイントとして重要なのは、標識液の pH を pH < 4.0 に調整することであった。

本研究で、副産物の化学構造は解析できなかったが、本章で確立した改良蛍光標識法は、副産物の生成を抑制し、GlcNAc オリゴマーを単一のバンドとして検出することができた (図 II. 2B)。この方法は簡便であり、生化学分析に一般的に使用される様々な緩衝液に適用することができる (図 II. 3)。さらに、中性領域の反応液を用いても GlcNAc オリゴマーの蛍光効率が低下しないことも確認した。なお、この改良標識法は、蛍光標識前に濃酢酸を加える以外、Jackson 法と本質的に同じである。

最後に、GlcNAc オリゴマーの改良蛍光標識法を用いて、キチン基質の pH 依存的分解を再検討した (図 II. 5)。pH 5.0~8.0 において、キチン基質から生成された生成物が、合成発色基質である 4-NP-(GlcNAc)₂ から推定されるレベルよりも高いことを明らかにした。これらの結果は、コロイダルキチンに対する AMCase の分解能力が、pH 5.0~8.0 において、合成基質よりも高く、AMCase が生体組織の pH 条件下で機能することを示している。AMCase は強酸性から中性の条件下で作用し、キチン基質を分解し、主に (GlcNAc)₂ を生成することができる [50]。

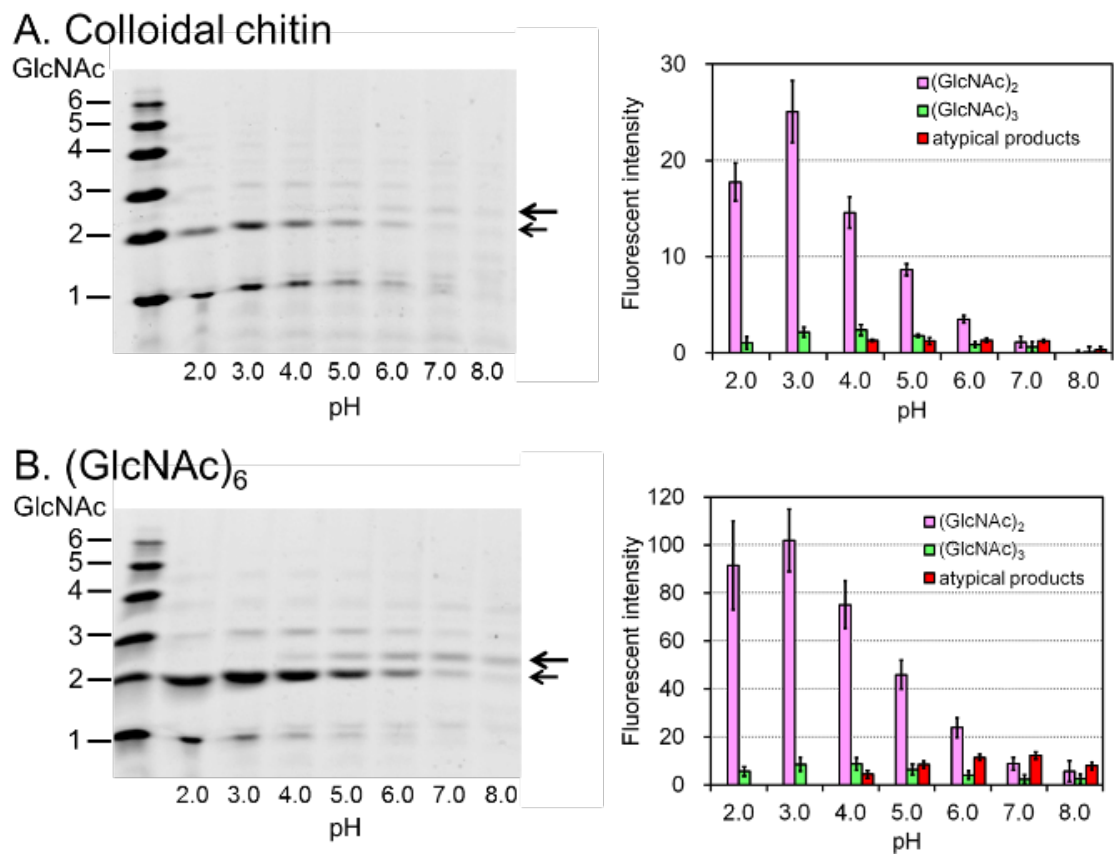


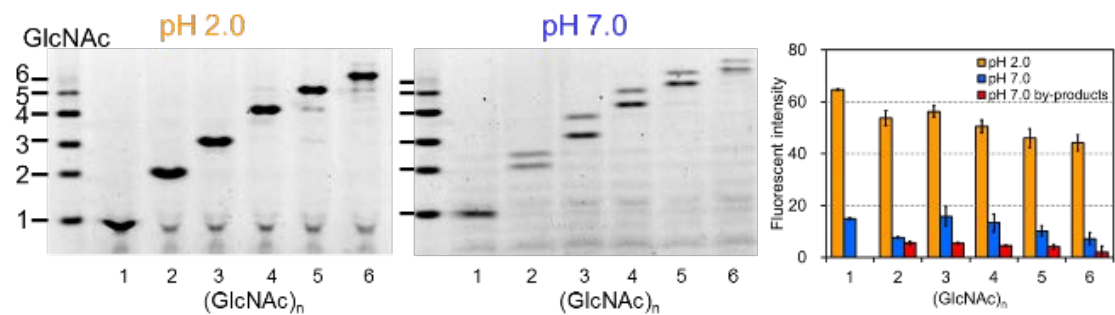
図 II. 1. pH 5.0~8.0 での pH 依存的蛍光標識バンドの検出。

(A) コロイダルキチンの分解

(B) (GlcNAc)₆ の分解

グラフは定量結果を示した。

A. Jackson's method



B. Pre-acidification method

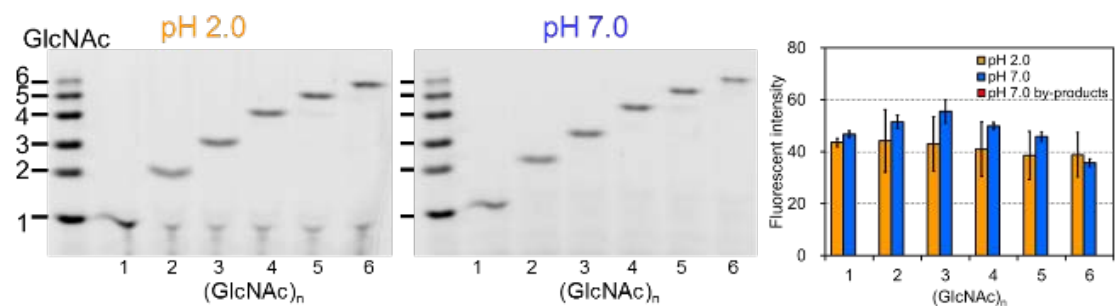


図 II. 2. キチンオリゴマーの蛍光標識比較

(A) Jackson 法での結果

(B) Pre-acidification 法での結果

グラフは定量結果を示した。

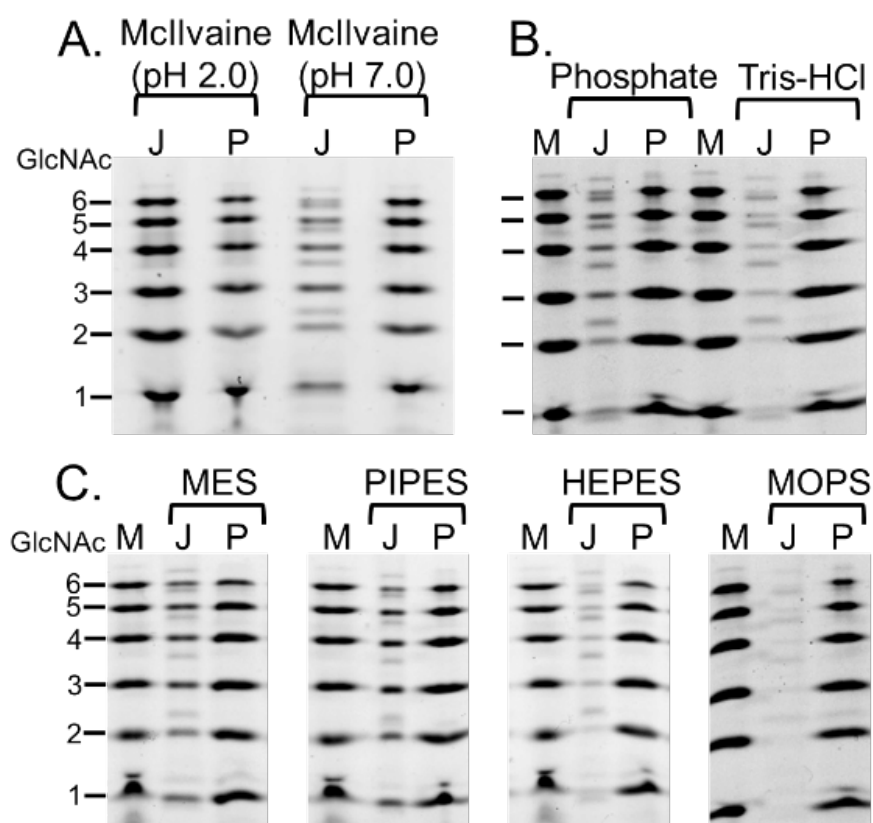


図 II. 3. 蛍光標識法における緩衝液の検討

(A) McIlvaine 緩衝液の結果

(B) Phosphate, Tris-HCl 緩衝液の結果

(C) Good 緩衝液の結果

M, GlcNAc の分子量マーカー; J, Jackson's method; P, Pre-acidification method.

