

2017 年 2 月 24 日

論文審査要旨

化学応用学専攻 主査 小山文隆
副査 今村保忠
南雲紳史
澤村直哉

化学応用学専攻博士課程 3 年の大川一明氏より申請のあった学位請求論文「ヒト酸性ほ乳類キチナーゼの活性喪失と復活に関する研究」に対し、2017 年 2 月 16 日に、主査 小山文隆、副査 今村保忠、南雲紳史、澤村直哉（早稲田大学）出席のもと、公開発表会を開催した。大川一明氏より、口頭の発表があり、その後質疑を行った。

本学位論文での研究対象は、ヒト酸性ほ乳類キチナーゼ (acidic mammalian chitinase, AMCCase) で、研究では、遺伝子工学的、進化学的解析手法を用いてヒト AMCCase の活性に関する詳細な解析が行われている。この酵素は、キチン (N-acetyl D-glucosamine のポリマー) の加水分解を触媒し、喘息、アレルギー性炎症、食物消化にかかわる。大川氏は、ヒト AMCCase について、進化の過程で nonsynonymous single-nucleotide polymorphisms (nsSNPs) によってコードされた 61 番目のアミノ酸が Arg に置換されたことが不活性化の原因であることを明らかにしている。そして、そのアミノ酸を Met に置換することで、活性を著しく上昇させることが出来ることを示している。さらに、この 61 番目の Met が、ヒトとオランウータンを除くほ乳類で保存されていることも示している。このように、1 アミノ酸を置換することで、酵素の不活性化と再活性化が可能であることを明らかにしている。

論文は全 5 章で構成されている。第 I 章は研究の背景で、キチン、キチナーゼ、ほ乳類キチナーゼ、AMCCase の生物・医学的役割、そして本研究の目的について述べられている。

第 II 章は、ヒト AMCCase の活性の喪失について述べられている。大川氏は、マウスとヒトの AMCCase を大腸菌のペリプラズム空間に発現させた。そして、ヒト AMCCase のキチナーゼ活性が、マウス AMCCase より著しく低下していたことを示した (活性の喪失)。次に、大川氏は、遺伝子工学的手法を駆使し、ヒト AMCCase の活性中心を含む N 末端側の領域がその活性喪失に関わることを明らかにした。

第 III 章は、nsSNPs を利用した AMCCase の活性の復活について述べられている。大川氏は、まず、ヒト AMCCase の活性中心を含む N 末端側の領域に存在する nsSNPs にコードされたアミノ酸置換がキチナーゼ活性に強い影響力を

持つことを明らかにした。そして、マウス AMCCase (この分子は強いキチナーゼ活性を持っている) に保存されている 5 アミノ酸を含む新規分子の variant C/B を創成した。この新規ヒト AMCCase が、マウス AMCCase に匹敵するようなキチナーゼ活性を有することを示した。つまり、最小限の遺伝子操作で、ヒト AMCCase の再活性化に成功した。さらに、マウス AMCCase の 61 番目の Met を Arg に置換するとキチナーゼ活性が喪失することから、61 番目のアミノ酸がキチナーゼ活性に重要であることを明らかにした。

第 IV 章では、AMCCase の進化的解析について述べられている。進化的解析から、AMCCase の 61 番目の Met は、ヒトやオランウータンを除いた他の霊長類やほ乳類で保存されていることを明らかにした。オランウータンの AMCCase は 61 番目が Ile であり、このアミノ酸もマウス AMCCase に導入した際に、そのキチナーゼ活性を失った。これらのことから、61 番目の Met は、AMCCase のキチナーゼ活性にとって重要なアミノ酸残基であることが示され、さらに、ヒト AMCCase 分子全体が、進化の過程で、機能的制約が緩和されていることも明らかにした。

