

氏名(本籍)	鈴木雅子(山梨県)		
学位の種類	博士(獣医)		
学位記番号	獣医博甲第107号		
学位授与年月日	平成14年3月13日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
研究科及び専攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻		
研究指導を受けた大学	岩手大学		
学位論文題目	血清中のキチン結合性タンパク質の構造と機能に関する研究		
審査委員	主査	岩手大学 教授	首藤文榮
	副査	帯広畜産大学 教授	齋藤篤志
	副査	岩手大学 教授	小林晴男
	副査	東京農工大学 教授	山根義久
	副査	岐阜大学 教授	平井克哉

論文の内容の要旨

キチンは、甲殻類の甲羅に多く含まれるN-アセチル-D-グルコサミンの重合体である。最近、キチンは、「創傷治癒促進効果」を持つ医用材料として注目され、獣医療領域でも広く使用されている。この効果について、キチンおよびその分解産物の直接作用を解明する研究が進んでおり、補体系の活性化、好中球の遊走性促進などの作用が報告されている。しかしながら、キチンに結合する因子の機能やキチンを消化する生体内因子についての研究は極めて少ない。キチンの物質吸着性や生体吸収性を考えると、キチンの直接作用に加えて、血清タンパク質のような内因性因子が関与する間接的作用も存在するであろうと考えられる。そこで、この研究では、キチンの医用材料としての利点および創傷治癒促進効果の発現と血清タンパク質との関連について考察した。

第一章では、キチンの低異物反応性に関わる因子について検討した。

キチンの創傷治癒促進効果の一つに、生体に対して強い刺激を持たないという点が上げられる。キチンおよびキチン様物質は哺乳類の体内には存在せず、寄生虫やカビ類の菌壁構成成分である。それにもかかわらず、キチンは強い異物反応や炎症反応を引き起こさない。キチンがなぜ低異物反応性の素材となりうるのか、その機構は明らかにされていない。キチン結合性分子の特性を調べた結果、ウシ血清中にはGlcNAcを認識するオプソニン化抑制因子が存在することが明らかになった。この因子について、血清中のキチン結合性タンパク質の中でもっとも含有量が多く、分子量が大きいことからCBPb01と名付け、同定と生物活性の解析を行った。CBPb01は、分子量、サブユニット構造、派生ペプチドのアミ

ノ酸配列、抗IgM抗体との反応性からIgMと同定された。ついで、CBPb01でザイモサンを処理したところ、オプソニン化ザイモサンの好中球に対する活性酸素産生能が抑制された。この抑制は0.1 M GlcNAcの添加により解除された。これらの結果は、CBPb01がザイモサン表面のGlcNAcに結合することでオプソニン活性を抑制していることを示唆している。すなわち、キチンが生体に対して低い異物反応性しか示さないのは、血清中にキチン結合性IgMが存在し、異物のオプソニン化を抑制するからであると考えられる。

第二章では、血清中のキチナーゼについて検討した。

キチンは生体内で分解されてキトオリゴ糖やGlcNAc単糖を産生し、これらの分解産物がキチンの創傷治癒促進効果の発現に大きな役割を果たしていることが知られている。しかし、キチンを分解する酵素に関する報告は少ない。そこで、キチン結合性タンパク質の中からキチン加水分解酵素キチナーゼの分離・精製と同定を試みた。ウシ血清中のキチン結合性タンパク質の一つCBPb04は、分子質量約50 kDaのタンパク質で、キチナーゼ活性を持っていた。CBPb04をコードしているcDNAは、1,419 bpのオープンリーディングフレームを持ち、21アミノ酸残基の分泌シグナルを含む472アミノ酸残基のタンパク質をコードしていた。CBPb04のmRNAは、ウシでは肝臓にのみ発現していた。この発現は、他のほ乳類のキチナーゼと明らかに異なっていた。また、CBPb04は内分泌型キチナーゼとして分泌されるが、そのアミノ酸配列は、内分泌型のヒト血清キチナーゼよりもヒトおよびマウスの外分泌型キチナーゼである消化管キチナーゼと高い相同性を示した。さらに、ニワトリのCBPb04ホモログ(CBPch04)を検索したところ、CBPch04は肝臓においても消化管においても発現が確認された。これらの結果から、多くの動物の体内にはキチナーゼが存在することが明らかになり、キチナーゼがキチンを分解してキトオリゴ糖を産生し、そのキトオリゴ糖がサイトカインの産生を誘導し、サイトカインが創傷治癒に関わる因子の合成を誘導するという系の存在が示唆された。