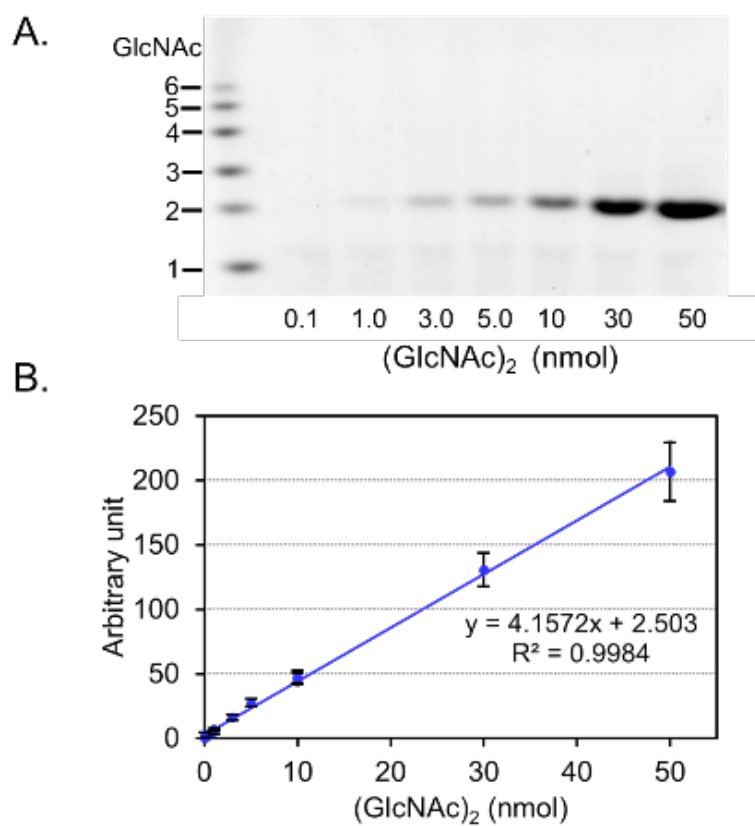
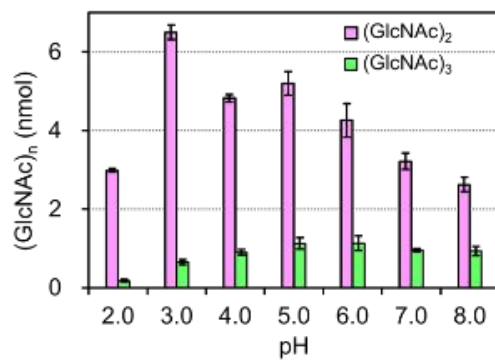
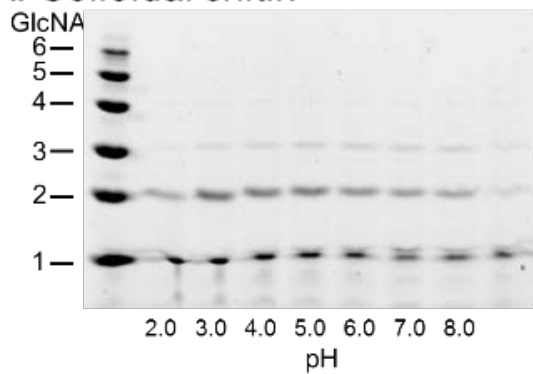


図 II. 4. GlcNAc オリゴマー標識物標準曲線の作成

(A) 0.1~50 nmol (GlcNAc)₂ 標準物質の泳動結果

(B) (A) をもとに作成した標準曲線

A. Colloidal chitin



B. (GlcNAc)₆

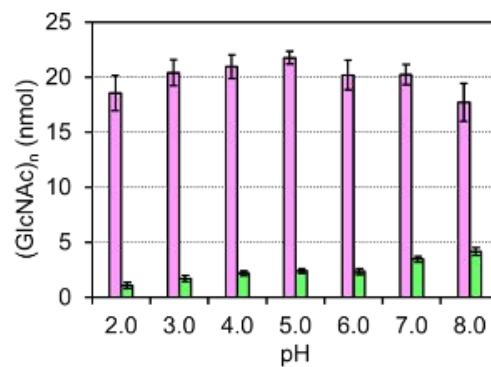
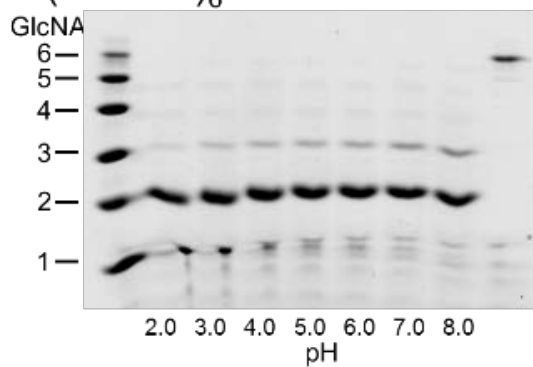


図 II. 5. Mouse AMCase の各種キチンの分解

(A) コロイダルキチンの分解

(B) (GlcNAc)₆ の分解

グラフはその定量結果を示した。

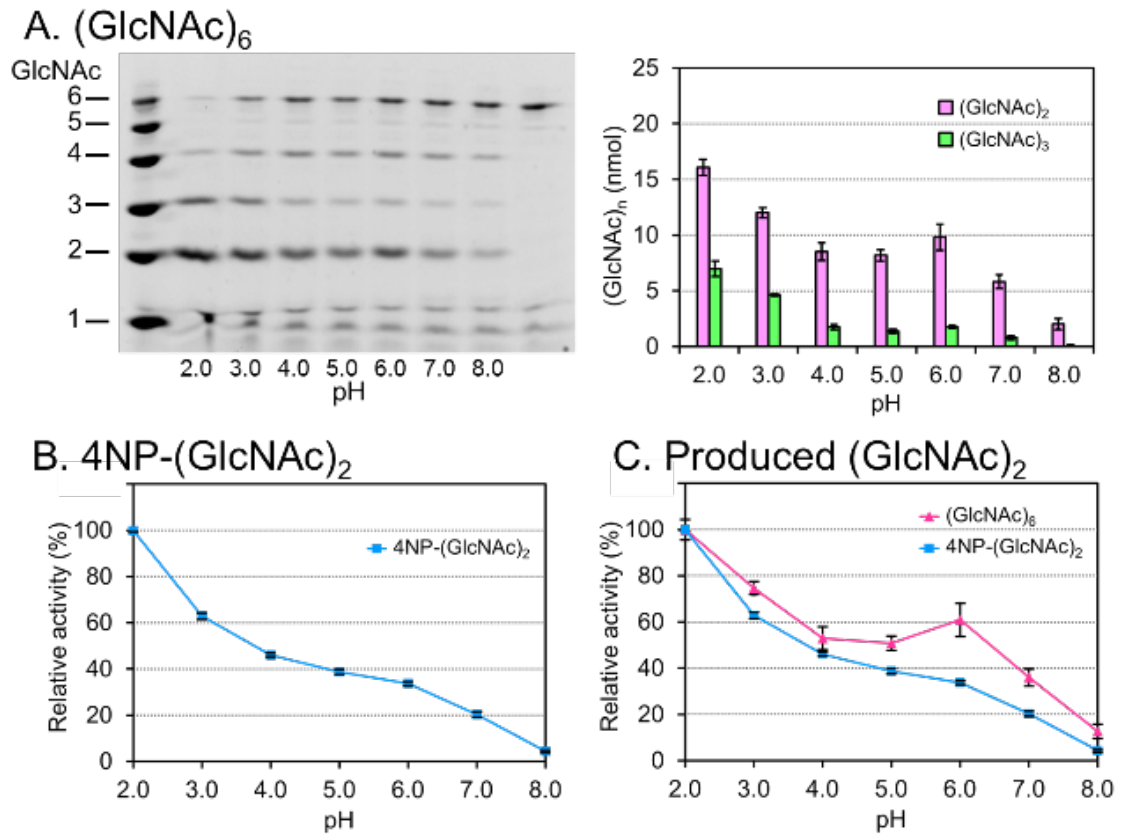


図 II. 6. 生体内 pH 条件下における AMCase のキチン分解特性

(A) マウス AMCase (0.1mU) による, (GlcNAc)₆ の分解

(B) 4NP-(GlcNAc)₂ を用いた, AMCase の pH 依存性

(C) (GlcNAc)₆, 4-NP-(GlcNAc)₂ によるマウス AMCase のキチン分解活性の比較

改良 FACE 法 (図 II. 6A) によって定量された (GlcNAc)₂, および 405 nm で検出された 4-nitrophenol (図 II. 6B) の比較。値は, pH 2.0 での最大活性を 100% として表した。

