

論文の内容の要旨

論文題目 Studies on collagenolytic serine and cysteine proteases
from northern shrimp hepatopancreas
(ホッコクアカエビ肝膵臓由来コラーゲン分解性セリンおよび
システインプロテアーゼに関する研究)

氏名 青木 仁史

プロテアーゼは、食品加工や洗剤など多岐にわたり産業用酵素剤として利用されている。近年、酵素の性質に関する理解が深まり、プロテアーゼを産業的に利用する際の選択は、基質特異性をはじめ諸種の性状に関する知見を基準として行われるようになってきた。一方、新規な性状をもつ酵素の発見は、産業用酵素剤として特殊な用途が見出され、新たな産業の創出にも繋がるのが期待される。とくに酵素による低温下での反応は熱エネルギー要求量の低下や副反応の抑制など種々の利点をもたらす。最近になって、低温に適応した生物から得られるプロテアーゼは低温でも十分な活性をもつことが示されるようになったが、精製・単離したプロテアーゼを用いて性質や構造を詳細に検討した例は少ない。

本研究は、このような背景の下、4°C 以下に生息するホッコクアカエビ *Pandalus borealis* の肝膵臓を対象に、各種のプロテアーゼについて検討を加えた。まず、コラーゲン分解活性をもつセリンプロテアーゼを単離して酵素活性を調べた。次に、カテプシン B の cDNA クローニングを行い、構造上の特徴を明らかにした。さらに、カテプシン L 様酵素を単離して酵素化学的性状を検討するとともに、cDNA クローニングを試みた。最後に、活性をもつ新規システインプロテアーゼを人為的に発現する組換え DNA 体を構築し、酵素化学的性状を検討したもので、得られた研究成果の概要は以下の通りである。

1. コラーゲン分解性セリンプロテアーゼの精製および性質

ホッコクアカエビ肝臓から硫酸分画、hydroxyapatite 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、DNP-Pro-Gln-Gly-Ile-Ala-Gly-Gln-Arg (DNP-peptide) に対する酵素活性を指標に 3 種類の酵素を精製した。いずれの酵素もゼラチンゼイモグラフィーで単一バンドを示し、DNP-peptide を分解したが、25°C、pH 7.5 の条件下では 2 酵素のみがコラーゲンを分解した。これら 2 酵素について DNP-peptide を基質として性状を調べたところ、至適 pH はそれぞれ 11 および 8.5 にあり、pH 7.5 における最適温度はいずれも 40-45°C と既報の他生物種コラーゲン分解酵素に比べて低かった。さらに、pH 7.5、種々の温度でインキュベートして残存活性を 25°C で測定したところ、40°C 以上で失活することが明らかになった。また、両酵素の活性はいずれも市販のセリンプロテアーゼ阻害剤で完全に阻害された。

2. カテプシン B (NsCtB) の cDNA クローニング

ホッコクアカエビの肝臓から PCR 法によりカテプシン B の全長をコードする cDNA クローン、*NsCtB* を単離した。*NsCtB* の全長は 1159 bp で翻訳領域(ORF)は 984 bp からなり、27 bp の 5' 非翻訳領域(UTR)と 148 bp の 3'-UTR を含んでいた。*NsCtB* の 3' 側の 369 bp (697-1064 bp) をプローブとしたノーザンブロット解析では、肝臓でのみ強いシグナルが検出された。一方、肝臓から調製したゲノム DNA を制限酵素で消化し、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 2 つのバンドがみられ、*NsCtB* にアイソフォームが存在する可能性が示された。

NsCtB の ORF は 328 残基のアミノ酸をコードし、15 アミノ酸残基のシグナルペプチド、60 アミノ酸残基のプロペプチドおよび 253 アミノ酸残基の成熟型酵素をコードしていた。成熟型酵素はヒト・カテプシン B と最も高い 53% のアミノ酸同一率を示した。ホッコクアカエビでは基質結合ポケット近傍およびエキソペプチダーゼ活性に必須な *occluding loop* に負電荷をもつアミノ酸が多く含まれていたことから、基質の正電荷をもつアミノ酸残基をより効果的に触媒クレフトに導くことが示唆された。さらに、成熟型酵素の分子全体の電荷は他生物種カテプシン B と比較して著しく低かった。

3. カテプシン L 様酵素(NsCtL)の精製、性質および cDNA クローニング

ホッコクアカエビ肝臓より粗酵素液を調製し、Q-Sepharose FF イオン交換、Superdex 75 ゲルろ過および hydroxyapatite の各クロマトグラフィーに供し、Z-Phe-Arg-MCA に対する酵素活性を指標に *NsCtL* を精製した。精製酵素は SDS-PAGE およびゼラチンゼイモグラフィーで高純度であることが示された。本酵素は幅広い範囲の pH で活性を持ち、かつ安定であった。また、pH 6.0 における最適温度は 40°C と既報の他生物種カテプシン L 様酵素に比べて低かった。さらに、P2 部位にロイシンを含む合成基質 Z-Leu-Leu-Arg-MCA に対して最も高い活性を示した。この基質に対する活性はカテプシン L の標準的な合成基質である Z-Phe-Arg-MCA に対する活性よりも約 4 倍高かった。

