

Grimontia hollisae 由来コラゲナーゼの遺伝子クローニングと
組換えタンパク質を用いた機能解析に関する研究

Cloning of a collagenase gene from *Grimontia hollisae* 1706B and
functional analysis of its recombinant protein.

田中啓友

目次

略語一覧	… 4
第1章 緒論	… 6
第2章 VI型コラーゲンが過剰蓄積した若年性硝子化線維腫症の腫瘍のコラーゲン分析	
2.1 序論	… 13
2.2 材料と方法	… 15
2.3 結果	… 18
2.4 考察	… 21
第3章 <i>Grimontia hollisae</i> コラゲナーゼの遺伝子配列の同定と組換えタンパク質の作製	
3.1 序論	… 24
3.2 材料と方法	… 26
3.3 結果	… 33
3.4 考察	… 37
第4章 <i>Grimontia hollisae</i> コラゲナーゼタンパク質のC末端領域の機能解析	
4.1 序論	… 40
4.2 材料と方法	… 42

4.3 結果	… 49
4.4 考察	… 55
第5章 <i>Grimontia hollisae</i> 由来組換えコラゲナーゼの組織分散酵素への応用研究	
5.1 序論	… 58
5.2 材料と方法	… 61
5.3 結果	… 72
5.4 考察	… 80
第6章 総括	… 86
本研究に関する既発表論文	… 89
謝辞	… 90
参考文献	… 91
表	…109
図	…114
要旨	…143

略語一覽

ANOVA: analysis of variance

BSA: bovine serum albumin

CBB: coomassie brilliant blue

CBD: collagen-binding domain

CD: circular dichroism

CMG2: capillary morphogenesis gene 2

ColG: *Clostridium histolyticum* (*Hathewayia histolytica*) type I collagenase

ColH: *Clostridium histolyticum* (*Hathewayia histolytica*) type II collagenase

DIG: digoxigenin

DTT: dithiothreitol

EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid

EGTA: ethylene glycol tetraacetic acid

FITC: fluorescein isothiocyanate

FPLC: fast protein liquid chromatography

IEQ: islet equivalent

JHF: juvenile hyaline fibromatosis

LC-MS/MS: liquid chromatograph-mass spectrometry

MMP: matrix metalloproteinase

NEM: N-ethylmaleimide

PCR: polymerase chain reaction

PKD: polycystic kidney disease

PMSF: phenylmethanesulfonyl fluoride

PPC: bacterial pre-peptide C-terminal

QTOF-MS: quadrupole time-of-flight mass spectrometry

SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis

STZ: streptozotocin

TFA: trifluoroacetic acid

TEM8: tumor endothelial marker 8

第1章 緒論

1) 病原菌の感染とタンパク質分解酵素

宿主における病原菌の生育と増殖には様々な因子が関与している。近年、このプロセスがタンパク質分解酵素の作用に依存するという仮説をサポートする報告が増えている。病原菌の病原性は特有の毒素の産生に依存するが、菌体外で作用するタンパク質分解酵素が宿主におけるコロニー形成に重要な役割を果たしていると考えられている[1]。すなわち、タンパク質分解酵素が病原菌の宿主への侵入やアミノ酸の供給、毒素タンパク質のプロセッシングなどに関与している。多くのタンパク質分解酵素の中で、細菌性コラゲナーゼ(EC 3.4.24.3) が病因と関係していることが知られている[1]。

2) コラーゲン

コラーゲンは細胞外マトリックスの主要タンパク質として皮膚、骨、軟骨、腱などの結合組織や各臓器に広く分布しており、全タンパク質のおよそ30%を占める。コラーゲンの生体内における役割は、第一に構造タンパク質として臓器やそれらの境界を形成し維持していることである。各種コラーゲンが特有の線維構造を取り、臓器に強度と柔軟性を与えている。第二に機能タンパク質として、コラーゲンが細胞の足場となり、増殖、移動、分化などの制御に関与していることである。

コラーゲンは Gly-Xaa-Yaa (Gly : グリシン、Xaa : 任意のアミノ酸、Yaa : 任意のアミノ酸)の繰り返し配列からなる α 鎖と呼ばれるポリペプチドが三本会合してらせん構造をとった棒状の分子である。最も豊富なコラーゲンはI型コラーゲンであり、直径1.5 nm、長さ300 nmの分子が自己会合して細線維を形成し、さらに細線維同士が会合したコラーゲ

ン線維束として生体内で存在している (Fig. 1)。アミノ酸組成の特徴として、構成するアミノ酸の 1/3 をグリシンが占め、他のタンパク質には見られないアミノ酸であるヒドロキシプロリン、ヒドロキシリジンが存在する。ヒトでは線維性コラーゲン (I 型、II 型、III 型、V/XI 型) 以外にも、基底膜コラーゲン (IV 型)、ビーズ状線維を形成する VI 型コラーゲン、アンカリング線維を形成する VII 型コラーゲン、短鎖コラーゲン (VIII 型、X 型)、FACIT コラーゲン (IX 型、XII 型、XIV 型)、細胞表面に存在する膜貫通型コラーゲン (XIII 型、XVII 型、XXIII 型、XXV 型)、Multiplexin コラーゲン (XV 型、XVIII 型) など、高次構造や機能の異なる 28 種類の分子種が知られている [2]。

3) 細菌性コラゲナーゼ

コラゲナーゼは活性中心に HEXXH 配列を持つメタロプロテアーゼで、コラーゲンの三重らせん構造を加水分解する唯一の酵素である。細菌性コラゲナーゼはコラーゲンの Gly-Xaa-Yaa の繰り返し配列の Yaa-Gly 結合を加水分解し、最終的にトリペプチドにまで分解する。また、三重らせん構造を有したコラーゲンだけでなく、コラーゲンが熱変性して一本鎖となったゼラチンも同様に分解する。細菌性コラゲナーゼは MEROPS タンパク質分解酵素データベースにおいて M9 ファミリーに属し、M9 ファミリーはアミノ酸配列や触媒機能によって M9A、M9B のサブファミリーに分類される。M9 A にはビブリオ菌由来コラゲナーゼが含まれ、M9B にはクロストリジウム属由来コラゲナーゼが含まれる [1] (Fig. 2)。

3-1) クロストリジウム属由来コラゲナーゼ

最もよく研究されている細菌性コラゲナーゼは、ガス壊疽菌として知られる

Clostridium histolyticum 由来のコラゲナーゼ (ColG、ColH) である。*C. histolyticum* は 16s rDNA に基づく分類により *Hathewayia histolytica* と新たに命名されたが、本学位論文では一般的に認知されている細菌名である *C. histolyticum* と表記する[3]。*C. histolyticum* コラゲナーゼは触媒ドメイン (コラゲナーゼモジュール)、多発性嚢胞腎様 (polycystic kidney disease-like [PKD]) ドメイン、コラーゲン結合ドメイン (collagen-binding domain [CBD]) の3つのドメインから成るマルチドメインタンパク質である。二種類のコラゲナーゼはドメイン構造が異なり、ColG では PKD が 1 個、CBD が 2 個に対して、ColH では PKD が 2 個、CBD が 1 個である。各種ドメインの立体構造はドメイン単位で解明されており (Fig. 3)、ColG ではマルチドメインタンパク質としての立体構造が予測され、そのコラーゲン分解メカニズムが提唱されている[4, 5]。

ColG の触媒ドメインはコラゲナーゼモジュールと呼ばれ、アクチベータードメインとペプチダーゼドメインの二つのドメインから成る[5] (Fig. 3A)。両ドメインはグリシンリッチリンカーで繋がり、鞍状の構造をしている。コラーゲン分解活性はコラゲナーゼモジュール、すなわちアクチベーターおよびペプチダーゼの両ドメインが必要であるが、ゼラチン分解活性はペプチダーゼドメインのみで活性を持つことが示されている。この知見から、アクチベータードメインとペプチダーゼドメインが協調してコラーゲン分子の三重らせん構造を解き、露出したペプチド鎖をペプチダーゼドメインで切断すると考えられる。ColG の PKD ドメインは 7 本の β -ストランドから成る β -バレル構造をしている[5] (Fig. 3B)。機能として確定はしていないが、コラーゲンとの結合を高めたり[6]、コラーゲン線維を膨潤させ、コラーゲンモノマーを露出させる作用が提唱されている[7, 8]。CBD は 10 本の β -ストランドから成る jelly-roll 構造をしている[4, 9] (Fig. 3C)。CBD の表面にはチロシンに富む領域があり、その面でコラーゲンの三重らせん構造を認識し結合する[10]。ColG の

tandem CBD は二回転対称構造をとっており、お互いのコラーゲン結合面がおよそ 55 Å 離れて外側を向いているため、ColG の tandem CBD はコラーゲン線維間やダメージを受けた線維表面の裂け目に楔のように結合すると予想される[4]。高速原子間力顕微鏡観察により、ColG はコラーゲン分子の C 末端から N 末端に向かって動きながら分解することが報告されているが[11]、tandem CBD の立体構造と各 CBD のコラーゲン結合力の違いにより、C 末端から N 末端に向かう動きは説明できる[4]。各種ドメインの立体構造から以下のようなコラーゲン分解メカニズムが提唱されている。(i) CBD を介して酵素がコラーゲン線維に結合する。(ii) PKD ドメインがコラーゲン線維を膨潤させ、コラーゲン分子あるいはコラーゲン細線維を露出させる。(iii) コラゲナーゼモジュールがコラーゲン分子の三重らせん構造を解き、露出したペプチド鎖をペプチダーゼドメインで切断する[1]。

また、基質特異性にも違いがあり、ColG はコラーゲンに対して活性が強く、合成ペプチドに対しては適度な活性を示すのに対し、ColH は合成ペプチドに対して活性が強く、コラーゲンに対しては適度な活性を示す。さらには、両酵素のコラーゲン切断部位が異なることも報告されている[12]。ColG のコラーゲン切断部位はコラーゲンの末端部分であるのに対し、ColH はコラーゲンの中央部を優位に切断する。細菌性コラゲナーゼはコラーゲンをトリペプチドにまで分解するが、両酵素ともコラーゲン配列の Xaa 位にグルタミン酸を含むペプチド鎖は切断できないことが知られている[13]。また、ビーズ状線維を形成する VI 型コラーゲンを切断できないことも知られている[14, 15]。

C. histolyticum コラゲナーゼは細胞単離のための組織分散用酵素といった研究用途として用いられ、1 型糖尿病患者への膵島移植のための膵島分離やデュピュイトラン拘縮 (Dupuytren's contracture) の治療、火傷や潰瘍、褥瘡における組織の除去といった医療用途として広く用いられている[1]。

3-2) ビブリオ属由来コラゲナーゼ

ビブリオ属由来メタロプロテアーゼは活性中心の相同性配列 **HEXXH** のアミノ酸配列と基質特異性から三種類のサブクラス（クラス I、II、III）に分類される[16]。活性中心のアミノ酸配列に関して、クラス I は **HEVSH-E**、クラス II は **HEYTH**、クラス III は **HEYVH** である。基質特異性に関しては、クラス I はエラスチンに対して活性が強く、コラーゲンを分解しないのに対し、クラス II とクラス III はコラーゲンを分解する。クラス II は一般的なタンパク質の代表であるカゼインを分解しないのに対して、クラス III はコラーゲン、ゼラチンと同様にカゼインも分解する。このサブクラスの分類において、M9A に属するコラゲナーゼと言えるのはクラス II とクラス III と考えられる。ビブリオ属コラゲナーゼとして *Vibrio alginolyticus* 由来コラゲナーゼが研究されている[17-20]。 *V. alginolyticus* コラゲナーゼは触媒ドメイン、PKD ドメイン、プレペプチダーゼ C 末端（pre-peptidase C-terminal: PPC）ドメインの3つのドメインから成るマルチドメインタンパク質であり、コラーゲン、ゼラチン、カゼインを分解する。 *V. alginolyticus* コラゲナーゼの比活性は高いので、火傷や潰瘍、褥瘡に用いると効率的に壊死した組織を除去できることが知られている[21, 22]。

4) *Grimontia (Vibrio) hollisae* 1706B 株由来コラゲナーゼ

Vibrio hollisae は1982年に初めて発見されたグラム陰性菌で[23]、2003年に *Grimontia* 属に再分類された菌である[24]。 *Grimontia hollisae* は thermostable direct hemolysin という毒素を産生し[25]、健常人に感染した場合、軽度から重度の胃腸炎を引き起こすことが報告されている[26]。1998年、鈴木らは東京都新木場の海岸砂土より *G. hollisae* 1706B

株を単離した[27]。この菌株はゼラチン存在下で活性の強いコラゲナーゼを産生することが明らかとなった。本コラゲナーゼの分子量は 60 kDa で不溶性コラーゲン、可溶性コラーゲン、ゼラチン、合成基質 (Z-GPLGP、Pz-PLGPR) を分解できるが、カゼインは分解しない[28]。本コラゲナーゼは pH 4.5~11 で活性を維持しており、不溶性コラーゲンの分解に対する至適 pH は 7.0~8.0 である。至適温度は 35°C で、60°C で 30 分加熱するとほぼ失活した。また、EDTA により失活し、セリンあるいはシステイン分解酵素の阻害剤に影響を受けないことから、本コラゲナーゼはメタロプロテアーゼであることが明らかとなった。本コラゲナーゼは食肉の軟化剤、シェービング屑など皮革の分解、動物細胞の細胞分散剤として産業利用の可能性が考えられる[29]。

5) 本研究の概要

以上の背景より、一般的に広く使用されているクロストリジウム属由来コラゲナーゼでは切断できないアミノ酸配列やコラーゲン分子種が存在することから、組織分散用酵素としてのコラゲナーゼ製剤には改善の余地があると考えた。本研究では *G. hollisae* 1706B 株由来コラゲナーゼの産業利用を進めるため遺伝子クローニングを行い、安定な組換えタンパク質の作製を試みた。第 2 章では、クロストリジウム属由来コラゲナーゼでは切断できない VI 型コラーゲンを豊富に含む組織の一例として、若年性硝子化線維腫症の腫瘤のコラーゲン分析を行った。第 3 章では、*G. hollisae* 1706B 株のコラゲナーゼ遺伝子を同定し、他のビブリオ属由来のコラゲナーゼタンパク質との相同性解析により本コラゲナーゼのドメイン構造を予測した。さらには、ブレビバチルス発現系を用いて組換えタンパク質の作製を行ない、同定した遺伝子がコラゲナーゼをコードする遺伝子であることを確認した。第 4 章では、*G. hollisae* 1706B 株由来コラゲナーゼの PPC ドメインを含む C 末端領域が

コラーゲンの三重らせん構造を認識して結合する CBD であるか検証した。この仮説を証明するために、*G. hollisae* コラゲナーゼの C 末端領域の組換えタンパク質を作製し、未変性コラーゲンあるいは変性コラーゲン（ゼラチン）に対する結合実験を行なった。さらには、C 末端領域を含む 74 kDa 酵素と触媒ドメインのみの 60 kDa 酵素を用い、C 末端領域がコラーゲン分解活性に影響を与えるか検証した。第 5 章では、60 kDa の *G. hollisae* 1706B 株由来コラゲナーゼを設計し、ブレビバチルス発現系を用いて組換えタンパク質を産生できるか検証した。次に、60 kDa の組換えタンパク質がコラーゲン分解活性を維持しているか、また、コラゲナーゼ製剤として使用できるだけの活性の安定性があるか、さらにはマウス腓島分離の系を用いて初代細胞を単離することができるか検証した。

第2章 VI型コラーゲンが過剰蓄積した若年性硝子化線維腫症の腫瘍のコラーゲン分析

2.1 序論

VI型コラーゲンは動物組織に普遍的に存在するコラーゲンであり、多くの組織において構造的な足場となっているだけでなく、細胞の接着や遊走など細胞機能を調節することが知られている[30]。VI型コラーゲンは、 $\alpha 1$ 鎖、 $\alpha 2$ 鎖、 $\alpha 3$ 鎖の三本の α 鎖が三重らせん構造をとった分子で、細胞内で四量体を形成した後に分泌され、細胞外で短いコラーゲン鎖が数珠つなぎになったビーズ状線維を形成する (Fig. 4)。VI型コラーゲンのビーズ状線維はI型コラーゲンなどの線維性コラーゲンの周囲に巻き付くように存在し、ビーズ状線維のメッシュ構造を介して他の細胞外マトリックスタンパク質や細胞とのネットワーク形成に寄与していると考えられている。ヒトにおいては、筋肉、皮膚、神経、腱、軟骨、血管、肝臓、肺、脂肪組織において重要な細胞外マトリックス成分とみなされている。VI型コラーゲンが欠損すると、Ullrich型先天性筋ジストロフィーやBethlemミオパチーといった筋疾患を引き起こすことが知られている[31]。

VI型コラーゲンが過剰蓄積する疾患として、希少な常染色体劣性遺伝の結合組織疾患である若年性硝子化線維腫症 (Juvenile hyaline fibromatosis: JHF [MIM #228600]) が知られている[32-34]。この疾患の症状として、関節の拘縮、骨の変形、歯肉の肥大、背中や頭部、四肢の皮下腫瘍などが見られる。皮下腫瘍は日常的に刺激を受けやすい部位に生じることが知られており、その治療は外科的に切除するしかない[35] (Fig. 5)。組織学的解析によると、皮膚や軟組織の腫瘍では細胞外の不定形なヒアリン物質の過剰蓄積が報告されている[36]。腫瘍のコラーゲン分析の結果、腫瘍組織においてI型コラーゲンの減少[37]やVI型コラーゲンの沈着異常が起きていることが示唆されている[32, 33]。2003年にこの

疾患の原因遺伝子が **capillary morphogenesis gene 2 (CMG2)**であることが明らかとなった[38, 39]。CMG2 は元々、ヒト臍帯血管由来内皮細胞をコラーゲンゲル内で培養し管腔構造が誘導される際に発現量が上昇する遺伝子として同定された[40]。CMG2 タンパク質の詳細な機能は明らかとなっていないが、CMG2 タンパク質に含まれるフォンビルブラント因子タイプ A ドメインが IV 型コラーゲンやラミニンに結合することから、CMG2 タンパク質は *in vivo*では基底膜タンパク質のレセプターとなっている可能性が示唆された[40]。また、細胞膜レセプターとして血管新生に関与していると考えられている **tumor endothelial marker 8 (TEM8)**と相同性があることが明らかとなり、両タンパク質は炭疽菌が感染する際のレセプターとなっていることが報告された[41, 42]。しかし、CMG2 遺伝子の変異と本疾患の症状の関係性は明らかとなっていない。

JHF は希少疾患であり日本においては約 10 家系の報告しかないが、JHF と診断された日本人女性（手術時 38 歳）が腫瘍の切除手術を受ける際に頭部と耳介の腫瘍を供与していただける機会を得た。遺伝子解析の結果、本症例では CMG2 遺伝子のエキソン 15 の AG（遺伝子配列 1796～1797）が欠損しており、この変異がタンパク質翻訳時にフレームシフト変異を引き起こしていることを確認している[35]。本研究では、生化学的解析、電子顕微鏡観察、質量分析計によるタンパク質同定技術を用いて、JHF 由来腫瘍の詳細なコラーゲン分析を行い、過去の報告と一致するか検証した。

2.2 材料と方法

2.2.1 検体

外科手術により、JHF と診断された日本人女性の頭部 (6.5 cm × 4 cm) および耳介 (1 cm × 1 cm) の腫瘍を切除した。患者よりインフォームドコンセントを得て、コラーゲン分析、免疫電子顕微鏡観察および質量分析計によるタンパク質同定実験に用いた。また、コラーゲン分析のコントロールとして健常人皮膚を用いた[43]。

2.2.2 コラーゲン抽出

JHF 症例の皮膚および腫瘍 (頭、耳)、健常人皮膚 0.1 g を 5 mm 角に細断し、プロテアーゼインヒビター溶液 (1 mM EDTA、0.1 mM NEM、10 μM PMSF、10 mM disodium phosphate、pH 7.4) で洗浄した。遠心後、0.1 N の塩酸溶液を加え、組織を膨潤させた。1 mg/ml 濃度となるようにペプシン (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) を添加し、4°C で 2 日間処理してコラーゲンを可溶化した[44]。

2.2.3 SDS-PAGE

電気泳動は Laemmli の方法[45]に従い、7.5%ポリアクリルアミドゲルを用いて行なった。泳動後、ゲルを固定液 (50%メタノール、10%酢酸) で 3 分間固定処理し、染色液 (0.25% Coomassie brilliant blue (CBB) R-250、50%メタノール、10%酢酸) で染色した。1 分半後、染色液を除き、脱色液 (5%メタノール、7.5%酢酸) で脱色した。

2.2.3 電気泳動像のデンストメトリー解析

NIH image を用いて CBB 染色した電気泳動像のコラーゲンのバンドの濃さを解析した。

I型コラーゲンの $\alpha 1$ 鎖および $\alpha 2$ 鎖、V型コラーゲンの $\alpha 1$ 鎖、VI型コラーゲンの $\alpha 1$ 鎖、 $\alpha 2$ 鎖、 $\alpha 3$ 鎖を定量し、I型、V型、VI型コラーゲンの比率を概算した。

2.2.4 免疫電子顕微鏡観察

JHF 症例の腫瘍（頭部、耳介）の凍結切片をウサギ抗ヒト VI 型コラーゲン抗体（Polysciences, Warrington, PA, USA）と 4°C で終夜反応させたのち、0.8 nm 金コロイド標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体（Aurion, Wageningen, Netherlands）と反応させた。切片を固定液（0.2% タンニン酸、2.5% グルタルアルデヒド）に浸して前固定したのち、2% オスミウム酸、0.1 M リン酸バッファー（pH 7.4）と室温で 30 分反応させて後固定した。切片を蒸留水で洗浄し、室温で 30 分、金コロイド用銀増感試薬（Aurion R-gent SE-LM, Aurion）に浸した。切片を上昇系列のエタノール溶液で脱水し、エポキシ樹脂に包埋した。超薄切片を作製し、酢酸ウラン液、クエン酸鉛液で電子染色を行ったのち、透過型電子顕微鏡（JEOL JEM 1230, JEOL, Tokyo, Japan）で観察した。

2.2.5 ウェスタンブロット

常法に従ってタンパク質を 7.5% ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離し、ゲルから PVDF 膜（Immobilon-P, Millipore, Billerica, MA, USA）に転写した。PVDF 膜を 2% スキムミルクでブロッキングし、ウサギ抗ヒト VI 型コラーゲン抗体と室温で 2 時間反応させた。PBS(-)で洗浄後、ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体と反応させた。PBS(-)で洗浄後、SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate（PIERCE, Rockford, IL, USA）で処理し、トランスイルミネーター（LAS-3000, Fuji Film, Tokyo, Japan）でバンドを検出した。

2.2.6 質量分析計を用いたタンパク質の同定

電気泳動のゲルから VI 型コラーゲン由来のバンドを切り出し、1 mm 角に細断した。ゲル片をチューブに移し、脱色液 (25 mM 重炭酸アンモニウム/50%アセトニトリル) で脱色したのち、アセトニトリルを添加して、ゲル片を収縮させた。チューブに還元液 (10 mM DTT/25 mM 重炭酸アンモニウム) を添加し、56°Cで 45 分間インキュベートしてサンプルを還元した。遠心したのち、還元液を取り除き、アルキル化液 (55 mM ヨードアセトアミド/25 mM 重炭酸アンモニウム) を添加して、室温で 30 分間反応させた。遠心したのち、アルキル化液を取り除き、アセトニトリルを添加してゲル片を完全に脱水させた。トリプシン溶液をゲル片に添加してゲル内に浸透させたのち、ゲル片が浸る程度の重炭酸アンモニウムを添加して、37°Cで一晩ゲル内消化を行った。消化したゲル片に抽出液 (50% アセトニトリル/0.1% TFA) を添加してペプチド断片の抽出を行った。再度ゲル片を 100% アセトニトリル/0.1% TFA および 100% H₂O/0.1% TFA で抽出を行い、質量分析のサンプルとした。

液体クロマトグラフ質量分析 (LC-MS/MS) は Agilent 1200 LC システムおよびトリプル四重極リニアイオントラップ質量分析計 (3200 Q TRAP, AB Sciex, Foster City, CA, USA) を用いて行った。分離カラムには 5 μm Xterra C18 (150 mm x 2.1 mm, Waters, Milford, MA, USA) を用いた。液体クロマトグラフィーと質量分析は Analyst® software (AB Sciex) を用いて行い、得られたデータを ProteinPilot Ion Search (AB Sciex) で解析した。

2.3 結果

2.3.1 JHF 由来組織のコラーゲン組成

JHF 由来組織のコラーゲン組成を調べるため、JHF と診断された日本人女性の頭部 (6.5 cm × 4 cm) および耳介 (1 cm × 1 cm) の腫瘍および皮膚を用いて、ペプシン処理にてコラーゲンを可溶化した。電気泳動によりコラーゲンを分離して組成を確認したところ (Fig. 6A)、JHF 患者の皮膚では I 型コラーゲンが主成分であり、少量の III 型、V 型、VI 型コラーゲンが含まれていた (lane 2)。このバンドパターンは健常人の皮膚のコラーゲン組成と同様の傾向であった (lane 1)。一方、JHF 患者の腫瘍では、頭部および耳介の腫瘍ともに VI 型コラーゲンが増えており、相対的に I 型コラーゲンが減少していた (lane 3,4)。各種コラーゲンのバンドをデンストメトリー解析により定量したところ、JHF 患者の頭部および耳介の腫瘍では健常人皮膚のおよそ 10 倍量の VI 型コラーゲンが含まれており、一方、I 型コラーゲンはそれぞれ健常人皮膚の 57%、38%であった (Fig. 6B)。

2.3.2 JHF 由来腫瘍における VI 型コラーゲンの分布

JHF 由来腫瘍における VI 型コラーゲンの分布を調べるために、抗 VI 型コラーゲン抗体を用いた免疫電子顕微鏡観察を行った。頭部腫瘍では主に I 型コラーゲンの線維束が観察され、VI 型コラーゲンはビーズ状線維を形成し I 型コラーゲン線維の周囲に沿うように分布していた (Fig. 7A, 7B)。一方、耳介腫瘍では I 型コラーゲン線維間の不定形領域が多く観察された。VI 型コラーゲンは I 型コラーゲン線維の周囲のほか、不定形領域において観察された 100 nm 周期の縞模様構造体にも分布していることが明らかとなった (Fig. 7C, 7D)。この構造体は VI 型コラーゲンのビーズ状線維がさらに会合した「Zebra body」であり、I 型コラーゲン線維間の隙間を VI 型コラーゲンのビーズ状線維同士が会合して埋めて