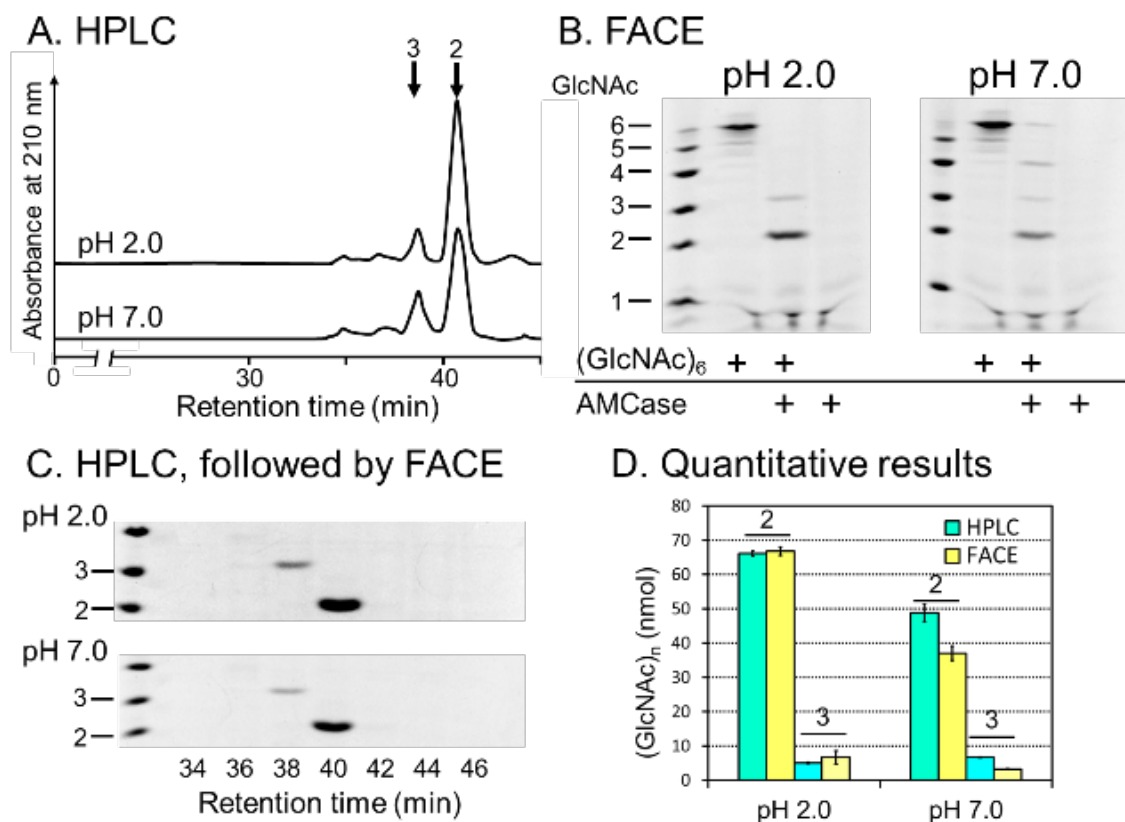


図 II. 7. HPLC および FACE 法を用いた GlcNAc オリゴマーの検出

第 II 章, 第 2 節で示したように, pH 2.0 または pH 7.0 の条件で, (GlcNAc)₆ と AMCase と反応させた。

(A) HPLC での解析

(B) FACE での解析 : FACE は, 試料を 10 倍希釈し, 解析した

(C) FACE による HPLC 抽出物の分析

(D) HPLC および FACE によって生成されたデータの定量比較

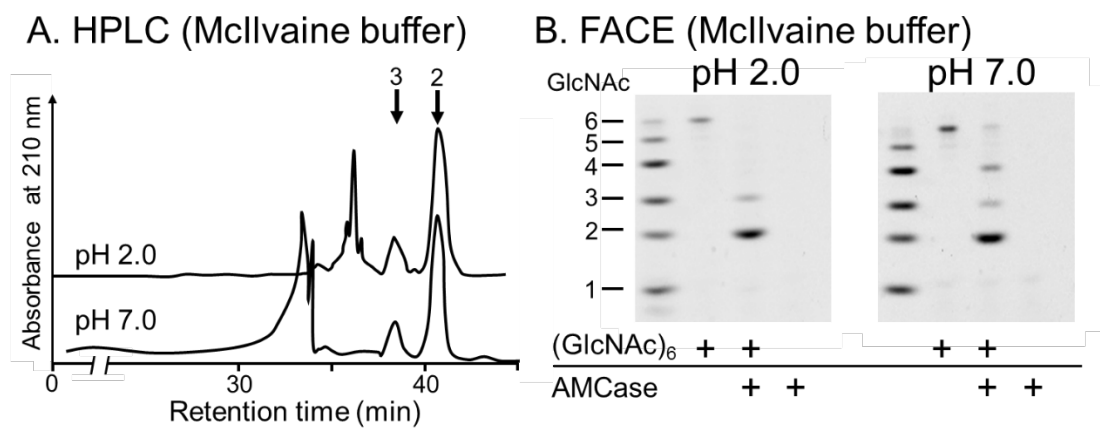


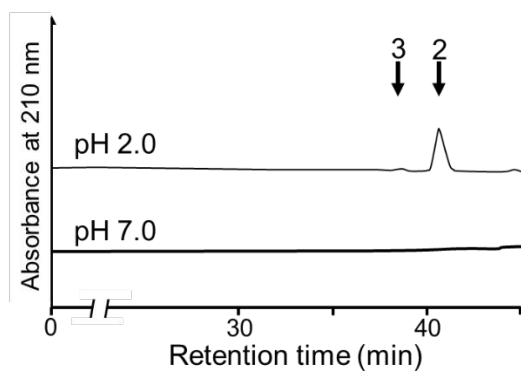
図 II. 8. HPLC および FACE 法を用いた検出における緩衝液の影響

第 II 章, 第 2 節で示したように, pH 2.0 または pH 7.0 (McIlvaine 緩衝液) の条件で, (GlcNAc)₆ と AMCase を反応させた。

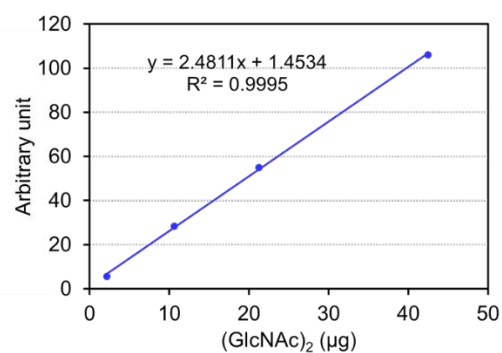
(A) HPLC での解析：三量体の直前に緩衝液由来のピークが検出された

(B) FACE での解析：FACE は, 試料を 10 倍希釈し, 解析した

A. HPLC (buffer only)



C. Standard curves for HPLC



B. HPLC & FACE (buffer only)

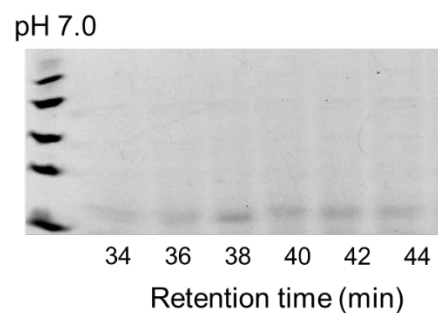
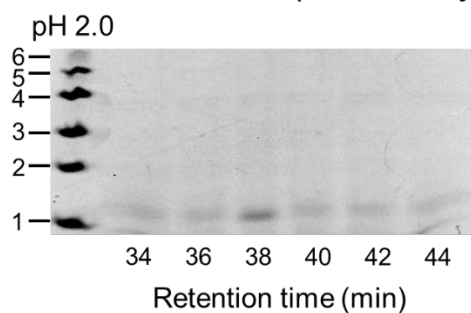


図 II. 9. HPLC および FACE 法を用いた検出における緩衝液の影響

緩衝液系を Gly-HCl (pH2.0) および Tris-HCl (pH7.0) に変更した。

(A) HPLC での解析

(B) FACE による HPLC 抽出物の分析

(C) 1~42 μg (GlcNAc)₂ 標準物質の標準曲線

第 III 章 生体内 pH 条件下におけるマウス酸性ほ乳類キチナーゼの糖転移活性

第 1 節 研究目的

最近, AMCase を欠損させたマウスを用いた研究により, AMCase は恒常的に発現する酵素で, 気道, 肺組織における環境由来のキチンを分解するのに不可欠な酵素であることが示された [51]。また AMCase の重要な役割は, 宿主の消化器官内における寄生虫に対する免疫防御反応であると考えられる [52]。

第 II 章では, 開発した改良 FACE 法を用い, AMCase の強酸性から中性 pH でのキチンの分解産物を解析した。第 II 章において, AMCase は, 広い pH で活性を示し, 胃を模倣した pH 2.0 の条件下において, (GlcNAc)₂ を生成し, 肺等を模倣した pH 7.0 の条件下において (GlcNAc)₂, (GlcNAc)₃ を生成することを見出した。

本章は, 中性条件下における AMCase の特性を詳細に解析することを目的とした。キチンオリゴマー [(GlcNAc)_{3~6}] を基質とし, AMCase の特性解析を行った。その過程で, AMCase が糖転移活性を有する可能性を示唆する結果を得た。AMCase の糖転移活性を証明するため, 人工基質を用いた実験を行い, 改良 FACE 法を用いてその反応メカニズムを考察する。

改良 FACE 法は, コロイダルキチンや (GlcNAc)_{3~6} のような天然型と 4-NP-chitobioside のような人工基質からの遊離した微量な反応産物を検出することを可能であると期待し, 研究を進めた。

第 2 節 実験材料と方法

大腸菌組換えマウス AMCase の発現

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)。

マウス AMCase による GlcNAc オリゴマーの分解と FACE 法によるキチン分解産物の解析

キチン加水分解活性を評価する基質として、(GlcNAc)₄₋₆ を用い、すべての酵素反応において、(GlcNAc)₄₋₆ (Seikagaku Corporation 社) の終濃度を (200 μ M) とし、大腸菌発現マウス AMCase (50 μ U), そして McIlvaine 緩衝液 (0.1 M citric acid と 0.2 M Na₂HPO₄ の混合液; pH 2.0 or 7.0), 全量 50 μ L の条件下で 37°C, 10 分もしくは 60 分反応した。

GlcNAc の分子量マーカーは、キチンモノマー, オリゴマー [(GlcNAc)₂₋₆] を用いた。キチン分解産物は、第 II 章で確立した改良 FACE 法で解析した [50]。

人工基質を用いた AMCase キチン加水分解活性と糖転移活性の測定

ほ乳類キチナーゼにおける人工基質を用いた糖転移活性の測定は、Aguilera らが報告している [54]。彼らは、Chit1 の分解活性の至適 pH 条件における糖転移活性を二種類の人工基質を用いて測定した [54]。私は、その研究を参考に、生体内条件下 (pH 2.0, pH 7.0) における AMCase の糖転移活性の相対的な比較検討を行った。

キチン加水分解活性は 4-NP-(GlcNAc)₂ (200 μ M) または蛍光基質, 4-methylumbelliferyl *N*-acetyl- β -D-glucosaminide [4-MU-GlcNAc, Sigma-Aldrich 社]