第三章は、その他のキチン結合性タンパク質について検討した。

ウシ血清中には少なくとも10種類以上のキチン結合性タンパク質が存在する。そこでCBPb01、CBPb04以外の3つのタンパク質について同定を行った。CBPb03は、その分子性状や酵素消化産物の質量解析からウシ血清アルブミンと同定された。キチンの創傷治癒促進効果の発現との関連は不明である。CBPb05は、その分子性状とN-末端のアミノ酸配列の解析から、アポリポプロテインA-I (apo A-I) と同定された。Superdex 200カラムによるゲルろ過において、IgGやアルブミンなど分子量の大きい分子と同一のピークに溶出されたことから、何らかの複合体を形成していたと考えられる。apo A-Iとキチンの創傷治癒促進効果の発現との直接的な関連は不明であるが、apo A-Iは単球の炎症関連因子の産生を抑制することが知られているから、キチンはapo A-Iを吸着し、濃縮して単球に作用させることで、キチン周囲における急激な炎症反応を抑制しているのかもしれない。CBPb06はその分子性状とN-末端のアミノ酸配列の解析から、C4aアナフィラトキシンと同定された。キチンを医用材料として使用すると、多量の滲出液が認められることが報告されている。C4aはこの滲出液の産生に関与していると考えられる。

以上の研究により、キチンの創傷治癒促進効果の発現にはキチン自身が持つ直接作用以外にもキチンに結合するタンパク質が介在する間接作用が存在することが明らかになった。これらの間接作用の解明は、キチンを用いた高品質な医用材料の開発に重要な知見を提供する。

審 査 結 果 の 要 旨

キチンは、「創傷治癒促進効果」を持つ医用材料として注目され、獣医療領域でも広く使用されている。この効果について、キチンおよびその分解産物の直接作用を解明する研究が進んでいる。しかしながら、キチンに容易に結合する生体分子が存在することや生体がキチンを消化して吸収することを考えると、血清タンパク質のような内因性因子が関与する間接的作用についての研究も必要である。

この研究では、申請者はキチンの創傷治癒促進効果に関わる因子として、キチンに結合する血清タンパク質の機能に注目している。キチンの創傷治癒促進効果の一つに、生体に対して強い刺激を持たないという点が上げられる。キチンおよびキチン様物質は哺乳類の体内には存在せず、寄生虫やカビ類の細胞壁構成成分である。それにもかかわらず、キチンは強い異物反応や炎症反応を引き起こさない。キチンがなぜ低異物反応性の素材となりうるのか、申請者は、まずその機構を調べ、ウシ血清中にはGlcNAcを認識するオプソニン化抑制因子が存在することを明らかにした。この因子について、血清中のキチン結合性タンパク質の中で最も含有量が多く、分子量が大きいことからCBPb01と名付け、分子性状、部分的な一次構造、免疫学的特性およびオプソニン化抑制活性を調べた。CBPb01は、分子量、サブユニット構造、派生ペプチドのアミノ酸配列、抗IgM抗体との反応性からIgMと同定した。

ついで、ザイモサンをオプソニン化するときCBPb01で前処理または後処理すると、好中球に対する活性酸素産生能が抑制されること、およびこの抑制は0.1 M GlcNAcの添加により解除されることを明らかにし、CBPb01がザイモサン表面のGlcNAcに結合することでオプソニン活性を抑制していることを示唆した。これらの結果をもとに、申請者は、キチンが生体に対して低い異物反応性しか示さないのは、血清中にキチン結合性IgMが存在し、異物のオプソニン化を抑制しているからであろうと推察している。