いると考えられる (Fig. 7E)。

2.3.3 ウェスタンブロット解析による高分子化したVI型コラーゲンの検出と質量分析計を用いたVI型コラーゲンの同定

免疫電子顕微鏡観察により腫瘍においてVI型コラーゲンが高次構造化した「Zebra body」が確認されたので、抗VI型コラーゲン抗体を用いたウェスタンブロット解析により、VI型コラーゲンが高分子化しているか検討した。頭部および耳介の腫瘍では、60 kDaのVI型コラーゲン三重らせん領域のバンド以外に150 kDaおよび220 kDaにも抗VI型コラーゲン抗体と反応したバンドが検出された (Fig. 8A)。これらの高分子化したバンドは健康人皮膚およびJHF患者の皮膚ではほとんど検出されなかった。また、耳介の腫瘍の方が頭部の腫瘍よりも高分子化したバンドが多く検出され、この結果から免疫電子顕微鏡観察で見られた「Zebra body」はペプシンなど分解酵素に耐性があると考えられる。

次に、抗VI型コラーゲン抗体と反応したバンドがどのような配列を含むのか質量分析計を用いて分析した。Fig. 8Bに示した5本のバンドの同定結果をFig. 8Cに示した。三重らせん領域のバンド1、2、3はそれぞれ $\alpha 1(\text{VI})$ 、 $\alpha 2(\text{VI})$ 、 $\alpha 3(\text{VI})$ であった。150 kDaのバンド4、220 kDaのバンド5ともに $\alpha 3(\text{VI})$ と同定された。バンド4では、 $\alpha 3(\text{VI})$ の三重らせん領域 (アミノ酸番号：2022~2045、Fig. 9A) およびC末端球状ドメイン (アミノ酸番号：2165~2178、Fig. 9B) のフラグメントが同定された。さらには、C末端球状ドメイン (アミノ酸番号：2165~2178) のフラグメントではシステインがアルキル化されたカルバミドメチル化システインとして検出され、システイン残基がジスルフィド結合を形成していることが明らかとなった。また、バンド5ではバンド4と同じ三重らせん領域 (アミノ酸番号：2022~2045) のフラグメントが同定された (結果は省略する)。以上の結果、

腫瘍では VI 型コラーゲンがシステインを介した架橋により安定化していることが示唆された。

2.4 考察

本研究において、健常人皮膚、JHF 患者由来皮膚および JHF 患者由来腫瘍の生化学的分析を行い、JHF 患者由来腫瘍では健常人皮膚および JHF 患者由来皮膚と比べてコラーゲンの組成が変化しており、腫瘍では I 型コラーゲンが減少し、VI 型コラーゲンが増加していることを確認した。また、耳介腫瘍においては VI 型コラーゲンの超分子会合体である「Zebra body」も存在することを見出した。さらには、腫瘍に含まれる VI 型コラーゲンがシステインを介した架橋により高分子化して安定化した状態であることを確認した。

JHF 患者由来腫瘍の生化学的研究はあまり行われていないが、Katagiri らは腫瘍に VI 型コラーゲンが異常沈着していると報告し[33]、Lubec らは I 型コラーゲンの沈着が減少していると報告している[37]。本症例の腫瘍ではこれら報告と同様の結果であった (Fig. 6)。I 型コラーゲンはコラーゲン線維の主成分であり、組織・臓器に力学的強度と柔軟性を与え、その構造を維持している。一方、VI 型コラーゲンは生体内ではビーズ状線維という細線維で存在し、組織構造の維持や細胞と細胞外マトリックス成分をつなぎとめる役割を担っている。耳介腫瘍では I 型コラーゲンの線維と線維の隙間を埋めるように VI 型コラーゲンの超分子会合体である「Zebra body」が検出され (Fig. 7)、その VI 型コラーゲンがシステインを介した架橋により安定化していることも明らかとなった (Fig. 8, 9)。通常、ペプシンによる可溶化処理を行った場合、VI 型コラーゲンの N 末端および C 末端の球状ドメインは消化され、三重らせん領域のみが可溶化される。一方、腫瘍の VI 型コラーゲンでは球状ドメインが残ったまま可溶化されることが明らかとなった。(Fig. 8) この結果は分子内および分子間の架橋によりペプシンによる消化に耐性が向上していることを示しており、おそらく生体内でも MMP-1 などのタンパク質分解酵素による分解に対して耐性を示すと考えられる。腫瘍では I 型コラーゲンの減少を補うために VI 型コラーゲンが安定化

した状態で異常沈着し、腫瘍の形や構造を維持しているのかもしれない。

一般的に後頭部、耳、口、背中など日常的に刺激を受けやすい部位に腫瘍が生じることが報告されている[35]。また、腫瘍は刺激を受け続けることにより成長し、ヒアリン物質が石灰化することが知られている[46]。本研究では頭と耳介の二つの部位から腫瘍を採取し分析したが、頭の腫瘍は大きく、一部石灰化していると考えられるほど固い部位があったため、成長が止まり石灰化のステージに移行していると考えられる。一方、耳介の腫瘍は小さくて柔らかく、成長段階の腫瘍と考えられる。両腫瘍とも VI 型コラーゲンの比率は同様であったことから (Fig. 6)、「Zebra body」の形成は VI 型コラーゲンの含量に依存するのではなく、腫瘍の成長のステージに依存しているのかもしれない。近年、CMG2 ノックアウトマウスが作製されたが、ほぼすべての臓器において異常は見られず、ヒトで見られるような腫瘍は形成されなかった[34, 47, 48]。唯一、メスの子宮においてのみ VI 型コラーゲンの過剰蓄積が確認された[34, 48]。腫瘍形成のメカニズムさらには腫瘍の成長と VI 型コラーゲンの関係性を解明するためにはさらなる研究が必要である。

CMG2 タンパク質の生理機能は未解明のままであったが、CMG2 タンパク質が VI 型コラーゲンのレセプターとして作用し、エンドサイトーシスによる VI 型コラーゲンの分解に関与することが報告された[34]。腫瘍由来細胞では VI 型コラーゲンを含む主要なコラーゲンの生合成は正常であるが、VI 型コラーゲンを分解できないために VI 型コラーゲンの異常沈着が起きていることが明らかとなった。一方、本症例では I 型コラーゲンの沈着が減少しており、VI 型コラーゲンの異常沈着だけでは説明できない。興味深いことに、JHF 患者由来皮膚のコラーゲン組成は健常人皮膚と同様であり (Fig. 6)、VI 型コラーゲンの高分子化も見られなかった (Fig. 8)。JHF 患者は全身において CMG2 タンパク質が働いていないが、腫瘍でのみコラーゲンの沈着異常が見られる原因は未だ解明されていない。腫

瘤では物理的な刺激により VI 型コラーゲンの産生が促進されると想像されるが、分解できないことで過剰蓄積し、さらには VI 型コラーゲンリッチという皮下においては異常な環境からのシグナルにより、I 型コラーゲンの生合成あるいは分解に異常をきたしているのかもしれない。

腫瘍の治療は外科的に切除するしかなく、切除したとしても再び腫瘍が生じてしまうため、患者の肉体的・精神的負担は非常に大きい。コラーゲンが異常蓄積する疾患としてデュピュイトラン拘縮という手掌腱膜の疾患があり、コラーゲンが異常蓄積した指や掌の腱膜を消化させるコラゲナーゼ製の酵素注射療法が行われている[49]。腫瘍の治療においても、同様にコラゲナーゼを注入することで腫瘍を小さくできるのならば患者の負担を軽減できると考えられる。しかし、市販されている細菌性コラゲナーゼは *Clostridium histolyticum* 由来のコラゲナーゼがほとんどであり、*C. histolyticum* 由来コラゲナーゼは VI 型コラーゲンを分解できないことが知られているため、効果はあまり期待できないと予想される。VI 型コラーゲンを分解できるコラゲナーゼ製剤ができれば、組織溶解注射剤として応用の幅が広がり、JHF の腫瘍の除去においても大いに貢献できると考えられる。

第3章 *Grimontia hollisae* コラゲナーゼの遺伝子配列の同定と組換えタンパク質の作製

3.1 序論

細菌性コラゲナーゼはメタロプロテアーゼであり、活性中心に亜鉛要求性酵素のコンセンサス配列である HEXXH 配列を持つ。細菌性コラゲナーゼは未変性コラーゲンおよび変性コラーゲン（ゼラチン）の両者を分解できる酵素であり、コラーゲン三重らせん領域の特徴的配列である Gly-Xaa-Yaa の繰り返し配列の Yaa-Gly 結合を切断し、Gly-Xaa-Yaa のトリペプチド単位にまで分解する（Xaa、Yaa は任意のアミノ酸）[1]。細菌性コラゲナーゼはこのような特長を持つため、細胞単離のための組織分散用酵素といった研究用途として用いられ、臍島移植のための臍島分離[50]やデュピュイトラン拘縮（Dupuytren's contracture）[51]の治療といった医療用途として広く用いられている。

細菌性コラゲナーゼの研究として、ガス壊疽菌として知られる *Clostridium histolyticum* が産生するコラゲナーゼの研究が広く知られている[6, 52-55]。*C. histolyticum* コラゲナーゼの遺伝子解析により、*C. histolyticum* コラゲナーゼは触媒ドメイン、多発性嚢胞腎様（polycystic kidney disease-like [PKD]）ドメイン、コラーゲン結合ドメイン（collagen-binding domain [CBD]）の3つのドメインから成るマルチドメインタンパク質であることが明らかとなった。さらには、酵素としての産業利用に加えて、成長因子などの生理活性を持つタンパク質をコラーゲン線維にアンカリングさせる目的で CBD を利用する研究も行われている[56]。一方、他の細菌性コラゲナーゼとして *Vibrio alginolyticus* コラゲナーゼも知られている[17-20]。*V. alginolyticus* コラゲナーゼの比活性は高いので、火傷や潰瘍、褥瘡に用いると効率的に壊死した組織を除去できることが知られている[21, 22]。現在では様々な菌からコラゲナーゼが単離され、その遺伝子配列が同

定されている[16, 57-60]。しかし、産業利用を前提とした研究開発は少ない。

*V. hollisae*は1982年に初めて発見されたグラム陰性菌で[23]、2003年に *Grimontia* 属に再分類された菌である[24]。 *Grimontia hollisae*は thermostable direct hemolysin という毒素を産生し[25]、健康人に感染した場合、軽度から重度の胃腸炎を引き起こすことが報告されている[26]。 *G. hollisae* 1706B株は東京都新木場の海岸砂土より単離された[27]。この菌株はゼラチン存在下で活性の強いコラゲナーゼを産生し、このコラゲナーゼは鞣した皮革をも分解することができる[29]。本コラゲナーゼの分子量は 60 kDa で不溶性コラーゲン、可溶性コラーゲン、ゼラチン、合成基質 (Z-GPLGP、Pz-PLGPR) を分解できるが、一般的なタンパク質の代表であるカゼインは分解しない。本コラゲナーゼは pH 4.5~11 で活性を維持しており、不溶性コラーゲンの分解に対する至適 pH は 7.0~8.0 である[27-29]。本コラゲナーゼの詳細な性状解析や産業利用を考えた場合、遺伝子配列ならびに一次構造の情報が必要となる。

本研究では、 *G. hollisae* 1706B株のコラゲナーゼ遺伝子を同定し、ブレヴィバチルス発現系を用いて組換えタンパク質の作製を行なった。精製した組換えタンパク質を用いて詳細な性状解析を行ない、同定した遺伝子がコラゲナーゼをコードする遺伝子であることを確認した。さらには、推定されるアミノ酸配列と他のビブリオ属由来のコラゲナーゼタンパク質との相同性解析により、本コラゲナーゼのドメイン構造を予測した。

3.2 材料と方法

3.2.1 バクテリアおよびプラスミド

G. hollisae 1706B 株は東京都新木場の海岸砂土より分離した[27]。発現プラスミド pCC1BAC および大腸菌 TransforMaxEPI300 (Epicentre Biotechnologies, Madison, WI, USA) は *G. hollisae* 1706B 株ゲノムライブラリー作製のベクターおよび宿主として用いた。プラスミド pGEM-T Easy および大腸菌コンピテントセル JM109 (Promega, Madison, WI, USA) はサブクローニングのベクターおよび宿主として用いた。発現ベクター pNY326 および *Brevibacillus choshinensis* S5 (Takara Bio, Shiga, Japan) は組換えタンパク質作製のベクターおよび宿主として用いた。

3.2.2 SDS-PAGE

電気泳動は Laemmli の方法[45]に従い、7.5%あるいは 10%ポリアクリルアミドゲルを用いて行なった。泳動後、ゲルを固定液 (50%メタノール、10%酢酸) で 3 分間固定処理し、染色液 (0.25% Coomassie brilliant blue (CBB) R-250、50%メタノール、10%酢酸) で染色した。1 分半後、染色液を除き、脱色液 (5%メタノール、7.5%酢酸) で脱色した。

3.2.3 精製酵素の部分アミノ酸配列の同定

G. hollisae 1706B 株由来コラゲナーゼは Suzuki の方法により調製した[28]。精製酵素およびリジレンドペプチダーゼ、トリプシン、V8 プロテアーゼを用いて調製した精製酵素消化断片の N 末端アミノ酸配列はプロテインシークエンサーにて解析した[61]。常法に従ってタンパク質を 10%ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離し、ゲルから PVDF 膜 (Immobilon-P, Millipore, Billerica, MA, USA) に転写した。PVDF 膜を CBB R-250

で染色し、超純水で洗浄した後、目的のバンドを切り出した。精製酵素の N 末端アミノ酸配列はプロテインシークエンサー (Procise 491, Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA)により解析した。

3.2.4 *G. hollisae* 1706B 株ゲノムライブラリーの作製

G. hollisae 1706B 株のゲノム DNA は QIA genomic DNA extraction kit (Qiagen, Hilden, Germany)を用いて調製した。精製したゲノム DNA を制限酵素 EcoR I で消化し、0.6%アガロース電気泳動により分離した。2 kb 以上の DNA 断片を回収し、あらかじめ制限酵素処理した発現プラスミド pCC1BAC に組み込んだ。その後、エレクトロポレーション法により大腸菌 TransforMaxEPI300 を形質転換し、50 µg/ml のアンピシリンを含む LB 寒天培地に塗り広げた。37°Cで一晩培養し形質転換体のコロニーを得た。以上のように、クロラムフェニコール耐性形質転換体として *G. hollisae* 1706B 株ゲノムライブラリーを作製した。ゲノム DNA の調製ならびにゲノムライブラリーの作製は、製造メーカーのマニュアルに従って行った。

3.2.5 DNA プローブの調製

コラゲナーゼ遺伝子のクローニングのため縮重プライマーを設計した。Forward プライマー F1 は精製酵素の内部配列 (AAFSSNHMY) を元に、Reverse プライマー R1 は相同性のあった *V. alginolyticus* (accession number: CAA44501) と *V. parahaemolyticus* (accession number: NP_797719) コラゲナーゼの活性中心に見られるコンセンサス配列 (HEYVH)を元にした。

F1: 5'-GAGGCNATCTTTAGCTCCAATCATATGTAYAAAY-3'

R1: 5'-ATCTAAGT AATGCACGTATTCATGYTCNAGRTT-3'

配列内の Y、R、N はそれぞれ C/T、A/G、A/C/T/G の塩基を示す。

上記プライマーセットを用いて PCR 反応（95°C : 0.5 分、45°C : 0.5 分、72°C : 1 分、50 サイクル）を行い、1,080 bp の PCR 産物を増幅した。増幅した PCR 産物を 1%アガロース電気泳動により分離して回収し、pGEM-T Easy ベクターに組み込み、大腸菌 JM109 に形質転換した。精製したプラスミドを鋳型として、digoxigenin (DIG)-high prime labeling reagent (Roche, Basel, Switzerland) を用いて DIG ラベル化プローブを作製した。DIG ラベル化プローブの作製は、製造メーカーのマニュアルに従って行った。

3.2.6 DIG ラベル化プローブを用いた *G. hollisae* 1706B 株ゲノムライブラリーのスクリーニング

ゲノムライブラリーのスクリーニングはコロニーハイブリダイゼーション法を用いて行なった。アンピシリン耐性形質転換体をナイロンメンブレンに転写し、0.5 N の NaOH を用いて菌体を溶解した。変性した DNA をメンブレンに固定化し protease K 処理を行なったのち、DIG ラベル化プローブを用いてハイブリダイゼーションを行なった。LB 寒天培地に生育した陽性コロニーを単離し、アンピシリンを含む LB 液体培地で培養し、回収した菌体から QIA genomic DNA extraction kit を用いてコラゲナーゼ陽性コロニーの BAC DNA を回収した。コロニーハイブリダイゼーションは、製造メーカーのマニュアルに従って行った。

3.2.7 DNA シーケンシング

精製した BAC DNA pCC1BAC-2 に含まれるコラゲナーゼ遺伝子の塩基配列を DNA オートシーケンサー (Prism 310, Applied Biosystems) を用いて解析した。同定したコラゲナーゼの塩基配列は DDBJ データベースに登録した (accession number: AB600550)。同定したコラゲナーゼ遺伝子配列の相同性解析は GenBank データベース、BLAST サーチプログラムおよび CLUSTAL W2 プログラムを使用した。

3.2.8 組換えタンパク質の作製

pCC1BAC-2 を鋳型として、コラゲナーゼ遺伝子を増幅した。ブレビバチルス発現系で組換えタンパク質を作製するために、コラゲナーゼ遺伝子の成熟体領域の 5'側に Nco I サイトを、3'側に Hind III サイトを付加するプライマーを設計した。

Forward: 5'-AAACCATGGCTTTCGCTGCGGTTGAACAGTGTGATCT-3'

Reverse: 5'-AAAAAGCTTTTACTGACGACACTGGTTAC-3'

下線は制限酵素サイトを示す。

5'側に Nco I サイトを、3'側に Hind III サイトを付加したコラゲナーゼ遺伝子の DNA 断片を Expand High Fidelity PCR system (Roche)を用いて増幅した。Nco I と Hind III で処理したブレビバチルス発現ベクター pNY326 のバチルスシグナル配列の下流にコラゲナーゼ遺伝子の DNA 断片を組み込み、発現プラスミド pNY326-Col2 を作製した。組換えコラゲナーゼを作製するために、エレクトロポレーション法により発現プラスミド pNY326-Col2 を *Brevibacillus choshinensis* S5 に形質転換した。ブレビバチルス形質転

換体を 50 µg/ml ネオマイシンを含む 2SLN 培地(4% ポリペプトン S、0.5% 酵母エキス、2% グルコース、0.001% FeSO₄·7H₂O、0.001% MnSO₄·7H₂O、0.0001% ZnSO₄·7H₂O、50 µg/ml ネオマイシン) で 30°C、48 時間培養した。培養液を遠心処理して菌体成分を除き、上清を 0.2 µm フィルターでろ過滅菌した。飽和硫酸アンモニウム溶液を加え、50% 硫酸アンモニウム濃度で沈殿を回収した。カラム精製は DEAE-Sepharose (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) を用いた FPLC システムで行った。沈殿を 50 mM Tris-HCl 緩衝液に溶解し、同緩衝液で平衡化した DEAE-Sepharose に吸着させ、0.2~1.1 M NaCl 濃度によるグラジエントクロマトグラフィーで溶出液を分画した。コラゲナーゼ活性がある画分を集め、30 kDa カットオフの限外濾過を用いて濃縮し、50 mM Tris-HCl 緩衝液に透析して精製組換え酵素標品とした。

3.2.9 FITC ラベル化コラーゲンを用いたコラーゲン分解活性の測定

コラーゲン分解活性は FITC-コラーゲンを用いて測定した[62]。Collagenase AMANO (Amano Enzyme, Nagoya, Japan)は *C. histolyticum* 由来コラゲナーゼとして用いた。酵素溶液と 0.05% FITC-コラーゲン、200 mM NaCl、5 mM CaCl₂ を含む 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) と混合し、30°C で 30 分間反応させた。反応後、EDTA を添加し、氷上で冷却して反応を停止した。反応液に 70%エタノールを含む 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 9.5) を等量添加し、氷上で 30 分間保持して未変性コラーゲンを沈殿させた。遠心分離によって上清中に遊離した分解されたコラーゲン断片を回収し、蛍光プレートリーダー (SH-9000, Corona Electric, Ibaraki, Japan) により 530 nm の蛍光強度を測定した (励起: 485nm)。コラーゲン分解活性 1 ユニット (U) は、30°C、1 分間あたりに 1 µg の FITC-コラーゲンを分解する活性と定義する。

3.2.10 組換えコラゲナーゼの反応速度論解析

K_m 、 V_{max} 、specific constant (V_{max}/K_m)を求めるために、反応測度論解析を行なった。0.5 μg の酵素を異なる量 (10~50 μg) の FITC-コラーゲンと混合し、30°Cで5分間反応させた。3.2.9と同様の方法で上清の蛍光強度を測定し、Lineweaver-Burk plotにより K_m 、 V_{max} 、specific constant (V_{max}/K_m)を算出した。

FITC-コラーゲンの他に合成基質 N-(3-[2-furyl]acryloyl)-Leu-Gly-Pro-Ala (FALGPA; Bachem AG, Bubendorf, Switzerland)を用いて反応測度論解析を行なった[63]。1 μg の酵素を、0.4 M NaCl と 40 mM CaCl_2 を含む 50 mM Tricine 緩衝液 (pH 7.5) に溶解した異なる量 (0.5~3.0 mM) の FALGPA と混合し、30°Cで5分間反応させた。反応後、プレートリーダーを用いて 345 nm の吸光度変化を測定した。Lineweaver-Burk plot により K_m 、 V_{max} 、specific constant (V_{max}/K_m)を算出した。FALGPA 分解活性1ユニット (U) は、30°C、1分間あたりに 1 μmol の FALGPA を分解する活性と定義する。

3.2.11 リアルタイムザイモグラフィ

0.05% FITC ラベル化ゼラチンを含む 10%ポリアクリルアミドゲルを用いて、リアルタイムザイモグラフィを行なった[64]。酵素を非還元条件下で電気泳動し、ゲルを 2.5% Triton X-100 を含む 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) で30分洗浄した。洗浄液を除き、200 mM NaCl、5 mM CaCl_2 を含む 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) を添加して、37°Cで5時間インキュベートした。コラゲナーゼで消化された FITC-ゼラチンをトランスイルミネーターで検出した。

さらには、プロテアーゼ阻害剤の効果を検証するために、インキュベーションの際に各

種プロテアーゼ阻害剤を添加した。メタロプロテアーゼ阻害剤の EDTA および o-phenanthroline、システインプロテアーゼ阻害剤である NEM、セリンプロテアーゼ阻害剤の PMSF は、それぞれ 20 mM、2 mM、5 mM、1 mM で使用した。

3.3 結果

3.3.1 *G. hollisae* 1706B 株由来コラゲナーゼ遺伝子のクローニング

*G. hollisae*1706B 株由来コラゲナーゼ遺伝子を増幅するために、精製酵素の内部配列 6 (AAFSSNHMY) とビブリオコラゲナーゼの活性中心のコンセンサス配列 (HEYVH) を元に縮重プライマーを設計した。増幅された 1,080 bp の PCR 産物の遺伝子配列から推定されるアミノ酸配列には、精製酵素の解析から判明した 4 種類の部分アミノ酸配列 (内部配列 2、3、4、7) が含まれていた (Fig. 10)。ゲノムライブラリースクリーニングを行うために、この PCR 産物の遺伝子配列を含むプラスミドを用いて DIG ラベル化した DNA プローブを調製した。DIG ラベル化 DNA プローブと *EcoR* I 消化した *G. hollisae*1706B 株由来 DNA ゲノムライブラリーを用いてコロニーハイブリダイゼーションしたところ、30 個の陽性クローンを得た。陽性クローンのうち、50 kb 以上のインサートを持つ pCC1BAC-2 を選択し、以下の実験に用いた。

3.3.2 *G. hollisae* 1706B 株由来コラゲナーゼ遺伝子の遺伝子配列の解析

pCC1BAC-2 のインサートの遺伝子配列を解析し、2.3 kb の *G. hollisae* 1706B 株由来コラゲナーゼ遺伝子の遺伝子配列を同定した (Fig. 10)。コラゲナーゼ遺伝子のオープンリーディングフレームは開始コドンの ATG (+1) から終始コドンの TAA (+2,301) までの 767 アミノ酸をコードすることが明らかとなった。ATG コドンの上流に Shine-Dalgarno 配列 (AGAAGAA) が確認された (-11~-5)。また、終始コドン TAA の下流には stem-loop 配列が確認された (+2,328~+2,347)。

菌体由来の精製酵素の N 末端配列である Ala-Val-Glu-Gln- Cys-Asp-Lys-Ser-Gln は、遺伝子配列から推定されるアミノ酸配列に相当する塩基番号 262 から 288 番と完全に一致し

た。遺伝子配列にはメタロプロテアーゼの活性中心に見られる相同配列である HEXXH を含み、塩基番号 1,474 から 1,488 番に HEYVH が確認された。さらには、菌体由来の精製酵素で同定された内部配列も全て一致した (Fig. 10)。

次に BLASTP プログラムを用いて、塩基配列から推定されるアミノ酸配列の相同性検索を行なった。*G. hollisae* コラゲナーゼは *V. alginolyticus* 由来コラゲナーゼ[20]および *V. parahaemolyticus* 由来コラゲナーゼ[16]とそれぞれ 59%、60%とアミノ酸レベルで高い相同性を示した。また、これらの酵素との相同性解析により、*G. hollisae* コラゲナーゼはプレプロ領域、触媒ドメイン、プレペプチダーゼ C 末端 (pre-peptidase C-terminal: PPC) ドメイン[65]からなるマルチドメイン酵素であることが明らかとなった (Fig. 11)。一方、他のビブリオ属由来のメタロプロテアーゼとの相同性は 35%以下であり、さらには *C. histolyticum* 由来コラゲナーゼの ColG および ColH との相同性はそれぞれ 12%、11%であった。

3.3.3 ブレビバチルス発現系を用いた組換えコラゲナーゼの作製とその性状解析

コラーゲン分解活性を維持した組換えタンパク質を作製できるか検討するために、ブレビバチルス発現系を用いて成熟酵素 (アミノ酸番号 88~767) の発現テストを行なった。発現プラスミド pNY326-Col2 を形質転換した形質転換体を培養し、その培養上清のコラーゲン分解活性を FITC-コラーゲンをを用いて測定したところ、モックと比較して高いコラーゲン分解活性が検出された。この結果より、活性を維持した組換えタンパク質が分泌されていることが明らかとなった。

組換えタンパク質の性状を解析するために、DEAE-Sepharose カラムを用いて培養上清から組換えタンパク質を精製した (Fig. 12A)。1 リットルの培養上清から 0.2 グラムの組

