

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：31201

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20574

研究課題名（和文）病原性真菌に対するほ乳類キチナーゼの生体防御機能の解明

研究課題名（英文）Biological defense function of mammalian chitinases against pathogenic fungi.

研究代表者

木村 将大 (Kimura, Masahiro)

岩手医科大学・医学部・任期付助教

研究者番号：80910215

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：キチンはアスペルギウスやカンジダなどの病原性真菌の細胞壁の主要な構成成分である。ほ乳類は2種類のキチナーゼ[chitotriosidase (Chit1), acidic mammalian chitinase (AMCase)]を発現している。キチンを化学処理して得られたキチンオリゴマーは自然免疫を増強する機能をもつことが報告されており、本研究ではこの知見からはほ乳類キチナーゼが病原性真菌に含まれるキチンを分解し、その過程で生成されたキチンオリゴマーが自然免疫を増強すると仮説をたて、研究を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

キチンはセルロースの次に豊富に存在する糖である。これまで、化学的処理によって生成されたキチンオリゴマーでは自然免疫の増強が報告されてきた。ほ乳類は生体内にキチンを分解する酵素を保有するが、それらがどのように病原体に対して機能するのか明らかになっていなかった。本研究で、ほ乳類キチナーゼが自然免疫を増強するキチンオリゴマーを生成することが明らかになれば、ほ乳類キチナーゼの生体内での生体防御機構の一端を担うメカニズムが明らかになる、豊富に存在するキチンの有効利用方法として、キチンオリゴマーでの免疫増強など利用方法の安全性を意味する、ことになる。

研究成果の概要（英文）：Chitin is a major component of the cell wall of pathogenic fungi such as *Aspergillus* and *Candida*. Mammals express two types of chitinases [chitotriosidase (Chit1) and acidic mammalian chitinase (AMCase)]. Chitin oligomers obtained by chemical treatment of chitin have been reported to enhance innate immunity. Based on this finding, we hypothesized that mammalian chitinase degrades chitin in pathogenic fungi and that the chitin oligomers produced in the process enhance innate immunity.

研究分野：酵素学

キーワード：AMCase Chit1 Chitin Chitin oligomer 自然免疫 糖質分解酵素 炎症性サイトカイン 真菌感染

1. 研究開始当初の背景

キチンは *N*-アセチル-D-グルコサミンが重合した多糖類であり、病原性真菌の細胞壁の主要な構成成分である [1]。ほ乳類ではキチン分解酵素である chitotriosidase (Chit1) と acidic mammalian chitinase (AMCase) (ほ乳類キチナーゼ) がマクロファージや好中球内に発現するが、その役割は不明である [2-6]。キチンを化学処理して得られたキチンオリゴマーは自然免疫を増強する [6]。しかし、生体内でほ乳類キチナーゼが生理活性を有するキチンオリゴマー生成した報告はない。本研究では、ほ乳類キチナーゼが生体内で自然免疫を増強するキチンオリゴマーを生成すると仮定し実験を行った。

2. 研究の目的

本研究では、ほ乳類キチナーゼがキチンオリゴマーを生成するかを明らかにし、さらに生成されたオリゴマーを免疫細胞に作用させ、自然免疫を増強するかを調べる。すなわち本研究の目的は、ほ乳類キチナーゼは、マクロファージが病原性真菌に作用しキチンオリゴマーを生成することで、自然免疫を活性化する役割をもつかを明らかにすることである (図1)。

