

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23380062

研究課題名(和文)キチナーゼ様タンパク質の機能を鍵としたアロサミジン類の抗喘息作用の分子機構解析

研究課題名(英文)Analysis of molecular mechanism of anti-asthmatic activity of allosamidin by focusing the function of chitinase-like proteins

研究代表者

作田 庄平 (Shohei, Sakuda)

東京大学・農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：80192087

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,000,000円、(間接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：キチナーゼ阻害物質アロサミジンの示す抗喘息作用の機能解析を行うため、アロサミジンのターゲット分子と推定されるキチナーゼ(AMCase)およびキチナーゼ様タンパク質(BRP39、Ym1、Ym2)の組換えタンパク質および新規アロサミジンプローブを調製し、4種全てのタンパク質がアロサミジンと10-100 nM程度のKd値で結合することを示した。BRP39がマウスプライマリー細胞に対して細胞死保護作用を有することを見出し、その作用に対してアロサミジンは阻害活性を示さないことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Allosamidin, a chitinase inhibitor, shows anti-asthmatic activity toward model mice. Chitinase (AMCase) and chitinase-like proteins (BRP39, Ym1, and Ym2) are possible candidates as target molecules for anti-asthmatic activity of allosamidin. To Recombinant protein of each of the four proteins was prepared and their binding activity toward allosamidin probes, which were newly prepared, was investigated. All the recombinant proteins bound to allosamidin with low Kd values around 10-100 nM. It was found that BRP39 shows protecting activity against death of mouse primary cells. Allosamidin did not inhibit the activity of BRP39 for the cells.

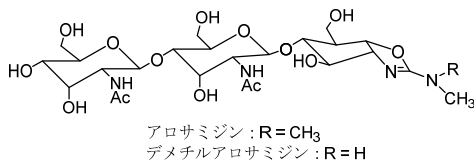
研究分野：生物有機化学

科研費の分科・細目：農芸化学・生物生産化学・生物有機化学

キーワード：生物活性物質 喘息 キチナーゼ キチナーゼ様タンパク質 アロサミジン

### 1. 研究開始当初の背景

研究代表者が 1986 年に発見したアロサミジンは放線菌の代謝産物であり、キチンミミックの擬似三糖構造を有している。アロサミジンはファミリー 18 キチナーゼに、遷移中間体ホモログとして強く結合し、キチナーゼ活性を阻害する。ほぼ全ての生物はキチナーゼを生産することが知られているが、種々の生物におけるキチナーゼの生理的役割は様々である。アロサミジンは個々の生物におけるキチナーゼの役割の解明に用いられて来た。その中で近年、アロサミジンが喘息モデルマウスにおいて抗喘息作用を示すことが明らかとなった。哺乳類はキチンを生体成分として持たないことより、哺乳類の発現するキチナーゼの生理的役割は不明であるが、アロサミジンが抗喘息作用を示すことで哺乳類キチナーゼが喘息発症のメディエーターとして機能する可能性が示唆された。アロサミジンの抗喘息作用のターゲット分子の解明は新たな作用点を有する抗喘息剤の開発に有用であり、喘息発症メカニズム解明の基礎研究としても重要である。



抗喘息作用におけるアロサミジンのターゲット分子は当初、喘息マウスの肺において発現が誘導される哺乳類酸性キチナーゼ (AMCase) であるとされていた。しかし、研究代表者と連携研究者はアロサミジン類縁体であるデメチルアロサミジンがアロサミジンよりはるかに優れた抗喘息作用を示すことを、喘息モデルマウスを用いる実験で見出した。また、アロサミジン、デメチルアロサミジンの抗喘息活性の違いは、AMCase のキチナーゼ活性に対する阻害活性の違いによるものではないことを明らかにした。即ち、ターゲット分子が AMCase だけであるとの考えでは、デメチルアロサミジンの強い抗喘息作用は説明できず、抗喘息作用において重要なアロサミジン類のターゲット分子が別に存在することが示唆された。

そこで新たなターゲット分子を、喘息モデルマウスの肺胞洗浄液中に探索することにした。ピオチン残基が結合したアロサミジン類のフォトアフィニティープローブを合成し、結合するタンパク質を同定したところ、マウスのキチナーゼ様タンパク質の一つである Ym1 がアロサミジンと結合する分子として同定された。キチナーゼ様タンパク質はキチナーゼと同じ構造を有するが、キチナーゼ活性に必須の酸性アミノ酸残基が他のアミノ酸に置換しておりキチナーゼ活性を欠