換えタンパク質が得られた。電気泳動によりバンドを確認すると、74 kDa、60 kDa、40 kDa の三本のバンドが検出された。74 kDa 酵素はプレプロ領域（アミノ酸番号 1~87）を除いた予測分子量と一致した。主要な分子である 60 kDa 酵素は菌体由来の精製酵素と同一の分子量と考えられる。ゼラチンザイモグラフィを行なったところ、74 kDa、60 kDa 酵素と比べて 40 kDa 酵素はゼラチン分解活性が弱いことが明らかとなった (Fig. 12B)。また、金属イオンのキレート剤であるメタロプロテアーゼ阻害剤の EDTA と o-phenanthroline を添加したところバンドは消失したが、システインプロテアーゼ阻害剤である NEM、セリンプロテアーゼ阻害剤の PMSF を添加してもバンドは消失しなかった (Fig. 12C)。さらには、これら三種類の分子は同じ N 末端配列を持つことから、74 kDa 酵素の C 末端領域が切断されて、60 kDa 酵素と 40 kDa 酵素が生じたと考えられる。FITC-コラーゲンをを用いてコラーゲン分解活性を測定したところ、比活性は 5,841 U/mg であり、培養上清の比活性と比べて 5.8 倍上昇していた。一方、本組換えタンパク質はカゼイン分解活性を持っていなかった [66]。

3.3.4 組換えコラーゲナーゼの反応速度論解析

FITC-コラーゲンと合成基質 FALGPA を用いて、*G. hollisae* 1706B 株由来組換えコラーゲナーゼの反応速度論解析を行なった (Table 1)。*G. hollisae* 1706B 株由来組換えコラーゲナーゼの FITC-コラーゲンに対する比活性は 5,314 U/mg で対照の *C. histolyticum* 由来コラーゲナーゼと比べて 4.1 倍高く、FALGPA に対する比活性は 7.40 U/mg で *C. histolyticum* 由来コラーゲナーゼと比べて 19 倍高かった。

FITC-コラーゲンに対するカイネティックパラメーターを算出したところ、 K_m は *C. histolyticum* 由来コラーゲナーゼと同程度であったが、 V_{max} は 4.2 倍速いため、5.3 倍高い

specific constant (V_{\max}/K_m)を示した。FALGPA を基質とした場合においても K_m は両酵素共に同程度であったのに対して、*G. hollisae* 1706B 株由来組換えコラゲナーゼの V_{\max} は *C. histolyticum* 由来コラゲナーゼと比べて 25 倍速く、24 倍高い specific constant (V_{\max}/K_m)を示した。*G. hollisae* 1706B 株由来組換えコラゲナーゼの比活性が高い理由として、高い specific constant (V_{\max}/K_m)が起因していると考えられる。以上の結果、*G. hollisae* 1706B 株由来組換えコラゲナーゼは FITC-コラーゲンと FALGPA のどちらの基質に対しても *C. histolyticum* 由来コラゲナーゼと比べて高い基質特異性を示すことが明らかとなった。

3.4 考察

本研究において *G. hollisae* 1706B 株由来コラゲナーゼの全遺伝子配列を同定した。同定した遺伝子配列は 2,301 塩基から成り、767 アミノ酸をコードする遺伝子であった。相同性解析の結果、オープンリーディングフレームはいくつかのビブリオ属由来コラゲナーゼと高い相同性を示した。また、ブレビバチルス発現系を用いて組換えタンパク質の作製に成功し、金属イオンキレート剤である EDTA でコラーゲン分解活性が消失することから、同定した遺伝子配列が金属酵素をコードする遺伝子であることを確認した。

BLASTP サーチの結果、*V. alginolyticus*、*V. parahaemolyticus* コラゲナーゼと 60%以上の相同性を示した。一方、*C. histolyticum* コラゲナーゼである ColG および ColH、あるいは *C. perfringens* コラゲナーゼである ColA とは 20%以下の相同性であった。このことから、*G. hollisae* 1706B 株由来コラゲナーゼは MEROPS データベースの分類で M9A に分類されるコラゲナーゼであることが明らかとなった[67]。一方、ビブリオ属由来プロテアーゼの分類も知られており、活性中心の相同性配列 HEXXH のアミノ酸配列と基質特異性から三種類のサブクラス（クラス I、II、III）に分類される[16]。本分類に従うと、相同性の高い *V. alginolyticus*、*V. parahaemolyticus* コラゲナーゼと同じクラス III に分類されることになる。しかし、*V. alginolyticus*、*V. parahaemolyticus* コラゲナーゼはカゼイン分解活性を持つことが報告されており、*G. hollisae* 1706B 株由来コラゲナーゼにはカゼイン分解活性がないことからこれらの酵素は性質が異なる酵素だと考えられる。この基質特異性の違いは酵素のドメイン構造に起因している可能性が考えられる。*V. alginolyticus*、*V. parahaemolyticus* コラゲナーゼは触媒ドメイン、PKD ドメイン、PPC ドメインからなる酵素であるが、*G. hollisae* 1706B 株由来コラゲナーゼは PKD ドメインを持たないので (Fig. 11)、このドメインがカゼイン分解活性に寄与しているのかもしれない

い。以上の事実より、*G. hollisae* 1706B 株由来コラゲナーゼはクラス III には当てはまらないため新しいクラスに分類すべきだと考えられるが、これら 3 つの酵素は進化的に近いことが示唆された。

組換え *G. hollisae* コラゲナーゼの比活性は *C. histolyticum* コラゲナーゼよりも予想以上に高かった (Table 1)。反応速度論解析の結果、組換え *G. hollisae* コラゲナーゼは *C. histolyticum* コラゲナーゼと比べて未変性コラーゲンおよび合成ペプチド基質である FALGPA に対して早い分解速度を示した。この結果は、コラーゲンおよびゼラチンに対する両酵素の分解メカニズムが異なることを示唆している。一方、本研究で用いた *C. histolyticum* コラゲナーゼは市販品であり、市販品の酵素は精製度や自己消化率が異なることが知られているため、結果の解釈に対して配慮する必要がある。電気泳動でタンパク質を調べた結果、本研究で用いた *C. histolyticum* コラゲナーゼは CBD や PKD ドメインが切断された分子も一部含まれており [66]、その結果、比活性が低くなった可能性がある。

上記のように、組換え *G. hollisae* コラゲナーゼは *C. histolyticum* コラゲナーゼよりも比活性が高いことから、組換え *G. hollisae* コラゲナーゼはなぜ効率的にコラーゲンを分解できるのか、さらにはどのようにコラーゲンを分解できるのかといった分解メカニズムの解明が期待される。コラーゲンは三重らせん構造を持った棒状の分子であり、一般的なプロテアーゼに対して分解耐性を有する。そのコラーゲンを分解できる酵素を一般的にコラゲナーゼと称する。コラゲナーゼとして知られているいくつかの分子はコラーゲンを分解するための特徴的な分解メカニズムを持つことが知られている。哺乳動物由来コラゲナーゼである MMP-1 は触媒ドメインと CBD として作用するヘモペキシンドメインの 2 つのドメインが協調して三重らせんを解き、 α 鎖を切断することが知られている [68]。*C. histolyticum* コラゲナーゼの ColG では、MMP-1 とは異なるメカニズムで分解することが触

媒ドメイン（コラゲナーゼモジュール）の結晶構造解析より明らかとなった。ColGのコラゲナーゼモジュールはアクチベータードメインとペプチダーゼドメインの2つのドメインからなり、両ドメインでコラーゲン線維を挟み込み、コラーゲン線維からコラーゲン一分子を引き剥がし、さらにはコラーゲン分子の三重らせんを解いてペプチダーゼドメインで α 鎖を分解するというメカニズムが提唱された[5]。一方、MMP-1でも *C. histolyticum* コラゲナーゼの ColH でも CBD がコラーゲンの分解には必須だと考えられている[6, 69]。さらには、ColHにおいて PKD ドメインがコラーゲン線維と CBD の結合を増強することが知られている[6]。バクテリア由来のコラーゲンを分解できるセリンプロテアーゼである *deseasin* MCP-1 では、PKD ドメインがコラーゲン線維に結合し、コラーゲン線維を膨潤させることにより、触媒ドメインのコラーゲン分解活性を促進することが示唆されている[7, 8]。一方、組換え *G. hollisae* コラゲナーゼは酵素活性に関与すると考えられている CBD も PKD ドメインも持たないため、触媒ドメインのみの 60 kDa 酵素の中に未同定の CBD が含まれているかもしれない。あるいは上記コラゲナーゼとは異なる分解メカニズムを有するかもしれない。組換え *G. hollisae* コラゲナーゼの分解メカニズムを解明するためには、今後、結晶構造解析による構造機能相関の研究を行う必要がある。

ブレビバチルス発現系を用いて活性を維持した組換えコラゲナーゼの作製に成功したことは工業的に価値がある。ブレビバチルスはグラム陽性細菌であるため、炎症反応を引き起こすエンドトキシンを産生せず、また、動物由来原料を用いずに培養することができる。したがって、本組換えコラゲナーゼは臍島移植や幹細胞移植のための組織分散用酵素として医療用途に用いられるコラゲナーゼとして有用であると考えられる。

第4章 *Grimontia hollisae* コラゲナーゼタンパク質のC末端領域の機能解析

4.1 序論

Grimontia hollisae 1706B 株が産生するコラゲナーゼの遺伝子配列を同定し、相同解析をした結果、*Vibrio alginolyticus*、*V. parahaemolyticus* コラゲナーゼと相同性があることから MEROPS データベースにおける M9A に分類されることが明らかとなった[66]。遺伝子配列から推定されるアミノ酸配列の解析をした結果、本コラゲナーゼタンパク質はプレプロ領域（アミノ酸番号 1~87）、触媒ドメイン（アミノ酸番号 88~615）、プレペプチダーゼ C 末端（pre-peptidase C-terminal: PPC）ドメイン（アミノ酸番号 688~749）から成ることが明らかとなった[66]。さらには、N 末端アミノ酸配列解析の結果、本コラゲナーゼは触媒ドメインと PPC ドメインを含む C 末端領域から成る 74 kDa タンパク質として分泌されると考えられる[66]。

一方、M9B に分類される *Clostridium histolyticum* は ColG および ColH の 2 種類のコラゲナーゼを分泌する。*C. histolyticum* コラゲナーゼはマルチドメイン酵素であり、ColG は 2 つの PPC ドメインを、ColH は 1 つの PPC ドメインを持つ[1]。*C. histolyticum* コラゲナーゼの PPC ドメインは、構造機能解析によりコラーゲン結合ドメイン（collagen-binding domain: CBD）として働くことが明らかになった[6, 54, 70]。*G. hollisae* コラゲナーゼと *C. histolyticum* コラゲナーゼは異なるクラスに分類されるが、*G. hollisae* コラゲナーゼの PPC ドメインも CBD として働くかどうか興味をそそられる。

本研究では、*G. hollisae* コラゲナーゼの PPC ドメインを含む C 末端領域がコラーゲンの三重らせん構造を認識して結合する CBD であると仮説を立てた。この仮説を証明するために、*G. hollisae* コラゲナーゼの C 末端領域（アミノ酸番号 616~767）の組換えタン

パク質を作製し、未変性コラーゲンあるいは変性コラーゲン（ゼラチン）に対する結合実験を行なった。また、結合実験、アミノ酸配列の相同性解析、二次構造予測、円偏光二色性(circular dichroism: CD)分析を行い、既存の細菌性コラゲナーゼの CBD である *C. histolyticum* コラゲナーゼの CBD との比較研究を通し、新規の CBD であるか検証した。さらには、C 末端領域を含む 74 kDa 酵素と触媒ドメインのみの 60 kDa 酵素を用い、C 末端領域がコラーゲン分解活性に影響を与えるか検証した。最後に、他の M9A に属するコラゲナーゼの PPC との相同性解析を行なった。

4.2 材料と方法

4.2.1 バクテリアおよびプラスミド

G. hollisae 1706B 株由来コラゲナーゼ遺伝子を含む発現プラスミド pNY326-Col2 は C 末端配列 (アミノ酸番号 616~767) をコードする遺伝子配列の鋳型として用いた。発現ベクター pBIC2 および *Brevibacillus choshinensis* HPD31-SP3 (Takara Bio, Shiga, Japan) は組換えタンパク質作製のベクターおよび宿主として用いた。

4.2.2 *G. hollisae* コラゲナーゼの C 末端領域の組換えタンパク質の作製

pNY326-Col2 を鋳型として、C 末端領域 (アミノ酸番号 616~767) をコードする遺伝子配列を増幅した。直鎖型発現プラスミド pBIC2 で組換えタンパク質を作製するために、C 末端領域 (アミノ酸番号 616~767) をコードする遺伝子配列の 5'側および 3'側に発現プラスミドと相同な塩基配列を付加するプライマーを設計した。このプライマーを用いることで、目的遺伝子をバチルス分泌シグナル配列の下流に連結させ、かつ N 末端に AD + 6×His + DDDDK (Enterokinase の認識配列) を付けた形で分泌させることができる。

Forward: 5'- GATGACGATGACAAAACCGAGGCGCTGGCGAAG -3'

Reverse: 5'- CATCCTGTTAAGCTTTTACTGACGACACTGGTT -3'

下線は直鎖型発現プラスミド pBIC2 と相同な配列を示す。

5'側および 3'側に発現プラスミドと相同な塩基配列を付加した C 末端領域 (アミノ酸番号 616~767) をコードする遺伝子配列の DNA 断片を Expand High Fidelity PCR system (Roche, Basel, Switzerland) を用いて増幅した。増幅した PCR 産物と直鎖型発現プラスミ

ド pBIC2 を混合し、*Brevibacillus in vivo cloning* 法により *Brevibacillus choshinensis* HPD31-SP3 を形質転換して発現プラスミドを作製した。ブレビバチルス形質転換体を TMNm 培地 (10 g/L グルコース、10 g/L ファイトンペプトン、5 g/L エルリッヒ カツオエキス、2 g/L 酵母エキス B2、10 mg/L FeSO₄·7H₂O、10 mg/L MnSO₄·7H₂O、1 mg/L % ZnSO₄·7H₂O、50 µg/ml ネオマイシン、pH 7.0) で 30°C、48 時間培養した。培養液を遠心処理して菌体成分を除き、上清を 0.2 µm フィルターでろ過滅菌した。飽和硫酸アンモニウム溶液を加え、50%硫酸アンモニウム濃度で沈殿を回収した。カラム精製は Ni-chelating カラム (cOmpete His-Tag Purification Column, Roche) を用いた ÄKTA system (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) で行った。沈殿を Tris-HCl 緩衝液 (50 mM Tris-HCl、500 mM NaCl、pH 8.0) に溶解し、同緩衝液で平衡化した Ni-chelating カラムに吸着させ、250 mM イミダゾールを含む Tris-HCl 緩衝液 (50 mM Tris-HCl、500 mM NaCl、250 mM imidazole、pH 8.0) で溶出した。溶出画分を集め、5 kDa カットオフの限外濾過を用いて濃縮し、Tris-HCl 緩衝液 (50 mM Tris-HCl、1 mM CaCl₂、pH 8.0) に透析した。1 U/ml 濃度のエンテロキナーゼと混合し、25°C で 16 時間反応させて His タグを切断した。プロテアーゼインヒビター (Pefabloc, Roche) を添加して反応を停止させ、再びニッケルカラムクロマトグラフィーにより His タグを取り除いた。C 末端領域 (アミノ酸番号 616-767) の組換えタンパク質はフロースルー画分に溶出され、溶出画分を 5 kDa カットオフの限外濾過を用いて濃縮し、Tris-HCl 緩衝液 (10 mM Tris-HCl、1 mM CaCl₂、pH 8.0) に透析して精製した。

精製した組換えタンパク質は、四重極飛行時間質量分析計 (maXis II, Bruker, Billerica, MA, USA)、N 末端アミノ酸分析計 (Procise 491, Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA)、サイズ排除クロマトグラフィー (ÄKTA system, GE Healthcare) により確認した。分光

光度計 (NanoDrop 1000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いて濃度を算出し、以下の実験に用いた。

4.2.3 SDS-PAGE

電気泳動は Laemmli の方法[45]に従い、7.5%あるいは 10%ポリアクリルアミドゲルを用いて行なった。泳動後、ゲルを固定液 (50%メタノール、10%酢酸) で 3 分間固定処理し、染色液 (0.25% Coomassie brilliant blue (CBB) R-250、50%メタノール、10%酢酸) で染色した。1 分半後、染色液を除き、脱色液 (5%メタノール、7.5%酢酸) で脱色した。

4.2.4 結合実験

不溶性コラーゲン線維に対する結合実験は Matsushita の方法[6]に従い行なった。まず、C 末端領域の組換えタンパク質と BSA を結合バッファー (50 mM Tris-HCl、200 mM NaCl、5 mM CaCl₂、pH 7.5) に溶解し、それぞれ 0.2 mg/ml 濃度の混合液を調製した。5 mg の不溶性コラーゲン線維はあらかじめ 400 μ l の結合バッファーで 5 回洗浄した。100 μ l の混合液と 5 mg の不溶性コラーゲン線維をスピнкаラム (ポアサイズ 0.22 μ m) 内で混合し、室温で 30 分間インキュベートした。10,000 $\times g$ で 15 分間遠心した後、濾過液を電気泳動に供した。電気泳動後のバンドの有無により、不溶性コラーゲン線維への結合を判定した。塩濃度の影響を調べる場合は、結合バッファーの NaCl 濃度を 0、0.1、0.5、1.0 M となる様に調整した。また、pH の影響を調べる場合は、緩衝液を 50 mM の MES (pH 6.0)、HEPES (pH 7.0)、TAPS (pH 8.0 および pH 9.0) に変更した。カルシウムイオンの影響を調べる場合には、結合バッファーに 10 mM EGTA を添加して行なった。一方、ゼラチンに対する結合能を調べる場合には、不溶性コラーゲン線維をゼラチンセファロースビー

ズ (GE Healthcare) に変更して不溶性コラーゲン線維を基質とした場合と同様の実験を行なった。

4.2.5 Scatchard analysis

コラーゲン線維との親和性を評価するために上記結合実験の方法を改変して Scatchard analysis を行なった。結合実験において、混合液中の C 末端領域組換えタンパク質の濃度を様々な濃度 (0.1~2.0 mg/ml) に調整し、BSA 濃度は 0.05 mg/ml に固定した。50 μ l の混合液と 2.5 mg の不溶性コラーゲン線維を用いて結合実験を行なった。既知濃度の C 末端領域組換えタンパク質を電気泳動し、NIH ImageJ ソフトウェアを用いて CBB 染色後のバンドの濃さを定量して検量線を作製した。結合実験を行なったサンプルのバンドを定量することにより、結合したタンパク質量を算出した。独立した三回の実験結果を Scatchard plot により解析し、解離定数 (dissociation constant: K_d) と最大結合量 (number of binding sites on insoluble collagen: B_{max}) を算出した。

4.2.6 各種コラーゲン結合ビーズの作製

各種ペプシン可溶化コラーゲン分子 (ウシ I 型、II 型、III 型、V 型コラーゲン [Nippi, Tokyo, Japan]、ヒト IV 型コラーゲン [Collagen Research Center, Tokyo, Japan]) をセファロースビーズ (NHS-activated Sepharose™ 4 Fast Flow, GE Healthcare) に固定化し、各種コラーゲンに対する結合を評価した。酢酸に溶解した各種コラーゲンを等量の二倍濃度のカップリングバッファーと混合し、カップリング溶液を調製した (1.5 mg/ml コラーゲン、0.2 M NaHCO_3 、0.5 M NaCl 、4% スクロース)。一方、CNBr 活性化セファロースを 1 mM HCl で洗浄し、セファロースビーズを活性化した。活性化したビーズとカップリング溶液

を混合し、4°Cで2日間攪拌しながら反応させた。遠心して未反応のコラーゲンを除いた後、0.1 M Tris-HCl (pH 8.0)を添加し、室温で2時間反応させて未反応の活性基をブロックした。塩基性と酸性の二種類の洗浄液 (0.1 M Tris-HCl [pH 8.0]および 0.1 M sodium acetate, 0.5 M NaCl [pH 4.0]) を用いて交互に3回ずつ洗浄し、結合バッファーに再懸濁して結合実験に供した。

4.2.7 アミノ酸配列の相同性解析

Protein BLAST プログラムを用いて、*G. hollisae* コラゲナーゼの PPC ドメインを含む C 末端領域の一次構造と他の細菌性コラゲナーゼの PPC ドメインの相同性を解析した。アミノ酸配列の相同性解析は Clustal Omega プログラムを用いて行なった[71]。

4.2.8 *in silico* 二次構造予測

細菌性コラゲナーゼの PPC ドメインの二次構造予測は NPS@structure server を用いて行なった[72]。各種 PPC ドメインの配列は以下の通りである。*G. hollisae* コラゲナーゼ (NCBI accession number: BAK39964) の PPC ドメイン：アミノ酸番号 647~767、*C. histolyticum* コラゲナーゼ ColG (NCBI accession number: D87215)の CBD1：アミノ酸番号 888~999 および CBD2：アミノ酸番号 1007~1118)、*C. histolyticum* コラゲナーゼ ColH (NCBI accession number: AB014075)の CBD：アミノ酸番号 906~1016。二次構造予測を検証するために、5種類の方法 (MLRC[73], DSC[74], GOR IV[75], PHD[76] and PREDATOR[77]) を用いて解析した。

4.2.9 円偏光二色性 (CD) 分析

CD スペクトルは光路長 1 mm の石英セルを用いて測定した。分光光度計 (NanoDrop 1000) を用いてタンパク質濃度を算出した。各種 PPC ドメインを 10 mM リン酸バッファー (pH 7.5) で希釈し、濃度 0.1 mg/ml、温度 20°C で波長スキャンを行なった。波長スキャンは 0.1 nm 毎に 8 回スキャンし、その平均を CD スペクトルデータとした。αヘリックスやβシートといった二次構造含量を予測するため、BeStSel software を用いて CD スペクトルデータを解析した[78, 79]。

4.2.10 組換えコラゲナーゼの調製

pNY326-Col2 を形質転換したブレヴィバチルス形質転換体を 50 µg/ml ネオマイシンを含む 2SLN 培地 (4% ポリペプトン S、0.5% 酵母エキス、2% グルコース、0.001% FeSO₄·7H₂O、0.001% MnSO₄·7H₂O、0.0001% ZnSO₄·7H₂O、50 µg/ml ネオマイシン) で 30°C、48 時間培養した。培養液を遠心処理して菌体成分を除き、上清を 0.2 µm フィルターでろ過滅菌した。飽和硫酸アンモニウム溶液を加え、50%硫酸アンモニウム濃度で沈殿を回収した。カラム精製は DEAE-Sepharose (GE Healthcare) を用いた FPLC システムで行った。沈殿を 50 mM Tris-HCl 緩衝液に溶解し、同緩衝液で平衡化した DEAE-Sepharose に吸着させ、0.2~1.1 M NaCl 濃度によるグラジエントクロマトグラフィーで溶出液を分画した。74 kDa コラゲナーゼおよび 60 kDa コラゲナーゼの溶出画分を集め、30 kDa カットオフの限外濾過を用いて濃縮し、50 mM Tris-HCl 緩衝液に透析して精製組換え酵素標品とした[66]。

4.2.11 コラーゲン分解活性およびゼラチン分解活性の測定

コラーゲン分解活性は FITC ラベル化コラーゲンを用いて測定した[66]。酵素溶液と

0.05% FITC-コラーゲン、200 mM NaCl、5 mM CaCl₂を含む 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) と混合し、30°Cで 30 分間反応させた。反応後、EDTA を添加し、氷上で冷却して反応を停止した。反応液に 70%エタノールを含む 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 9.5) を等量添加し、氷上で 30 分間保持して未変性コラーゲンを沈殿させた。遠心分離によって上清中に遊離した分解されたコラーゲン断片を回収し、蛍光プレートリーダー (SH-9000, Corona Electric, Ibaraki, Japan) により 530nm の蛍光強度を測定した (励起 : 485nm)。コラーゲン分解活性 1 ユニット (U) は、30°C、1 分間あたりに 1 μg の FITC-コラーゲンを分解する活性と定義する。

ゼラチン分解活性を測定する場合には FITC-コラーゲンに代えて FITC-ゼラチンを用いて測定した。また、分解されなかった FITC-ゼラチンを沈殿させる際には、反応液に 30% 濃度の氷冷したトリクロロ酢酸を等量添加し、氷上で 30 分間保持して未変性コラーゲンを沈殿させた。ゼラチン分解活性 1 ユニット (U) は、30°C、1 分間あたりに 1 μg の FITC-ゼラチンを分解する活性と定義する。

4.3 結果

4.3.1 *G. hollisae* 1706B 株由来コラーゲナーゼの C 末端領域の組換えタンパク質の調製とそのコラーゲン結合活性の検証

*G. hollisae*1706B 株由来コラーゲナーゼの PPC ドメインがコラーゲン結合能を持つか調べるために、PPC ドメインを含む C 末端領域（アミノ酸番号 616～767）の組換えタンパク質の調製を試みた（Fig. 13A）。精製した組換えタンパク質を電気泳動すると、15 kDa 付近に一本のバンドが確認された（Fig. 13B）。非還元条件で泳動すると、還元条件よりも低分子に泳動されることから、配列内に含まれるシステイン残基がジスルフィド結合を形成していることが示唆された。推定されるアミノ酸配列から算出される予測分子量は 15,448.72 Da である。四重極飛行時間質量分析（QTOF-MS）を行なったところ、組換えタンパク質の分子量が 15,445.01 Da であることが明らかとなった[80]。配列中にある 4 個のシステイン残基が 2 個のジスルフィド結合を形成すると予測分子量は 15,444.72 Da と算出され、この値は QTOF-MS で測定された天然状態の分子量 15,445.01 Da と極めて近い。また、N 末端アミノ酸配列を解析したところ、TEALAKGDSG の配列が確認され[80]、設計したタンパク質が得られていることが確認された。さらには、サイズ排除クロマトグラフィーを行い、得られた組換えタンパク質が会合することなく単分子で存在していることを確認した[80]。以上の結果、設計した通りに組換えタンパク質が得られており、以下の機能解析の実験に用いることとした。

4.3.2 *G. hollisae* 1706B 株由来コラーゲナーゼの C 末端領域の組換えタンパク質のコラーゲン結合活性の検証

最初に、不溶性 I 型コラーゲン線維およびゼラチンビーズを基質として、C 末端配列組

換えタンパク質の結合実験を行なった。C 末端領域組換えタンパク質と不溶性コラーゲン線維をインキュベートした後、遠心して結合しなかったタンパク質を回収した。得られた濾過液を電気泳動したところ、不溶性コラーゲン線維とインキュベートしたサンプルではコラーゲン線維とインキュベートするとバンドは明らかに減少した (Fig. 13C 左図)。一方、ゼラチンビーズとインキュベートしたサンプルではゼラチンビーズとインキュベートしてもバンドの濃さは変わらなかった (Fig. 13C 右図)。コントロールとして添加した BSA は不溶性コラーゲン線維、ゼラチンビーズとインキュベートしてもバンドの濃さに変化はなかった (Fig. 13C)。以上の結果、C 末端配列組換えタンパク質は不溶性コラーゲン線維には結合するが、変性したゼラチンには結合しないことが明らかとなった。すなわち、C 末端領域組換えタンパク質はコラーゲンの三重らせん構造を認識して結合することが明らかとなった。

4.3.3 Scatchard analysis

C 末端領域組換えタンパク質の不溶性コラーゲン線維に対する親和性を調べるために、C 末端配列組換えタンパク質の濃度を変えて結合実験を行い、解離定数 (K_d) と最大結合量 (B_{max}) を算出した。C 末端配列組換えタンパク質の濃度を上げると、それに伴い結合量も増加した (Fig. 14A)。Scatchard plot 解析を行なったところ、 K_d は $2.72 \pm 0.31 \times 10^{-5}$ M、 B_{max} は 1.94 ± 0.07 nmol/mg collagen であった (Fig. 14B)。

4.3.4 各種コラーゲンに対する結合能

I 型コラーゲン以外のコラーゲンに対する結合を調べるために、I 型、II 型、III 型、IV 型、V 型コラーゲンを固定化したセファロースビーズを用いて結合実験を行なった (Fig.

