

論文の内容の要旨

水圏生物科学専攻

平成 12 年度博士課程 進学

アーサン モハメド ナズムル

氏名 Ahsan Md. Nazmul

指導教官 渡部 終五

論文題目 Studies on the Molecular and Biochemical Properties of Anchovy Trypsin

(カタクチイワシ・トリプシンの分子構造および生化学的性状に関する研究)

変温動物の魚類は環境水温とほぼ等しい体温を保つが、水界の温度は一般に低いため、魚類の体温は哺乳類のものに比べて通常低い。魚類はこのように低い体温でありながらも、生命活動は恒温動物の高等脊椎動物のものとは変わらない。生体内反応といえども化学反応の法則に従えば温度が低下すれば低くなる。したがって、魚類が低温でも十分な代謝活性を維持するためには、低温でも十分な活性を示す酵素の存在が必要となる。魚類の死後変化は高等脊椎動物のそれに比べて速く、その原因の一つとして魚類に含まれる消化酵素の活性の高さがあるが、その生理的理由は前述の通りである。このような魚類消化酵素の活性の高さは、魚肉の熟成には利点となっている。とくにカタクチイワシ類は世界中で魚醤油の原料として多用されており、その理由には消化酵素の活性の高さが考えられるが、構造と機能の関係には不明な点が多い。

このような背景の下、本研究はカタクチイワシ *Engraulis japonicus* を対象に、まずトリプシンの cDNA クローニングを試みた。次に、このトリプシンを幽門垂から単離し、酵素活性を調べた。さらに、一次構造の情報から立体構造を予測し、機能との関係を検

討した。最後に、リコンビナント・トリプシンを人為的に発現する組換え DNA 体の構築を試みたもので、成果の概要は以下の通りである。

カタクチイワシ・トリプシノーゲンの cDNA クローニング

カタクチイワシの幽門垂から PCR 法によりトリプシンの不活性前駆体トリプシノーゲンの全長をコードする 2 種類の cDNA クローン、*aTgI* および *aTgII* を単離した。*aTgI* の全長は 832 bp で翻訳領域(ORF)は 720 bp からなり、23 bp の 5'非翻訳領域(UTR)と 89 bp の 3'-UTR を含んでいた。一方、*aTgII* の全長は *aTgI* より少し長い 974 bp で、723 bp の ORF、*aTgI* と同じ大きさの 23 bp の 5'-UTR、*aTgI* より長い 228 bp の 3'-UTR を含んでいた。*aTgI* の 3'側の 408 bp をプローブとしたノーザンブロット解析で組織別の転写蓄積量を調べたところ、幽門垂で最も高く、次いで小腸、胃の順であった。一方、筋肉から調製したゲノム DNA を制限酵素で消化してノーザンブロット解析に用いたプローブでサザンブロット解析したところいくつかのバンドがみられ、*aTgI* および *aTgII* 以外にもアイソフォームが存在する可能性が示された。

aTgI および *aTgII* cDNA の塩基配列からそれぞれ *aTgI* および *aTgII* のアミノ酸配列を演繹し他動物種のものと比較した。まず、カタクチイワシ両アイソフォームは N 末端側に 13 アミノ酸からなるシグナルペプチドと、6 アミノ酸からなるプロペプチドを含んでいた。次に、*aTgI* および *aTgII* のトリプシン部分、それぞれ aT-I および aT-II の演繹アミノ酸配列は、いずれも 12 個のシステイン残基を含み、その位置が保存されていることから両分子の立体構造には 6 個の SS 結合があることが示唆された。また、トリプシン活性の特異性を決定する Trp172 および Asp189 も保存されていた。さらに、触媒の三組を形成する His59、Asp102 および Ser195、さらには autolysis loop 構造と 2 個所の分子表面に存在する loop 構造もよく保存されていた。なお、本研究のアミノ酸番号はキモトリプシンの基準配列に基づいて記載した。一方、カタクチイワシでは autolysis loop に 2 つのアミノ酸の欠失がみられた。さらに、基質結合ポケット近傍にもアミノ酸変異がみられた。また、カタクチイワシ aT-I では loop 2 に負電荷をもつアミノ酸が含まれていた。最終的に、*aTgI* がコードする aT-I ではヒラメ *Paralichthys olivaceus* のトリプシンと 84%、*aTgII* がコードする aT-II は南極産タラ類 *Paranotothenia magellanica* のトリプシンとは 85%のアミノ酸同一率を示した。

単離カタクチイワシ・トリプシンの物理学的および酵素化学的性状

カタクチイワシの内臓から硫酸分画、アフィニティークロマトグラフィー、ゲルろ過、イオン交換クロマトグラフィーを骨子とする方法で、トリプシンの 2 つのアイソフォーム aT-I および aT-II を精製した。両アイソフォームとも native-および SDS-PAGE で高純度であることが示され、さらにゼラチン・ザイモグラフィーでもこれが確認された。単

