

論文審査の結果の要旨

報告番号	博（生）甲第86号	氏 名	タン・エン
学 位 審 査 委 員 会	主 査	原 研 治	
	副 査	小 田 達 也	
	副 査	橘 勝 康	
	副 査	長 富 潔	
・論文審査の結果の要旨 タン・エン氏は平成 10年 7月に北京輕工業大学化学工学部を卒業後、北京 Pernod Ricard 釀酒有限公司を経て、平成13年4月長崎大学大学院生産科学研究科博士前期課程に入学した。平成 15年 3月同研究科を修了後、同年の 4 月に同研究科博士後期課程に進学し、現在に至っている。 同氏は生産科学研究科に入学以降、魚類リソソーム酵素の一つであり、細胞内タンパク分解を担うカテプシンB及びH の構造と機能に関する研究に従事し、その結果を平成 17年 12月に主論文「Studies on Structures and Functions of Cathepsins B and H in Carp <i>Cyprinus carpio</i>」として完成させ、参考論文 3編（審査付き論文 2編）を添え、長崎大学大学院生産科学研究科教授会に博士（学術）の学位を申請した。 長崎大学大学院生産科学研究科教授会は、平成 17 年 12 月 21 日の定例教授会において論文内容の要旨を検討し、学位申請の提出資格ありと判定し、上記の委員会を選定した。委員は主査を中心として、その論文内容を慎重に審査し、公開論文発表会を行わせるとともに、口頭による専門分野に関する質疑を行って最終試験とし、審査結果および最終試験結果を平成 18 年 2 月 15 日の研究科教授会に報告した。 提出された論文は、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 の遺伝子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ものである。以下に概要を述べる。 第 1 章では、コイ筋肉から 2 種のカテプシン B（Bm1 と Bm2）を精製し、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）であることを明らかにした。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%の相同性を持っていた。 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。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を明らかにした。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。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 Bm1 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、Bm2 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 2 種類 (Bh1 と Bh2) のカテプシン B が得られた。これら 2 種のカテプシン B は酵素学的な性質や分子量が類似しており、又、N 末端アミノ酸配列も全てコイ筋肉カテプシン B 重鎖と一致した。

第 4 章ではカテプシン B mRNA の組織分布をノーザンブロット法により調べた。用いたコイ組織は肝臓、脾臓、腎臓、心臓、筋肉、腸、鰓、脳、精巣、卵巣の 10 組織であった。その結果、実験に供した全組織においてカテプシン B mRNA の発現が確認されたが、組織間で差異が見られた。 β -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 (2474bp) 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。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 (30 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、プロ部分の一部 (10 アミノ酸残基) 及び成熟型酵素 (218 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 の配列を決定した。カテプシン H の活性基である Gln20, Cys26, His166 及び糖鎖結合部位と推定される Asn115 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。

以上のように、本研究はエンドタイプとエキソタイプを併せ持つコイカテプシン B と H の遺伝子及びタンパク質の構造、またカテプシン B の組織中の発現量を明らかにした。これらはカテプシン B 及び H の進化や、魚類カテプシン群の生理的役割を理解するのに大きく貢献するものであることを認め、博士 (学術) の学位に値するものとして合格と判定した。