

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 Ahsan Md. Nazmul

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、構造と機能の関係には不明な点が多い。本論文はカタクチイワシ *Engraulis japonicus* を対象に、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。

まず、カタクチイワシの幽門垂から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 3' 側の DNA 断片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。

次に、カタクチイワシの内臓からトリプシンの 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。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。

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。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。また、S1 基質結合ポケットの入り口における Gln192 の自由度が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。

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、大腸菌 *Escherichia coli* の発現系の構築を試みた。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、0.6M 塩酸グラ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。

以上本論文は、カタクチイワシ幽門垂から 2 種類のトリプシンノーゲンをコードする cDNA を単離し、いくつかの特徴を示した。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 がウシ・トリプシンのそれに比べて著しく高いことを明らかにした。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 体の構築にも成功し、産業的な利用開発に道筋を示したもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。