第 V 章は、総合考察で、本研究の意義について述べられている。本研究では、ヒト AMCCase のキチナーゼ活性の喪失と活性化を調べてきた。ヒト AMCCase のキチナーゼ活性の喪失は、この分子が進化の過程で機能を失い、偽遺伝子化しつつあることを示している。偽遺伝子化は、ゲノムレベルで起こる進化的現象で、環境の変化に対応するため、遺伝子にアミノ酸置換が入り、機能喪失に至ったと推定している。

Seibold らの集団遺伝学的解析で、AMCCase の nsSNPs である G339T (Arg61Met) は、喘息に対して保護的に働くと報告されている。本研究では、Met 61 が、機能獲得的な強いキチナーゼ活性に関係することを明らかにした。本研究の成果と Seibold らの先行研究で、喘息の抑制には AMCCase のキチナーゼ活性が深くかかわる可能性を強く示している。

以上をまとめると、大川氏は、機能喪失したヒトのキチナーゼで置換しているアミノ酸を明確にし、活性が高いほ乳類キチナーゼで保存されているアミノ酸に置換することで、不活性酵素の再活性化に成功している。この概念は、最小限の遺伝子操作で、他の不活性化酵素の再活性化にも応用できる。さらに、活性化したヒト AMCCase は、喘息、アレルギーなど、AMCCase がかかわる様々な疾患の治療法、補充療法の開発に用いることが出来る。

本学位論文は、不活性酵素の再活性化について、生命工学的に新規の知見を提供し、医学領域においても大きな影響を与えるものである。以上のことから、本論文は博士 (工学) の学位請求論文として充分価値があり、合格と判断できる。

博士学位論文要旨

ヒト酸性ほ乳類キチナーゼの 活性喪失と復活に関する研究

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	bd14001
氏名	大川 一明
指導教員	小山 文隆 教授

目次

- 第 I 章 研究の背景
- 第 II 章 ヒト AMCase の活性の喪失
- 第 III 章 Nonsynonymous SNPs を利用した AMCase の活性の復活
- 第 IV 章 AMCase の進化的解析
- 第 V 章 総合考察
- 第 VI 章 結論

I 章 序論

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、甲殻類や昆虫の外骨格、寄生虫や真菌類の細胞壁に主要成分である。キチンの構造は、セルロースと類似の構造であるが、2 位炭素の水酸基がアセトアミド基になっている。

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。細菌類、真菌類、植物、線虫と節足動物など様々な生物は、キチナーゼを合成している。これらのキチナーゼは、キチンを分解することで、自身の防御あるいは炭素、窒素、エネルギー源として利用することに重要であると考えられている。

ほ乳類はキチンを合成しないにもかかわらず、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, AMCase) の二種類を合成している。両酵素は糖質加水分解酵素のファミリー 18 に属しており、触媒ドメインのアミノ酸配列に類似性が有り、 $(\beta/\alpha)_8$ -TIM バレルの基本構造を持つ一群のグループで、細菌類キチナーゼに高い配列相同性を示す。このファミリーには、キチナーゼに構造が似ているがキチナーゼ活性を欠損しているキチナーゼ様タンパク質 (chitinase-like proteins) が含まれている。

Chit1 の活性は、常染色体劣性遺伝のリソソーム蓄積症である Gaucher 病で顕著に上昇すると報告されている。Chit1 は最初のほ乳類のキチナーゼで、最初に精製、クローン化された分子である。Chit1 の生理的役割は不明だが、キチンを含む病原体からの防御が考えられている。劣性遺伝性の Chit1 活性の欠損は、コーカサス人 (白人) で一般的に観察される。

もう一つのほ乳類キチナーゼである AMCase は、酸性の等電点から、酸性ほ乳類キチナーゼ (acidic mammalian chitinase, AMCase) と命名された。AMCase は