15)。コラーゲンを固定化していないセファロースビーズをコントロールとした。C 末端領域組換えタンパク質はコントロールのセファロースビーズには結合しなかったが、I 型、II 型、III 型、IV 型、V 型コラーゲンを固定化したセファロースビーズの全てに結合した。以上の結果、C 末端配列組換えタンパク質は I 型コラーゲン以外にも、II 型、III 型、IV 型、V 型コラーゲンにも結合することが明らかとなった。

4.3.5 *C. histolyticum* 由来コラゲナーゼの PPC ドメインとの比較

C. histolyticum 由来コラゲナーゼの PPC ドメインはよく研究されており、CBD として働くことが明らかとなっている[6, 54, 81]。そこで、*G. hollisae* 1706B 株由来コラゲナーゼの PPC ドメインと *C. histolyticum* 由来コラゲナーゼの三種類の CBD との比較実験を行なった。

まず、Clustal Omega プログラムを用いて一次構造の比較を行なった[71]。*G. hollisae* コラゲナーゼの PPC ドメインと *C. histolyticum* 由来コラゲナーゼの三種類の CBD のアミノ酸配列の相同性は 11.2%から 22.7%であり、*C. histolyticum* 由来コラゲナーゼの三種類の CBD 同士の相同性 (30.3%から 38.5%) よりも明らかに低かった (Table 2)。以上の結果、*G. hollisae* コラゲナーゼの PPC ドメインの一次構造は *C. histolyticum* 由来コラゲナーゼの三種類の CBD の一次構造とは異なることが示された。

次に、二次構造を比較するために NPS@structure server [72]を用いた *in silico* 二次構造予測を行なった。この解析の結果、*G. hollisae* コラゲナーゼの PPC ドメインと *C. histolyticum* 由来コラゲナーゼの三種類の CBD 共にβシートとランダムコイルから成るタンパク質であると予測された (Fig. 16)。*C. histolyticum* 由来コラゲナーゼの三種類の CBD には 8~9 か所のβシート構造が分布しており、各βシート構造がランダムコイルによ

り繋がれている。一方、*G. hollisae* 由来コラゲナーゼの N 末端側を除く配列（アミノ酸番号：30～120）において 7 か所のβシート構造が予測され、*C. histolyticum* 由来コラゲナーゼの三種類の CBD と比較してβシートとランダムコイルの分布が類似していることが明らかとなった。したがって、この解析ではこれらのタンパク質の二次構造は類似していると予測された。

さらには、円偏光二色性を測定し、CD スペクトルから二次構造の比率を予測した。*G. hollisae* コラゲナーゼの C 末端領域組換えタンパク質の CD スペクトルは *C. histolyticum* 由来コラゲナーゼの CBD の CD スペクトルとは全く異なるプロファイルであった (Fig. 17A)。しかし、不思議なことに CD スペクトルから予測される二次構造の比率は類似していた (Fig. 17B～E)。βシート構造について詳細に解析できる BeStSel software[78]を用いて CD スペクトルデータを解析したところ、*C. histolyticum* 由来コラゲナーゼの CBD の右巻き逆平行βシート構造の比率が 30%程度であるのに対して、*G. hollisae* コラゲナーゼの C 末端領域組換えタンパク質では右巻き逆平行βシート構造の比率が 52.8%であった (Fig. 17B)。*G. hollisae* コラゲナーゼの C 末端領域組換えタンパク質と *C. histolyticum* 由来コラゲナーゼの CBD の CD スペクトルが異なったプロファイルであったのは、右巻き逆平行βシート構造の比率が高いことが原因だと考えられる。

最後に、様々なバッファーを用いて結合実験を行なった (Fig. 18)。C 末端配列組換えタンパク質の不溶性コラーゲン線維に対する結合において、塩濃度の違い (0～1 M) (Fig. 18A)、pH の変化 (pH 6～9) (Fig. 18B)、さらには EGTA の添加 (Fig. 18C 左図) は影響しなかった。一方、Matsushita らの研究によると、*C. histolyticum* 由来コラゲナーゼの CBD も塩濃度の違い (0～1 M)、pH の変化 (pH 6～9) は結合に影響を与えないが、EGTA の添加により結合が阻害されると報告されている[54]。本研究においても *C.*

histolyticum 由来コラゲナーゼ ColG の CBD (CBD2 および CBD1-CBD2) では EGTA を添加すると結合が阻害されることを確認した (Fig. 18C 右図)。以上の結果、C 末端領域組換えタンパク質において、コラーゲンとの結合にはカルシウムイオンは必須ではなく、C 末端領域組換えタンパク質は *C. histolyticum* 由来コラゲナーゼの CBD とは異なったメカニズムでコラーゲンに結合する可能性が示唆された。

4.3.6 *G. hollisae* 由来コラゲナーゼにおける分解活性に対する C 末端領域の効果

G. hollisae コラゲナーゼにおいて PPC ドメインを含む C 末端領域がコラーゲン分解活性に影響を与えるか調べるために、C 末端領域を含む 74 kDa コラゲナーゼと触媒ドメインのみの 60 kDa コラゲナーゼを用い (Fig. 19A)、コラーゲン分解活性およびゼラチン分解活性を測定した。74 kDa コラゲナーゼのコラーゲン分解活性は 60 kDa コラゲナーゼの活性に比べておよそ 2 倍高いことが明らかとなった (Fig. 19B)。一方、両者のゼラチン分解活性は同等であった (Fig. 19C)。以上の結果、*G. hollisae* コラゲナーゼにおいて PPC ドメインを含む C 末端領域はコラーゲン分解活性を促進することが確認された。

4.3.7 *G. hollisae* コラゲナーゼ由来 PPC ドメインと他の M9A コラゲナーゼ由来 PPC ドメインの相同性

G. hollisae 1706B 株由来コラゲナーゼの PPC ドメインと他の M9A コラゲナーゼの PPC ドメインに相同性があるか検証するために、Protein BLAST プログラムを用いて相同性のあるコラゲナーゼを検索した。その結果、7 種類のビブリオ菌由来コラゲナーゼが見つかった。

次に、Clustal Omega プログラム[71]を用いて、*G. hollisae* コラゲナーゼおよび 7 種類

の M9A コラゲナーゼの PPC ドメインの一次構造の比較を行なった (Fig. 20)。 *G. hollisae* コラゲナーゼの PPC ドメインと 7 種類の M9A コラゲナーゼの PPC ドメインのアミノ酸配列の相同性は 41.0%から 57.3%であり、 *C. histolyticum* 由来コラゲナーゼの 3 種類の CBD 同士の相同性 (30.3%から 38.5%) よりも明らかに高かった (Table 2, Table 3)。また、これら 8 種類の PPC ドメインにおいて、立体構造の安定化に関与するシステイン残基の位置が保存されていることが明らかとなった。以上の結果、7 種類の M9A コラゲナーゼの PPC ドメインの一次構造は *G. hollisae* コラゲナーゼの PPC ドメインと相同性があり、さらには立体構造も類似している可能性が示された。

4.4 考察

本研究において、*G. hollisae* 1706B 株由来コラゲナーゼの PPC ドメインを含む C 末端領域がコラーゲンの三重らせん構造を認識して結合する新規の CBD であることを見出した。C 末端領域の組換えタンパク質が未変性コラーゲンに結合し変性コラーゲン（ゼラチン）には結合しないことから、C 末端領域が三重らせん構造を認識して結合することが示された (Fig. 13C)。また、既存の細菌性コラゲナーゼの CBD である *C. histolyticum* 由来コラゲナーゼの CBD と一次構造が異なることから新規の CBD と判断した。一次構造の相同性に関しては、*G. hollisae* コラゲナーゼの PPC ドメインと *C. histolyticum* 由来コラゲナーゼの三種類の CBD のアミノ酸配列の相同性は *C. histolyticum* 由来コラゲナーゼの三種類の CBD 同士の相同性の半分以下であった (Table 2)。

二次構造の予測を二種類の方法で行なったところ、二次構造に関しては *G. hollisae* コラゲナーゼの PPC ドメインと *C. histolyticum* 由来コラゲナーゼの三種類の CBD は相同性があると考えられる。NPS@structure server を用いた *in silico* 二次構造予測では、*G. hollisae* コラゲナーゼの PPC ドメインと *C. histolyticum* 由来コラゲナーゼの三種類の CBD において二次構造要素の含量とそれらの分布が類似していることが明らかとなった (Fig. 16)。二次構造要素の含量に関して、*in silico* 二次構造予測の結果は BeStSel software を用いて CD スペクトルデータを解析した結果と一致した (Fig. 17)。一方、CD スペクトルデータ解析では、*G. hollisae* コラゲナーゼの C 末端領域組換えタンパク質と *C. histolyticum* 由来コラゲナーゼの CBD では逆平行 β シート構造の組成比が異なることが明らかとなった (Fig. 17B~E)。両者の β シート構造の組成比が異なることを考慮すると、タンパク質全体としての三次構造は異なる可能性が示唆された。両者の立体構造の違いを検証するためには結晶構造解析を行う必要があり、今後の研究の発展が期待される。

さらには、*G. hollisae* コラゲナーゼにおいて PPC ドメインを含む C 末端領域がコラーゲン分解活性を促進することを見出した (Fig. 19)。このような現象は *C. histolyticum* 由来コラゲナーゼ ColH や哺乳類コラゲナーゼ MMP-1 といった他のコラゲナーゼでも報告されている[6, 68]。両者の C 末端領域は進化的に類似していないにも関わらず、両者がコラーゲンを分解する上で C 末端領域を有効利用していることは興味深い。*C. histolyticum* 由来コラゲナーゼの CBD はコラーゲンの三重らせん構造の緩んだ箇所には結合し[82]、触媒ドメインをコラーゲン線維に留めて効率よく分解させるというメカニズムが提唱されている[6]。また、MMP-1 の CBD であるヘモペキシンドメインは触媒ドメインと協調して三重らせんを解くと考えられている[68]。*G. hollisae* コラゲナーゼにおいて PPC ドメインを含む C 末端領域がどのように触媒ドメインのコラーゲン分解活性を促進しているのか、今後の研究によってそのメカニズムが解明されることが期待される。

G. hollisae コラゲナーゼの C 末端領域の応用を考えると、ドラッグデリバリーシステム分野におけるアンカリング分子としての利用が考えられる。*C. histolyticum* 由来コラゲナーゼの CBD は薬剤や成長因子との融合タンパク質として血中投与すると全身のコラーゲンが豊富な組織に生理活性物質を集積させることができると報告されている[83, 84]。また、コラーゲン製の移植基材との組み合わせで投与すると、局所に生理活性物質を留め、長期にわたってその効果を発揮させることも報告されている[85]。*G. hollisae* コラゲナーゼの C 末端領域は生理条件下において様々な型のコラーゲンに結合できるなど *C. histolyticum* 由来コラゲナーゼの CBD と同等な機能が確認された[6, 54, 81] (Fig. 14, 15, 18A, 18B) ので、*C. histolyticum* 由来コラゲナーゼの CBD のように生理活性物質のアンカリング分子になり得ると考えている。さらには、生理活性物質との融合タンパク質を細胞培養用プラスチックディッシュやコラーゲン性三次元培養基材に固相

化することにより、再生医療分野における細胞培養にも応用できる。*G. hollisae* コラゲナーゼの C 末端領域は *C. histolyticum* 由来コラゲナーゼの CBD と異なりコラーゲンとの結合にカルシウム依存性がないため、低カルシウム条件での培養が必要な上皮系細胞、特に表皮細胞の培養の際には有効だと考えられる[86] (Fig. 18C)。

細菌性コラゲナーゼの研究は M9B に属する *C. histolyticum* 由来コラゲナーゼの研究が盛んに行われてきた。本研究において、M9A に属する *G. hollisae* コラゲナーゼの PPC ドメインが新規の CBD であることを証明した。本 CBD は *C. histolyticum* 由来コラゲナーゼの CBD と同様に三重らせん構造を認識してコラーゲンに結合するが、既存の CBD とは立体構造が若干異なっていると予想され、その結果、コラーゲン結合の性質も若干異なると考えられる。さらには、いくつかのビブリオ属のコラゲナーゼにおいて、その PPC ドメインが *G. hollisae* コラゲナーゼの PPC ドメインと一次構造が類似していることを確認した (Fig. 20)。M9A コラゲナーゼの PPC ドメインも CBD として働くことが予想され、PPC ドメインの機能構造相関に関する研究が進めば、*C. histolyticum* 由来コラゲナーゼの CBD とは異なる応用の可能性が見えてくると考えられる。今後、M9A コラゲナーゼの基礎研究、さらには M9A コラゲナーゼの PPC ドメインの応用研究が進むことが期待される。

第5章 *Grimontia hollisae* 由来組換えコラゲナーゼの組織分散酵素への応用研究

5.1 序論

細菌性コラゲナーゼはコラーゲンが主成分である組織・臓器から様々な組織・臓器特異的な細胞を単離する際に用いられている。初代細胞を単離することは細胞の機能解析を行う上で重要であり[87, 88]、臨床研究においてもガン幹細胞の単離はガンの病態生理を研究する上で重要である[89, 90]。さらには、細胞単離の手技は細胞移植医療や再生医療の分野において必要不可欠な技術として考えられている[91-94]。このような細胞単離のための組織分散用酵素には一般的に *Clostridium histolyticum* 由来コラゲナーゼが使用されている。*C. histolyticum* 由来コラゲナーゼ製剤には ColG と ColH の二種類のコラゲナーゼが含まれている。これら二種類のコラゲナーゼはコラーゲンの分解において異なる役割を担っている[95, 96]。両酵素が効率的な細胞単離に必要だと考えられており[12]、対象となる組織・臓器によって二種類の酵素の量比が最適化されている製品もある[97]。しかし、*C. histolyticum* 由来コラゲナーゼ製品はコラゲナーゼが精製されていたとしてもロット間やロット内で活性のバラツキが見受けられる。一つの製剤に二種類の酵素を混合することは製剤の安定性が損なわれるリスクがあり、両酵素の自己消化によりロット間やロット内で活性のバラツキを生じさせているのかもしれない[98-101]。さらには、*C. histolyticum* 由来コラゲナーゼでは切断できないアミノ酸配列[13]やコラーゲン分子種が存在すること[14, 15]から、組織分散用酵素としてのコラゲナーゼ製剤には改善の余地がある。

Grimontia hollisae は元々ビブリオ属に分類されていたグラム陰性菌であり[24]、いくつかのビブリオ菌はコラゲナーゼを産生することが知られている[1]。*G. hollisae* 1706B 株が産生するコラゲナーゼは活性の強い 60 kDa のコラゲナーゼとして同定された[28]。この

コラゲナーゼは生理条件下において安定かつ最も活性が高く、鞣した皮革をも分解することができる[29]。 *G. hollisae* 1706B 株由来コラゲナーゼのこのような性質を考慮すると、一成分からなるコラゲナーゼ製剤として組織分散に用いることができる可能性が示唆される。

第3章において *G. hollisae* 1706B 株が産生するコラゲナーゼの遺伝子配列を同定し、本コラゲナーゼは触媒ドメインとプレペプチダーゼ C 末端ドメインを含む C 末端領域から成る 74 kDa タンパク質として分泌されることを明らかとした。また、ブレビバチルス発現系を用いて 74 kDa タンパク質として組換えタンパク質の作製を行ったところ、74 kDa タンパク質として分泌後、大部分の酵素が自己消化により C 末端領域が切断されて触媒ドメインのみの 60 kDa タンパク質となることを明らかとした[66]。さらには、第4章において 74 kDa 酵素と 60 kDa 酵素ではコラーゲン分解活性が異なることを明らかとした[80]。一般的に組換えタンパク質は天然タンパク質に比べて均一性と安定性の点で優れている[102]が、74 kDa 組換えタンパク質はその特長を示していない。すなわち、74 kDa 組換えタンパク質には 74 kDa 酵素と 60 kDa 酵素とが混在するため均一性が損なわれること、さらには 74 kDa 酵素の自己消化により活性の安定性も損なわれることを考慮すると、74 kDa 組換えタンパク質をコラゲナーゼ製剤として使用するのにはふさわしくない。したがって、*G. hollisae* 1706B 株由来コラゲナーゼを組織分散用酵素製剤として応用するには、60 kDa 組換えタンパク質を直接発現する必要がある。

本研究では、60 kDa の *G. hollisae* 1706B 株由来コラゲナーゼを設計し、ブレビバチルス発現系を用いて組換えタンパク質を産生できるか検証した。次に、60 kDa 組換えタンパク質がコラーゲン分解活性を維持しているか、また、コラゲナーゼ製剤として使用できるだけの活性の安定性があるか、さらには初代細胞を単離することができるか検証した。初

代細胞単離の評価はマウス腭島分離を用いた。マウス腭島分離は単離した腭島の機能評価系が確立されており[103]、さらには臨床用コラゲナーゼ製剤が開発されている[104]ため、評価系として最適である。

5.2 材料と方法

5.2.1 バクテリアおよびプラスミド

G. hollisae 1706B 株由来 74 kDa コラゲナーゼ遺伝子を含む発現プラスミド pNY326-Col2 は 62 kDa コラゲナーゼ (アミノ酸番号 88~646) および 60 kDa コラゲナーゼ (アミノ酸番号 88~624) をコードする遺伝子配列の鋳型として用いた。発現ベクター pNY326 および *Brevibacillus choshinensis* HPD31-SP3 (Takara Bio, Shiga, Japan) は組換えタンパク質作製のベクターおよびホストとして用いた。

5.2.2 試薬

Liberase MTF C/T, GMP grade kit (Roche, Basel, Switzerland) は *C. histolyticum* 由来精製コラゲナーゼ製剤および精製サーモライシン製剤として用いた。ウシ由来ペプシン可溶化 I 型、II 型、III 型、V 型コラーゲン (Nippi, Tokyo, Japan)、ウシ由来酸抽出 IV 型コラーゲン (Nippi) およびヒト由来ペプシン可溶化 VI 型コラーゲン (BD Biosciences, Bedford, MA, USA) はコラーゲン分解実験におけるコラゲナーゼの基質として用いた。

5.2.3 *G. hollisae* コラゲナーゼ由来組換えタンパク質の作製

pNY326-Col2 を鋳型として、62 kDa コラゲナーゼ (アミノ酸番号 88~646、1,677 bp) および 60 kDa コラゲナーゼ (アミノ酸番号 88~624、1,611 bp) をコードする遺伝子配列を増幅した。直鎖型発現プラスミド pNY326 で組換えタンパク質を作製するために、62 kDa コラゲナーゼ (アミノ酸番号 88~646) および 60 kDa コラゲナーゼ (アミノ酸番号 88~624) をコードする遺伝子配列の 5'側および 3'側に発現プラスミドと相同な塩基配列を付加するプライマーを設計した。このプライマーを用いることで、目的遺伝子をバチル

ス分泌シグナル配列の下流に連結させ、組換えタンパク質を分泌させることができる。

62 kDa Forward: 5'- CCCATGGCTTTCGCTGCGGTTGAACAGTGTGATCT -3'

62 kDa Reverse: 5'- CATCCTGTTAAGCTTAGGTATTACCACCAGATTCA -3'

60 kDa Forward: 5'- CCCATGGCTTTCGCTGCGGTTGAACAGTGTGATCT -3'

60 kDa Reverse: 5'- CATCCTGTTAAGCTTACTGTCGCCCT TCGCCAGC -3'

下線は直鎖型発現プラスミド pNY326 と相同な配列を示す。

直鎖型発現プラスミド pNY326 を増幅する際は下記プライマーを用いた。

Forward: 5'- AAGCTTAACAGGATGCGGGG -3'

Reverse: 5'- AGCGAAAGCCATGGGAGCAA -3'

下線はインサートの 5'側および 3'側に付加した相同な配列を示す。

5'側および 3'側に発現プラスミドと相同な塩基配列を付加した 62 kDa コラゲナーゼ (アミノ酸番号 88~646) および 60 kDa コラゲナーゼ (アミノ酸番号 88~624) をコードする遺伝子配列の DNA 断片を Expand High Fidelity PCR system (Roche)を用いて増幅した。増幅した PCR 産物と直鎖型発現プラスミド pNY326 を混合し、*Brevibacillus in vivo* cloning 法により *Brevibacillus choshinensis* HPD31-SP3 を形質転換して発現プラスミドを作製した。ブレビバチルス形質転換体を TMNm 培地 (10 g/L グルコース、10 g/L フェイトンペプトン、5 g/L エルリッヒ カツオエキス、2 g/L 酵母エキス B2、10 mg/L FeSO₄ · 7H₂O、10 mg/L MnSO₄ · 7H₂O、1 mg/L % ZnSO₄ · 7H₂O、50 µg/ml ネオマイシン、pH 7.0) で 30°C、48 時間培養した。培養液を遠心処理して菌体成分を除き、上清

を 0.2 μm フィルターでろ過滅菌した。飽和硫酸アンモニウム溶液を加え、50%硫酸アンモニウム濃度で沈殿を回収した。カラム精製は DEAE-Sepharose (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) を用いた FPLC システムで行った。沈殿を Tris-HCl 緩衝液 (50mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, pH 8.0) に溶解し、同緩衝液で平衡化した DEAE-Sepharose に吸着させ、0.2~1.1 M NaCl 濃度によるグラジエントクロマトグラフィーで溶出液を分画した。コラゲナーゼ活性がある画分を集め、30 kDa カットオフの限外濾過を用いて濃縮し、50 mM Tris-HCl 緩衝液に透析して精製組換え酵素標品とした。Coomassie Plus – The Better Bradford™ Assay Reagent (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) を用いて濃度を算出し、以下の実験に用いた。

5.2.4 SDS-PAGE

電気泳動は Laemmli の方法[45]に従い、7.5%あるいは 10%ポリアクリルアミドゲルを用いて行なった。泳動後、ゲルを固定液 (50%メタノール、10%酢酸) で 3 分間固定処理し、染色液 (0.25% Coomassie brilliant blue R-250、50%メタノール、10%酢酸) で染色した。1 分半後、染色液を除き、脱色液 (5%メタノール、7.5%酢酸) で脱色した。

5.2.5 コラーゲン分解活性の測定

コラーゲン分解活性は FITC ラベル化コラーゲンを用いて測定した[62]。酵素溶液と 0.05% FITC-コラーゲン、200 mM NaCl、5 mM CaCl_2 を含む 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) と混合し、30°C で 30 分間反応させた。反応後、EDTA を添加し、氷上で冷却して反応を停止した。反応液に 70%エタノールを含む 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 9.5) を等量添加し、氷上で 30 分間保持して未変性コラーゲンを沈殿させた。遠心分離によって上清中

に遊離した分解されたコラーゲン断片を回収し、蛍光プレートリーダー (SH-9000, Corona Electric, Ibaraki, Japan) により 530 nm の蛍光強度を測定した (励起 : 485 nm)。コラーゲン分解活性 1 ユニット (U) は、30°C、1 分間あたりに 1 µg の FITC-コラーゲンを分解する活性と定義する。

5.2.6 安定性試験

終濃度 0.5 mg/ml となるように酵素溶液を 200 mM NaCl、5 mM CaCl₂ を含む 50 mM Bis-Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) で希釈し、37°C でインキュベートした。6、12、18、24 時間後にサンプルを回収し、電気泳動とコラーゲン分解活性を測定することで酵素の安定性を評価した。

5.2.7 リアルタイムゼラチンザイモグラフィ

0.05% FITC ラベル化ゼラチンを含む 10% ポリアクリルアミドゲルを用いて、リアルタイムザイモグラフィを行なった[64]。酵素を非還元条件下で電気泳動し、ゲルを 2.5% Triton X-100 を含む 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) で 30 分洗浄した。洗浄液を除き、200 mM NaCl、5 mM CaCl₂ を含む 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) を添加して、37°C で 5 時間インキュベートした。コラーゲナーゼで消化された FITC-ゼラチンをトランスイルミネーターで検出した。

5.2.8 サイズ排除クロマトグラフィ

サイズ排除クロマトグラフィは Superdex 200 HR10/30 column (GE Healthcare) を用いた Alliance 2895 system (Waters, Milford, MA, USA) により行った。サンプルをカ

ラムに添加し、200 mM NaCl を含む 50 mM Bis-Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) を用いて流速 0.75 ml/min で分画した。分画したタンパク質は 220 nm の吸光度により検出した。

5.2.9 コラゲナーゼ活性の pH 依存性および温度依存性の測定

コラゲナーゼ活性の pH 依存性は合成基質 FALGPA (Bachem AG, Bubendorf, Switzerland)を用いた活性測定により行った[63]。1 μg の酵素を、0.2 M NaCl と 5 mM CaCl_2 を含む緩衝液に溶解した異なる量 (0.5~3.0 mM) の FALGPA と混合し、30°C で 10 分間反応させた。緩衝液は 50 mM MES (pH 6.0~7.0)、50 mM HEPES (pH 7.0~8.5)、50 mM TAPS (pH 8.5 and 9.0)および 50 mM CHES (pH 9.0 and 10.0) を用いた。反応後、プレートリーダーを用いて 345nm の吸光度変化を測定した。FALGPA 分解活性 1 ユニット (U) は、30°C、1 分間あたりに 1 μmol の FALGPA を分解する活性と定義する。