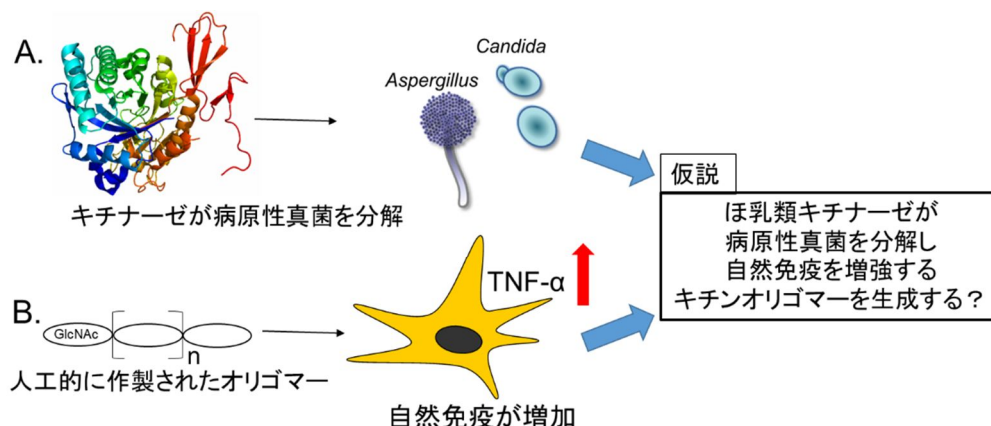


図 1. これまでの研究からの仮説

3. 研究の方法

- 1) ほ乳類キチナーゼを様々なキチン、キトサン (キチンを脱アセチル化したもの) 基質やそれぞれのオリゴマーに作用させ、キチンオリゴマーが生成される条件を検証する。
- 2) 生成されたキチンオリゴマーを、マウスの免疫細胞に作用させ、自然免疫を増強するサイトカインやシグナルが動くかどうかを検証する。
- 3) キチンオリゴマーによって自然免疫が増強された場合、その細胞の変化を詳細に明らかにし、病原性真菌に感染した際の影響を調べる。

4. 研究成果

1. ほ乳類キチナーゼによるオリゴマーの生成

一の生成

いくつかの予備実験の結果、既に Chit1 が自然免疫の増強が確認されている六量体以上のキチンオリゴマーを生成することを明らかにした (Kimura 未発表データ)。

また、AMCase を、キチンを脱アセチル化したキトサンに作用させた。その結果、様々な長さのキトオリゴ

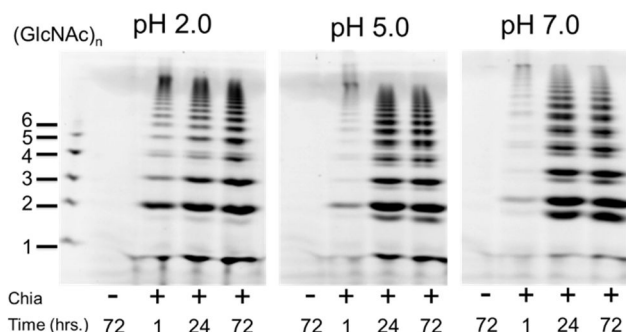


図 2. AMCaseは各pHでキトオリゴマーを生成した

マーを生成した(図2)[研究業績 雑誌論文 (1)]。キチンオリゴマー同様にキトサンを化学処理して得られたキトオリゴマーでも整理活性が報告されている。また、一部の病原性真菌はキチン脱アセチル化酵素を有していることから、キトサンを保持している可能性もある。今回、AMCaseがキトオリゴマーを生成したことから生体防御機構に関わる可能性が示唆された。しかし、真菌がキトサンを保持するか、そのキトサンは感染時に影響するかは今後の課題である。

2. オリゴマーによる免疫細胞への作用

ほ乳類キチナーゼによって生成したオリゴマーをマウスから採取した免疫細胞に作用させ、サイトカインの増減を検証した。その結果、TNF- α などの炎症性サイトカインの上昇が見られた(Kimura 未発表データ)。このことから、これらのオリゴマーが自然免疫を増強する可能性を見出した。さらに詳細にオリゴマーを作用させた免疫細胞の活性化メカニズムを調べようとしたが、いくつかの Cell line では活性化後の変化が、マウス由来の免疫細胞と異なった。このため、Cell line の遺伝子上にキチンオリゴマーと関与するものが足りないもしくは過剰に発現している可能性が示唆された。現在、この原因を調べている。

3. キチナーゼを用いたオリゴマー定量系の確率

既に我々はキチン分解産物の検出と定量する方法としてFACE法を確立している。しかし、この方法は電気泳動で分解産物を分離してから定量するため、系全体のキチン分解産物の量を定量できない。ほ乳類キチナーゼにより生成したオリゴマーを免疫細胞に作用させる際に安定的に供給するために、もう一つの定量法を作

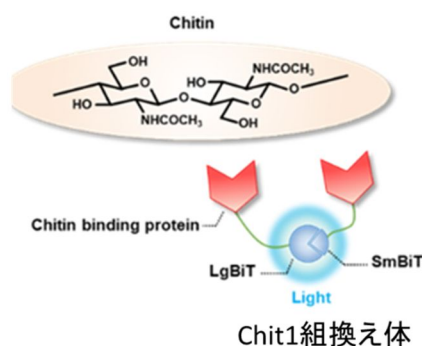


図 3. ほ乳類キチナーゼによるキチンの定量系

製した。ヒト Chit1 に変異を加え、さらにルシフェラーゼで検出できる組換え体を用いて、ELISA 様のキチン検出系を作製した[研究業績 雑誌論文 (2)]。この方法と FACE 法を用いることで、「2. オリゴマーによる免疫細胞への作用」実験の再現が安定して取れるようになった。

4. その他(ほ乳類キチナーゼの取得方法の改良)