離した aT-I および aT-II を N 末端アミノ酸配列分析に供したところ、両アイソフォームとも演繹アミノ酸配列と一致する配列が得られた。また、ゲルろ過により分子量を測定したところ、いずれも 24,000 の値が得られ、cDNA クローンの演繹アミノ酸配列から算出したトリプシン領域の値によく一致した。

両アイソフォームの活性はいずれも市販のトリプシン特異的阻害剤およびセリンプロテアーゼ阻害剤で完全に阻害された。合成基質 BAPA および BAEE を用いて 25°C で aT-I および aT-II の触媒効率 k_{cat}/K_m を測定したところ、いずれもウシ・トリプシンに比べて高く、とくに aT-II の BAPA に対する活性はウシの 35 倍であった。これは主にカタクチイワシ・トリプシンで K_m 値が小さいことに起因し、カタクチイワシが進化の過程で海洋環境に低温適応し基質との親和性を増大させたためと考えられた。両アイソフォームとも 25°C、pH 7-12 で活性を示し、至適 pH は 9.5 と測定された。また、pH 8 で BAPA を基質として酵素活性を測定したところ、20°C でも高い活性を示した。さらに、pH 8、種々の温度で 30 分間処理して残存活性を 25°C で測定したところ、50°C 以上で失活することが明らかになった。

カタクチイワシおよびウシのトリプシンの立体構造の比較

SWISS-MODEL の公開サーバーを用いたコンピュータによる分子構造モデルを構築し、カタクチイワシ・トリプシンの高い触媒活性と構造との関係をウシ・トリプシンを対照にしつつ調べた。なお、カタクチイワシ・トリプシンの構造予測には既報の大西洋サケ *Salmo salar* トリプシンの結晶構造解析データを用いた。まず、カタクチイワシ・トリプシン両アイソフォームのポリペプチド骨格の構造は、autolysis loop を除いて他脊椎動物のそれに良く一致した。先述のように、カタクチイワシ・トリプシンの autolysis loop は 2 つのアミノ酸の欠失が存在する。また、哺乳類のトリプシンでは分子サイズの大きな Tyr151 が Gln192 の方向に突き出しているが、カタクチイワシではこの Tyr151 がセリンに置換されていた。そのため、カタクチイワシ・トリプシンでは S1 基質結合ポケットの入り口における Gln192 の自由度がより大きな構造的自由度を得ていることが明らかとなった。さらにカタクチイワシ・トリプシンでは構造上重要な分子表面に存在する loop 2 で負電荷のアミノ酸が分子表面の静電的な力を作り出し、ウシ・トリプシンの場合とは異なった。このような、カタクチイワシ・トリプシンの S1 基質結合ポケットに存在する負電荷の要素が、基質中の正電荷のアルギニンやリシンを効果的に基質結合クレフトに向かわせていることが予測された。

組換え DNA 体によるカタクチイワシ・トリプシンの人為的発現

活性をもつリコンビナントのカタクチイワシ・トリプシンを得るために、酵母 *Pichia pastoris* および大腸菌 *Escherichia coli* の発現系の構築を試みた。まず、酵母については

pUniD/V5-His-TOPO を供与体ベクター、pPICZ α -E を受容体ベクターに用いて発現系を構築した。この系はトリプシノーゲンのようにシグナルペプチドやプロペプチドを切り離して天然型の立体構造をもつ活性タンパク質を人為的に発現させるために開発されたもので、本研究でも活性型のトリプシンが細胞外に得られた。しかしながら、いくつかの条件検討を試みたが、発現したトリプシンのほとんどは自己消化作用あるいは共存する他のプロテアーゼによって分解し、産業的な利用を目指すためには収量が低すぎた。そこで、安価に構築できる大腸菌プラスミド pETBlue とその宿主の系について検討を加えた。その結果、リコンビナント・タンパク質は封入体に得られた。このまま封入体から抽出したトリプシンには加水分解活性は認められなかったが、6M 塩酸グアニジンで不溶体を溶解し、0.5M non-detergent sulfobetaine の存在下で再生処理を施すことによってカタクチイワシ内臓から単離したトリプシンの 75% の比活性をもつ発現タンパク質が 12mg/L の高収量で得られた。

以上、本研究により、カタクチイワシ幽門垂から 2 種類のトリプシノーゲンをコードする cDNA を単離した。活性体のトリプシン領域につきアミノ酸配列を他動物種のものと比較したところ、autolysis loop に 2 つのアミノ酸の欠失があるなど、カタクチイワシの特徴がみられた。一方、2 種類のトリプシンを幽門垂から単離し、触媒効率 k_{cat}/K_m を測定したところ、ウシ・トリプシンのそれに比べて著しく高かった。カタクチイワシの構造と機能の相関はコンピュータを利用した立体構造モデルでも確認された。さらに、リコンビナント・トリプシンを大量生産する組換え DNA 体の構築にも成果が得られ、低温でも高活性のカタクチイワシ・トリプシンの産業的な利用に開発の道筋が示されたもので、比較生化学上および応用上に資するところが大きいと考えられる。