50 kDa の酵素で、マウスの胃と肺で発現している。AMCase は、特定の病態下で過剰発現することから注目されている。例えば、AMCase mRNA とタンパク質レベルの上昇は喘息モデルマウス、抗原誘導性のアレルギー性喘息モデルマウスで見られる。ヒトにおいて、AMCase はアレルゲンを暴露した喘息患者の肺、および喘息患者の肺胞マクロファージで増加する。さらに、ヒト AMCase では、一塩基多型 (single nucleotide polymorphisms, SNPs) に基づく AMCase variants が同定されている。ヒト AMCase では特定の多型と気管支喘息のハプロタイプとの連関が報告されている。しかし、ヒトにおける AMCase のキチナーゼ活性の遺伝的制御に関する知識はとても限られており、生体内での生物・医学的役割もほとんど分かっていない。

ヒト AMCase は、マウス AMCase とアミノ酸配列の相同性が 90% で、よく似ている。しかし、ヒトとマウス AMCase では、その性質がかなり異なる。加えてヒト AMCase には、アミノ酸置換を伴う一塩基多型 [non-synonymous SNPs (nsSNPs)] が存在する。ヒト AMCase variants のアミノ酸配列をマウス AMCase と比較すると、ヒト AMCase でのアミノ酸置換は、マウス AMCase のアミノ酸と一致している場合と、一致していない場合があった。

この研究において、大腸菌の系を用いヒトとマウス AMCase の酵素機能の比較と nsSNPs にコードされた AMCase variants によるキチナーゼ活性の変化について詳細に検討した。

第 II 章 ヒト AMCase の活性の喪失

ヒト AMCase は、マウス AMCase とアミノ酸配列の一次構造の相同性が 90% で、よく似ている。しかし、ヒト AMCase は、至適が pH 4 付近である

のに対して、マウス AMCase の至適が pH2 と性質が異なる。本研究において、ヒトとマウス AMCase を N 末端に Protein A, C 末端に V5 エピトープと (His)6 を付加した融合タンパク質 (ProteinA-AMCase-V5-His) として発現し、そのキチナーゼ活性の比較を行った。また、ヒト AMCase のキチン分解活性の減少の原因となる領域の決定するため、ヒトとマウス AMCase 間でキメラタンパク質を発現した。作製したヒト AMCase のキチナーゼ活性は、pH 2.0-4.0 において、マウス AMCase のそれぞれ約 1/75-1/11 だった。さらに発現したキメラタンパク質の結果からヒト AMCase の活性中心を含む N 末端領域が活性を著しく低下させていることが分かった。

第 III 章 Nonsynonymous SNPs を利用した AMCase の活性の復活

ヒト AMCase では複数の AMCase アミノ酸置換体 (variant) が一塩基多型を基に同定されており、ヒト AMCase では特定の多型と気管支喘息のハプロタイプとの連関が報告されている。この研究においてヒト AMCase のキチナーゼ活性が自然発生的な nsSNPs のアミノ酸置換によって酵素機能が変わるかどうかを検討した。ヒト AMCase のキチナーゼ活性に関わる触媒ドメインとヒンジ領域に存在する nsSNPs の影響を調べるため、3 種類の天然型の variants (A~C) と 1 種類の人工的な variant (C/B) を作製し、マウス AMCase のキチナーゼ活性と比較した。ここで使用したヒト AMCase variants には nsSNPs によるアミノ酸置換が 6 種類存在している。さらに、キメラタンパク質の結果からヒト

AMCase の N 末領領域の 3 アミノ酸置換 (N45D, D47N, R61M) が重要であると考え、この N 末領領域の 3 アミノ酸置換がマウス AMCase の酵素活性に影響を与えるか調べるためにマウス AMCase 変異体を作製し発現した。ヒト AMCase のキチナーゼ活性は 1 塩基置換にコードされたアミノ酸置換で変動した。特に、キメラタンパク質の結果から、ヒト AMCase の N 末領領域の 3 アミノ酸置換 (N45D, D47N, R61M) が、キチナーゼ活性に重要であることが明らかになった。加えて、マウス AMCase の M61R を変異させると著しくキチナーゼ活性が低下したことから、ヒトにおける M61R はキチナーゼ活性に高い影響を持っていることが強く示唆された。