(50 μ M) 用いて決定した [54]。AMCase のユニットは以前報告した方法に従った [41]。キチナーゼ活性は、反応後、過剰量の 0.1 M Gly-NaOH (pH 10.0) または 1 M NaCO₃ を加えることで停止し、4-MU の蛍光は、励起波長 360 nm, 蛍光波長 450 nm で検出し、4-NP は 405 nm で検出した。

FACE 法による AMCase キチン加水分解活性と糖転移活性の測定

4-NP-(GlcNAc)₂ (200 μ M) と 4-MU-GlcNAc (50 μ M) を基質とし、組換えマウス AMCase を pH 2.0 または pH 7.0 で、37°C で 0.5, 1, 24 時間反応した。分解産物は改良 FACE 法を用いて解析した [50]。

第 3 節 結果

pH 依存的糖転移産物の検出

私が改良した FACE 法は、蛍光標識段階において、高濃度の不揮発性の緩衝液存在下でもキチンオリゴ糖を特異的に検出できる。さらにその定量性は 0.1~50 nmol までであった [50]。(GlcNAc)₆, (GlcNAc)₅ および (GlcNAc)₄ を基質に用い、胃の条件である pH 2.0 または胃以外の組織条件である pH 7.0 で、AMCase と 10 分または 60 分間反応し、その後、改良 FACE 法を用いて解析した。マウス AMCase はどちらの pH 条件でも主として (GlcNAc)₂ を生成した (図 III. 1A-C)。しかしながら、中性の pH 条件では (GlcNAc)₂ に比べ、(GlcNAc)₃ の比が増加した (図 III. 1A-C, 右)。

これらの結果は、二つの可能性を示唆した。一つ目は、中性条件における (GlcNAc)₃ に対する AMCase の分解活性が低下した可能性である。もう一つは、中性条件下において糖転移反応が起こった可能性である [54]。

(GlcNAc)₆, (GlcNAc)₅ および (GlcNAc)₄ 分解における (GlcNAc)₃ の増加は pH 7.0 で AMCase と反応させて起こったことから、キチン分解活性のほかに異なる酵素活性を有することが強く示唆された。

ヒト Chit1 は pH 5.3 において糖転移活性を有することが既に報告されており [54]、この酵素活性はおそらくキチンと AMCase の反応においても起こりうると考えられた。

酸性から中性条件下におけるマウス AMCase 糖転移活性の発現

前述の二つの可能性を検証するために、(GlcNAc)₃ と AMCase を pH 2.0 または pH 7.0 の条件下で、37°C, 60 min 反応し、FACE 法を用い解析した。pH

2.0 において、GlcNAc と (GlcNAc)₂ を検出した。また pH 7.0 と比較し、(GlcNAc)₃ をより効率良く分解していることが分かった (図 III. 2A)。

次に、天然基質の代わりに、人工基質である 4-NP-(GlcNAc)₂ を用いた実験を行った。驚いたことに、(GlcNAc)₂ 以外に (GlcNAc)₃ が検出できた (図 III. 2B)。4-NP は分子の還元末端に付加しているので、(GlcNAc)₃ の検出は予想外の結果であった。

蛍光試薬 ANTS を用いた FACE 解析で、4-NP-(GlcNAc)₂ は、還元末端が存在しないので、検出されない (図 III. 2B, 2C 参照)。

AMCase による 4-NP-(GlcNAc)₂ の分解は、GlcNAc と (GlcNAc)₂ を遊離し (図 III. 2C, 点線上)、その後糖転移反応により (GlcNAc)₃ が生成された (図 III. 2C, 点線下) との仮説を立てた。

今回の結果は、マウス AMCase が中性条件下で糖転移活性を有する可能性を示唆した。

人工基質 4-NP-(GlcNAc)₂, 4-MU-GlcNAc による糖転移活性の証明

マウス AMCase が糖転移活性を有する可能性をさらに検討するため、Aguilera らが報告した方法 [54] に従い、4-NP-(GlcNAc)₂ と 4-MU-GlcNAc を AMCase と反応した。4-NP-(GlcNAc)₂ と 4-MU-GlcNAc は、そのままでは、どちらも吸光または蛍光を示さない (図 III. 3, 右, ○□)。これに対し、遊離した 4-NP と 4-MU は、黄色や蛍光をそれぞれ呈する (図 III. 3, 右, 緑○ 赤□)。

4-NP-(GlcNAc)₂ を AMCase と反応すると、pH 2.0, pH 7.0 とともに、遊離した 4-NP の 405 nm での吸光度が増加した (図 III. 3A)。これに対し、4-MU-GlcNAc で同様に反応させても蛍光は検出されなかった (図 III. 3B)。これらの

結果は、上記の条件において、AMCase は 4-NP-(GlcNAc)₂ を分解するが、4-MU-GlcNAc を分解できないことを示す。

これらの基質を AMCase と同時に反応させると、pH 2.0 と pH 7.0 のどちらの条件においても、4-MU の蛍光が検出できた (図 III. 3C)。pH 2.0 では、吸光度 405 nm における 4-NP の増加に伴い、蛍光の 4-MU が低い値で検出された (図 III. 3C, 左)。これに対し、pH 7.0 で AMCase と基質を反応すると、高い量の蛍光が検出された。これらの結果は、マウス AMCase は、pH 2.0 と比較すると、pH 7.0 で強い糖転移活性を有することを示した (図 III. 3C, 右)。

FACE 法を用いたマウス AMCase の糖転移活性の解析

最後に、図 III. 3 において示した AMCase による 4-NP-(GlcNAc)₂ と 4-MU-GlcNAc の分解産物を FACE 法で解析した。pH 2.0 で、0.5, 1 時間の反応において AMCase は、主として (GlcNAc)₂ を生成した。しかし、pH 7.0 で、0.5, 1 時間の反応において、AMCase は (GlcNAc)₃ を (GlcNAc)₂ と同程度生成した (図 III. 4)。その糖転移反応により生成された (GlcNAc)₃ は、AMCase との反応により、24 時間後には (GlcNAc)₂ に分解された。この結果は 図 III. 2B と一致し、どちらの実験でも得られた pH 7.0 条件における (GlcNAc)₃ は、AMCase の糖転移産物であることを示す。

この結果を模式的に 図 III. 4B に示した。AMCase による 4-NP-(GlcNAc)₂ の分解また糖転移メカニズムは 図 III. 2C に基本的に従っている。4-MU-GlcNAc は糖転移反応により 4-MU-(GlcNAc)₂ の構造をしたと考えている。(GlcNAc)₂ は、AMCase により分解されたのち、糖転移反応が起こり、

(GlcNAc)₃ が生成したと考えられる (図 III. 4B 点線下)。以上のことから、マウス AMCase は中性条件下において糖転移活性を示すことが分かった。

第 4 節 考察

AMCase が、天然基質または人工基質を中性条件下で反応させることにより、キチン分解活性と糖転移活性を有することを示した。この章では、蛍光と比色定量を組み合わせ、キチン分解産物を改良 FACE 法により直接解析した。

FACE 法は、糖の還元末端の蛍光標識と PAGE による分離から構成される分析法である [43, 50]。この方法はごく少量のキチンオリゴ糖 (pmol レベル) の定量に用いることができ、HPLC や薄層クロマトグラフィー (TLC) と比べて、高感度である。さらに、FACE は MALDI-TOF-MASS よりも定量的である。さらに改良 FACE 法は、高濃度の緩衝液存在下でも直接的なキチンオリゴ糖の解析を可能にする。以上のことから、改良 FACE 法はキチン分解産物あるいは糖転移産物の解析法としてとても優れている。

改良 FACE 法はコロイダルキチン、 $(\text{GlcNAc})_{2-6}$ 、 4-NP-(GlcNAc)_2 など、天然または人工のキチン基質の分解産物を直接解析できる。この章で、AMCase が、pH 2.0 に比べ、pH 7.0 において糖転移活性が高い酵素であることを示した。しかしながら、pH 7.0 における 4-NP-(GlcNAc)_2 の分解において $(\text{GlcNAc})_4$ は検出されなかった (図 III. 2B)。この結果は、図 III. 1 における pH 7.0 の結果と一致しており、AMCase のキチン分解活性が糖転移活性より強いことを示す。可能性の高い解釈として、AMCase の糖転移反応は、 GlcNAc 単量体を経由し、 $(\text{GlcNAc})_3$ を生成することが挙げられる (図 III. 2)。

pH 7.0 における、基質と AMCase の反応による蛍光強度の上昇は、マウス AMCase が中性で糖転移活性が高いことを裏付けた (図 III. 3C)。したがって、AMCase は、加水分解反応によって $(\text{GlcNAc})_2$ を生成し、 GlcNAc 単量体の糖転移反応によって $(\text{GlcNAc})_3$ を生成する酵素であると考えられる (図

III. 4B)。pH 7.0 での (GlcNAc)₃ の増加は、キチン分解活性の低下と糖転移活性の増加による結果であると考えられる。

ヒト Chit1 は、弱酸性条件下で、ヒト AMCase と比較してより高い糖転移活性を有することが示されている [55]。pH 2.0 で、マウス AMCase を用いた今回の結果は、本質的に以前の報告と一致した [55]。

AMCase は、生体防御および消化において重要な生理学的役割を果たすと考えられている。最近、マウス AMCase とそのホモログであるニワトリ及びブタ Chia は、消化管で消化酵素として機能することが示された [40, 56, 57]。この結果は、AMCase が胃の加水分解酵素として食物消化の役割を果たす、との現在の仮説と一致している [29, 39, 45]。