コラゲナーゼ活性の温度依存性は Wunsch 法を改変して行った[105]。基質は合成基質 Pz-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg-OH (Bachem AG, Bubendorf, Switzerland) を用いた。0.13 $\mu\text{g/ml}$ の酵素を、0.2 M NaCl と 5 mM CaCl_2 を含む 50 mM HEPES (pH 7.5)に溶解した Pz ペプチドと混合し、異なる温度 (10~60°C) で反応させた。2、4、8、12 分において等量の 25 mM クエン酸溶液を添加して反応を停止し、酢酸エチルを用いて分解産物 (Pz-Pro-Leu) を抽出した。分光光度計を用いて 320 nm の吸光度変化を測定し、1 分あたりのコラゲナーゼ活性を算出した。

5.2.10 組換えコラゲナーゼの反応速度論解析

K_m 、 V_{max} 、 K_{cat} を求めるために、反応速度論解析を行なった[66]。0.5 μg の酵素を異なる量 (10~50 μg) の FITC-コラーゲンと混合し、30°C で 5 分間反応させた。5.2.5 と同様

の方法で上清の蛍光強度を測定し、Lineweaver-Burk plot により K_m 、 V_{max} 、specific constant (V_{max}/K_m)を算出した。

FITC-コラーゲンの他に合成基質 N-(3-[2-furyl]acryloyl)-Leu-Gly-Pro-Ala (FALGPA; Bachem AG, Bubendorf, Switzerland)を用いて反応測定論解析を行なった。1 μg の酵素を、0.4 M NaCl と 40 mM CaCl_2 を含む 50 mM Tricine 緩衝液 (pH 7.5) に溶解した異なる量 (0.5~3.0 mM) の FALGPA と混合し、30°Cで 5 分間反応させた。反応後、プレートリーダーを用いて 345nm の吸光度変化を測定した。Lineweaver-Burk plot により K_m 、 V_{max} 、specific constant (V_{max}/K_m)を算出した。

5.2.11 コラーゲン分解実験

ウシ由来 I 型、II 型、III 型、IV 型、V 型コラーゲン (1 mg/ml の 5 mM 酢酸溶液) を等量の緩衝液 (100 mM Tris-HCl, 400 mM NaCl, 10 mM CaCl_2 , pH 7.5) と混合し、終濃度 0.5 mg/ml のコラーゲン溶液を調製した。ヒト由来 VI 型コラーゲンは 50 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 5 mM CaCl_2 , pH 7.5 に溶解し、終濃度 0.5 mg/ml のコラーゲン溶液を調製した。コラーゲン溶液に 10 分の 1 量のコラゲナーゼ溶液 (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を添加し、30°Cでインキュベートした。Fig. 23 で示す時間において、4 分の 1 量の SDS サンプルバッファーを添加し、反応を停止した。各サンプルは 7.5 %ゲルを用いた電気泳動により、コラゲナーゼによる分解過程を分析した。

5.2.12 グルタミン酸を含むヘキサペプチドの分解実験

50 mM Tris-HCl (pH 7.5) にウシ I 型コラーゲン由来ペプチド基質 Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Hyp (GERGFO) を溶解させて 2 mM GERGFO 溶液を調製した。

10 mM CaCl₂を含む 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) 0.23 ml に前記 GERGFO 溶液 0.25 ml を混合し、予め 37°C で加温した後、0.01% Tween20 を含む 10 mM CaCl₂ で希釈したコラゲナーゼ溶液 20 μ l を加えて反応液とした。この反応液を 37°C に保温し、経時的に 50 μ l をサンプリングした。得られたサンプル液は 50 μ l の 1%ギ酸と混合して反応停止した後、質量分析計 (3200 QTRAP, AB Sciex, Foster City, CA, USA) にて Gly-Glu-Arg (GER)を定量し、GERGFO 分解活性を評価した。ペプチド基質の対照として、ウシ I 型コラーゲン由来ペプチド基質 Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Hyp (GPOGPO)を使用し、Gly-Pro-Hyp (GPO)を定量し、GPOGPO 分解活性を評価した。反応には、*G. hollisae* 由来コラゲナーゼが 20 ng、*C. histolyticum* 由来精製コラゲナーゼが 80~320 ng の酵素を用いた。

5.2.13 ウシ腱由来酸抽出 I 型コラーゲンの完全消化実験

予め 5 mM 酢酸に溶解した 3 mg/ml 濃度のウシ皮膚由来酸抽出 I 型コラーゲン溶液に、0.4 M NaCl、10 mM CaCl₂ を含む 0.1 M Tris-HCl (pH 7.5)基質中和液を 1:1 の割合で添加してコラーゲン濃度を 1.5 mg/ml に調製し、コラーゲン中性塩溶液とした。また、*G. hollisae* 由来コラゲナーゼ溶液を希釈液 (50 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, pH 7.5) で希釈し、濃度 0.01 mg/ml の酵素液を調製した。前記コラーゲン溶液 0.1 ml に酵素液 0.15 ml を混合し、温度 30°C で反応させた。反応後 1、2、4、20、28 および 48 時間の反応液をサンプリングし、5 分の加熱処理を行った後に-20°C にて凍結保存し、分析用試料とした。同様に、*C. histolyticum* 由来精製コラゲナーゼの 0.025 mg/ml 酵素液を調製し、前記コラーゲン溶液 0.1 ml に酵素液 0.15 ml を混合し、温度 30°C で反応させ、分析用試料を調製した。なお、コラゲナーゼの添加量は、反応系中で同等の活性となるようそれぞれの分子量および k_{cat} 値から算出したものであり、質量換算で *G. hollisae* 由来コ

ラゲナーゼの 2.5 倍量の *C. histolyticum* 由来精製コラゲナーゼが必要となる。各分析試料について、サイズ排除クロマトグラフィーを用いて生じたトリペプチドの生成面積比 (%) を算出した。サイズ排除クロマトグラフィーは Superdex Peptide 10/30 HR (GE Healthcare) を用いた Alliance 2895 system により行った。サンプルをカラムに添加し、0.1 M 重炭酸アンモニウム、20%アセトニトリルアセトニトリルを用いて流速 0.75 ml/min で分画した。分画したタンパク質は 220 nm の吸光度により検出した。

生成したトリペプチドの定量実験では、コラーゲン 1 mg/ml と *G. hollisae* 由来コラゲナーゼ 5 µg/ml を等量混合し、温度 30°C で 20 時間反応させた。*C. histolyticum* 由来精製コラゲナーゼは 12.5 µg/ml で処理した。反応液を 0.1%ギ酸で希釈した後、質量分析計にて Table 5 に示した 12 種類のトリペプチド生成量を測定した。

5.2.14 動物

マウス腓島分離は体重 20~27 グラムの 8 週齢 C57 BL/6 NCrSlc 雄マウス (Sankyo Laboratory, Tokyo, Japan) を用いて行った。本動物実験は東京大学生産技術研究所動物実験委員会の承認 (承認番号: 25-6) を得て、東京大学動物実験実施マニュアルに則って実施した。麻酔導入は、マウスを導入箱に入れイソフルラン (Forane, Abbott Japan, Tokyo, Japan) を気化器 (400 Anesthesia Unit, Univentor, Malta) により 4.5~5%濃度となるように揮発させることで行った。また、麻酔維持は、マスクを使用し、気化器により 1.5~2.5%濃度となるように揮発させて行った。外科手術は 1.5~2.5%濃度のイソフルラン吸入麻酔下で行い、苦痛を緩和する努力を行った。

5.2.15 マウス腓臓消化後に分離した画分のコラーゲン量および組織量の定量

膵臓消化の実験には各濃度 3 匹のマウス、計 21 匹のマウスを用いた。濃度の異なるコラゲナーゼ (0.00625、0.0125、0.025、0.05、0.10、0.15、0.20 mg/ml) と一定濃度のサーモライシン (0.012 mg/ml) を混合し、開腹したマウスの膵管より酵素溶液を膵臓に注入した。切除した膵臓をバイアルに移し、酵素溶液中 37°C で 15 分間インキュベートして膵臓を消化した。消化液を直径 1 mm のメッシュで濾過し、未消化画分と消化画分に分離した。さらに、メッシュを通過した消化画分を $490 \times g$ で 20 分間遠心し、得られた上清を消化画分上清、沈殿を消化画分沈殿とした。未消化画分、消化画分上清および消化画分沈殿の三つの画分のコラーゲン量および組織量を算出するために、6 M HCl、110°C、20 時間の条件で塩酸加水分解した。

コラーゲン量は質量分析計を用いて各画分のヒドロキシプロリン量を測定し、係数 7.94 (マウス I 型コラーゲンの総アミノ酸の 12.6% がヒドロキシプロリン; $100\%/12.6\%=7.94$) を乗じることにより算出した[106]。質量分析計での測定において、サンプルに安定同位体ラベルしたコラーゲン (SI-collagen) を添加し、サンプル間のイオン化効率を補正した[107]。組織量はアミノ酸分析計 (L-8800, Hitachi, Tokyo, Japan) を用いて各画分の総アミノ酸量を測定し、係数 1.64 (脱脂後のマウス膵臓の総重量の 61.1% がタンパク質; $100\%/61.1\%=1.64$) を乗じることにより算出した。

5.2.16 マウス膵臓消化沈殿画分から単離した膵島数および IEQ (islet equivalent) の測定

濃度の異なるコラゲナーゼ (0.0125、0.025、0.05、0.10、0.15、0.20 mg/ml) と一定濃度のサーモライシン (0.012 mg/ml) を混合した酵素溶液を用いて、各濃度 3 匹のマウス、計 18 匹のマウスの膵臓を消化した。消化液を直径 1 mm のメッシュで濾過して得られた消化沈殿画分から ET-Kyoto 溶液 (Otsuka Pharmaceutical, Tokyo, Japan) と OptiPrep

(Axis-Shield PoC, Oslo, Norway) を用いた密度勾配遠心法によって膵島を単離した。ジチゾン(diphenylthiocarbazone, Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) により染色した膵島を顕微鏡下(Olympus IX81, Olympus, Tokyo, Japan) で観察し、膵島数と IEQ を評価した。IEQ は直径 150 μm の膵島を標準として換算した膵島数で、1 IEQ は直径 150 μm の球形膵島 1 つに相当する[108, 109]。

5.2.17 1 型糖尿病モデルマウスへの膵島移植

20 時間絶食させた C57 BL/6 NCrSlc 9 週齢雄マウスにストレプトゾトシン (STZ, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 120 mg/kg を腹腔内投与し、1 型糖尿病モデルマウスを作製した。糖尿病の診断の基準は、STZ 投与 5 日以降に 350 mg/dl 以上の血糖値を 2 日連続で示した場合とした。STZ で誘発した 1 型糖尿病モデルマウス 5 匹の腎被膜下へ単離した 300 個の膵島を移植した。毎日血糖値を測定し、連続して 350 mg/dl 以上の血糖値を示すと糖尿病、連続して 200 mg/dl 以下の血糖値を示すと正常と判定した。血糖値の測定は、マウスの尾の先端 1~2 ミリ切り、血液が半球状になったところで血糖値測定器 (ACCU-CHEK, Roche Diagnostics, Tokyo, Japan) により行った。移植 38 日後に膵島を移植した腎臓を切除して、移植した膵島が血糖値のコントロールに寄与したか確認した。

5.2.18 腹腔内ブドウ糖負荷試験

腹腔内ブドウ糖負荷試験は移植 34 日後に行った。ブドウ糖 (2.0 g/kg) を腹腔内に投与し、投与前、投与後 15、30、60、90、120 分に血糖値を測定した。ブドウ糖負荷試験ではコントロールとして 5 匹の正常 C57BL/6 マウスを用いた。

5.2.19 組織染色

切除した膵島移植腎はヘマトキシリン／エオジン染色および抗インスリン抗体による免疫組織染色に供した。腎臓を 4%パラホルムアルデヒドで固定し、パラフィンで包埋したのち、切片を作製した。免疫組織染色では、一次抗体としてモルモット抗インスリン抗体 (Dako, Glostrup, Denmark) を、二次抗体としてペルオキシダーゼ標識抗モルモット抗体を用いて検出した。

5.2.20 統計処理

データは三回の独立した実験の平均値±SD で表示した。有意差検定は 2 グループ間においては unpaired t-test を用い、4 グループ間では one-way ANOVA を用いた。P<0.05 は統計的に有意とする。

5.3 結果

5.3.1 *G. hollisae* 1706B 株由来コラゲナーゼの C 末端欠損組換えタンパク質の調製とそのコラーゲン分解活性の検証

*G. hollisae*1706B 株由来 74 kDa コラゲナーゼの自己消化で生じる C 末端が欠損した 60 kDa コラゲナーゼの組換えタンパク質を設計する上で、触媒ドメイン (59.2 kDa) と PPC ドメインを含む C 末端領域 (8.5 kDa) を繋ぐリンカー配列 (6.9 kDa) に着目した。リンカー配列内にはコラゲナーゼで切断され得るコラーゲン様配列 (Gly-Xaa-Yaa 配列: Gly はグリシン、Xaa と Yaa は任意のアミノ酸) の繰り返しが 4 箇所存在した。そこで、この Gly-Xaa-Yaa 配列において自己消化すると仮定して、リンカー配列が最も短い 60 kDa とリンカー配列が最も長い 62 kDa の二種類のタンパク質を設計した (Fig. 21A)。ブレビバチルス発現系を用いた小スケールの発現試験において、どちらの組換えタンパク質も培養上清中に分泌され、クロマトグラフィーにより精製することに成功した (Fig. 21B)。二種類の精製した組換えタンパク質と組換え 74 kDa コラゲナーゼを電気泳動で分析したところ、自己消化で生じる 60 kDa のコラゲナーゼは 60 kDa ではなく 62 kDa であることが明らかとなった (Fig. 21B)。四重極飛行時間質量分析 (QTOF-MS) を行なったところ、自己消化で生じる 62 kDa のコラゲナーゼと 62 kDa の組換えタンパク質とで同じ分子種 (61.9 kDa、61.5 kDa、61.1 kDa) が含まれることを確認した[110]。FITC-コラーゲンをを用いたコラーゲン分解活性を測定したところ、62 kDa 組換えタンパク質と 60 kDa 組換えタンパク質は同程度のコラーゲン分解活性であった (Fig. 21C)。さらには、この比活性は組換え 74 kDa コラゲナーゼの自己消化で生じる 62 kDa コラゲナーゼの比活性とも同程度だった。一方、これら三つの組換えタンパク質の比活性は組換え 74 kDa コラゲナーゼの比活性よりも明らかに低かった。次に、組換え 74 kDa コラゲナーゼの安定性試験を行

ったところ、74 kDa タンパク質は時間依存的に 62 kDa へと自己消化し、それに伴いコラーゲン分解活性も低下した (Fig. 21D)。さらには、74 kDa タンパク質と 62 kDa タンパク質の比率を変えたサンプルのコラーゲン分解活性を測定したところ、その比活性は両タンパク質の比率と正比例しなかった (Fig. 21E)。以上の結果、組換え 74 kDa コラゲナーゼは自己消化しやすく、かつ、コラゲナーゼ活性も変動するため、安定なコラゲナーゼ製剤を開発するための候補から除外することにした。

5.3.2 *G. hollisae* 1706B 株由来組換え 62 kDa コラゲナーゼの性状解析

C 末端が欠損した組換えコラゲナーゼの検討を進める上で、安定発現株が得られなかった 60 kDa 組換えタンパク質を除外し、安定発現株が得られた 62 kDa 組換えタンパク質を進めることにした。62 kDa 組換えタンパク質の安定発現株を用いて大スケールの発現試験を行い、培養上清から 62 kDa 組換えタンパク質を精製した。電気泳動により精製した組換えタンパク質を分析したところ、精製タンパク質は 62 kDa の単一タンパク質であった (Fig. 22A)。また、サイズ排除クロマトグラフィーにより、精製タンパク質は溶液中で単量体であることが確認された (Fig. 22B)。組換えタンパク質がコラゲナーゼとして働か確認するために、ゼラチンザイモグラフィーを行い、精製タンパク質がゼラチン分解活性を維持していることを確認した (Fig. 22A)。さらには、合成ペプチドを基質とした活性測定により、至適 pH が 7.5~9.0 (Fig. 22C)、至適温度が 30~40°Cであることを確認した (Fig. 22D)。この結果は、*G. hollisae*1706B 株由来精製コラゲナーゼの性状と同等であった。以上の結果、大スケールの発現試験においても、活性を維持した 62 kDa 組換えタンパク質を作製することに成功した。さらには、組換え 62 kDa コラゲナーゼの安定性試験を行ったところ、62 kDa タンパク質は 37°C で 24 時間まで自己消化せず、コラーゲン分

解活性も一定であった (Fig. 22E)。したがって、組換え 62 kDa コラゲナーゼは自己消化せず、かつ、コラゲナーゼ活性も安定ため、コラゲナーゼ製剤を開発するための候補として最適だと判断し、以降の実験に用いることとした。

5.3.3 *G. hollisae* 1706B 株由来組換え 62 kDa コラゲナーゼの反応速度論解析

FITC ラベル化コラーゲンと合成基質 FALGPA を用いて、*G. hollisae* 1706B 株由来組換えコラゲナーゼの反応速度論解析を行なった (Table 4)。対照の *C. histolyticum* 由来精製コラゲナーゼと比べて、FITC-コラーゲンに対する比活性および FALGPA に対する比活性はどちらも 3 倍以上高かった。

FITC-コラーゲンおよび FALGPA に対するカイネティックパラメーターを算出したところ、*C. histolyticum* 由来精製コラゲナーゼと比べてミカエリス・メンテン定数： K_m は同等であったが、最大反応速度： V_{max} はどちらの基質に対しても優位に速いため、その結果、高い代謝回転数： K_{cat} 値を示した。以上の結果、FITC-コラーゲンと FALGPA のどちらの基質に対しても、*G. hollisae* 1706B 株由来組換え 62 kDa コラゲナーゼは *C. histolyticum* 由来精製コラゲナーゼと同等のコラーゲンに対するアフィニティーを持ち、同等以上の触媒効率であることが明らかとなった。

5.3.4 *G. hollisae* 1706B 株由来組換え 62 kDa コラゲナーゼのコラーゲン分解実験

G. hollisae 1706B 株由来組換え 62 kDa コラゲナーゼのコラーゲンの型別の基質特異性を *C. histolyticum* 由来精製コラゲナーゼと比較検討するために、I 型、II 型、III 型、IV 型、V 型、VI 型コラーゲンを用いた分解実験を行った。その結果、組換え 62 kDa コラゲナーゼは試した全ての型のコラーゲンを分解した。I 型、II 型、III 型、IV 型コラーゲン

に対しては 3 時間以内で (Fig. 23A~D)、V 型コラーゲンに対しては 20 時間以内で (Fig. 23E)、VI 型コラーゲンに対しては 72 時間以内で α 鎖を分解した (Fig. 23F)。一方、*C. histolyticum* 由来精製コラゲナーゼはコラーゲンの型によって分解活性が異なっていた。I 型、II 型、III 型、IV 型コラーゲンに対しては 5 時間でも α 鎖を完全に分解できなかった (Fig. 23A~D)。V 型コラーゲンに対しては 20 時間以内でも (Fig. 23E)、VI 型コラーゲンに対しては 72 時間以内でもほとんど α 鎖を分解できなかった (Fig. 23F)。さらには、I 型、II 型、III 型、IV 型コラーゲンに対しては、組換え 62 kDa コラゲナーゼによって生じた分解産物は *C. histolyticum* 由来精製コラゲナーゼで生じた分解産物よりも分子量が小さい傾向にあった (Fig. 23A~D)。以上の結果、組換え 62 kDa コラゲナーゼは今回試した全ての型のコラーゲンに対して *C. histolyticum* 由来精製コラゲナーゼよりも分解活性が高いと考えられる。しかし、このような差が生じた原因がモル数の違いによるか、あるいは、モル数の違いだけでなくコラゲナーゼの質の違いによるのかは、まだはっきりとは解明されていない。

5.3.5 グルタミン酸を含むヘキサペプチドの分解実験

C. histolyticum 由来コラゲナーゼはグルタミン酸を含むペプチドを消化することができないことが知られている[13]。そこで、グルタミン酸を含むウシ I 型コラーゲン由来ヘキサペプチド GERGFO、およびコラーゲン様ヘキサペプチド GPOGPO を用いた分解実験を行った。組換え 62 kDa コラゲナーゼはウシ I 型コラーゲン由来ペプチド基質 GERGFO に作用して Arg と Gly との間を切断し、Gly-Glu-Arg (GER) を産生することができた (Fig. 24A)。これに対し、*C. histolyticum* 由来精製コラゲナーゼは反応 60 分でも Arg と Gly との間を切断することができず、GER は生成されなかった。一方、GPOGPO

に対する分解活性は、組換え 62 kDa コラゲナーゼ 20 µg/ml と *C. histolyticum* 由来精製 コラゲナーゼ 80 µg/ml とが同等の活性であった (Fig. 24B)。

5.3.6 ウシ腱由来酸抽出 I 型コラーゲンの完全消化実験

ウシ腱由来酸抽出 I 型コラーゲンに組換え 62 kDa コラゲナーゼを 1 時間反応させると 71.7 %がトリペプチドにまで分解され、48 時間の反応では 93.5 %がトリペプチドにまで分解された (Fig. 25A)。一方、*C. histolyticum* 由来精製コラゲナーゼを使用した場合には、1 時間の反応ではオリゴペプチドのブロードなピークが検出され、トリペプチドのピークは 37.0 %であった。48 時間反応させた場合でも 68.7 %しかトリペプチドにまで分解できておらず、30%程度がオリゴペプチドとして残存することが明らかとなった (Fig. 25B)。

I 型コラーゲン消化物に含まれる 12 種類のトリペプチドを定量した結果、20 時間の消化時間において *C. histolyticum* 由来精製コラゲナーゼはトリペプチドを 76.13 mg/g 生成したのに対し、組換え 62 kDa コラゲナーゼは 271.48 mg/g と 3.6 倍多いトリペプチドを生成した (Table 5)。また、I 型コラーゲンを基質とした場合でも組換え 62 kDa コラゲナーゼは、従来の *C. histolyticum* 由来コラゲナーゼでは生成し得なかった Gly-Glu-Arg (GER) および Gly-Glu-Hyp (GEO)を生成することができた。収量は GER が 13.07 mg/g、GEO が 13.16 mg/g であった。さらには、最も存在比の高い Gly-Pro-Hyp (GPO)の生成量は、*C. histolyticum* 由来精製コラゲナーゼが 35.11 mg/g であるのに対し、組換え 62 kDa コラゲナーゼは 63.30 mg/g と約 2 倍高い結果であった。さらには、*C. histolyticum* 由来コラゲナーゼで生成量の低いトリペプチドに関して、組換え 62 kDa コラゲナーゼは Gly-Phe-Hyp (GFO)では 63.8 倍、Gly-Ala-Arg (GAR)では 9.3 倍、Gly-Pro-Val (GPV)で

は 7.9 倍、Gly-Leu-Hyp (GLO)では 7.0 倍、Gly-Ala-Hyp (GAO)では 6.9 倍のトリペプチドを生成することができた。以上の結果、組換え 62 kDa コラゲナーゼは従来 *C. histolyticum* 由来コラゲナーゼでは切断しない、あるいは切断しにくいアミノ酸配列をも切断でき、効率的にトリペプチドにまで分解できることが明らかとなった。

5.3.7 マウス膀胱を用いた *G. hollisae* 1706B 株由来組換え 62 kDa コラゲナーゼの組織分散用酵素としての適正評価実験

G. hollisae 1706B 株由来組換え 62 kDa コラゲナーゼが組織分散用酵素としての適正があるか評価するために、マウス膀胱を対象として組織を消化できるか検討した。濃度の異なるコラゲナーゼ (0.00625、0.0125、0.025、0.05、0.10、0.15、0.20 mg/ml) と一定濃度のサーモライシン (0.012 mg/ml) を混合した酵素溶液を用いて、各濃度 3 匹のマウス、計 21 匹のマウスの膀胱を消化した。消化後、未消化画分、消化画分上清および消化画分沈殿の三つの画分に分画し、コラーゲン量および組織量を算出した (Fig. 26A)。

未消化画分では、コラゲナーゼ濃度が高くなるにしたがってコラーゲン量も組織量も減少し、コラゲナーゼ濃度 0.05 mg/ml で横ばい状態となった (Fig. 26B)。消化画分上清では、コラゲナーゼ濃度が高くなるにしたがってコラーゲン量は増加し、コラゲナーゼ濃度 0.05 mg/ml で横ばい状態となった。一方、消化画分上清の組織量はコラゲナーゼ濃度が高くなっても増減はなく低いままであった (Fig. 26B)。消化画分沈殿のコラーゲン量はコラゲナーゼ濃度が高くなっても増減はなく低いままであったが、消化画分沈殿の組織量は、コラゲナーゼ濃度が高くなるにしたがって増加し、コラゲナーゼ濃度 0.05 mg/ml で横ばい状態となった (Fig. 26B)。さらには、*C. histolyticum* 由来精製コラゲナーゼを用いた際の組織分散の傾向は組換え 62 kDa コラゲナーゼでの組織分散と同じ傾向であった (Fig.