失している。しかし、多くのキチナーゼ様タンパク質はキチンやキチンオリゴ糖と結合する性質は保持している。マウスやヒトは数種のキチナーゼ様タンパク質を持ち、それらの発現が認められるが、キチナーゼ様タンパク質の生理的役割はキチナーゼと同様に不明である。

研究代表者らが、上述のアロサミジンの抗喘息作用に関する研究を行っている間に、哺乳類キチナーゼおよびキチナーゼ様タンパク質と喘息との関連についての論文が数多く出された。特に、マウスキチナーゼ様タンパク質の一つである BRP39 およびそのヒトでのホモログである YKL40 が、喘息発症機構に強く関与していることを示唆するデータが多く出された。

### 2. 研究の目的

喘息は、抗原によって活性化された Th2 細胞より分泌されるインターロイキン 13 (IL-13) が主なサイトカインとして機能し、そのシグナルが好酸球の活性化、ケミカルメディエーターの分泌を促し、気管支収縮等がおこり発症するとされる。アロサミジン類は IL-13 投与で誘導した喘息マウスにおいて好酸球の活性化等の喘息症状を緩和した。従って、アロサミジン類のターゲット分子は IL-13 の下流でシグナル分子として機能すると考えられる。また前述のように、アロサミジンはキチナーゼ分子に特異的に結合することより、そのターゲット分子候補として、キチナーゼおよびキチナーゼ様タンパク質が第一に考えられる。そこで、マウスの持つそれら分子について、IL-13 によって発現が誘導されるかどうか調べたところ、AMCase と 3 種のキチナーゼ様タンパク質 (Ym1、Ym2、BRP39) の発現が上昇することが分かった。

以上より本研究では、アロサミジン類の抗喘息作用機構を明らかにすることを目的に、それらのターゲット分子である可能性が高い、AMCase、Ym1、Ym2、および BRP39 とアロサミジン類との相互作用を調べることにした。それらタンパク質に対する、アロサミジンとデメチルアロサミジンの結合活性の違いが見られる場合は、両者の抗喘息活性の違いを探る手がかりになると考えられる。また、それらタンパク質の示す生理活性に対するアロサミジン類の作用を調べることとした。

### 3. 研究の方法

AMCase、Ym1、Ym2、および BRP39 とアロサミジン類との相互作用を調べるために、それらの組換えタンパク質とアロサミジンプローブを調製した。

His タグを付した組換え Ym1 において凝集が見られたため、GST 融合タンパク質として大腸菌 BL21(DE3)株を宿主として大量発現を行ったところ、GST-AMCase、GST-Ym1、

GST-Ym2、GST-BRP39 のすべてにおいて発現したタンパク質が不溶性画分に検出された。そこで maltose binding protein (MBP) との融合タンパク質として同じ大腸菌株を用いて発現誘導を行ったところ、MBP-AMCase、MBP-Ym1、MBP-Ym2、MBP-BRP39 すべてにおいて可溶性画分に目的のタンパク質の発現が見られた。それぞれの組換えタンパク質を MBP アフィニティーカラムで精製した。

生体分子間相互作用解析装置 (Octet) を用いて相互作用解析を行うこととし、センサーチップに固定するアロサミジン類のプロープを調製した。以前に調製した SS-biotin プロープ以外に、スペーサー長を変えた PEG4-biotin および PEG12-biotin プロープを調製し解析に用いた。

マウス脾臓由来の CD4<sup>+</sup>脾細胞に TNF- $\alpha$  を添加してアポトーシスを誘導する系で、FITC 標識した Annexin V と propidium iodide (PI) で蛍光染色した細胞をフローサイトメトリーにより検出した。Annexin V<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup> の死細胞が継時的に増加することを見出し、その死細胞の増加に対する BRP39 とアロサミジン類の効果を調べた。

#### 4. 研究成果

4 種のタンパク質を、可溶化することが多いことが知られる MBP 融合タンパク質として調製した。発現用ベクターに pMAL-c5x を用い、大腸菌 BL21(DE3) 株を宿主として発現を行った。発現は条件検討により、MBP-AMCase、MBP-Ym1 および MBP-Ym2 では、IPTG 濃度 1 mM、誘導温度 26.5、誘導時間 30 分で行い、MBP-BRP39 では、0.25 mM、26.5、1 時間で行った。可溶性画分に得られた融合タンパク質を MBP のアフィニティーカラムで精製した。全てにつき目的の分子量を持つタンパク質のバンドが検出された。分解産物と考えられるマイナーなバンドが存在していたため、発現条件の再検討を行い、また、イオン交換等によるさらなる精製を試みたが、カラム担体へのタンパク質の吸着等により困難であった。そこで、図 1 に示した MBP 融合タンパク質がメジャーバンドとして存在する画分を今後の実験に用いることにした。それぞれの組換えタンパク質のキチナーゼ活性を測定したところ、MBP-AMCase に活性があり、その活性がアロサミジンにより阻害されることを確認した。

