

高分子基質を使用したほ乳類キチナーゼの活性の評価

Evaluation of chitinolytic activities of mammalian chitinases using high molecular weight substrates

○木村将大*, 梅山隆敏, 脇田悟誌, 大川一明, 坂口政吉, 小山文隆
工学院大学先進工学部生命化学科

ほ乳類は自身でキチンを生産していないにもかかわらず, キトトリオシダーゼ (chitotriosidase, Chit1) と酸性ほ乳類キチナーゼ (acidic mammalian chitinase, AMCCase) の 2 種類の活性を有するキチナーゼを合成している。これらキチナーゼは同じ組織や細胞でも発現していることが知られている。我々は, 高分子基質を用い, マウス Chit1 と AMCCase を, 最も研究されている細菌の *Serratia marcescens* chitinase B (ChiB) と直接的に比較した。

キーワード: acidic mammalian chitinase, chitin, chitinase B, chitotriosidase, mammalian chitinases

キチンは, *N*-アセチル-D-グルコサミン (GlcNAc) が β -1,4 結合した多糖である。キチンは, 甲殻類や昆虫の外骨格, 寄生虫や真菌類の細胞壁の主要構成成分あり, セルロースに次いで二番目に豊富に存在するバイオマスである。

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酵素である。ほ乳類はキチンを合成しないにもかかわらず, キチナーゼを合成している。マウスとヒトでは, 活性を持つキチナーゼとして chitotriosidase (Chit1) と acidic mammalian chitinase (AMCCase) が同定されている。

Chit1 は, ほ乳類で最初に精製され, クローン化されたキチナーゼであり, 主に, 活性化したマクロファージや好中球で合成される。Chit1 活性が欠損しているヒトは少なからず認められる。Chit1 の活性を欠損したヒトでのキチナーゼの検索の結果, 活性を有するタンパク質が発見され, その等電点が酸性を示すことからこの酵素は acidic mammalian chitinase (AMCCase) と命名された。

Serratia marcescens はキチナーゼを高発現するグラム陰性菌である。*Serratia marcescens* は Chitinase A (ChiA), Chitinase B (ChiB) と Chitinase C (ChiC) の 3 つのキチナーゼを発現している。これらのキチナーゼは, 他の生物におけるキチン分解およびキチン分解酵素系の分子メカニズムを解明するために広く使用されている。

Chit1 と AMCCase は異なる病態で発現量が増加することから注目されている。Chit1 は, ゴーシェ病, 慢性閉塞性肺疾患 (COPD), アルツハイマー病, アテローム性動脈硬化症, 喫煙者などの疾患で発現が上昇する。他方, AMCCase は喘息やアレルギーにおいて発現量が増加する。しかし, これらの疾患や病態における病態生理学的なほ乳類キチナーゼの役割は未だ明らかになっていない。

Fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis (FACE) 法はオリゴ糖の還元末端を蛍光標識し, 検出する方法である。我々が改良した FACE 法は, キチンオリゴ糖を特異的に検出し, 50 nmol までの定量性がある。

この研究では, Chit1 と AMCCase をより研究されているキチナーゼである *Serratia marcescens* の ChiB と高分子量キチン基質を用いて比較した。それぞれの酵素を高分子基質と作用させ, その分解産物を FACE 法で解析した。その結果, AMCCase は pH 2, Chit1 は pH 5 で最大活性を示した。両酵素を比較すると, AMCCase は強酸性で高い活性を示し, pH 5 での活性も ChiB の最大活性に匹敵するほどであった。この結果から, ほ乳類キチナーゼの位置づけを明確にする事ができた。また, ほ乳類キチナーゼは pH の違いで役割が異なることが示唆された。