26B)。以上の結果、組換え 62 kDa コラゲナーゼはマウス膵臓のコラーゲンを消化することによって組織分散でき、その効果は *C. histolyticum* 由来精製コラゲナーゼ製剤と同等であることが明らかとなった。したがって、組換え 62 kDa コラゲナーゼは組織分散用酵素として十分使用できると考えられる。

5.3.8 *G. hollisae* 1706B 株由来組換え 62 kDa コラゲナーゼを用いたマウス膵島分離実験

G. hollisae 1706B 株由来組換え 62 kDa コラゲナーゼが機能を維持したマウス膵島を単離できるか評価するために、濃度の異なるコラゲナーゼ (0.0125、0.025、0.05、0.10、0.15、0.20 mg/ml) と一定濃度のサーモライシン (0.012 mg/ml) を混合した酵素溶液を用いて、各濃度 3 匹のマウス、計 18 匹のマウスの膵臓を消化し、消化画分沈殿から密度勾配遠心法によりマウス膵島を単離した。単離した膵島をジチゾンで染色し、膵島数と islet equivalent (IEQ、1 IEQ は直径 150 μ m の膵島が一つ) を評価した。コラゲナーゼ濃度が高くなるにしたがって、膵島数と IEQ 共に増加し、コラゲナーゼ濃度 0.05 mg/ml で横ばい状態となった (Fig. 27A, 27B)。さらには、*C. histolyticum* 由来精製コラゲナーゼを用いた際の膵島分離の傾向は組換え 62 kDa コラゲナーゼでの膵島分離と同じ傾向であった (Fig. 27A, 27B)。

次に、組換え 62 kDa コラゲナーゼを用いて単離した膵島が機能を維持しているか確認するため、5 匹の 1 型糖尿病モデルマウスの腎被膜下への移植実験を行った。腎被膜下への膵島移植は、(i) 比較的非侵襲的な術式で死亡率が低い、(ii) 少ない膵島数の移植でも数日間で高血糖が改善される、(iii) 膵島を移植した腎臓を切除することにより膵島が機能していたことを判断でき、さらには組織学的評価も行える、という理由により一般的に行われている [111]。腎被膜下において、移植された膵島の周囲に血管が新生し、生育に必要な

な栄養分が供給されるため、膵島は長期間インスリンを分泌することが可能となる[112]。一定濃度のコラゲナーゼ (0.15 mg/ml) とサーモライシン (0.012 mg/ml) を混合した酵素溶液を用いて膵島分離を行い、同系のストレプトゾトシン誘発 1 型糖尿病モデルマウス 5 匹の腎被膜下へ 300 個の膵島を移植した (Fig. 28A)。移植マウスの血糖値は徐々に減少し、移植後 3 日で正常値となった。一方、膵島を移植していない 1 型糖尿病モデルマウスの血糖値は依然として高血糖を示した。移植後 38 日に膵島移植腎を切除すると、膵島移植マウスの血糖値は速やかに高血糖の状態へと戻ってしまった (Fig. 28B)。移植後 34 日に、4 匹の移植マウスを用いて腹腔内ブドウ糖負荷試験を行ったところ、移植マウスは正常マウスと同様に速やかに血糖値が正常値にまで戻った (Fig. 28C)。抗インスリン抗体を用いて切除した膵島移植腎の組織染色実験を行ったところ、腎被膜下に抗インスリン抗体で染色される膵島が生着していることを確認した (Fig. 28D)。以上の結果、組換え 62 kDa コラゲナーゼは *C. histolyticum* 由来精製コラゲナーゼ製剤と同等に機能を維持したマウス膵島を単離できることが明らかとなった[108]。

5.4 考察

本研究において、研究用や臨床用酵素製剤として条件を満たす *G. hollisae* 1706B 株由来の組換え 62 kDa コラゲナーゼを作製することに成功し、本組換えコラゲナーゼは初代細胞を単離するのに十分なコラゲナーゼ活性を持つことを示した。また、ブレビバチルス発現系と 62 kDa コラゲナーゼの安定発現株を用いたリットルスケールの発現試験において、溶液中で凝集することなく単分子で存在する組換えコラゲナーゼが得られたため (Fig. 22A, 22B)、酵素製剤として製品化でき得る条件を満たすことを確認した。初代細胞を単離するのに十分なコラゲナーゼ活性を持つことに関しては、本組換えコラゲナーゼと中性プロテアーゼのサーモライシンとの組み合わせにより、マウス膵臓を消化し、機能を維持した膵島を単離できることを証明した。その効果は既存の酵素製剤である *C. histolyticum* 由来精製コラゲナーゼ製剤と同等であった (Fig. 26~28)。

G. hollisae 1706B 株由来組換え 62 kDa コラゲナーゼが細胞単離に十分なコラゲナーゼ活性を持つことに加えて、本組換えコラゲナーゼは酵素活性が安定であることを示した (Fig. 22E)。酵素活性の安定性には二つの理由が考えられる。一つ目の理由は、酵素の精製プロセスにおいて純度の高い組換えコラゲナーゼが得られているため、不純物として含まれる他のプロテアーゼが存在せず、分解が起きないことである (Fig. 22A, 22B)。二つ目の理由は、本コラゲナーゼが自己消化しにくいことが理由である。自己消化の原因として、i) 本コラゲナーゼが中性プロテアーゼ活性を有しないこと、ii) 本組換えコラゲナーゼに含まれるコラーゲン様配列 (Gly-Xaa-Yaa-Gly-Xaa-Yaa) が自己消化を受けにくいこと、という二つの可能性が考えられる。中性プロテアーゼ活性に関しては、本組換えコラゲナーゼがカゼイン分解活性を持たないことや線維芽細胞に対する細胞毒性がないことを確認している[110]。コラーゲン様配列が自己消化を受けにくいことに関しては、本組換えコラ

ゲナーゼにはリンカー領域に 3 ヶ所、触媒ドメインに 1 ヶ所のコラーゲン様配列があり、合成ペプチドを用いた分解実験によりこれら 4 ヶ所のコラーゲン様配列が 74 kDa コラゲナーゼの PPC ドメイン切断部よりも自己消化を受けにくいことを確認している[110]。電気泳動と QTOF-MS 分析の結果から、触媒ドメインのコラーゲン様配列はリンカー領域のコラーゲン様配列に比べて自己消化を受けにくいと考えられる。自己消化の感受性の違いを考察するため、*C. histolyticum* 由来コラゲナーゼ ColG の結晶構造[5]を鋳型としたホモロジーモデリングを行ったところ、触媒ドメインのコラーゲン様配列は酵素の内側表面に位置していると予想され、コラゲナーゼ自身による分解を受けにくいと考えられる[110]。

74 kDa コラゲナーゼから PPC ドメインを含む C 末端領域を取り除き、残りの 62 kDa タンパク質として作製したことにより、安定なコラゲナーゼ活性を持つ組換えコラゲナーゼが得られた (Fig. 21, 22)。74 kDa コラゲナーゼの不安定性は触媒ドメインと PPC ドメインを繋ぐリンカー配列が自己消化を受けやすいという一次構造に起因する (Fig. 21D)。62 kDa 組換えタンパク質のコラーゲン分解活性は触媒ドメインのみに依存する。触媒ドメインのみから成るコラゲナーゼがいくつか報告されている[5, 6, 60, 113]が、文献を調べる限り初代細胞を単離するための組織分散に使用できると報告されているコラゲナーゼは本組換えコラゲナーゼのみである。第 4 章において、PPC ドメインはコラーゲン結合能を持ち、触媒ドメインをコラーゲンに留めることによってコラーゲン分解活性を促進することを報告した[80]が、74 kDa 組換えタンパク質はこの PPC ドメインを含むため 62 kDa 組換えタンパク質よりコラーゲン分解活性が高い (Fig. 21C)。Matsushita らは *C. histolyticum* 由来コラゲナーゼ ColH の詳細な解析を行い、同様の報告を行なっている。Matsushita らはコラーゲン結合ドメインを欠損した触媒ドメインのみの組換えコラゲナーゼがコラゲナーゼ活性を持つことを証明したが、その活性はコラーゲン結合ドメインを

含む全長組換えコラゲナーゼの活性の 20 分の 1 でしかないことを報告した[6]。*G. hollisae* 1706B 株由来組換えコラゲナーゼの場合、単一な組換え 74 kDa コラゲナーゼを調製することができないため組換え 62 kDa コラゲナーゼと活性を直接比較することはできないが、本研究から推測する限り、組換え 74 kDa コラゲナーゼは組換え 62 kDa コラゲナーゼよりもおよそ 2 倍活性が高いと考えられる (Fig. 21C)。さらには、74 kDa タンパク質と 62 kDa タンパク質の比率を変えたサンプルの比活性は両タンパク質の比率と正比例しなかったため (Fig. 21E)、コラーゲンの分解において組換え 74 kDa コラゲナーゼと組換え 62 kDa コラゲナーゼは単独で働いている訳ではないと予想される。実際、組換え 62 kDa コラゲナーゼは未変性コラーゲンよりも変性コラーゲンであるゼラチンに対して活性が高いことを確認した[110]。したがって、74 kDa タンパク質と 62 kDa タンパク質が含まれているサンプルでは、74 kDa コラゲナーゼがコラーゲンを切断し、分解物が変性してゼラチンになると、62 kDa コラゲナーゼは残っているコラーゲンよりも分解物であるゼラチンと速やかに反応すると考えられる。

G. hollisae 1706B 株由来組換え 62 kDa コラゲナーゼは触媒ドメインのみの酵素であるにもかかわらず、*C. histolyticum* 由来コラゲナーゼと比較して比活性が 3 倍以上高いことが明らかとなった (Table 4)。また、各種コラーゲンに対する分解実験において、組換え 62 kDa コラゲナーゼによって生じた分解産物は *C. histolyticum* 由来コラゲナーゼで生じた分解産物よりも分子量が小さい傾向にあった (Fig. 23)。このような分解活性の差異は両酵素の基質特異性に依存していると考えられる。組換え 62 kDa コラゲナーゼは *C. histolyticum* 由来コラゲナーゼでは生成量の低いトリペプチド (GEO、GER、GFO、GAR、GPV、GLO、GAO) の生成量が高いこと (Table 5) から、コラーゲンの一次配列において切断しにくいアミノ酸は少なく、効率的にトリペプチドにまで分解することができる

考えられる。VI 型コラーゲンは分子間および分子内架橋が多く存在するため *C. histolyticum* 由来コラゲナーゼで分解できないと考えられている[14, 15]が、組換え 62 kDa コラゲナーゼは効率的にトリペプチドにまで分解できるため VI 型コラーゲンを分解できるのかもしれない (Fig. 23F)。コラーゲンの一次配列における広い基質特異性が組換え 62 kDa コラゲナーゼの反応速度が速い一因であると予想され、高い比活性に貢献していると考えられる。一方、マウス脾臓の消化実験では両酵素の消化力は同等となった (Fig. 26)。本研究に用いた *C. histolyticum* 由来コラゲナーゼは PKD ドメインおよび CBD を含む全長酵素であるため、CBD により組織内のコラーゲン線維に留まることで効率的にコラーゲン線維を分解したと考えられる。一方、第 4 章において *G. hollisae* 1706B 株由来コラゲナーゼの PPC ドメインも CBD として働くことを明らかとした。遺伝子工学技術により自己消化しないように改変された安定な組換え 74 kDa コラゲナーゼが作製できれば、*C. histolyticum* 由来コラゲナーゼよりも低い濃度で、あるいは、同じ濃度であれば短時間でマウス脾臓を消化できると予想される。今後の研究によって、組織分散酵素としてより優れた *G. hollisae* 1706B 株由来組換えコラゲナーゼ変異体が作製されることが期待される。

G. hollisae 1706B 株由来組換え 62 kDa コラゲナーゼが組織分散用酵素として使用できるか、マウス脾臓を用いて評価した。本研究において、コラゲナーゼがマウス脾臓を分散する能力と脾臓中のコラーゲンを分解する能力の両方を調べられる評価系を開発した。本評価系は、酵素処理の後に未消化画分、消化画分上清および消化画分沈殿の三つの画分に分画し、コラーゲン量および組織量を算出するものである (Fig. 26A)。未消化画分の組織量に対する消化画分沈殿の組織量は組織分散用酵素としてのコラゲナーゼの能力を示し、消化画分沈殿のコラーゲン量に対する消化画分上清のコラーゲン量はコラゲナーゼが組織中のコラーゲンを分解している直接的な能力を示している。一般的に、コラゲナーゼが脾

臓を分散する能力は単離された膵島数によって評価されている[104, 114]。しかし、この一般的な評価法では膵臓の分散に対する直接的なコラゲナーゼの作用を評価するには向いていないかもしれないと考えられる。なぜなら、単離膵島数は、膵臓に酵素溶液を注入する際の圧力[115]や膵島純化の技術[116, 117]といった膵島分離の条件などコラゲナーゼとは異なる要因に影響され得ることが知られているからである。本研究では、酵素処理後の三画分の組織量およびコラーゲン量による評価結果と単離膵島数による評価結果が一致した (Fig. 26B, 27)。これは本研究での膵島分離技術が安定していることによると考えられる。今回開発した評価系は、コラゲナーゼ製品が組織分散用酵素として適しているか評価するための *ex vivo* 評価系として有益だと考えられる。

G. hollisae 1706B 株由来組換え 62 kDa コラゲナーゼの臨床応用を考えた場合、組換え 62 kDa コラゲナーゼは *C. histolyticum* 由来精製コラゲナーゼでは切断できない VI 型コラーゲンを分解することができるため (Fig. 23F)、既存の精製コラゲナーゼ製剤と比較して優位性がある可能性が考えられる。VI 型コラーゲンは動物組織に普遍的に存在するコラーゲンであり [30]、膵臓にも存在することが知られている [118]。また、肝硬変など組織の線維化の際に VI 型コラーゲンが増加することが知られており [119]、慢性膵炎で起きる線維化でも VI 型コラーゲンが増加する可能性も示唆されている。したがって、組換え 62 kDa コラゲナーゼは VI 型コラーゲンを分解できるため、*C. histolyticum* 由来精製コラゲナーゼと比較して線維化した組織からの細胞単離に使用できる可能性がある。さらには、組換え 62 kDa コラゲナーゼを用いて線維化した膵臓から効率よく膵島分離できた場合、慢性膵炎患者の自家膵島移植の状況が改善されるかもしれない [120]。

本研究において、ブレビバチルス発現系を用いて安定な組換え 62 kDa コラゲナーゼの作製に成功した。この組換えコラゲナーゼは代表的な型のコラーゲンを分解でき、さらに

はマウスの膵臓を分散することにより活性を維持した膵島を単離することができることを確認した。これらの知見より、本組換えコラゲナーゼは膵島移植や幹細胞移植といった臨床用組織分散酵素として有用である。

第6章 総括

市販されている細菌性コラゲナーゼは *Clostridium histolyticum* 由来のコラゲナーゼがほとんどである。*C. histolyticum* 由来コラゲナーゼ製剤には ColG と ColH の二種類のコラゲナーゼが含まれている。さらには、中性プロテアーゼであるクロストリパインや neutral protease といった複数の中性プロテアーゼも含まれる製剤もあり、ロット間やロット内で活性のバラツキが見受けられる。一つの製剤に複数の酵素を混合することは製剤の安定性が損なわれるリスクがあり、細菌性コラゲナーゼ製剤として改善の余地がある。鈴木らはゼラチン存在下で活性の強いコラゲナーゼを産生する *Grimontia hollisae* 1706B 株を単離した。一方、*G. hollisae* 1706B 株由来コラゲナーゼの産業利用を考えた場合、遺伝子配列の同定、一次配列からのドメイン構造の推定、安定な組換えタンパク質の作製が必要である。

本研究では、*G. hollisae* 1706B 株由来コラゲナーゼについて以下のことを明らかとした。

1) *G. hollisae* 1706B 株由来コラゲナーゼの全遺伝子配列を同定した。同定した遺伝子配列は 2,301 塩基から成り、767 アミノ酸をコードする遺伝子であった。ビブリオ属由来コラゲナーゼとの相同性解析の結果、本コラゲナーゼは触媒ドメインとプレペプチダーゼ C 末端 (pre-peptidase C-terminal: PPC) ドメインから成る 74 kDa タンパク質として分泌されることを明らかとした。また、ブレビバチルス発現系を用いて組換えタンパク質の作製に成功し、金属イオンキレート剤である EDTA でコラーゲン分解活性が消失することから、同定した遺伝子配列が金属酵素をコードする遺伝子であることを確認した。さらには、74 kDa タンパク質として分泌後、大部分の酵素が自己消化により C 末端領域が切断されて触媒ドメインのみの 60 kDa タンパク質となることを明らかとした。

2) *G. hollisae* コラゲナーゼの PPC ドメインが新規のコラーゲン結合ドメイン (collagen-binding domain: CBD) であることを証明した。本 CBD は *C. histolyticum* 由来コラゲナーゼの CBD と同様に三重らせん構造を認識してコラーゲンに結合するが、既存の CBD とは立体構造が若干異なっていると予想され、その結果、コラーゲン結合の性質も若干異なると考えられる。さらには、PPC ドメインを持つ 74 kDa 酵素と触媒ドメインのみの 60 kDa 酵素ではコラーゲン分解活性が異なり、*G. hollisae* コラゲナーゼにおいて PPC ドメインを含む C 末端領域がコラーゲン分解活性を促進することを見出した。

3) ブレバチルス発現系を用いて、PPC ドメインを除いた触媒ドメインのみの安定な組換え 62 kDa コラゲナーゼの作製に成功した。この組換えコラゲナーゼは *C. histolyticum* 由来精製コラゲナーゼよりも可溶性の基質に対して比活性が 3 倍以上高く、代表的な型のコラーゲンを分解できる。*C. histolyticum* 由来精製コラゲナーゼでは分解できない VI 型コラーゲンを分解できる特長を持つ。また、コラーゲンの一次配列における基質特異性が広く、*C. histolyticum* 由来コラゲナーゼでは切断できないグルタミン酸を含むペプチドも消化することができるため、効率的にコラーゲンをトリペプチドにまで分解することができる。さらには、マウスの膵臓を消化することにより活性を維持した膵島を単離することができることを確認した。

ブレバチルス発現系は、低エンドトキシンかつ動物由来原料未使用でタンパク質を製造できるため、医療用途の組換えタンパク質の製造に適している。本組換えコラゲナーゼは *C. histolyticum* 由来精製コラゲナーゼと異なる特長を持つコラゲナーゼであり、膵島移

植や幹細胞移植といった臨床用組織分散酵素として有用であると考えられる。さらには、*C. histolyticum*由来コラゲナーゼでは分解できないVI型コラーゲンをも分解できるので、VI型コラーゲンが過剰蓄積する若年性硝子化線維腫症の腫瘍の除去を目的とした組織溶解注射剤としての応用や、病態解明のための腫瘍由来細胞の単離にも有用であると考えられる。

本研究に関する既発表論文

(1) Tanaka, K., Ebihara, T., Kusubata, M., Adachi, E., Arai, M., Kawaguchi, N., Utsunomiya, J., Miki, Y., Hiramoto, M., Hattori, S. & Irie, S. (2009) Abnormal collagen deposition in fibromas from patient with Juvenile hyaline fibromatosis. *J Dermatol Sci.* **55**: 197-200.

(2) Teramura, N., Tanaka, K., Iijima, K., Hayashida, O., Suzuki, K., Hattori, S. & Irie, S. (2011) Cloning of a novel collagenase gene from the gram-negative bacterium *Grimontia (Vibrio) hollisae* 1706B and its efficient expression in *Brevibacillus choshinensis*. *J Bacteriol.* **193**: 3049-56.

(3) Tanaka, K., Teramura, N., Hayashida, O., Iijima, K., Okitsu, T. & Hattori, S. (2018) The C-terminal segment of collagenase in *Grimontia hollisae* binds collagen to enhance collagenolysis. *FEBS open bio.* **8**: 1691-702.

(4) Tanaka, K., Okitsu, T., Teramura, N., Iijima, K., Hayashida, O., Teramae, H. & Hattori, S. (2020) Recombinant collagenase from *Grimontia hollisae* as a tissue dissociation enzyme for isolating primary cells. *Sci Rep.* **10**: 3927.

謝辞

本研究をまとめるにあたり、ご指導いただきました東京農工大学 新井克彦教授に謹んで感謝申し上げます。

本研究に対する多大なご助言ならびに実験協力をしてくださった東京大学生産技術研究所（現 株式会社理研鼎業） 興津輝特任教授に感謝申し上げます。

本研究の遂行にあたりご助言ならびにご協力頂きました株式会社ニッピ° バイオマトリックス研究所 寺村直子氏、飯嶋克昌氏、林田治博士、多賀祐喜博士、楠畑雅氏、後藤希代子博士、上野智規博士をはじめとする、同研究所の皆様感謝致します。

本研究の遂行に有益なご助言をくださった岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 松下治教授ならびにアーカンソー大学化学・生化学部 Joshua Sakon 教授に心から感謝申し上げます。

最後に、本研究を行う機会を与えてくださり、長年にわたってご指導、ご協力いただいた入江伸吉元バイオマトリックス研究所所長ならびに服部俊治前バイオマトリックス研究所所長に心から感謝申し上げます。

参考文献

1. Duarte, A. S., Correia, A. & Esteves, A. C. (2014) Bacterial collagenases - A review, *Crit Rev Microbiol.* **42**: 106-26.
2. Ricard-Blum, S. (2011) The collagen family, *Cold Spring Harbor perspectives in biology.* **3**, a004978.
3. Lawson, P. A. & Rainey, F. A. (2016) Proposal to restrict the genus *Clostridium* Prazmowski to *Clostridium butyricum* and related species, *Int J Syst Evol Microbiol.* **66**, 1009-1016.
4. Caviness, P., Bauer, R., Tanaka, K., Janowska, K., Roeser, J. R., Harter, D., Sanders, J., Ruth, C., Matsushita, O. & Sakon, J. (2018) Ca(2+) -induced orientation of tandem collagen binding domains from clostridial collagenase ColG permits two opposing functions of collagen fibril formation and retardation, *The FEBS journal.* **285**, 3254-3269.
5. Eckhard, U., Schonauer, E., Nuss, D. & Brandstetter, H. (2011) Structure of collagenase G reveals a chew-and-digest mechanism of bacterial collagenolysis, *Nat Struct Mol Biol.* **18**, 1109-14.
6. Matsushita, O., Jung, C. M., Minami, J., Katayama, S., Nishi, N. & Okabe, A. (1998) A study of the collagen-binding domain of a 116-kDa *Clostridium histolyticum* collagenase, *J Biol Chem.* **273**, 3643-8.
7. Wang, Y. K., Zhao, G. Y., Li, Y., Chen, X. L., Xie, B. B., Su, H. N., Lv, Y. H., He, H. L., Liu, H., Hu, J., Zhou, B. C. & Zhang, Y. Z. (2010) Mechanistic insight into the function of the C-terminal PKD domain of the collagenolytic serine protease

- deseasin MCP-01 from deep sea *Pseudoalteromonas* sp. SM9913: binding of the PKD domain to collagen results in collagen swelling but does not unwind the collagen triple helix, *J Biol Chem.* **285**, 14285-91.
8. Zhao, G. Y., Chen, X. L., Zhao, H. L., Xie, B. B., Zhou, B. C. & Zhang, Y. Z. (2008) Hydrolysis of insoluble collagen by deseasin MCP-01 from deep-sea *Pseudoalteromonas* sp. SM9913: collagenolytic characters, collagen-binding ability of C-terminal polycystic kidney disease domain, and implication for its novel role in deep-sea sedimentary particulate organic nitrogen degradation, *J Biol Chem.* **283**, 36100-7.
 9. Wilson, J. J., Matsushita, O., Okabe, A. & Sakon, J. (2003) A bacterial collagen-binding domain with novel calcium-binding motif controls domain orientation, *EMBO J.* **22**, 1743-52.
 10. Philominathan, S. T., Koide, T., Hamada, K., Yasui, H., Seifert, S., Matsushita, O. & Sakon, J. (2009) Unidirectional binding of clostridial collagenase to triple helical substrates, *J Biol Chem.* **284**, 10868-76.
 11. Watanabe-Nakayama, T., Itami, M., Kodera, N., Ando, T. & Konno, H. (2016) High-speed atomic force microscopy reveals strongly polarized movement of clostridial collagenase along collagen fibrils, *Scientific reports.* **6**, 28975.
 12. Fujio, A., Murayama, K., Yamagata, Y., Watanabe, K., Imura, T., Inagaki, A., Ohbayashi, N., Shima, H., Sekiguchi, S., Fujimori, K., Igarashi, K., Ohuchi, N., Satomi, S. & Goto, M. (2013) Collagenase H is crucial for isolation of rat pancreatic islets, *Cell Transplant.* **23**: 1187-98.

13. Van Wart, H. E. & Steinbrink, D. R. (1985) Complementary substrate specificities of class I and class II collagenases from *Clostridium histolyticum*, *Biochemistry*. **24**, 6520-6.
14. Heller-Harrison, R. A. & Carter, W. G. (1984) Pepsin-generated type VI collagen is a degradation product of GP140, *J Biol Chem*. **259**, 6858-64.
15. Kuo, H. J., Keene, D. R. & Glanville, R. W. (1989) Orientation of type VI collagen monomers in molecular aggregates, *Biochemistry*. **28**, 3757-62.
16. Kim, S. K., Yang, J. Y. & Cha, J. (2002) Cloning and sequence analysis of a novel metalloprotease gene from *Vibrio parahaemolyticus* 04, *Gene*. **283**, 277-86.
17. Keil, B. (1992) *Vibrio alginolyticus* ("Achromobacter") collagenase: biosynthesis, function and application, *Matrix Suppl.* **1**, 127-33.
18. Lecroisey, A. & Keil, B. (1979) Differences in the degradation of native collagen by two microbial collagenases, *Biochem J*. **179**, 53-8.
19. Lecroisey, A., Keil-Dlouha, V., Woods, D. R., Perrin, D. & Keil, B. (1975) Purification, stability and inhibition of the collagenase from *Achromobacter iophagus*, *FEBS Lett.* **59**, 167-72.
20. Takeuchi, H., Shibano, Y., Morihara, K., Fukushima, J., Inami, S., Keil, B., Gilles, A. M., Kawamoto, S. & Okuda, K. (1992) Structural gene and complete amino acid sequence of *Vibrio alginolyticus* collagenase, *Biochem J*. **281 (Pt 3)**, 703-8.
21. Di Pasquale, R., Vaccaro, S., Caputo, M., Cuppari, C., Caruso, S., Catania, A. & Messina, L. (2019) Collagenase-assisted wound bed preparation: An in vitro comparison between *Vibrio alginolyticus* and *Clostridium histolyticum*

- collagenases on substrate specificity, *International wound journal*. **16**, 1013-1023.
22. Onesti, M. G., Fioramonti, P., Carella, S., Fino, P., Sorvillo, V. & Scuderi, N. (2013) A new association between hyaluronic acid and collagenase in wound repair: an open study, *European review for medical and pharmacological sciences*. **17**, 210-6.
 23. Hickman, F. W., Farmer, J. J., 3rd, Hollis, D. G., Fanning, G. R., Steigerwalt, A. G., Weaver, R. E. & Brenner, D. J. (1982) Identification of *Vibrio hollisae* sp. nov. from patients with diarrhea, *J Clin Microbiol*. **15**, 395-401.
 24. Thompson, F. L., Hoste, B., Vandemeulebroecke, K. & Swings, J. (2003) Reclassification of *Vibrio hollisae* as *Grimontia hollisae* gen. nov., comb. nov, *Int J Syst Evol Microbiol*. **53**, 1615-7.
 25. Nishibuchi, M., Janda, J. M. & Ezaki, T. (1996) The thermostable direct hemolysin gene (tdh) of *Vibrio hollisae* is dissimilar in prevalence to and phylogenetically distant from the tdh genes of other vibrios: implications in the horizontal transfer of the tdh gene, *Microbiol Immunol*. **40**, 59-65.
 26. Hinestrosa, F., Madeira, R. G. & Bourbeau, P. P. (2007) Severe gastroenteritis and hypovolemic shock caused by *Grimontia* (*Vibrio*) *hollisae* infection, *J Clin Microbiol*. **45**, 3462-3.
 27. Suzuki, K. & Matsubara, Y. (1998) Determination of aerobic collagenolytic bacterium isolated from seashore sand, *Hikakukagaku*. **44**, 64-71.
 28. Suzuki, K. (2000) Purification and properties of collagenase from *Vibrio hollisae* 1706B strain, *Hikakukagaku*. **45**, 272-83.
 29. Suzuki, K. (2002) Studies on practical application of *Vibrio hollisae* collagenase,

Hikakukagaku. **48**, 209-213.