相互作用解析に用いるセンサーチップに、以前に調製したアロサミジン SS-biotin プロープ (図 2) を固定して組換えタンパク質との結合を調べたところ、非特異的結合が大きく特異的な結合の検出が困難であった。そこで、アロサミジン部位とビオチン残基間のスペーサー鎖長を変化させた PEG4-biotin および PEG12-biotin プロープを作製して解析に用いた (図 2)。それらプロープはアロサ

ミジン類より調製した非還元末端糖の 2 位 N-デアセチル体より調製した。

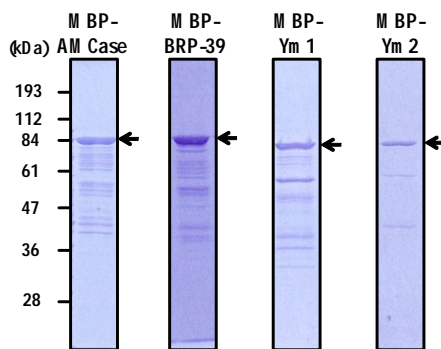


図 1 組換え体タンパク質の調製

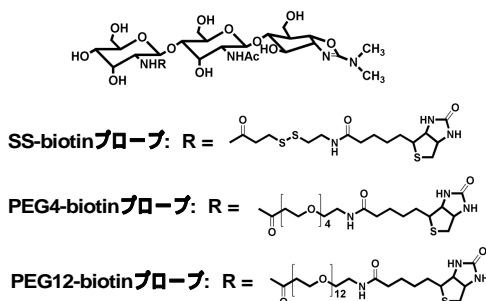


図 2 アロサミジンプロープ

分子間相互解析装置 Octet のセンサーチップに、調製したアロサミジンプロープを固定し、アナライトとして個々の組換えタンパク質を用いて相互作用解析を行った。PEG4-biotin プロープを用いた場合は特異的な結合は検出できなかったが、PEG12-biotin プロープではそれぞれの組換えタンパク質との特異的な結合を検出することができた。得られた結合曲線と解離曲線よりアロサミジン PEG12 プロープでの平衡解離定数 (Kd 値) を算出すると、MBP-AMCase で 30 nM、MBP-BRP39 で 20 nM、MBP-Ym1 で 120 nM、MBP-Ym2 で 20 nM であった。得られた Kd 値より、アロサミジンはそれぞれの組換えタンパク質と強く結合することが示された。Ym2、BRP39 とアロサミジンが結合することは今回初めて示された。デメチルアロサミジンプロープは現在作製しており、急ぎ組換えタンパク質との相互作用を調べ、アロサミジンプロープの場合との Kd 値の比較を行う予定である。

BRP39 の生理機能は不明であるが、マウス脾臓由来の CD4<sup>+</sup>脾細胞のアポトーシスを抑制するとの報告があり、また、IL-13 のレセプターである IL13Ra2 に結合するとの報告がある。そこで、BRP39 のそれら作用に対するアロサミジン類の影響を調べることにした。まず、CD4<sup>+</sup>脾細胞のアポトーシスの

検出を試みたが、死細胞の増加が早く、アポトーシス細胞数を目安にした BRP39 のアポトーシス抑制活性を検出することは困難であった。そこで試みに、死細胞の増加に対する MBP-BRP39 の作用を調べたところ、MBP-BRP39 が死細胞の増加を抑制する作用を有することが認められた。この BRP39 の細胞死抑制作用に対するアロサミジン類の影響を調べたが、アロサミジン、デメチルアロサミジンともに 160  $\mu$ M の高濃度においても BRP39 の細胞死抑制作用を阻害しなかった。また、His タグを付した IL13Ra2 の組換え体の発現系を構築し、MBP-BRP39 との結合実験を行ったが特異的な結合が検出できなかったため、現在 IL13Ra2 の組換え体調製法の検討を行っている。なお、BRP39 が IL13Ra2 に結合することを報告した Lee 教授の実験では、アロサミジンはそれらの結合を阻害しないとのプライマリーな結果が出ている (Lee 教授よりの私信)。