今回の研究において最も重要な点は、AMCase は、異なる pH 条件下で、キチンオリゴマーに対し、キチン分解活性と糖転移活性を示すことである。今回の結果より、AMCase は、pH 2.0 では、酵素は糖転移酵素として作用するのではなく、キチン分解酵素として作用する。たとえ糖転移反応が強酸性環境で起こったとしても、キチン分解活性は糖転移活性よりも優位である。これに対し、pH 7.0 では、マウス AMCase は、高い糖転移活性を示す。人工基質を用いた結果より、私は、いずれの場合でも、マウス AMCase で、明らかな糖転移活性を検出することができた。

AMCase は、喘息マウスモデルおよびアレルギー性肺炎症の抗原誘発マウスモデルにおけるような、免疫応答に関連する特定の病態生理学的な条件下での発現の増加が報告されている [30, 31]。最近、AMCase ノックイン/ノックアウトレポーターマウスを用いて、肺上皮細胞に発現する AMCase は、自然界由来のキチンを分解、除去し、加齢に関連した肺の線維化を防止すると報告さ

れている [51]。以上のことから AMCase は中性条件下で、重要な役割を担っていると考えられる。

この章で、マウス AMCase が体内組織条件下でキチン分解活性と糖転移活性を有することを示した [58]。本章での結果は、特定の病態生理学的条件において高レベルで発現するマウス AMCase が非常に重要な役割を果たす可能性を示唆している。

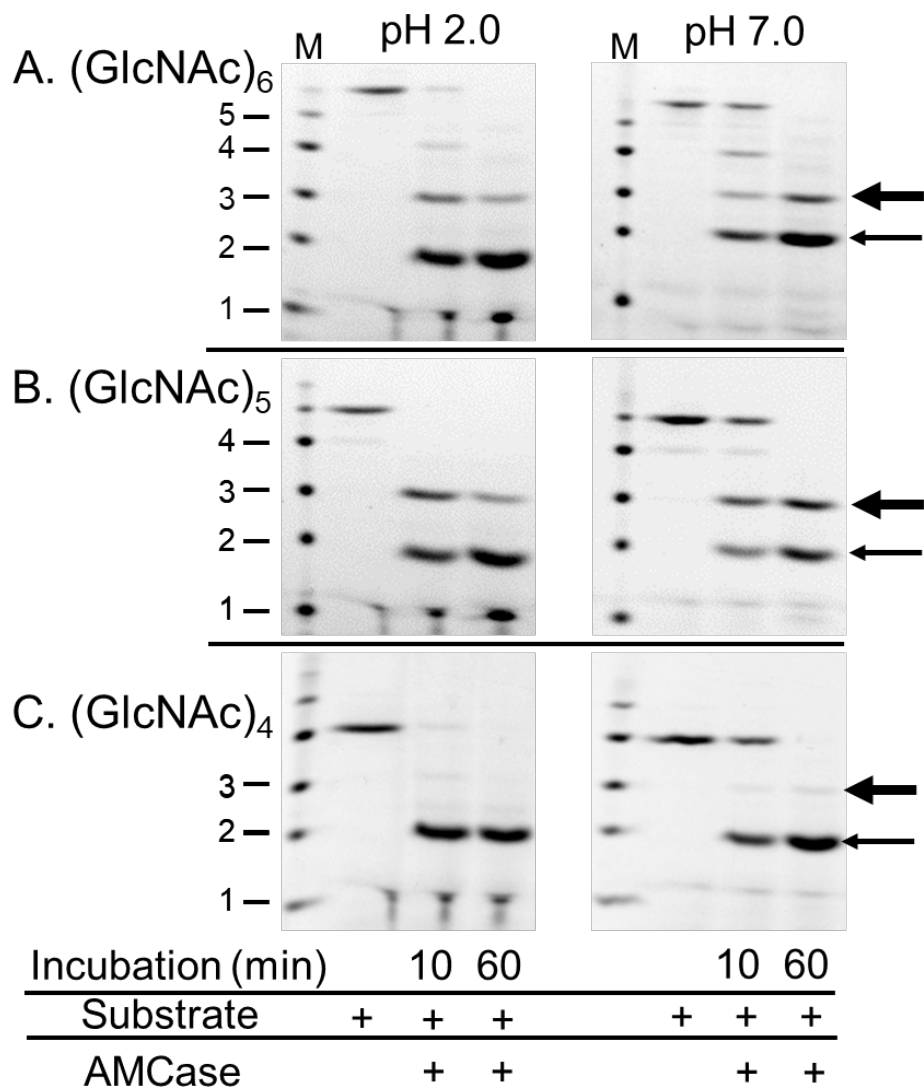


図 III. 1. pH 2.0, 7.0 条件下での AMCase によるキチン基質の分解

(A) (GlcNAc)₆ の分解

(B) (GlcNAc)₅ の分解

(C) (GlcNAc)₄ の分解

M, GlcNAc 分子量マーカー; 矢印, (GlcNAc)₂; 太矢印, (GlcNAc)₃

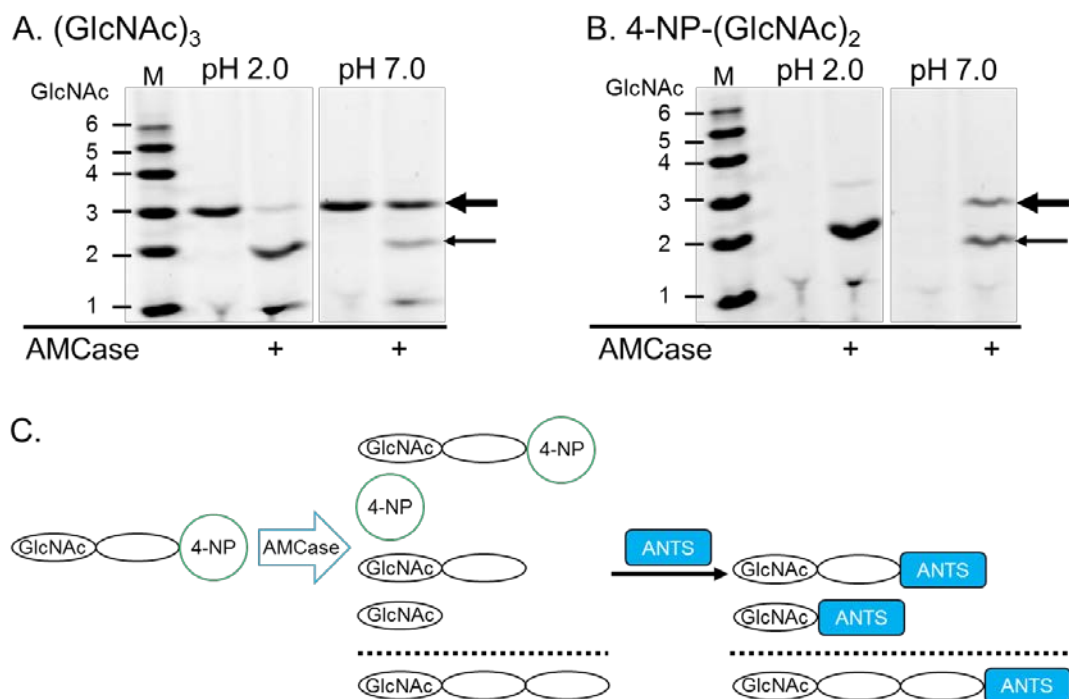


図 III. 2. 酸性から中性条件下におけるマウス AMCase 糖転移活性の発現

(A) (GlcNAc)₃ の分解

(B) 4-NP-(GlcNAc)₂ の分解

(C) ANTS 標識された産物の反応モデル

4-NP-(GlcNAc)₂ は分解されると、未分解 [4-NP-(GlcNAc)₂], 遊離物 [4-NP], 分解産物 [(GlcNAc)₂, GlcNAc] に分解されると予想された。続く, FACE 解析により, (GlcNAc)₃, (GlcNAc)₂, GlcNAc が検出されたことから, AMCase は GlcNAc を糖転移する糖転移酵素である可能性が示唆された。

M, GlcNAc 分子量マーカー。

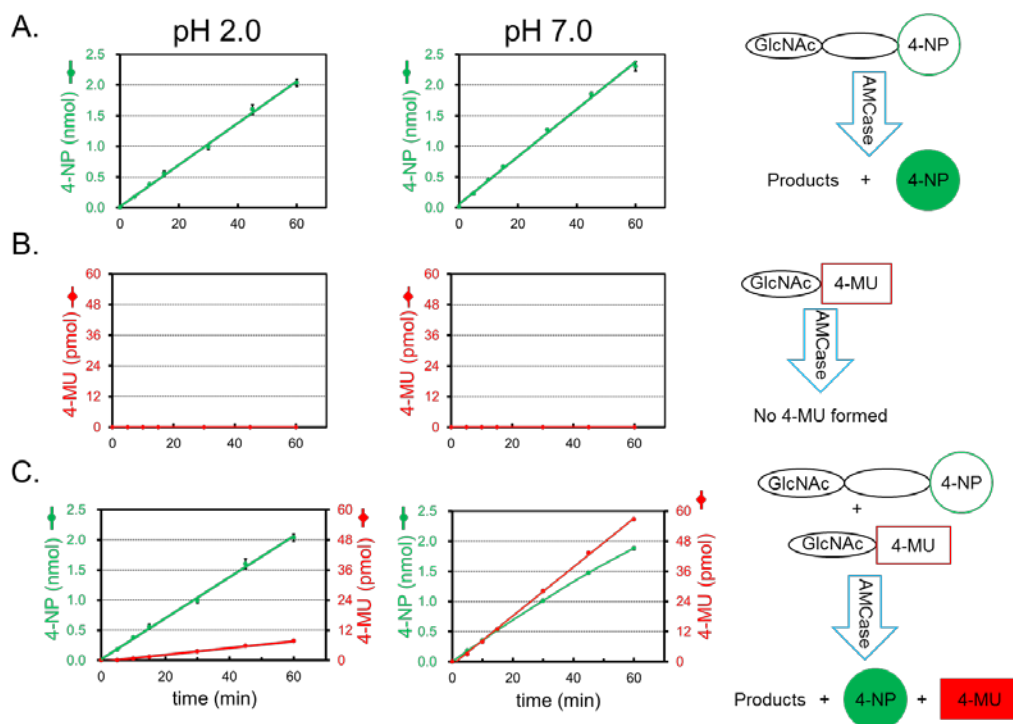


図 III. 3. 人工基質 4-NP-(GlcNAc)₂, 4-MU-GlcNAc による糖転移活性の証明

(A) 4-NP-(GlcNAc)₂ の分解

(B) 4-MU-GlcNAc の分解

(C) 4-NP-(GlcNAc)₂ および 4-MU-GlcNAc の分解

得られた生成物を吸光度測定または蛍光測定法により分析した。4-NP または 4-MU を有する分子は比色的または蛍光定量的に陰性であるが，放出された 4-NP (閉環) または 4-MU (閉鎖矩形) はアルカリ条件下で比色定量的または蛍光定量的に陽性である。