30. Richard-Blum, S., Dublet, B. & van der Rest, M. (2000) *Unconventional Collagens: Types VI, VII, VIII, IX, X, XII, XIV, XVI and XIX*, Oxford University Press.
31. Williams, L., Layton, T., Yang, N., Feldmann, M. & Nanchahal, J. (2022) Collagen VI as a driver and disease biomarker in human fibrosis, *The FEBS journal.* **289**, 3603-3629.
32. Glover, M. T., Lake, B. D. & Atherton, D. J. (1991) Infantile systemic hyalinosis: newly recognized disorder of collagen?, *Pediatrics.* **87**, 228-34.
33. Katagiri, K., Takasaki, S., Fujiwara, S., Kayashima, K., Ono, T. & Shinkai, H. (1996) Purification and structural analysis of extracellular matrix of a skin tumor from a patient with juvenile hyaline fibromatosis, *J Dermatol Sci.* **13**, 37-48.
34. Bürgi, J., Kunz, B., Abrami, L., Deuquet, J., Piersigilli, A., Scholl-Bürgi, S., Lausch, E., Unger, S., Superti-Furga, A., Bonaldo, P. & van der Goot, F. G. (2017) CMG2/ANTXR2 regulates extracellular collagen VI which accumulates in hyaline fibromatosis syndrome, *Nature communications.* **8**, 15861.
35. Deuquet, J., Lausch, E., Superti-Furga, A. & van der Goot, F. G. (2012) The dark sides of capillary morphogenesis gene 2, *EMBO J.* **31**, 3-13.
36. Senzaki, H., Kiyozuka, Y., Uemura, Y., Shikata, N., Ueda, S. & Tsubura, A. (1998) Juvenile hyaline fibromatosis: a report of two unrelated adult sibling cases and a literature review, *Pathol Int.* **48**, 230-6.
37. Lubec, B., Steinert, I., Breier, F., Jurecka, W., Pillwein, K. & Fang-Kircher, S.

- (1995) Skin collagen defects in a patient with juvenile hyaline fibromatosis, *Arch Dis Child.* **73**, 246-8.
38. Dowling, O., Difeo, A., Ramirez, M. C., Tukel, T., Narla, G., Bonafe, L., Kayserili, H., Yuksel-Apak, M., Paller, A. S., Norton, K., Teebi, A. S., Grum-Tokars, V., Martin, G. S., Davis, G. E., Glucksman, M. J. & Martignetti, J. A. (2003) Mutations in capillary morphogenesis gene-2 result in the allelic disorders juvenile hyaline fibromatosis and infantile systemic hyalinosis, *Am J Hum Genet.* **73**, 957-66.
39. Hanks, S., Adams, S., Douglas, J., Arbour, L., Atherton, D. J., Balci, S., Bode, H., Campbell, M. E., Feingold, M., Keser, G., Kleijer, W., Mancini, G., McGrath, J. A., Muntoni, F., Nanda, A., Teare, M. D., Warman, M., Pope, F. M., Superti-Furga, A., Futreal, P. A. & Rahman, N. (2003) Mutations in the gene encoding capillary morphogenesis protein 2 cause juvenile hyaline fibromatosis and infantile systemic hyalinosis, *Am J Hum Genet.* **73**, 791-800.
40. Bell, S. E., Mavila, A., Salazar, R., Bayless, K. J., Kanagala, S., Maxwell, S. A. & Davis, G. E. (2001) Differential gene expression during capillary morphogenesis in 3D collagen matrices: regulated expression of genes involved in basement membrane matrix assembly, cell cycle progression, cellular differentiation and G-protein signaling, *J Cell Sci.* **114**, 2755-73.
41. Bradley, K. A., Mogridge, J., Mourez, M., Collier, R. J. & Young, J. A. (2001) Identification of the cellular receptor for anthrax toxin, *Nature.* **414**, 225-9.
42. Scobie, H. M., Rainey, G. J., Bradley, K. A. & Young, J. A. (2003) Human capillary

- morphogenesis protein 2 functions as an anthrax toxin receptor, *Proc Natl Acad Sci U S A.* **100**, 5170-4.
43. Kobayashi, T., Hattori, S. & Shinkai, H. (2003) Matrix metalloproteinases-2 and -9 are secreted from human fibroblasts, *Acta dermato-venereologica.* **83**, 105-7.
44. Tanaka, K., Ebihara, T., Kusubata, M., Adachi, E., Arai, M., Kawaguchi, N., Utsunomiya, J., Miki, Y., Hiramoto, M., Hattori, S. & Irie, S. (2009) Abnormal collagen deposition in fibromas from patient with juvenile hyaline fibromatosis, *J Dermatol Sci.* **55**, 197-200.
45. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature.* **227**, 680-5.
46. Krishnamurthy, J., Dalal, B. S., Sunila & Gubanna, M. V. (2011) Juvenile hyaline fibromatosis, *Indian journal of dermatology.* **56**, 731-3.
47. Peters, D. E., Zhang, Y., Molinolo, A. A., Miller-Randolph, S., Szabo, R., Bugge, T. H., Leppla, S. H. & Liu, S. (2012) Capillary morphogenesis protein-2 is required for mouse parturition by maintaining uterine collagen homeostasis, *Biochem Biophys Res Commun.* **422**, 393-7.
48. Reeves, C. V., Wang, X., Charles-Horvath, P. C., Vink, J. Y., Borisenko, V. Y., Young, J. A. & Kitajewski, J. K. (2012) Anthrax toxin receptor 2 functions in ECM homeostasis of the murine reproductive tract and promotes MMP activity, *PloS one.* **7**, e34862.
49. Smeraglia, F., Del Buono, A. & Maffulli, N. (2016) Collagenase clostridium histolyticum in Dupuytren's contracture: a systematic review, *British medical*

bulletin. **118**, 149-58.

50. Matsumoto, S., Okitsu, T., Iwanaga, Y., Noguchi, H., Nagata, H., Yonekawa, Y., Yamada, Y., Fukuda, K., Tsukiyama, K., Suzuki, H., Kawasaki, Y., Shimodaira, M., Matsuoka, K., Shibata, T., Kasai, Y., Maekawa, T., Shapiro, J. & Tanaka, K. (2005) Insulin independence after living-donor distal pancreatectomy and islet allotransplantation, *Lancet.* **365**, 1642-4.
51. Hurst, L. C., Badalamente, M. A., Hentz, V. R., Hotchkiss, R. N., Kaplan, F. T., Meals, R. A., Smith, T. M. & Rodzvilla, J. (2009) Injectable collagenase clostridium histolyticum for Dupuytren's contracture, *N Engl J Med.* **361**, 968-79.
52. Maclennan, J. D., Mandl, I. & Howes, E. L. (1953) Bacterial digestion of collagen, *J Clin Invest.* **32**, 1317-22.
53. Matsushita, O., Jung, C. M., Katayama, S., Minami, J., Takahashi, Y. & Okabe, A. (1999) Gene duplication and multiplicity of collagenases in *Clostridium histolyticum*, *J Bacteriol.* **181**, 923-33.
54. Matsushita, O., Koide, T., Kobayashi, R., Nagata, K. & Okabe, A. (2001) Substrate recognition by the collagen-binding domain of *Clostridium histolyticum* class I collagenase, *J Biol Chem.* **276**, 8761-70.
55. Yoshihara, K., Matsushita, O., Minami, J. & Okabe, A. (1994) Cloning and nucleotide sequence analysis of the colH gene from *Clostridium histolyticum* encoding a collagenase and a gelatinase, *J Bacteriol.* **176**, 6489-96.
56. Nishi, N., Matsushita, O., Yuube, K., Miyataka, H., Okabe, A. & Wada, F. (1998) Collagen-binding growth factors: production and characterization of functional

- fusion proteins having a collagen-binding domain, *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**, 7018-23.
57. Lee, J. H., Kim, G. T., Lee, J. Y., Jun, H. K., Yu, J. H. & Kong, I. S. (1998) Isolation and sequence analysis of metalloprotease gene from *Vibrio mimicus*, *Biochim Biophys Acta.* **1384**, 1-6.
58. Matsushita, O., Yoshihara, K., Katayama, S., Minami, J. & Okabe, A. (1994) Purification and characterization of *Clostridium perfringens* 120-kilodalton collagenase and nucleotide sequence of the corresponding gene, *J Bacteriol.* **176**, 149-56.
59. Sakurai, Y., Inoue, H., Nishii, W., Takahashi, T., Iino, Y., Yamamoto, M. & Takahashi, K. (2009) Purification and characterization of a major collagenase from *Streptomyces parvulus*, *Biosci Biotechnol Biochem.* **73**, 21-8.
60. Yu, M. S. & Lee, C. Y. (1999) Expression and characterization of the prtV gene encoding a collagenase from *Vibrio parahaemolyticus* in *Escherichia coli*, *Microbiology.* **145 (Pt 1)**, 143-50.
61. Miura-Yokota, Y., Matsubara, Y., Ebihara, T., Koyama, Y., Ogawa-Goto, K., Isobe, N., Hattori, S. & Irie, S. (2005) Cloning and nucleotide sequence of a novel 28-kDa protein from the mantle muscle of the squid *Todarodes pacificus* with homology to tropomyosin, *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* **141**, 3-12.
62. Nagai, Y., Hori, H., Hattori, S., Sunada, Y., Terato, K., Hashida, R. & Miyamoto, K. (1984) A micro-assay method for collagenase activity and its application in the study of collagen metabolism in pathological tissues, *Japan J Inflamm.* **4**, 121-30.

63. Van Wart, H. E. & Steinbrink, D. R. (1981) A continuous spectrophotometric assay for *Clostridium histolyticum* collagenase, *Anal Biochem.* **113**, 356-65.
64. Hattori, S., Fujisaki, H., Kiriyama, T., Yokoyama, T. & Irie, S. (2002) Real-time zymography and reverse zymography: a method for detecting activities of matrix metalloproteinases and their inhibitors using FITC-labeled collagen and casein as substrates, *Anal Biochem.* **301**, 27-34.
65. Yeats, C., Bentley, S. & Bateman, A. (2003) New knowledge from old: in silico discovery of novel protein domains in *Streptomyces coelicolor*, *BMC Microbiol.* **3**, 3-23.
66. Teramura, N., Tanaka, K., Iijima, K., Hayashida, O., Suzuki, K., Hattori, S. & Irie, S. (2011) Cloning of a novel collagenase gene from the gram-negative bacterium *Grimontia (Vibrio) hollisae* 1706B and its efficient expression in *Brevibacillus choshinensis*, *J Bacteriol.* **193**, 3049-56.
67. Rawlings, N. D., Barrett, A. J. & Bateman, A. (2010) MEROPS: the peptidase database, *Nucleic Acids Res.* **38**, D227-33.
68. Chung, L., Dinakarbandian, D., Yoshida, N., Lauer-Fields, J. L., Fields, G. B., Visse, R. & Nagase, H. (2004) Collagenase unwinds triple-helical collagen prior to peptide bond hydrolysis, *Embo J.* **23**, 3020-30.
69. Clark, I. M. & Cawston, T. E. (1989) Fragments of human fibroblast collagenase. Purification and characterization, *Biochem J.* **263**, 201-6.
70. Bauer, R., Wilson, J. J., Philominathan, S. T., Davis, D., Matsushita, O. & Sakon, J. (2013) Structural comparison of ColH and ColG collagen-binding domains from

Clostridium histolyticum, *J Bacteriol.* **195**, 318-27.

71. Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Soding, J., Thompson, J. D. & Higgins, D. G. (2011) Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega, *Molecular systems biology.* **7**, 539.
72. Combet, C., Blanchet, C., Geourjon, C. & Deleage, G. (2000) NPS@: network protein sequence analysis, *Trends in biochemical sciences.* **25**, 147-50.
73. Guermeur, Y., Geourjon, C., Gallinari, P. & Deleage, G. (1999) Improved performance in protein secondary structure prediction by inhomogeneous score combination, *Bioinformatics (Oxford, England).* **15**, 413-21.
74. King, R. D. & Sternberg, M. J. (1996) Identification and application of the concepts important for accurate and reliable protein secondary structure prediction, *Protein science : a publication of the Protein Society.* **5**, 2298-310.
75. Garnier, J., Gibrat, J. F. & Robson, B. (1996) GOR method for predicting protein secondary structure from amino acid sequence, *Methods in enzymology.* **266**, 540-53.
76. Rost, B. & Sander, C. (1993) Prediction of protein secondary structure at better than 70% accuracy, *Journal of molecular biology.* **232**, 584-99.
77. Frishman, D. & Argos, P. (1996) Incorporation of non-local interactions in protein secondary structure prediction from the amino acid sequence, *Protein engineering.* **9**, 133-42.
78. Micsonai, A., Wien, F., Bulyaki, E., Kun, J., Moussong, E., Lee, Y. H., Goto, Y.,

- Refregiers, M. & Kardos, J. (2018) BeStSel: a web server for accurate protein secondary structure prediction and fold recognition from the circular dichroism spectra, *Nucleic Acids Res.* **46**, W315-W322.
79. Micsonai, A., Wien, F., Kernya, L., Lee, Y. H., Goto, Y., Refregiers, M. & Kardos, J. (2015) Accurate secondary structure prediction and fold recognition for circular dichroism spectroscopy, *Proc Natl Acad Sci U S A.* **112**, E3095-103.
80. Tanaka, K., Teramura, N., Hayashida, O., Iijima, K., Okitsu, T. & Hattori, S. (2018) The C-terminal segment of collagenase in *Grimontia hollisiae* binds collagen to enhance collagenolysis, *FEBS open bio.* **8**, 1691-1702.
81. Toyoshima, T., Matsushita, O., Minami, J., Nishi, N., Okabe, A. & Itano, T. (2001) Collagen-binding domain of a *Clostridium histolyticum* collagenase exhibits a broad substrate spectrum both in vitro and in vivo, *Connective tissue research.* **42**, 281-90.
82. Philominathan, S. T., Koide, T., Matsushita, O. & Sakon, J. (2012) Bacterial collagen-binding domain targets undertwisted regions of collagen, *Protein science : a publication of the Protein Society.* **21**, 1554-65.
83. Katikaneni, R., Ponnappakkam, T., Suda, H., Miyata, S., Sakon, J., Matsushita, O. & Gensure, R. C. (2012) Treatment for chemotherapy-induced alopecia in mice using parathyroid hormone agonists and antagonists linked to a collagen binding domain, *International journal of cancer.* **131**, E813-21.
84. Ponnappakkam, T., Katikaneni, R., Suda, H., Miyata, S., Matsushita, O., Sakon, J. & Gensure, R. C. (2012) A single injection of the anabolic bone agent, parathyroid

- hormone-collagen binding domain (PTH-CBD), results in sustained increases in bone mineral density for up to 12 months in normal female mice, *Calcified tissue international*. **91**, 196-203.
85. Saito, W., Uchida, K., Ueno, M., Matsushita, O., Inoue, G., Nishi, N., Ogura, T., Hattori, S., Fujimaki, H., Tanaka, K. & Takaso, M. (2014) Acceleration of bone formation during fracture healing by injectable collagen powder and human basic fibroblast growth factor containing a collagen-binding domain from *Clostridium histolyticum* collagenase, *Journal of biomedical materials research Part A*. **102**, 3049-55.
 86. Elsholz, F., Harteneck, C., Muller, W. & Friedland, K. (2014) Calcium--a central regulator of keratinocyte differentiation in health and disease, *European journal of dermatology : EJD*. **24**, 650-61.
 87. Wolffe, A. P. & Tata, J. R. (1984) Primary culture, cellular stress and differentiated function, *FEBS Lett*. **176**, 8-15.
 88. Zhang, S. & Kuhn, J. R. (2013) Cell isolation and culture, *WormBook*, 1-39.
 89. Al-Hajj, M., Wicha, M. S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S. J. & Clarke, M. F. (2003) Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells, *Proc Natl Acad Sci USA*. **100**, 3983-8.
 90. Singh, S. K., Hawkins, C., Clarke, I. D., Squire, J. A., Bayani, J., Hide, T., Henkelman, R. M., Cusimano, M. D. & Dirks, P. B. (2004) Identification of human brain tumour initiating cells, *Nature*. **432**, 396-401.
 91. Carvalho, P. P., Gimble, J. M., Dias, I. R., Gomes, M. E. & Reis, R. L. (2013)

- Xenofree enzymatic products for the isolation of human adipose-derived stromal/stem cells, *Tissue Eng Part C Methods*. **19**, 473-8.
92. Gramignoli, R., Green, M. L., Tahan, V., Dorko, K., Skvorak, K. J., Marongiu, F., Zao, W., Venkataramanan, R., Ellis, E. C., Geller, D., Breite, A. G., Dwulet, F. E., McCarthy, R. C. & Strom, S. C. (2012) Development and application of purified tissue dissociation enzyme mixtures for human hepatocyte isolation, *Cell Transplant*. **21**, 1245-60.
93. Lakey, J. R., Burridge, P. W. & Shapiro, A. M. (2003) Technical aspects of islet preparation and transplantation, *Transpl Int*. **16**, 613-32.
94. Wang, S., Qu, X. & Zhao, R. C. (2011) Mesenchymal stem cells hold promise for regenerative medicine, *Front Med*. **5**, 372-8.
95. Vos-Scheperkeuter, G. H., van Suylichem, P. T., Vonk, M. W., Wolters, G. H. & van Schilfgaarde, R. (1997) Histochemical analysis of the role of class I and class II *Clostridium histolyticum* collagenase in the degradation of rat pancreatic extracellular matrix for islet isolation, *Cell Transplant*. **6**, 403-12.
96. Wolters, G. H., Vos-Scheperkeuter, G. H., Lin, H. C. & van Schilfgaarde, R. (1995) Different roles of class I and class II *Clostridium histolyticum* collagenase in rat pancreatic islet isolation, *Diabetes*. **44**, 227-33.
97. Brandhorst, D., Huettler, S., Alt, A., Raemsch-Guenther, N., Kurfuerst, M., Bretzel, R. G. & Brandhorst, H. (2005) Adjustment of the ratio between collagenase class II and I improves islet isolation outcome, *Transplant Proc*. **37**, 3450-1.

98. Bertuzzi, F., Cainarca, S., Marzorati, S., Bachi, A., Antonioli, B., Nano, R., Verzaro, R. & Ricordi, C. (2009) Collagenase isoforms for pancreas digestion, *Cell Transplant.* **18**, 203-6.
99. Brandhorst, D., Brandhorst, H. & Johnson, P. R. V. (2017) Enzyme Development for Human Islet Isolation: Five Decades of Progress or Stagnation?, *The review of diabetic studies : RDS.* **14**, 22-38.
100. Loganathan, G., Subhashree, V., Breite, A. G., Tucker, W. W., Narayanan, S., Dhanasekaran, M., Mokshagundam, S., Green, M. L., Hughes, M. G., Williams, S. K., Dwulet, F. E., McCarthy, R. C. & Balamurugan, A. N. (2018) Beneficial effect of recombinant rC1rC2 collagenases on human islet function: Efficacy of low-dose enzymes on pancreas digestion and yield, *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons.* **18**, 478-485.
101. Yamamoto, T., Ricordi, C., Messinger, S., Sakuma, Y., Miki, A., Rodriguez, R., Haertter, R., Khan, A., Alejandro, R. & Ichii, H. (2007) Deterioration and variability of highly purified collagenase blends used in clinical islet isolation, *Transplantation.* **84**, 997-1002.
102. Brandhorst, H., Brandhorst, D., Hesse, F., Ambrosius, D., Brendel, M., Kawakami, Y. & Bretzel, R. G. (2003) Successful human islet isolation utilizing recombinant collagenase, *Diabetes.* **52**, 1143-6.
103. Ricordi, C., Gray, D. W., Hering, B. J., Kaufman, D. B., Warnock, G. L., Kneteman, N. M., Lake, S. P., London, N. J., Socci, C., Alejandro, R. Zeng, Y.,

- Scharp, D. W., Viviani, G., Falqui, L., Tzakis, A., Bretzel, R. G., Federlin, K., Pozza, G., James, R. F., Rajjote, R. V., Carlo, V. D., Morris, P. J., Sutherland, D. E., Starzl, T. E., Mintz, D. H. & Lacy, P. E. (1990) Islet isolation assessment in man and large animals, *Acta Diabetol Lat.* **27**, 185-95.
104. McCarthy, R. C., Breite, A. G., Green, M. L. & Dwulet, F. E. (2011) Tissue dissociation enzymes for isolating human islets for transplantation: factors to consider in setting enzyme acceptance criteria, *Transplantation.* **91**, 137-45.
105. Wuensch, E. & Heidrich, H. G. (1963) [ON THE QUANTITATIVE DETERMINATION OF COLLAGENASE], *Hoppe Seylers Z Physiol Chem.* **333**, 149-51.
106. Taga, Y., Kusubata, M., Ogawa-Goto, K. & Hattori, S. (2014) Highly accurate quantification of hydroxyproline-containing peptides in blood using a protease digest of stable isotope-labeled collagen, *J Agric Food Chem.* **62**, 12096-102.
107. Taga, Y., Kusubata, M., Ogawa-Goto, K. & Hattori, S. (2014) Stable isotope-labeled collagen: a novel and versatile tool for quantitative collagen analyses using mass spectrometry, *J Proteome Res.* **13**, 3671-8.
108. Kimura, Y., Okitsu, T., Xibao, L., Teramae, H., Okonogi, A., Toyoda, K., Uemoto, S. & Fukushima, M. (2013) Improved hypothermic short-term storage of isolated mouse islets by adding serum to preservation solutions, *Islets.* **5**, 45-52.
109. Ramachandran, K., Huang, H. H. & Stehno-Bittel, L. (2015) A Simple Method to Replace Islet Equivalents for Volume Quantification of Human Islets, *Cell Transplant.* **24**, 1183-94.

110. Tanaka, K., Okitsu, T., Teramura, N., Iijima, K., Hayashida, O., Teramae, H. & Hattori, S. (2020) Recombinant collagenase from *Grimontia hollisae* as a tissue dissociation enzyme for isolating primary cells, *Scientific reports*. **10**, 3927.
111. Cantarelli, E., Citro, A., Marzorati, S., Melzi, R., Scavini, M. & Piemonti, L. (2013) Murine animal models for preclinical islet transplantation: No model fits all (research purposes), *Islets*. **5**, 79-86.
112. Wagner, L. E., Melnyk, O., Duffett, B. E. & Linnemann, A. K. (2022) Mouse models and human islet transplantation sites for intravital imaging, *Frontiers in endocrinology*. **13**, 992540.
113. Lee, J. H., Ahn, S. H., Lee, E. M., Kim, Y. O., Lee, S. J. & Kong, I. S. (2003) Characterization of the enzyme activity of an extracellular metalloprotease (VMC) from *Vibrio mimicus* and its C-terminal deletions, *FEMS microbiology letters*. **223**, 293-300.
114. Szot, G. L., Lee, M. R., Tavakol, M. M., Lang, J., Dekovic, F., Kerlan, R. K., Stock, P. G. & Posselt, A. M. (2009) Successful clinical islet isolation using a GMP-manufactured collagenase and neutral protease, *Transplantation*. **88**, 753-6.
115. Li, S., Sakai, T., Suzuki, Y., Goto, T., Tanaka, T., Yoshikawa, T., Kakinoki, K., Tanioka, Y., Matsumoto, I., Fujino, Y. & Kuroda, Y. (2007) Improved quantity and in vivo function of islets isolated by reduced pressure-controlled injection of collagenase in a rat model, *Cell Transplant*. **16**, 539-45.
116. Noguchi, H., Ikemoto, T., Naziruddin, B., Jackson, A., Shimoda, M., Fujita, Y.,

- Chujo, D., Takita, M., Kobayashi, N., Onaca, N., Levy, M. F. & Matsumoto, S. (2009) Iodixanol-controlled density gradient during islet purification improves recovery rate in human islet isolation, *Transplantation*. **87**, 1629-35.
117. Shimoda, M., Noguchi, H., Fujita, Y., Takita, M., Ikemoto, T., Chujo, D., Naziruddin, B., Levy, M. F., Kobayashi, N., Grayburn, P. A. & Matsumoto, S. (2012) Islet purification method using large bottles effectively achieves high islet yield from pig pancreas, *Cell Transplant*. **21**, 501-8.
118. Hughes, S. J., Clark, A., McShane, P., Contractor, H. H., Gray, D. W. & Johnson, P. R. (2006) Characterisation of collagen VI within the islet-exocrine interface of the human pancreas: implications for clinical islet isolation?, *Transplantation*. **81**, 423-6.
119. Veidal, S. S., Karsdal, M. A., Vassiliadis, E., Nawrocki, A., Larsen, M. R., Nguyen, Q. H., Hagglund, P., Luo, Y., Zheng, Q., Vainer, B. & Leeming, D. J. (2011) MMP mediated degradation of type VI collagen is highly associated with liver fibrosis--identification and validation of a novel biochemical marker assay, *PloS one*. **6**, e24753.
120. Kobayashi, T., Manivel, J. C., Bellin, M. D., Carlson, A. M., Moran, A., Freeman, M. L., Hering, B. J. & Sutherland, D. E. (2010) Correlation of pancreatic histopathologic findings and islet yield in children with chronic pancreatitis undergoing total pancreatectomy and islet autotransplantation, *Pancreas*. **39**, 57-63.