第 IV 章 AMCase の進化的解析

マウス AMCase において M61R の置換によってキチナーゼ活性を喪失したことから、R61 がヒト AMCase のキチナーゼ活性の喪失の原因であることが分かった。そこでヒトとマウス以外のほ乳類 AMCase で 61 番目のアミノ酸は M であるかどうかを検証した。その際に AMCase のキチナーゼ活性にどのような影響が与えられるかを検討した。さらに 10 種のほ乳類の nonsynonymous SNPs と synonymous SNPs の比 (dN/dS) を比較した。61 番目の M はヒトとオランウータンではそれぞれ R と I に置換されており、どちらもマウス AMCase のキチナーゼ活性に大きな影響を与えた。このことから AMCase の 61 番目に存在する M が R に変異するのはヒトに特異的なことであり、61M は高いキチナーゼ活性を保持するのに必須のアミノ酸残基であることが分かった。さらに、AMCase の dN/dS はヒトのみ $dN/dS > 1$ となり、正の自然選択の状態であることが分かった。このことはヒト AMCase が進化の過程において機能的制約

が緩和されていることを示唆する。

第 VI 章 総合考察

本研究では、nsSNPs にコードされることによって生じたヒト AMCase variant のキチナーゼ活性を調べた。ヒト AMCase の活性は、マウスに存在しない特異的なアミノ酸によって顕著に減少した。Variant A と B はアミノ酸置換によって活性を失っている酵素と考えることが出来る。従って、ヒト AMCase は進化の過程で機能を失い偽遺伝子になったと推定される。この仮説は霊長類だけでなく遠縁のほ乳類との比較の結果からも裏付けられている。偽遺伝子化は遺伝子の機能喪失により表現型の適応のための機会を提供すると考えられてきたゲノムの進化現象である。

他の霊長類の AMCase 遺伝子が dN/dS の値が進化的現象において中立の値に近いのに対してヒト AMCase のみ dN/dS が高い。このことから、ヒト AMCase は進化の過程で機能的喪失を起こし、未知の表現形の適応が起きている可能性が高い。また、マウス AMCase と比較したとき、ヒト AMCase のキチナーゼ活性が減少しているのに加えて、胃の組織においても mRNA の発現量が相対的に減少している。これは現代人がキチン含有食物を大量に消費しないことから考えられることである。そして多くの胃の疾患は、外因性の生物による感染に関連している。ピロリ菌の感染に関連した胃炎の重症度は内在性のキチナーゼの活性に関係している可能性がある。このことから、ヒトの胃での AMCase のキチナーゼ活性が低いことに関連した胃の疾患への応答に関してはまだ不明な点が多い。

Max Seibold の先行研究において、酵素活性部位のコード領域付近にある新規

の variant (A290G, G296A, G339T) を含む 8 つの nsSNPs が同定されている。加えて、集団遺伝学的解析から AMCase variant G339T (R61M) は喘息に対して保護的に働くと報告されている。本研究において、AMCase の61番目に存在する M はヒトとオランウータンを除く多くほ乳類で完全に保存されていた。加えて、M61R と M61I は野生型マウス AMCase のキチナーゼ活性の著しい減少を引き起こした。つまり、本研究や Max Seibold の先行研究における喘息に対して保護的に働くヒト AMCase G339T (R61M) はキチナーゼ活性を保持した AMCase であることを示した。

また最近の研究でネアンデルタール人とデニソワ人のゲノムが配列決定されている。それらが AMCase 遺伝子において M61 あるいは R61 を有するかどうかを決定することは興味深いことである。

この研究において不活性化していたアイソフォームを組み合わせることでヒト AMCase の再活性化を実現できた。マウス AMCase のアミノ酸配列とともよく保存された variant C/B は高い活性を有し、マウス AMCase と似た pH 依存性であった。これらの結果は酵素に導入された特異的アミノ酸置換はその活性を低下させる（特に、M61R および M61I 置換はキチン分解活性に重要である）が、一方で活性を保持している酵素において保存されたアミノ酸の存在はヒト AMCase をマウス AMCase 並みに再活性化する。それに加え、この研究ではヒト AMCase のキチン分解活性を低下させる原因となる nsSNPs によって特定のアミノ酸を決定した。ここでのコンセプトの概略は将来、最小の遺伝子操作による酵素活性の増強に利用することができる。