(右) 人工基質 4-NP-(GlcNAc)₂, 4-MU-GlcNAc による酵素反応モデル

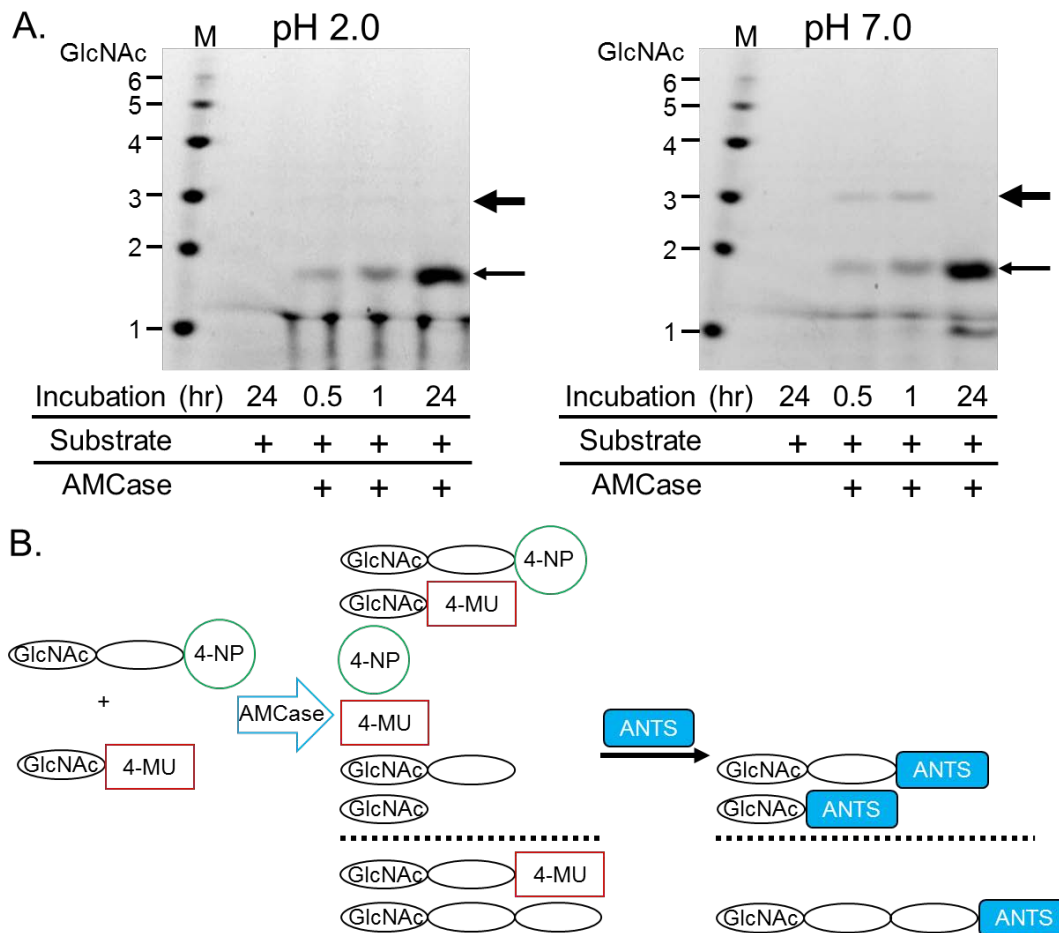


図 III. 4. FACE 法を用いたマウス AMCase の糖転移活性の解析

(A) 4-NP-(GlcNAc)₂ および 4-MU-GlcNAc の分解

(B) ANTS 標識された産物の反応モデル

図 III. 3. に記した方法と同様に 4-NP-(GlcNAc)₂ および 4-MU-GlcNAc は分解されると、未分解 [4-NP-(GlcNAc)₂, 4-MU-GlcNAc], 遊離物 [4-NP, 4-MU], 分解産物 [(GlcNAc)₂, GlcNAc] に分解されると予想された。続く、FACE 解析により、(GlcNAc)₃, (GlcNAc)₂, GlcNAc が検出された。

4-MU-GlcNAc は AMCase の糖転移反応により 4-MU-(GlcNAc)₂ を合成し、図 III. 3.C の 4-NP-(GlcNAc)₂ と同様の反応を経て、(GlcNAc)₃, (GlcNAc)₂, GlcNAc を合成したと考えられる。

細矢印 : (GlcNAc)₂, 太矢印 : (GlcNAc)₃

第 IV 章 総合考察

マウス AMCase は、活性の至適が pH 2.0 である [29, 41]。これまでの研究で、天然のキチン基質を用い、AMCase は pH 2.0 で主に (GlcNAc)₂ を生成すると報告されている [29, 41]。AMCase は、マウスの胃で大量に合成され、胃と腸の条件下で、消化酵素として機能することが示されている [29, 40, 53]。また最近、マウス AMCase とそのホモログであるニワトリとブタの Chia は、消化管で消化酵素として機能することが示された [40, 56, 57]。

これまでの遺伝子発現解析により、AMCase mRNA は、胃の他に肺や唾液腺などの組織においても高いレベルで発現することが報告されている [53]。

AMCase は、喘息マウスモデルおよびアレルギー性肺炎の抗原誘発マウスモデルにおけるような、免疫応答に関連する特定の病理学的条件下での発現の増加が示されている [30, 31]。最近、AMCase ノックイン/ノックアウトレポーターマウスを用いて、肺上皮細胞に発現する AMCase は、自然に蓄積するキチンを除去し、加齢に関連した肺の線維化を防止すると報告されている [51]。そこで、AMCase は、生体防御において重要な生理学的役割を果たすと考えられている。

キチンは基本的に生体内においてアレルギー反応を起こさない物質である。長鎖のキチンは、AMCase が消化酵素として報告されるまで、基本的に分解されない食物繊維であると考えられてきた。中鎖のキチンはわずかに生理作用を示すことが報告されている。さらに、キチンオリゴマーは、ほ乳類細胞において、様々な生理活性を有することが知られている [46-49]。キチンとキトサンオリゴマーには抗がん活性および抗炎症活性が報告されている [46, 47]。しかし、AMCase の分解産物である (GlcNAc)₂ や GlcNAc には明瞭な生理活性の

報告はない。また、ほ乳類キチナーゼによるキチンオリゴマーの生成は報告されていない。

現在、AMCase が特定の病理学的条件下で発現量が増加する意義は解明されていない。私は、特定の病理学的条件下で過剰発現された AMCase が、生理活性を有する特異的キチン分解産物を生成しうると仮定した。この点を明らかにするため、私は、FACE 法 [43] を用いて AMCase の特性解析を行った。

Peter Jackson が開発した FACE 法 [43] は、様々なオリゴ糖の解析を目標としており、高速液体クロマトグラフィー (HPLC)、薄層クロマトグラフィー (TLC) および核磁気共鳴 (NMR) と比べて、非常に高感度であり、微量の糖の検出にも優れている。さらに、FACE 法は MALDI-TOF-MASS よりも定量的である。本研究では FACE 法を用いて、キチン分解産物の解析を行った。

ほ乳類キチナーゼに関する研究では、通常、広範囲に pH を設定できる McIlvaine 緩衝液（クエン酸/リン酸緩衝系）がよく用いられる。この緩衝液を用いた反応産物を FACE 法で解析すると二つの問題が生じた。一点は、中性 pH における副産物の生成である。もう一点は、中性 pH での標識効率の低下であった。

本研究で、pH 5.0~8.0 中でキチンオリゴマーの蛍光標識中に、「副産物」が生成されることを明らかにした。この副産物は、AMCase によるキチン分解産物に由来するものではなかった。そこで、まず、副産物の生成を抑え、かつ、pH 2.0~8.0 での酵素反応で生成される GlcNAc オリゴマーの還元末端を効率的に標識できる蛍光標識法の開発を試みた。そして、蛍光標識の直前に濃酢酸により試料を酸性化（標識液の pH を $\text{pH} < 4.0$ に調整）することで副産物の生成を抑制する改良 FACE 法を確立できた。本研究で、副産物の化学構造は解明できなかったが、改良 FACE 法は、副産物の生成を抑制し、GlcNAc オリゴ

マーを単一のバンドとして検出することができた。さらに、定量性も非常に良好であることが確認できた。この改良 FACE 法は簡便であり、生化学分析に一般的に使用される様々な緩衝液に適用することができた。さらに、中性領域の反応液を用いても GlcNAc オリゴマーの蛍光標識効率が低下しないことも確認した。なお、この改良標識法は、蛍光標識前に濃酢酸を加える以外、FACE 法の原法である Jackson 法と本質的に同じである。私が改良した FACE 法は、高濃度の不揮発性緩衝液存在下でも直接的なキチンオリゴ糖の解析を可能にした。