今回得られた結果より、アロサミジン類が AMCase、Ym1、Ym2、BRP39 に結合することは確かであると考えられる。それらタンパク質それぞれに関して、喘息発症に關与することが示唆されているため、アロサミジン類はそれぞれのタンパク質の作用を抑制する可能性を持つことが示された。しかし、それらタンパク質の中に喘息発症に關して特に重要な働きを有するものが存在するのかわかるとは不明である。デメチルアロサミジンが強く作用するタンパク質が存在することを示すことができればその手がかりが得られる可能性があると考えられる。BRP39 の細胞死抑制作用と IL13Ra2 結合活性をアロサミジンは阻害しないとの結果が現在のところ得られている。もし、BRP39 が示すそれらの活性が喘息発症の鍵となっているのであれば、アロサミジンの抗喘息作用におけるターゲットは別に存在することになる。今後、本研究で得られた結果をもとに、アロサミジン類の抗喘息作用の分子機構をさらに探っていく予定である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 5 件、すべて査読有)

- (1) Jae Youn Cho, Peter Rosenthal, Maria Miller, Alexa Pham, Seema Aceves, Shohei Sakuda, and David H. Broide, Targeting AMCase reduces esophageal eosinophilic inflammation and remodeling in a mouse model of egg induced eosinophilic esophagitis. *Int. Immunol.*, **18**, 35-42 (2014). 10.1016/j.tca.2013.04.022
- (2) Shiro Kitamoto, Kensuke Egashira, Toshihiko Ichiki, Xinbung Han, Sara McCurdy, Shohei Sakuda, Kenji

Sunagawa, and William A. Boisvert, Chitinase inhibition promotes atherosclerosis in hyperlipidemic mice. *Amer. J. Pathology*, **183**, 313-325 (2013). 10.1016/j.ajpath.2013.04.003

- (3) Shohei Sakuda, Hiromasa Inoue, and Hiromichi Nagasawa, Novel biological activities of allosamidin. *Molecules*, **18**, 6952-6968 (2013). 10.3390/molecules18066952
- (4) Kristine Bistrup Eide, Silje Thoresen Lundmark, Shohei Sakuda, and Morten Sorlie, Thermodynamic analysis of allosamidin binding to the human chitotriosidase, *Thermochimica Acta*, **565**, 146-150 (2013). 10.1016/j.intimp.2013.10.026
- (5) Yosuke Sato, Shigeo Suzuki, Seiko Muraoka, Naoya Kikuchi, Naotaka Noda, Takafumi Matsumoto, Hiromasa Inoue, Hiromichi Nagasawa, and Shohei Sakuda, *Bioorg. Med. Chem.*, **19**, 3054-3059, 2011. 10.1016/j.bmc.2011.04.012

[学会発表](計 5 件)

- (1) 桑田一平、井上博雅、作田庄平他 4 名、キチナーゼ/キチナーゼ様タンパク質に着目したアロサミジン類の抗喘息作用の解析、日本農芸化学会 2014 年度大会、2014 年 3 月 28 日、神奈川県
- (2) 作田庄平、Novel biological activities of allosamidins, 10<sup>th</sup> Asia-Pacific Chitin & Chitosan Symposium, 2013 年 10 月 6 日、米子 (招待講演)
- (3) 桑田一平、井上博雅、作田庄平他 5 名、Studies on the target molecules of allosamidins in their anti-asthmatic activity, 10<sup>th</sup> Asia-Pacific Chitin & Chitosan Symposium, 2013 年 10 月 6 日、米子
- (4) 桑田一平、井上博雅、作田庄平他 5 名、抗喘息作用物質アロサミジン類の標的分子の探索、日本農芸化学会 2013 年度大会、2013 年 3 月 26 日、宮城県
- (5) 桑田一平、井上博雅、作田庄平他 3 名、アロサミジン類とキチナーゼ/キチナーゼ様タンパク質との相互作用解析、第 26 回キチンキトサンシンポジウム、2012 年 7 月 12 日、北海道

#### 6. 研究組織

- (1) 研究代表者  
作田 庄平 (SAKUDA SHOHEI)  
東京大学・大学院農学生命科学研究科・  
准教授  
研究者番号：80192087

- (2) 連携研究者

井上 博雅 (INOUE HIROMASA)  
鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・  
教授  
研究者番号：30264039