次に申請者は、血清中のキチナーゼの存在を明らかにし、キチンの体内における分解には、従来からいわれているリゾチームの他にキチナーゼが関与する可能性があることを示した。

キチンは生体内で分解されてキトオリゴ糖やGlcNAc単糖を産生し、これらの分解産物がキチンの創傷治癒促進効果の発現に大きな役割を果たしていることが知られている。申請者は、キチン結合性タンパク質の中からキチン加水分解酵素キチナーゼ(CBPb04)を分離・精製して、その分子性状を明らかにするとともに、それをコードしているcDNAをクローニングし、一次構造を推定した。CBPb04は、約50 kDaのタンパク質でキチナーゼ活性を有し、酵素活性の至適 pHは中性付近(pH 5.6~8.6)であること、CBPb04をコードしているcDNAは、1,419 bpのオープンリーディングフレームを持ち、21アミノ酸残基の分泌シグナルを含む472アミノ酸残基のタンパク質をコードしていること、CBPb04 mRNAは肝臓にのみ発現しており、他のほ乳類とは異なる発現を示すことを明らかにしている。

CBPb04は内分泌型のキチナーゼとして分泌されることから、キチンの生分解およびキトオリゴ

糖依存性のサイトカインの産生に関与していると考えられ、申請者の研究は、キトオリゴの産生機構に新しい知見を加えた。

ウシ血清中には少なくとも10種類以上のキチン結合性タンパク質が存在する。申請者は、CBPb01、CBPb04以外の3つのタンパク質についても同定を行っている。CBPb03は、その分子性状や酵素消化産物の質量解析からウシ血清アルブミンであり、CBPb05とCBPb06は、その分子性状とN-末端のアミノ酸配列の解析から、それぞれアポリipoprotein A-I (apo A-I)とC4aアナフィラトキシンと同定している。apo A-Iは単球の炎症関連因子の産生を抑制することが知られており、キチンはapo A-Iを吸着し、濃縮して単球に作用させることで、キチン周囲における急激な炎症反応を抑制している可能性がある。キチンを医用材料として使用すると、多量の滲出液が認められることが報告されている。C4aはこの滲出液の産生に関与していると考えられる。

この研究により、キチンの創傷治癒促進効果の発現には、キチンの直接作用に加えて、キチン結合性タンパク質の間接的作用が関与していることが明らかになった。

以上について、審査員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値があると認めた。

基礎となる学術論文

- 1) 題 目 : ウシ血清中のオプソニン化抑制因子の検索
著 者 名 : 鈴木 雅子, 竹内 由香, 海老原 恵,
森松 正美, 首藤 文榮

学術雑誌名 : 獣医生化学

巻・号・頁・発行年 : 37(1) : 11 ~ 15, 2000

- 2) 題 目 : A novel serum chitinase that is expressed in bovine liver
著 者 名 : Suzuki Masako, Morimatsu Masami, Yamashita Tetsuro,
Iwanaga Toshihiko, Syuto Bunei

学術雑誌名 : FEBS Letters

巻・号・頁・発行年 : 506(2) : 127~130, 2001

既発表学術論文

- 1) 題 目 : 血清中のキチン結合性タンパク質の分子性状と生物活性
著 者 名 : 鈴木 雅子, 中尾 敦子, 麦島 明香,
鬼柳 麗子, 森松 正美, 首藤文榮

学術雑誌名 : キチン・キトサン研究

巻・号・頁・発行年 : 4(2) : 232~233, 1998

2) 題 目 : キチン結合性タンパク質の好中球に対する作用
著 者 名 : 鈴木 雅子, 夏目 彩子, 森松 正美, 首藤 文榮
学術雑誌名 : キチン・キトサン研究
巻・号・頁・発行年:5(2) : 138~139, 1999

3) 題 目 : ウシ血清中のキチン結合性タンパク質CBPb04 (ウシ血清キチナーゼ)の分離・精製と同定
著 者 名 : 鈴木 雅子, 森松 正美, 山下 哲郎, 首藤 文榮
学術雑誌名 : キチン・キトサン研究
巻・号・頁・発行年:7(2) : 182~183, 2001