この改良 FACE 法を用いて、AMCase の pH 依存的キチン基質の分解性を再検討した。マウス AMCase は pH 8.0 まで活性があることが示されているが、pH が高くなるとその活性は低下する。pH 5.0~8.0 において、キチン基質から生成された産物が、合成発色基質である 4-NP-(GlcNAc)₂ を用いた分光学的キチン分解活性から推定されるレベルよりも、相対的に多いことを示した。これらの結果は、コロイダルキチンに対する AMCase の分解能力が、pH 5.0~8.0 において、低分子合成基質よりも高く、AMCase が生体組織の pH 条件下で機能することを示している。AMCase は強酸性から中性の条件下で天然のキチン基質を分解し、主に (GlcNAc)₂ を生成することができる。

本研究で改良した FACE 法は、コロイダルキチン、(GlcNAc)_{2~6}、4-NP-(GlcNAc)₂ など、天然または人工キチン基質の分解産物を直接解析でき、キチン分解産物あるいは糖転移産物の解析に用いることができた。そして、第 III 章で、AMCase が、pH 2.0 に比べ、pH 7.0 において糖転移活性を有することを示した。他方、pH 7.0 における 4-NP-(GlcNAc)₂ の分解において (GlcNAc)₄ は検出されなかった。この結果は、pH 7.0 での結果と一致していた。この結果は、AMCase のキチン分解活性が糖転移活性より強いことを示す。以上の結果

は、AMCase の糖転移反応は、GlcNAc 単量体を經由し、(GlcNAc)₃ を生成する可能性を強く示唆した。

基質と AMCase の pH 7.0 での反応における合成基質 4-MU の蛍光強度の上昇は、マウス AMCase が中性付近で糖転移活性が高いことを示した。つまり、AMCase は、キチン分解活性で (GlcNAc)₂ を生成し、その後の GlcNAc 単量体の糖転移反応で (GlcNAc)₃ を生成する酵素であると考えられた。そして、pH 7.0 での (GlcNAc)₃ の増加は、キチン分解活性の低下と糖転移活性の増加によるものだと考えられた。弱酸性条件下において、ヒト Chit1 は、ヒト AMCase より高い糖転移活性を有することが報告されている [11]。今回、マウス AMCase を pH 2.0 で用いているので、今回の結果は本質的に以前の報告と一致した [11]。重要なことは、この酵素は、異なる pH 条件下で、キチンオリゴマーに対し、異なるキチン分解活性および糖転移活性を示すことである。

AMCase は、pH 2.0 で、糖転移酵素として作用するのではなく、キチン分解酵素として作用するようである。そのキチン分解活性は、糖転移活性よりも優位であると考えられる。これに対し、AMCase は、中性条件下では、糖転移活性および弱いキチン分解活性を示す。そして、いずれの pH 条件下においても、マウス AMCase は糖転移活性を検出することができた。以上の結果は、マウス AMCase が体内組織の生理学的条件下でキチン分解活性と糖転移活性を有することを示した。

私は、特定の病理学的条件下で過剰発現された AMCase が、特異的分解産物を生成し得ると仮定し、FACE 法を用いて生体内でのキチンオリゴマーの生成について検討した。面白いことに、AMCase は生体内の条件下によって異なる性質を有することが分かった。AMCase は基本的にキチン分解酵素として作用する。しかし、中性組織条件において一定の糖転移活性を有することが分か

った。私は AMCase と疾患の関連が多く報告されている中性組織での役割について特に注目している。残念なことに、今回の条件においては抗炎症活性などといった生理活性が報告されているようなキチンオリゴマーの生成を行うことができなかった。しかし、糖転移活性を有するということは AMCase がキチンオリゴマーを生成し得る可能性があると考えられる。

以上の報告は、これまであまり注目されていなかった中性条件におけるマウス AMCase の酵素機能が特定の病態生理学的条件において非常に重要な役割を果たす可能性を示唆している。

第 V 章 結論

本研究では、まずキチン分解産物の解析のためのキチンオリゴマー蛍光標識法の改良を行い、その後 AMCase のキチン分解活性、糖転移活性に関する詳細な解析をおこなった

まず、Peter Jackson によってオリゴ糖分析のために開発された Fluorophore-Assisted Carbohydrate Electrophoresis (FACE) 法を用いて、弱酸性から中性条件下における AMCase によるキチン分解産物を分析した。その過程で、キチンに対し、AMCase を pH 5.0~8.0 で作用した場合、ポリアクリルアミドゲル電気泳動において、キチンオリゴマーマーカーよりも移動度の遅い産物が検出された。しかし、この産物は蛍光標識中に生成した反応副産物であり、蛍光標識時に事前に酸性化することによってこの副産物の生成を抑制できることが本研究で初めて明らかになった。この発見に基づき私はキチンオリゴマー分析の改良 FACE 法を確立した。次に、この方法を用いて、AMCase が弱酸性から中性の条件下で分解活性を示し、GlcNAc 二量体 $[(\text{GlcNAc})_2]$ に加え、三量体 $[(\text{GlcNAc})_3]$ を生成することを見出した。さらに、 $(\text{GlcNAc})_3$ の生成メカニズムを各種キチン基質と改良 FACE 法を用いて詳細に解析し、この産物が、糖転移反応によるものであることを明らかにした。

これらの知見は改良 FACE 法を用いることで初めて明らかにされたことであり、AMCase の新規酵素機能を発見に寄与する成果である。

参考文献

1. Jung, W. J. & Park, R. D. (2014) Bioproduction of chitooligosaccharides: present and perspectives, *Mar Drugs*. **12**, 5328-56.
2. Elieh Ali Komi, D., Sharma, L. & Dela Cruz, C. S. (2017) Chitin and Its Effects on Inflammatory and Immune Responses, *Clin Rev Allergy Immunol*.
3. Lee, C. G., Da Silva, C. A., Lee, J. Y., Hartl, D. & Elias, J. A. (2008) Chitin regulation of immune responses: an old molecule with new roles, *Curr Opin Immunol*. **20**, 684-9.
4. Elieh-Ali-Komi, D. & Hamblin, M. R. (2016) Chitin and chitosan: production and application of versatile biomedical nanomaterials, *Int J Adv Res (Indore)*. **4**, 411-427.
5. Carlstrom, D. (1957) The crystal structure of alpha-chitin (poly-N-acetyl-D-glucosamine), *J Biophys Biochem Cytol*. **3**, 669-83.
6. Hackman, R. H. & Goldberg, M. (1965) Studies on chitin. VI. The nature of alpha- and beta-chitins, *Aust J Biol Sci*. **18**, 935-46.
7. Minke, R. & Blackwell, J. (1978) The structure of alpha-chitin, *J Mol Biol*. **120**, 167-81.
8. Gardner, K. H. & Blackwell, J. (1975) Refinement of the structure of beta-chitin, *Biopolymers*. **14**, 1581-95.
9. Merzendorfer, H. & Zimoch, L. (2003) Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases, *J Exp Biol*. **206**, 4393-412.
10. Tsigos, I. & Bouriotis, V. (1995) Purification and characterization of chitin deacetylase from *Colletotrichum lindemuthianum*, *J Biol Chem*. **270**, 26286-91.

11. Kaur, S. & Dhillon, G. S. (2014) The versatile biopolymer chitosan: potential sources, evaluation of extraction methods and applications, *Crit Rev Microbiol.* **40**, 155-75.
12. Thadathil, N. & Velappan, S. P. (2014) Recent developments in chitosanase research and its biotechnological applications: a review, *Food Chem.* **150**, 392-9.
13. Ngo, D. H. & Kim, S. K. (2014) Antioxidant effects of chitin, chitosan, and their derivatives, *Adv Food Nutr Res.* **73**, 15-31.
14. Muzzarelli, R. A., El Mehtedi, M. & Mattioli-Belmonte, M. (2014) Emerging biomedical applications of nano-chitins and nano-chitosans obtained via advanced eco-friendly technologies from marine resources, *Mar Drugs.* **12**, 5468-502.
15. Khan, F. I., Rahman, S., Queen, A., Ahamad, S., Ali, S., Kim, J. & Hassan, M. I. (2017) Implications of molecular diversity of chitin and its derivatives, *Appl Microbiol Biotechnol.* **101**, 3513-3536.
16. Hamid, R., Khan, M. A., Ahmad, M., Ahmad, M. M., Abdin, M. Z., Musarrat, J. & Javed, S. (2013) Chitinases: an update, *J Pharm Bioallied Sci.* **5**, 21-9.
17. Bussink, A. P., van Eijk, M., Renkema, G. H., Aerts, J. M. & Boot, R. G. (2006) The biology of the Gaucher cell: the cradle of human chitinases, *Int Rev Cytol.* **252**, 71-128.
18. Hawtin, R. E., Arnold, K., Ayres, M. D., Zanotto, P. M., Howard, S. C., Gooday, G. W., Chappell, L. H., Kitts, P. A., King, L. A. & Possee, R. D. (1995) Identification and preliminary characterization of a chitinase gene in the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genome, *Virology.* **212**, 673-85.
19. Chigaleichik, A. G., Pirieva, D. A. & Rydkin, S. S. (1976) [Chitinase from *Serratia marcescens* BKM B-851], *Prikl Biokhim Mikrobiol.* **12**, 581-6.