キチンオリゴマーの自然免疫増強メカニズムの解明のためには多量のキチンオリゴマーが必要である。そのためにはキチンオリゴマー生成のためのほ乳類キチナーゼも相当量必要となる。また、これまで使用してきたほ乳類キチナーゼの発現系には黄色ブドウ球菌由来の ProteinA が付加されていた。過去に ProteinA を除いた場合、うまくフォールディングが取れなかったからである。しかし、ProteinA は IgG にするなど免疫細胞に作用させると不具合が生じる可能性がある。余計な懸念材料を消すため最新の大腸菌での発現系の技術を用いて、新たに ProteinA を除いたほ乳類キチナーゼの大腸菌での発現系を構築した。これにより従来の 10 倍以上の酵素の取得が可能となった。現在、この結果をまとめ論文の投稿準備を進めている。

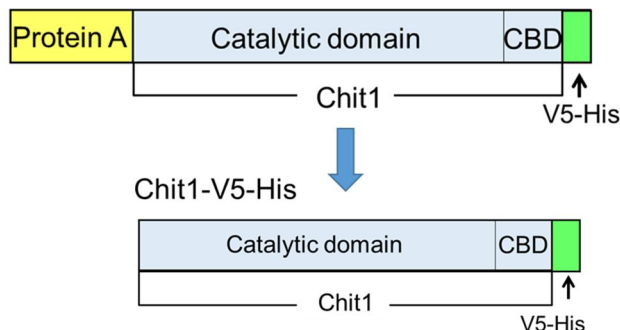


図 4. ProteinAを除いた発現系の構築

参考文献

1. Lee et al. (2011) *Annu Rev Physiol* 73, 479-5012.
2. Renkema et al. (1995) *J Biol Chem* 270, 2198-2202.
3. Hollak et al. (1994) *J Clin Invest* 93, 1288-1292.
4. Zhu et al. (2004) *Science* 304, 1678-1682.
5. Reese et al (2007) *Nature* 447, 92-96
6. Koch et al. (2015) *Glycobiology* 5, 469-482.
7. Wagener et al. (2014) *PLoS Psthog* 10, e1004050.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yamanaka Daisuke, Suzuki Kento, Kimura Masahiro, Oyama Fumitaka, Adachi Yoshiyuki	4. 巻 282
2. 論文標題 Functionally modified chitotriosidase catalytic domain for chitin detection based on split-luciferase complementation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Carbohydrate Polymers	6. 最初と最後の頁 119125 ~ 119125
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.carbpol.2022.119125	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Wakita Satoshi, Sugahara Yasusato, Nakamura Masayuki, Kobayashi Syunsuke, Matsuda Kazuhisa, Takasaki Chinatsu, Kimura Masahiro, Kida Yuta, Uehara Maiko, Tabata Eri, Hiraoka Koji, Seki Shiro, Matoska Vaclav, Bauer Peter O., Oyama Fumitaka	4. 巻 26
2. 論文標題 Mouse Acidic Chitinase Effectively Degrades Random-Type Chitosan to Chitooligosaccharides of Variable Lengths under Stomach and Lung Tissue pH Conditions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 6706 ~ 6706
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/molecules26216706	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 木村将大, 渡邊堯, 関根一孝, 石塚ひとみ, 池尻碧, 坂口政吉, 山中大輔, 小山文隆
2. 発表標題 ヒトとマウスキトトリオシダーゼの活性とアミノ酸配列比較
3. 学会等名 第35回日本キチン・キトサン学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鈴木健斗, 山中大輔, 木村将大, 小山文隆, 安達禎之
2. 発表標題 機能改変型ヒトキトトリオシダーゼを用いた高感度キチン検出方法の開発
3. 学会等名 第142回日本薬学会（名古屋）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 木村将大, 渡邊堯, 関根一孝, 石塚ひとみ, 池尻碧, 坂口政吉, 山中大輔, 小山文隆
2. 発表標題 マウスキトトリオシダーゼを基準とした活性比較
3. 学会等名 第36回日本キチン・キトサン学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 権来悟, 萩原佳輔, 笠原駿輔, 木村将大, 加藤学, 景山心悟, 生田智樹, 松野研司, 大野修
2. 発表標題 スズメバチに含まれる新規生物活性物質の単離と機能解析
3. 学会等名 第67回日本応用動物昆虫学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 笠原駿輔, 権来悟, 萩原佳輔, 木村将大, 加藤学, 景山心悟, 生田智樹, 松野研司, 大野修
2. 発表標題 スズメバチ由来新規キチナーゼ阻害剤の単離, 合成と機能解明
3. 学会等名 日本化学会第103春季年会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------