

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 青木 仁史

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。そこで、本論文は、4°C以下に生息するホッコクアカエビ *Pandalus borealis* の肝臓を対象に、各種のプロテアーゼについて検討を加えた。

まず、ホッコクアカエビ肝臓から各種クロマトグラフィーにより3種類の酵素を精製した。いずれの酵素もゼラチンゲルグラフィーで単一バンドを示し、コラーゲンに対する合成基質である DNP-Pro-Gln-Gly-Ile-Ala-Gly-Gln-Arg 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、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。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。

次に、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* の翻訳領域 (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、ホッコクアカエビ肝臓より粗酵素液を調製し、各種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カテプシン L 様酵素 (*NsCtL*) を精製した。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。次に本酵素の N 末端アミノ酸配列を分析した後、決定された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 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。

前節の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 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* 発現系を用いて新規システインプロテアーゼ (NsCys) を分泌生産し、酵素化学的性状を詳細に検討した。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。

以上、本論文は、ホッコクアカエビ肝臓から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、酵素化学的性状の特徴を明らかにした。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、それぞれの構造上の特徴を明らかにした。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持ち、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、その成果は学術上、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。