次に本酵素の N 末端アミノ酸配列を分析したところ、DTVDWRDKGA 以下計 25 残基が決定された。この配列の一部を参考に縮合プライマーを作成し、PCR 法により全コード領域を含む cDNA クローン、*NsCtL* を単離した。*NsCtL* の全長は 1246 bp で ORF は 954 bp からなり、28 bp の 5'-UTR と 264 bp の 3'-UTR を含んでいた。また、cDNA の 3'側の 311 bp (892-1202 bp) をプローブとしたノーザンブロット解析では、肝臓でのみ強いシグナルが検出された。*NsCtL* の ORF は 318 残基のアミノ酸をコードし、15 アミノ酸残基のシグナルペプチド、90 アミノ酸残基のプロペプチドおよび 213 アミノ酸残基の成熟型酵素をコードしていた。成熟型酵素はロブスター由来カテプシン L 様酵素と最も高い 65% のアミノ酸同一率を示した。一方、哺乳類のカテプシン S、L および K に対する同一率も高く、52-55% の範囲内にあった。しかしながら、構造上重要な S2 サブサイトを構成するアミノ酸残基が既報の他生物種カテプシン群とは異なっていた。

4. システインプロテアーゼ(*NsCys*)の cDNA クローニング、組換え DNA 体による発現および組換え酵素の性質

前節ではホッコクアカエビ肝臓よりカテプシン L 様酵素の cDNA クローン、*NsCtL* を単離した。興味深いことに、クローニングの際に *NsCtL* とは異なるシステインプロテアーゼをコードするクローン、*NsCys* も得られた。*NsCys* の全長は 1242 bp で ORF は 969 bp からなり、12 bp の 5'-UTR と 261 bp の 3'-UTR を含んでいた。cDNA の 3'側の 306 bp (891-1196 bp) をプローブとしたノーザンブロット解析では、*NsCtB* および *NsCtL* と同様に肝臓でのみ強いシグナルが検出された。*NsCys* の ORF は 323 残基のアミノ酸をコードし、16 アミノ酸残基のシグナルペプチド、90 アミノ酸残基のプロペプチドおよび 217 アミノ酸残基の成熟型酵素をコードしていた。成熟型酵素では前節の *NsCtL* およびロブスター由来カテプシン L 様酵素と、それぞれ 65 および 64% のアミノ酸同一率を示した。また、哺乳類のカテプシン S、L および K に対する同一率は、それぞれ 58、54 および 53% であった。しかしながら、*NsCys* の S2 サブサイトを構成するアミノ酸残基には比較したカテプシン群のいずれにも存在しないトリプトファンおよびシステイン残基が含まれ、ユニークな基質特異性をもつことが予見された。

そこで、酵母 *Pichia pastoris* 発現系を用いて *NsCys* を分泌生産し、酵素化学的性状を詳細に検討した。まず、*NsCys* をコードする cDNA を挿入した pUniD/V5-TOPO を供与体ベクター、pPICZ α -E を受容体ベクターに用いて酵母発現ベクター pPICZ α -*NsCys* を構築した。次に、制限酵素 *PmeI* を用いて発現ベクターを直鎖化し、エレクトロポレーション法により、宿主酵母 *Pichia pastoris* KM71H 株のゲノムに導入した。組換えタンパク質を発現誘導後、Superdex 75 ゲルろ過クロマトグラフィーにより精製したところ、活性を保持した *NsCys* が 60 mg/L の高収量で得られた。*NsCys* は *NsCtL* と同様に幅広い範囲の pH において活性を示し、かつ安定であった。また、*NsCys* はカテプシン K のように P2 部位にプロリンを持つ合成基質に対して高い特異性を示し、コラーゲンを速やかに分解した。しかしながら、カテプシン K とは異なり、P2 部位にフェニルアラニンまたはロイシンをもつ合成基質に対しては活性が低かった。

以上、本研究により、ホッコクアカエビ肝臓から3種類のプロテアーゼ、コラーゲン分解性セリンプロテアーゼ2種類とカテプシンL様酵素(NsCtL)を単離して酵素活性を調べたところ、既報の他生物種の相同酵素に比べて最適温度が40-45°Cと低く、20°Cでも高い活性を示すなどの特徴がみられた。また、カテプシンB(NsCtB)、NsCtLおよびシステインプロテアーゼ(NsCys)のcDNAを単離し、演繹アミノ酸配列を他動物種のものと比較したところ、基質結合部位が異なるなど、それぞれ構造上の特徴がみられた。さらに、NsCysを大量生産する組換えDNA体の構築にも成果が得られ、ユニークな基質特異性をもち、低温でも高活性の新規なホッコクアカエビ・プロテアーゼ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。