

# Studies on Structures and Functions of Cathepsins B and H in Carp

## *Cyprinus carpio.*

長崎大学大学院 生産科学研究科 海洋生産科学専攻

譚 龔

リソゾームマルシステインプロテアーゼであるカテプシン群には、カテプシン B, L, S, H, C 等さまざまな酵素があるが、これらは細胞内タンパク質のターンオーバーや免疫に関与する酵素である。ほ乳類では構造や生理機能、疾病との関わりについてよく研究されているが、魚類では構造や機能に関する報告はまだ少ない。そこで、筆者はエンドタイプとエキソタイプを併せ持つカテプシン B と H の酵素学的諸性質並びに全一次構造についてコイを用いて調べ、その生理機能を明らかにすることを目的とした。

第 1 章では、コイ筋肉からカテプシン B を精製した。その結果、Q-Sepharose カラムにおいて 2 種の酵素 ( $B_{m1}$  と  $B_{m2}$ ) を得た。両酵素とも分子量は 29 kDa であり、N 末端アミノ酸配列は 12 残基 (VSVEISAQDLLT) 決定したが同一であった。これはラットカテプシン B 重鎖の N 末端配列と 75%、ヒトと 83% の相同性を示した。

第 2 章ではコイカテプシン B の構造を明らかにするため、遺伝子クローニングを行った。活性中心として報告されているシステイン近傍と DNA データベースより種間で保存されている領域のアミノ酸配列に基づいて、プライマーを作製した。次にコイ筋肉より抽出精製した全 RNA から一本鎖 cDNA を合成した。これを鋳型とし、先のプライマーを用いて RT-PCR を行った。また、3'-下流領域や 5'-上流領域を得るために 3'-RACE や 5'-RACE 法も行った。増幅された PCR 産物は TA クローニング法によりクローニングし、塩基配列を決定した。

その結果、コイカテプシン B cDNA は 993 bp の open reading frame (以下 ORF) で構成されていることが明かとなった。ORF はプレ部 (18 アミノ酸残基)、プロ部 (60 アミノ酸残基) 及び成熟型酵素 (252 アミノ酸残基) をコードしていた。カテプシン B の活性基である Cys29, His199, Asn219 及び糖鎖結合部位と推定される Asn112 は保存されていた。コイカテプシン B (成熟型酵素) の一次構造を他生物種と比較すると、ヒト、マウス、ウシ、ニワトリ及びニジマスとは 76-79% の相同性を示した。またコイカテプシン B の一次構造と一部のアミノ酸が異なるカテプシン B アイソフォーム遺伝子も同時にクローン化された。このアイソフォームは 252 アミノ酸残基中 13 残基が異っていたが、カテプシン B の活性基や糖鎖結合推定部位は保存されており、精製酵素の N 末端アミノ酸配列とも完全に一致していた。アミノ酸組成から等電点を推測すると、カテプシン B の等電点はカテプシン B アイソフォームより酸性と考えられた。このことから Q-Sepharose での精製過程において、先に溶出した  $B_{m1}$  は遺伝子クローニングで得られたカテプシン B アイソフォームであり、 $B_{m2}$  はカテプシン B と考えられた。

第 3 章では筋肉以外にもカテプシン B アイソフォームが存在す

るかを調べるために、コイ肝臓からカテプシン B を精製した。その結果、筋肉同様 Q-Sepharose カラムにおいて 2 種類 ( $B_{h1}$  と  $B_{h2}$ ) のカテプシン B が得られた。これら 2 種のコイカテプシン B は酵素学的な性質が類似していたが、SDS-PAGE においてカテプシン  $B_{h1}$  は 29 kDa の単一タンパクバンド、 $B_{h2}$  は 29 kDa と 26kDa 二本のタンパクバンドが見られた。3 種のタンパクバンドの N 末端アミノ酸シーケンスは全てコイ筋肉カテプシン B 重鎖と一致した。このことからコイカテプシン  $B_{h2}$  は  $B_{h1}$  の C 末端側のペプチドが自己分解で離れたものである可能性が示唆された。

**第 4 章**ではコイカテプシン B mRNA の組織分布をノーザンブロット法により調べた。コイより 10 組織 (肝臓、脾臓、腎臓、心臓、筋肉、腸、鰓、脳、精巣、卵巣) を摘出し、全 RNA を抽出した。GenElute mRNA miniprep kit を用い mRNA を精製し、ホルムアルデヒド変性アガロースゲル電気泳動に供した。遺伝子クローニングで得たカテプシン B cDNA とそのアイソフォームとの共通の塩基配列に基づいてプライマーをデザインし、PCR 法により DIG 標識されたプローブ (カテプシン B cDNA 断片) を作製し、ノーザンハイブリダイゼーションを行った。

その結果、実験に供した全組織においてコイカテプシン B mRNA の発現が確認されたが、組織間で差異が見られた。 $\beta$ -actin に対するコイカテプシン B mRNA の相対発現量は卵巣 > 鰓 > 腸 > 精巣 > 肝臓 > 脾臓 > 腎臓 > 心臓 > 脳の順であった。また、卵巣において mRNA の発現レベルが最も高かったことから、カテプシン B が卵黄形成に関与している可能性が示唆された。

**第 5 章**ではコイカテプシン B の遺伝子構造について調べた。マウスカテプシン B の遺伝子構造に関する情報とコイカテプシン B の翻訳領域の塩基配列に基づいて、プライマーを作製し、コイ筋肉より抽出精製したゲノム DNA をテンプレートとし PCR を行った。

その結果、コイカテプシン B の翻訳領域に相当する部分と 3' 非翻訳領域の塩基配列 (2498 bp) を決定し、その遺伝子構造は 9 個のエキソンと 8 個のイントロンで構成されていることを明らかにした。エキソンの 5' 末端の GT と 3' 末端の AG の共通配列がすべてのエキソン/イントロン境界領域で確認された。各イントロンの挿入箇所はマウスカテプシン B と全て一致していたが、イントロンサイズはかなり小さかった。また、マウス同様よく保存されている触媒ドメインはイントロン 4 によって分断されており、エキソンは機能ドメインと対応していなかった。

**第 6 章**では、コイカテプシン H をコイ肝臓から精製した。その結果、精製酵素 (26 kDa) の N 末端アミノ酸配列 (12 残基) はラットやヒトのカテプシン H の N 末端配列と 55% の相同性を示した。

**第 7 章**では、遺伝子クローニングによって、コイカテプシン H の全一次構造を決定している。その結果、プロ部の一部 (10 アミノ酸残基) 及び成熟型酵素 (227 アミノ酸残基) をコードしていた 970 bp のコイカテプシン H cDNA を決定した。カテプシン H の活性基である Gln<sub>20</sub>, Cys<sub>26</sub>, His<sub>166</sub> 及び糖鎖結合部位と推定される Asn<sub>115</sub> は保存されていた。コイカテプシン H (成熟型酵素) の一次構造を他生物種と比較すると、ヒト、マウス、ブタ及びキリフィッシュとは 67-83 % の相同性を示した。