第 VII 章 結論

AMCase は、喘息とアレルギー性炎症、食物消化に関わっている。しかし、AMCase のキチナーゼ活性の遺伝的制御に関する知見は、とても限られていた。ヒト AMCase のキチナーゼ活性は、マウス AMCase に比べ、著しく低下していた。さらに、ヒトとマウスで AMCase のキメラタンパク質を作製することで、ヒト AMCase のキチナーゼ活性が活性中心を含む N 末領域が存在することで低下していることを明らかにした。

ヒト AMCase に存在する nsSNPs にコードされたアミノ酸置換はキチナーゼ活性に影響を与えていることを明らかにした。ヒト AMCase は、N45, D47, R61 をマウス AMCase のアミノ酸配列において保存されている D45, N47, M61 に置換することによってキチナーゼ活性を著しく上昇させることができた。他方、マウス AMCase のキチナーゼ活性は M61R 変異を導入することで顕著に減少させることができた。

さらに、AMCase の M61 は、ヒトやオランウータンを除いた他の霊長類やほ乳類で保存されていた。オランウータンの AMCase は 61I であり、これもマウス AMCase に置換してもキチナーゼ活性を低下させたことから、M61 は、AMCase のキチナーゼ活性にとって重要なアミノ酸残基であることが示された。

以上、本博士学位論文の結論として、ヒト AMCase キチナーゼ活性が nsSNPs によって制御され、高い活性を有したヒト AMCase variant のアミノ酸置換は、マウス AMCase のアミノ酸配列と一致することを明らかにした。

Studies on loss and gain of human acidic mammalian chitinase activity

Kazuaki Okawa

Biotechnology Laboratory, Graduate School of Engineering, Kogakuin University

Chitinase is responsible for chitin metabolism in a wide range of organisms, including bacteria, fungi, nematodes and arthropod. Despite the absence of endogenous chitin, humans and mice express two active chitinases, chitotriosidase (Chit1) and acidic mammalian chitinase (AMCase). First mammalian chitinase, Chit1, was identified in Gaucher disease patients. AMCase, encoded by the *CHIA* gene, was the second discovered mammalian chitinase and was named for its acidic isoelectric point. AMCase has been shown to be implicated with asthma, allergic inflammation and food processing. Little is known about genetic and evolutionary regulation of chitinolytic activity of AMCase. In this study, I show that human AMCase has lost its chitinolytic activity by non-synonymous single-nucleotide polymorphisms (nsSNPs) during evolution and that it can be reactivated by introducing amino acids conserved in the mouse homologue. The chitinolytic activity of the recombinant human AMCase was significantly lower than that of the mouse counterpart. Construction and expression of mouse-human chimeric AMCase protein revealed that the presence of the N-terminal region of human AMCase containing conserved active site residues reduced the enzymatic activity of the molecule. The chitinolytic activity of human AMCase was significantly reduced in the presence of amino acid substitutions encoded by nsSNPs (N45, D47 and R61), which are not present in the mouse counterpart. On the other hand, the activity of the human enzyme was recovered by introductions of amino acids conserved in the mouse homologue (D45, N47 and M61). For abolition of the mouse AMCase activity, introduction of M61R mutation was sufficient. M at the position 61 is highly conserved in the many mammals other than orangutan and humans. Orangutan has I61 substitution, which also markedly reduced the activity of the mouse AMCase, indicating that the M61 is a crucial residue for the chitinolytic activity. Altogether, their data suggest that human AMCase has lost its chitinolytic activity by integration of nsSNPs during evolution and that the enzyme can be reactivated by introducing amino acids conserved in the mouse counterpart.