20. Kuranda, M. J. & Robbins, P. W. (1991) Chitinase is required for cell separation during growth of *Saccharomyces cerevisiae*, *J Biol Chem.* **266**, 19758-67.
21. Sakuda, S., Isogai, A., Matsumoto, S. & Suzuki, A. (1987) Search for microbial insect growth regulators. II. Allosamidin, a novel insect chitinase inhibitor, *J Antibiot (Tokyo)*. **40**, 296-300.
22. Kasprzewska, A. (2003) Plant chitinases--regulation and function, *Cell Mol Biol Lett.* **8**, 809-24.
23. Nakazaki, T., Tsukiyama, T., Okumoto, Y., Kageyama, D., Naito, K., Inouye, K. & Tanisaka, T. (2006) Distribution, structure, organ-specific expression, and phylogenic analysis of the pathogenesis-related protein-3 chitinase gene family in rice (*Oryza sativa L.*), *Genome*. **49**, 619-30.
24. Bussink, A. P., Speijer, D., Aerts, J. M. & Boot, R. G. (2007) Evolution of mammalian chitinase(-like) members of family 18 glycosyl hydrolases, *Genetics*. **177**, 959-70.
25. Cantarel, B. L., Coutinho, P. M., Rancurel, C., Bernard, T., Lombard, V. & Henrissat, B. (2009) The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics, *Nucleic Acids Res.* **37**, D233-8.
26. Lee, C. G., Da Silva, C. A., Dela Cruz, C. S., Ahangari, F., Ma, B., Kang, M. J., He, C. H., Takyar, S. & Elias, J. A. (2011) Role of chitin and chitinase/chitinase-like proteins in inflammation, tissue remodeling, and injury, *Annu Rev Physiol.* **73**, 479-501.
27. Renkema, G. H., Boot, R. G., Muijsers, A. O., Donker-Koopman, W. E. & Aerts, J. M. (1995) Purification and characterization of human chitotriosidase, a novel member of the chitinase family of proteins, *J Biol Chem.* **270**, 2198-202.

28. Boot, R. G., Renkema, G. H., Strijland, A., van Zonneveld, A. J. & Aerts, J. M. (1995) Cloning of a cDNA encoding chitotriosidase, a human chitinase produced by macrophages, *J Biol Chem.* **270**, 26252-6.
29. Boot, R. G., Blommaart, E. F., Swart, E., Ghauharali-van der Vlugt, K., Bijl, N., Moe, C., Place, A. & Aerts, J. M. (2001) Identification of a novel acidic mammalian chitinase distinct from chitotriosidase, *J Biol Chem.* **276**, 6770-8.
30. Bierbaum, S., Nickel, R., Koch, A., Lau, S., Deichmann, K. A., 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**, 1505-9.
31. Seibold, M. A., Reese, T. A., Choudhry, S., Salam, M. T., Beckman, K., Eng, C., Atakilit, A., Meade, K., Lenoir, M., Watson, H. G., Thyne, S., Kumar, R., Weiss, K. B., Grammer, L. C., Avila, P., Schleimer, R. P., Fahy, J. V., Rodriguez-Santana, J., Rodriguez-Cintron, W., Boot, R. G., Sheppard, D., Gilliland, F. D., Locksley, R. M. & Burchard, E. G. (2009) Differential enzymatic activity of common haplotypic versions of the human acidic Mammalian chitinase protein, *J Biol Chem.* **284**, 19650-8.
32. Okawa, K., Ohno, M., Kashimura, A., Kimura, M., Kobayashi, Y., Sakaguchi, M., Sugahara, Y., Kamaya, M., Kino, Y., Bauer, P. O. & Oyama, F. (2016) Loss and gain of human acidic mammalian chitinase activity by nonsynonymous SNPs, *Mol Biol Evol.* **33**, 3183-3193.
33. Zhu, Z., Zheng, T., Homer, R. J., Kim, Y. K., Chen, N. Y., Cohn, L., Hamid, Q. & Elias, J. A. (2004) Acidic mammalian chitinase in asthmatic Th2 inflammation and IL-13 pathway activation, *Science.* **304**, 1678-82.

34. Reese, T. A., Liang, H. E., Tager, A. M., Luster, A. D., Van Rooijen, N., Voehringer, D. & Locksley, R. M. (2007) Chitin induces accumulation in tissue of innate immune cells associated with allergy, *Nature*. **447**, 92-6.
35. Musumeci, M., Aragona, P., Bellin, M., Maugeri, F., Rania, L., Bucolo, C. & Musumeci, S. (2009) Acidic mammalian chitinase in dry eye conditions, *Cornea*. **28**, 667-72.
36. Bucolo, C., Musumeci, M., Musumeci, S. & Drago, F. (2011) Acidic mammalian chitinase and the eye: implications for ocular inflammatory diseases, *Front Pharmacol*. **2**, 43.
37. Cozzarini, E., Bellin, M., Norberto, L., Polese, L., Musumeci, S., Lanfranchi, G. & Paoletti, M. G. (2009) CHIT1 and AMCase expression in human gastric mucosa: correlation with inflammation and *Helicobacter pylori* infection, *Eur J Gastroenterol Hepatol*. **21**, 1119-26.
38. Nookaew, I., Thorell, K., Worah, K., Wang, S., Hibberd, M. L., Sjovall, H., Pettersson, S., Nielsen, J. & Lundin, S. B. (2013) Transcriptome signatures in *Helicobacter pylori*-infected mucosa identifies acidic mammalian chitinase loss as a corpus atrophy marker, *BMC Med Genomics*. **6**, 41.
39. 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.
40. 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, P.

- O. & Oyama, F. (2016) Acidic mammalian chitinase is a proteases-resistant glycosidase in mouse digestive system., *Sci Rep.* **6** 37756.
41. 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.
 42. Kashimura, A., Kimura, M., Okawa, K., Suzuki, H., Ukita, A., Wakita, S., Okazaki, K., Ohno, M., Bauer, P. O., Sakaguchi, M., Sugahara, Y. & Oyama, F. (2015) Functional properties of the catalytic domain of mouse acidic mammalian chitinase expressed in *Escherichia coli*, *Int J Mol Sci.* **16**, 4028-42.
 43. Jackson, P. (1990) The use of polyacrylamide-gel electrophoresis for the high-resolution separation of reducing saccharides labelled with the fluorophore 8-aminonaphthalene-1,3,6-trisulphonic acid. Detection of picomolar quantities by an imaging system based on a cooled charge-coupled device, *Biochem J.* **270**, 705-13.
 44. 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**, 304-10.
 45. Boot, R. G., Bussink, A. P., Verhoek, M., de Boer, P. A., Moorman, A. F. & Aerts, J. M. (2005) Marked differences in tissue-specific expression of chitinases in mouse and man, *J Histochem Cytochem.* **53**, 1283-92.

46. Aam, B. B., Heggset, E. B., Norberg, A. L., Sorlie, M., Varum, K. M. & Eijsink, V. G. (2010) Production of chitoooligosaccharides and their potential applications in medicine, *Mar Drugs*. **8**, 1482-517.
47. Khoushab, F. & Yamabhai, M. (2010) Chitin research revisited, *Mar Drugs*. **8**, 1988-2012.
48. Masuda, S., Azuma, K., Kurozumi, S., Kiyose, M., Osaki, T., Tsuka, T., Itoh, N., Imagawa, T., Minami, S., Sato, K. & Okamoto, Y. (2014) Anti-tumor properties of orally administered glucosamine and *N*-acetyl-D-glucosamine oligomers in a mouse model, *Carbohydr Polym*. **111**, 783-7.
49. Azuma, K., Osaki, T., Minami, S. & Okamoto, Y. (2015) Anticancer and anti-inflammatory properties of chitin and chitosan oligosaccharides, *J Funct Biomater*. **6**, 33-49.
50. Wakita, S., Kimura, M., Kato, N., Kashimura, A., Kobayashi, S., Kanayama, N., Ohno, M., Honda, S., Sakaguchi, M., Sugahara, Y., Bauer, P. O. & 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.
51. Van Dyken, S. J., Liang, H. E., Naikawadi, R. P., Woodruff, P. G., Wolters, P. J., Erle, D. J. & Locksley, R. M. (2017) Spontaneous chitin accumulation in airways and age-related fibrotic lung disease, *Cell*. **169**, 497-509 e13.
52. Vannella, K. M., Ramalingam, T. R., Hart, K. M., de Queiroz Prado, R., Sciurba, J., Barron, L., Borthwick, L. A., Smith, A. D., Mentink-Kane, M., White, S., Thompson, R. W., Cheever, A. W., Bock, K., Moore, I., Fitz, L. J., Urban, J. F., Jr.

- & Wynn, T. A. (2016) Acidic chitinase primes the protective immune response to gastrointestinal nematodes, *Nat Immunol.* **17**, 538-44.
53. Ohno, M., Togashi, Y., Tsuda, K., Okawa, K., Kamaya, M., Sakaguchi, M., Sugahara, Y. & Oyama, F. (2013) Quantification of chitinase mRNA levels in human and mouse tissues by real-time PCR: species-specific expression of acidic mammalian chitinase in stomach tissues, *PLoS One.* **8**, e67399.
 54. Aguilera, B., Ghauharali-van der Vlugt, K., Helmond, M. T., Out, J. M., Donker-Koopman, W. E., Groener, J. E., Boot, R. G., Renkema, G. H., van der Marel, G. A., van Boom, J. H., Overkleeft, H. S. & Aerts, J. M. (2003) Transglycosidase activity of chitotriosidase: improved enzymatic assay for the human macrophage chitinase, *J Biol Chem.* **278**, 40911-6.
 55. Chou, Y. T., Yao, S., Czerwinski, R., Fleming, M., Krykbaev, R., Xuan, D., Zhou, H., Brooks, J., Fitz, L., Strand, J., Presman, E., Lin, L., Aulabaugh, A. & Huang, X. (2006) Kinetic characterization of recombinant human acidic mammalian chitinase, *Biochemistry.* **45**, 4444-54.
 56. Tabata, E., Kashimura, A., Wakita, S., Ohno, M., Sakaguchi, M., Sugahara, Y., Kino, Y., Matoska, V., Bauer, P. O. & 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.
 57. Tabata, E., Kashimura, A., Wakita, S., Ohno, M., Sakaguchi, M., Sugahara, Y., Imamura, Y., Seki, S., Ueda, H., Matoska, V., Bauer, P. O. & 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.

58. Wakita, S., Kobayashi, S., Kimura, M., Kashimura, A., Honda, S., Sakaguchi, M., Sugahara, Y., Kamaya, M., Matoska, V., Bauer, P. O. & Oyama, F. (2017) Mouse acidic mammalian chitinase exhibits transglycosylation activity at somatic tissue pH, *FEBS Lett.* **591**, 3310-3318.

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、小林元康教授、赤松憲樹准教授に心より感謝申し上げます。

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。