Table 1 *G. hollisae*由来組換えコラゲナーゼおよび*C. histolyticum*由来コラゲナーゼの反応速度パラメーター

Substrate	Enzyme	Specific Activity (U/mg)	K _m (mM)	V _{max} (mM/min)	Specific constant (V _{max} /K _m)
FITC-collagen	<i>G. hollisae</i>	5,314	$(3.08 \pm 0.76) \times 10^{-3}$	$(4.74 \pm 1.87) \times 10^{-4}$ **	$(15.2 \pm 3.07) \times 10^{-2}$ *
	<i>C. histolyticum</i>	1,289	$(4.27 \pm 2.19) \times 10^{-3}$	$(1.14 \pm 0.46) \times 10^{-4}$	$(2.85 \pm 0.49) \times 10^{-2}$
FALGPA	<i>G. hollisae</i>	7.40	2.41 ± 0.19	33.2 ± 1.11 *	13.8 ± 0.81 *
	<i>C. histolyticum</i>	0.39	2.40 ± 0.52	1.35 ± 0.12	0.57 ± 0.07

*G. hollisae*由来組換えコラゲナーゼと*C. histolyticum*由来コラゲナーゼの酵素活性はFITCラベル化コラーゲンと合成ペプチド基質 (FALGPA) を用いて測定した。FITCラベル化コラーゲンの活性測定は、両コラゲナーゼとも0.5 mgの酵素を用いて、50 mM Tris-HCl, 0.3 M NaCl, 10 mM CaCl₂, pH 7.5, 30°Cの条件で行なった。FALGPAの活性測定は、*G. hollisae*由来コラゲナーゼが1.0 mg、*C. histolyticum*由来コラゲナーゼが20 mgの酵素を用いて、50 mM Tricine, 0.4 M NaCl, 40 mM CaCl₂, pH 7.5, 30°Cの条件で行なった。データは三回の独立した実験の平均値±SDで表示した。**P* < 0.01. ***P* < 0.05。

Table 2 *G. hollisae*由来コラゲナーゼのPPCドメインと *C. histolyticum*由来コラゲナーゼのCBDとの相同性解析

	<i>G. hollisae</i>	ColG_CBD2	ColH_CBD	ColG_CBD1
<i>G. hollisae</i>	100	11.24	21.84	22.73
ColG_CBD2	11.24	100	30.28	30.63
ColH_CBD	21.84	30.28	100	38.53
ColG_CBD1	22.73	30.63	38.53	100

*G. hollisae*由来コラゲナーゼのPPCドメイン（アミノ酸番号647-767、NCBI accession number: BAK39964）、*C. histolyticum*由来コラゲナーゼColGのCBD1（アミノ酸番号888-999、NCBI accession number: D87215）、CBD2（アミノ酸番号1,007-1,118、NCBI accession number: D87215）および*C. histolyticum*由来コラゲナーゼColHのCBD（アミノ酸番号906-1,016、NCBI accession number: AB014075）について、Clustal Omegaプログラムを用いて相同性解析を行なった。

Table 3 *G. hollisae*由来コラゲナーゼのPPCドメインとビブリオ属由来コラゲナーゼのPPCドメインとの相同性解析

	<i>V. maritimus</i>	<i>V. variabilis</i>	<i>G. hollisae</i>	<i>V. splendidus</i>	<i>V. cyclitrophicus</i>	<i>V. proteolyticus</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. alginolyticus</i>
<i>V. maritimus</i>	100	92.31	44.44	46.15	46.15	55.65	47.01	46.15
<i>V. variabilis</i>	92.31	100	41.30	43.59	43.59	53.91	45.30	45.30
<i>G. hollisae</i>	44.44	41.03	100	49.57	49.57	54.78	57.26	56.41
<i>V. splendidus</i>	46.15	43.59	49.57	100	98.29	56.52	59.83	61.54
<i>V. cyclitrophicus</i>	46.15	43.59	49.57	98.29	100	56.52	58.97	60.68
<i>V. proteolyticus</i>	55.65	53.91	54.78	56.52	56.52	100	61.74	60.87
<i>V. parahaemolyticus</i>	47.01	45.30	57.26	59.83	58.97	61.74	100	81.20
<i>V. alginolyticus</i>	46.15	45.30	56.41	61.54	60.68	60.87	81.20	100

*G. hollisae*由来コラゲナーゼのPPCドメイン（アミノ酸番号：647～767、NCBI accession number: BAK39964）、*V. parahaemolyticus*由来コラゲナーゼのPPCドメイン（698～814、NP_797719）、*V. alginolyticus*由来コラゲナーゼのPPCドメイン（698～814、CAA44501）、*V. proteolyticus*由来コラゲナーゼのPPCドメイン（607～721、WP_021703968）、*V. splendidus*由来コラゲナーゼのPPCドメイン（613～729、WP_102548390）、*V. cyclitrophicus*由来コラゲナーゼのPPCドメイン（612～728、WP_016769033）、*V. maritimus*由来コラゲナーゼのPPCドメイン（608～724、WP_112460283）および*V. variabilis*由来コラゲナーゼのPPCドメイン（608～724、WP_112477837）について、Clustal Omegaプログラムを用いて相同性解析を行なった。

Table 4 *G. hollisae*由来組換え62 kDaコラゲナーゼおよび*C. histolyticum*由来コラゲナーゼの反応速度パラメーター

Substrate	Enzyme strain	Sp act (U/mg)	Mean + SD		
			K _m (mM)	V _{max} (mM/s)	K _{cat} (s ⁻¹)
FITC-collagen	<i>G. hollisae</i>	5,490	(1.09 ± 0.35) × 10 ⁻³	(4.06 ± 0.84) × 10 ⁻⁴ **	25.14 ± 5.20
	<i>C. histolyticum</i>	1,766	(1.89 ± 0.42) × 10 ⁻³	(1.61 ± 0.39) × 10 ⁻⁴	18.69 ± 4.46
FALGPA	<i>G. hollisae</i>	9.39	2.28 ± 0.23	0.61 ± 0.13*	37.53 ± 8.03**
	<i>C. histolyticum</i>	2.60	2.03 ± 0.48	0.19 ± 0.03	22.15 ± 2.94

*G. hollisae*由来組換え62 kDaコラゲナーゼと*C. histolyticum*由来コラゲナーゼの酵素活性はFITCラベル化コラーゲンと合成ペプチド基質 (FALGPA) を用いて測定した。FITCラベル化コラーゲンの活性測定は、両コラゲナーゼとも0.5 mgの酵素を用いて、50 mM Tris-HCl, 0.2 M NaCl, 5 mM CaCl₂, pH 7.5, 30°Cの条件で行なった。FALGPAの活性測定は、*G. hollisae*由来組換えコラゲナーゼが1.0 mg、*C. histolyticum*由来コラゲナーゼが2.5 mgの酵素を用いて、50 mM Tricine, 0.4 M NaCl, 40 mM CaCl₂, pH 7.5, 30°Cの条件で行なった。データは三回の独立した実験の平均値 ± SDで表示した。**P* < 0.01. ***P* < 0.05。

Table 5 コラゲナーゼ処理により生成されるウシ腱I型コラーゲン由来トリペプチドの定量

I型コラーゲン分子中の含有数	トリペプチド	生成量 (mg/g)	
		<i>G. hollisae</i>	<i>C. histolyticum</i>
111	Gly-Pro-Hyp	63.30	35.11
93	Gly-Pro-Ala	31.26	13.34
58	Gly-Ala-Hyp	17.43	2.53
37	Gly-Leu-Hyp	32.09	4.59
36	Gly-Glu-Hyp	13.16	N.D.
31	Gly-Glu-Arg	13.07	N.D.
30	Gly-Ala-Arg	21.23	2.29
27	Gly-Pro-Ser	14.01	4.69
25	Gly-Pro-Arg	23.11	7.25
19	Gly-Pro-Gln	10.81	4.18
19	Gly-Phe-Hyp	17.22	0.27
15	Gly-Pro-Val	14.79	1.88
12種類合計 トリペプチド量		271.48	76.13

組換え62 kDaコラゲナーゼおよび*C. histolyticum*由来コラゲナーゼとウシ腱由来酸抽出I型コラーゲンを混合し、30°Cで20時間インキュベートした。反応液に等量の1%ギ酸を添加して反応停止した後、質量分析計を用いて生成した12種類のトリペプチドを定量した。

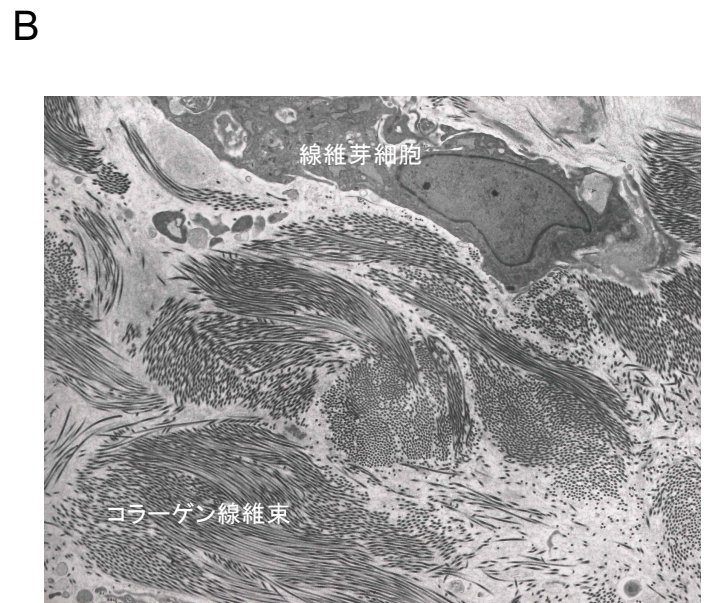
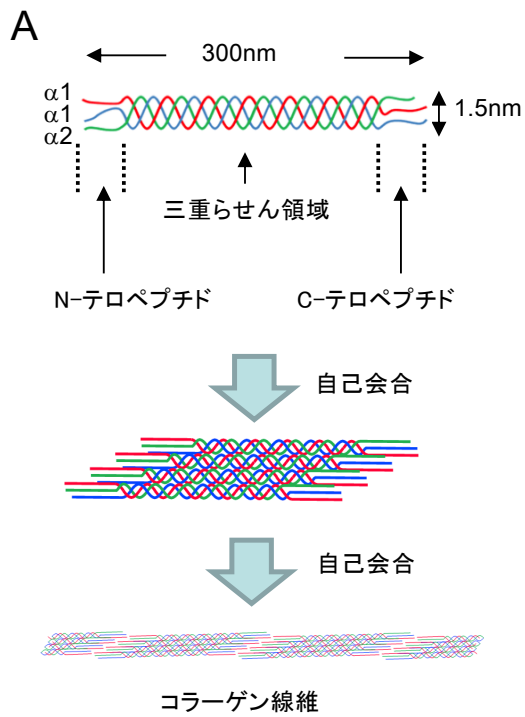


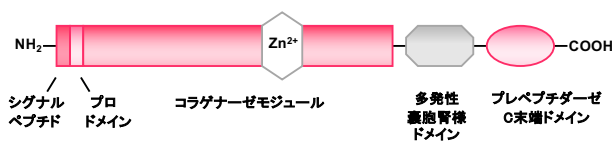
Fig. 1 コラーゲン分子とコラーゲン線維

A. I型コラーゲン分子の模式図。コラーゲン分子は自己会合し、コラーゲン線維となる。
 B. ヒト真皮の透過型電子顕微鏡像（9,500倍）。線維芽細胞の周囲にコラーゲンの線維束が見られる。

M9A

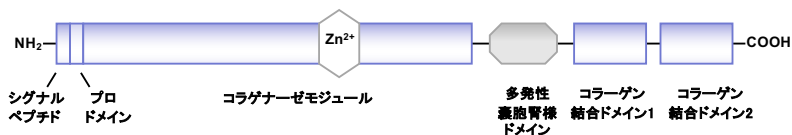
V. parahaemolyticus

V. alginolyticus



M9B

C. histolyticum ColG



C. histolyticum ColH

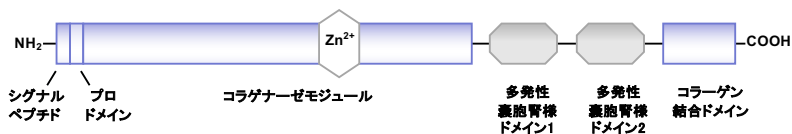


Fig.2 ドメイン構造モチーフによる細菌性コラゲナーゼの比較

MEROPSタンパク質分解酵素データベースにおいて、細菌性コラゲナーゼはM9に分類され、さらにM9AとM9Bのサブファミリーに分類される。M9Aにはビブリオ菌由来コラゲナーゼが含まれ、M9Bにはクロストリジウム属由来コラゲナーゼが含まれる。

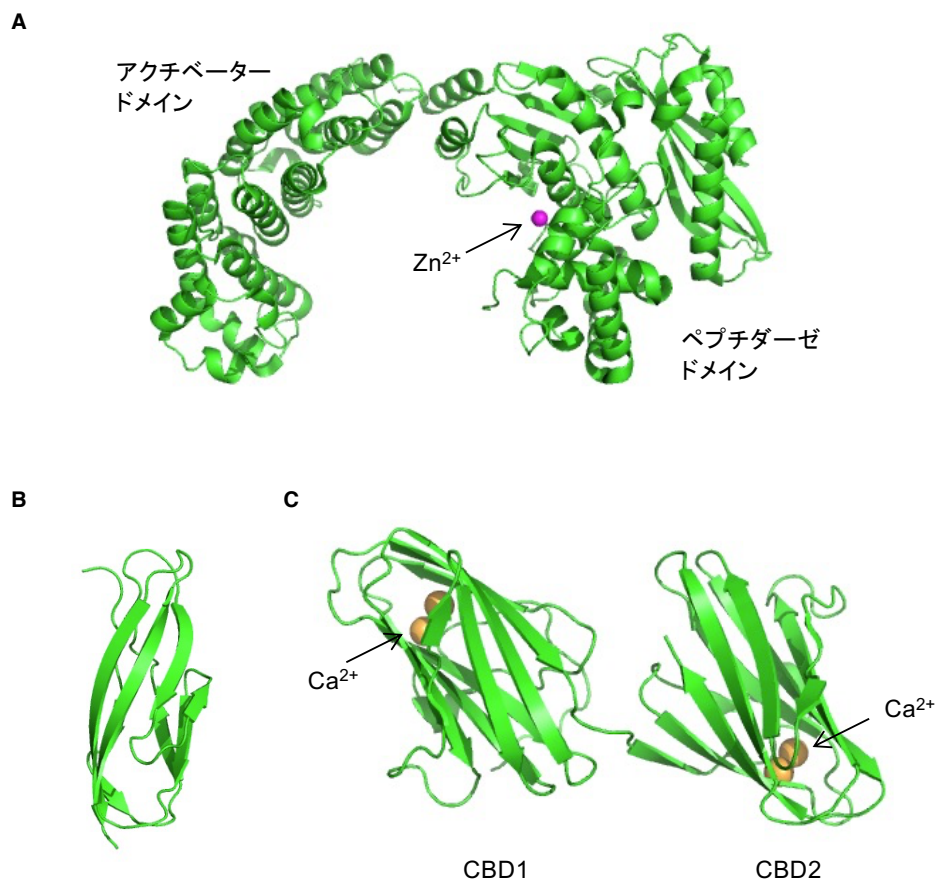


Fig. 3 *C. histolyticum*由来コラゲナーゼColGの各ドメインの結晶構造

(A) コラゲナーゼモジュールの構造 (PDB-ID: 2Y50)。コラゲナーゼモジュールは左側のアクチベータードメインと右側のペプチダーゼドメインから成る。ペプチダーゼドメインは亜鉛 (紫) を活性中心とした活性部位を含む。(B) 多発性嚢胞腎様ドメインの構造 (PDB-ID: 2Y72)。(C) コラーゲン結合ドメイン (CBD) の構造 (PDB-ID: 5IKU)。CBD1とCBD2にはカルシウム (オレンジ) が結合している。

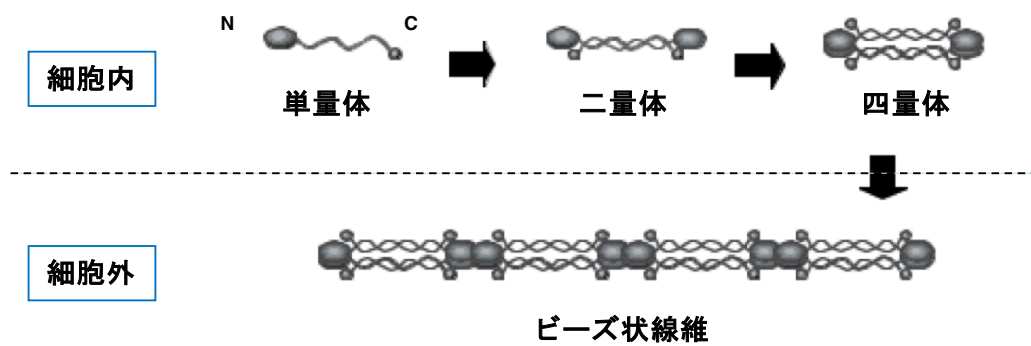


Fig. 4 VI型コラーゲンの会合体形成の模式図

VI型コラーゲンは、 $\alpha 1$ 鎖、 $\alpha 2$ 鎖、 $\alpha 3$ 鎖の三本の α 鎖が三重らせん構造をとった分子で、細胞内で四量体を形成した後に分泌され、細胞外で短いコラーゲン鎖が数珠つなぎになったビーズ状線維を形成する。

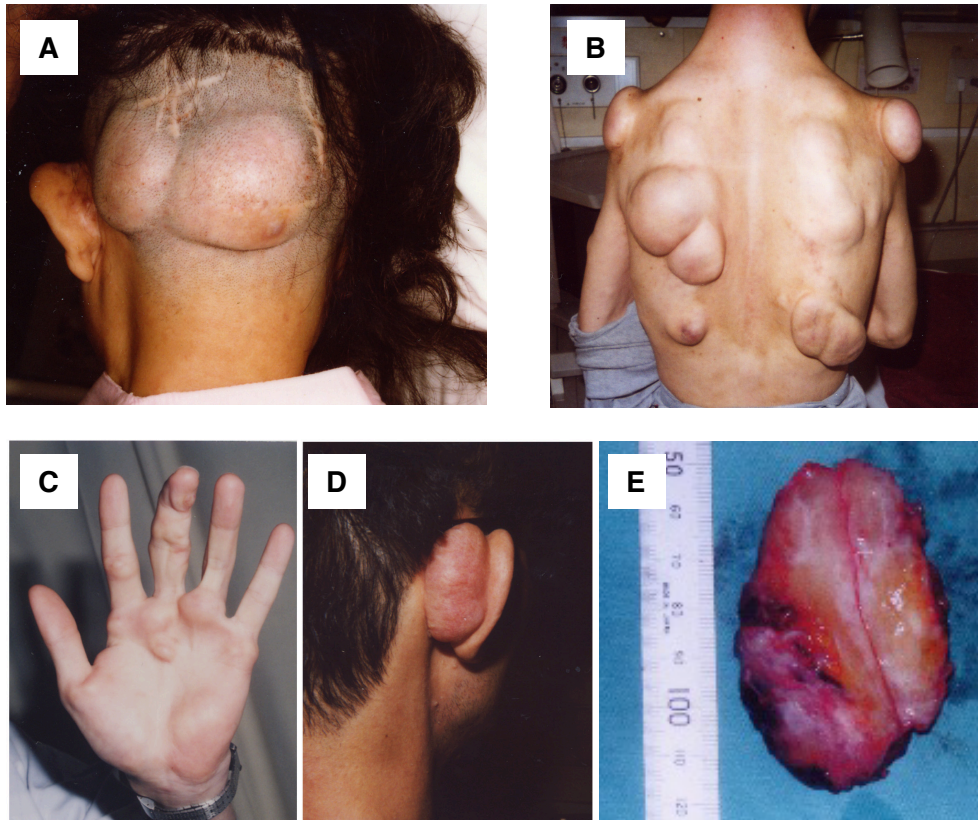


Fig. 5 若年性硝子化線維腫症の腫瘤

後頭部 (A)、背部 (B)、指および掌 (C)、耳の後ろ (D) など刺激を受けやすい部位に腫瘤が生じる。治療法はなく、外科的手術で切除する (E)。

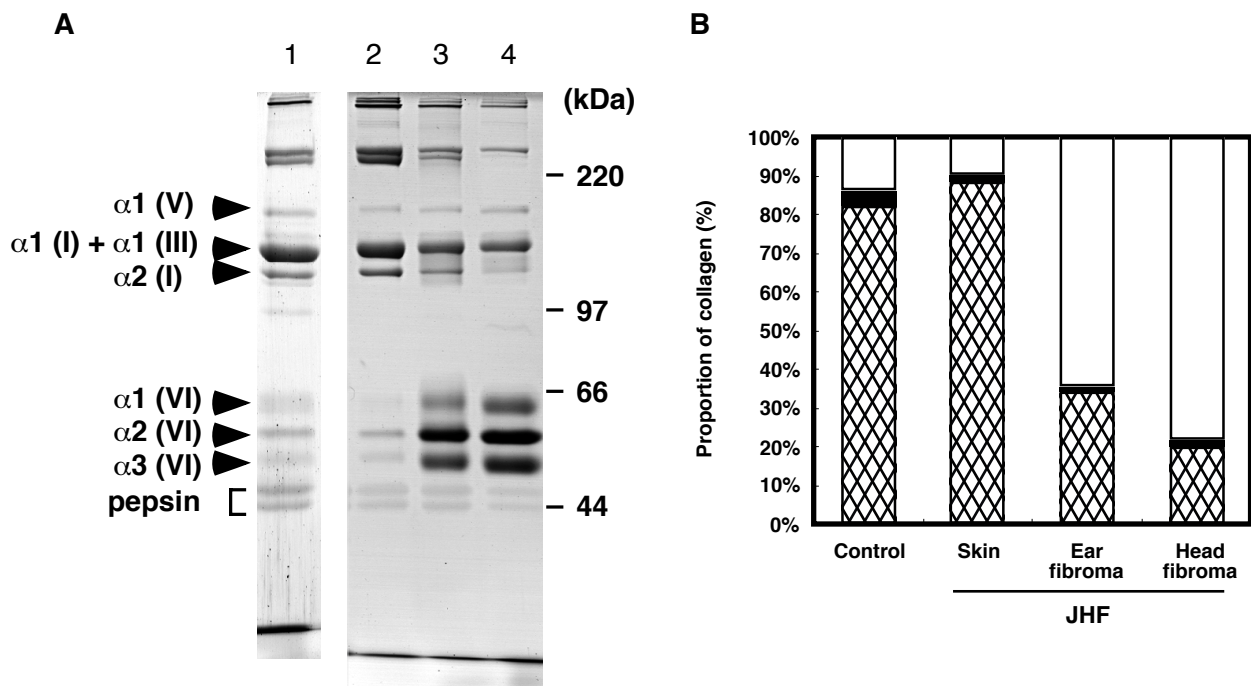


Fig. 6 若年性硝子化線維腫症 (JHF) の腫瘍のコラーゲン分析

A. 健常人皮膚 (レーン1)、JHF症例皮膚 (レーン2)、JHF症例耳介腫瘍 (レーン3)、JHF症例頭部腫瘍 (レーン4) からペプシンにより可溶化したコラーゲンを7.5% SDSポリアクリルアミドゲルを用いて還元条件で分離した。B. NIH imageを用いて各組織由来のコラーゲンのバンドを定量した。I型およびIII型コラーゲン (網掛け)、V型コラーゲン (黒)、VI型コラーゲン (白) で示した。

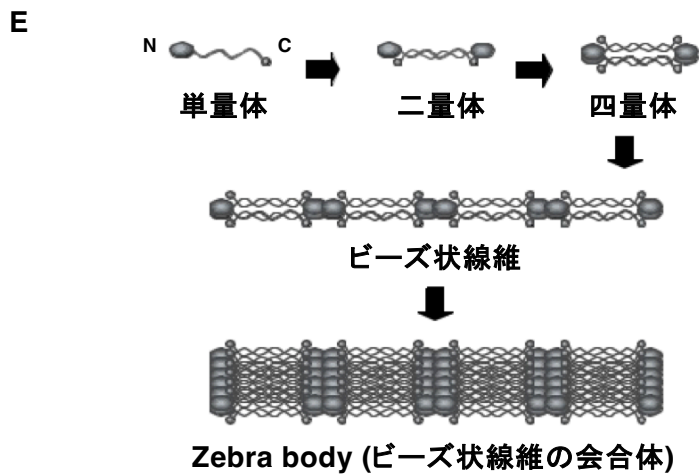
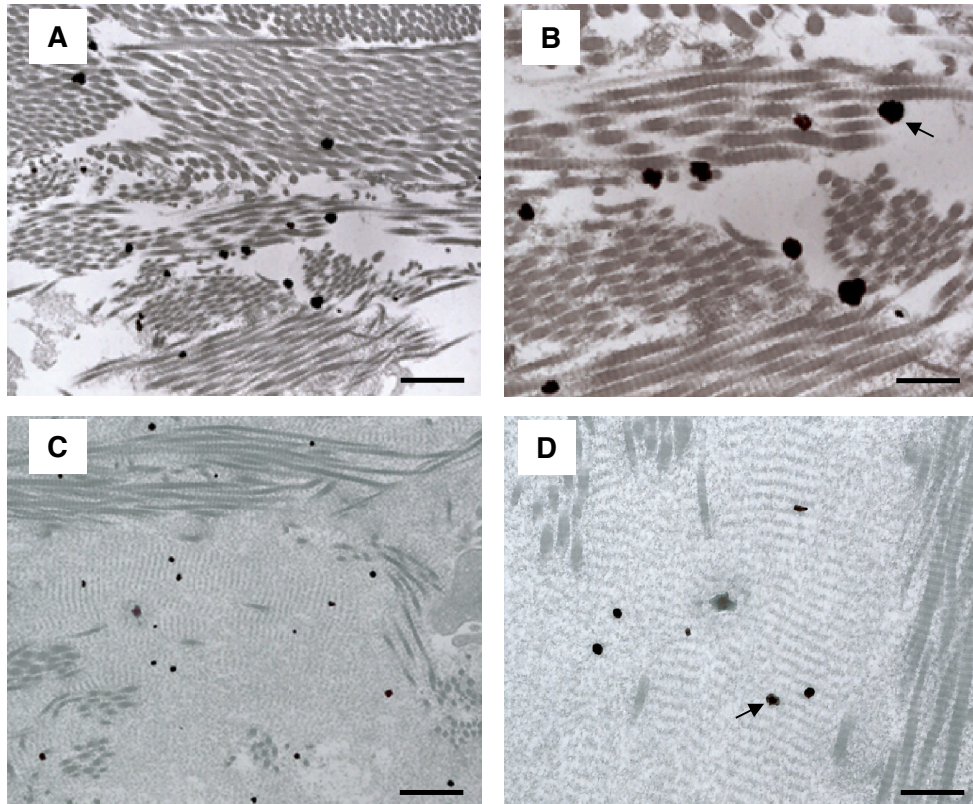


Fig. 7 若年性硝子化線維腫症 (JHF) の腫瘍の免疫電子顕微鏡像

A~D. 金コロイド標識抗VI型コラーゲン抗体を用いたJHF症例頭部腫瘍 (A, B) および耳介腫瘍 (C, D) の免疫電子顕微鏡像。I型コラーゲン線維の周囲 (A, B) やI型コラーゲン線維間のVI型コラーゲン会合体 (Zebra body)(C, D) 上に金コロイドが検出された。代表的な金コロイドを矢印で示した (B, D)。スケールバー: 1 μm (A, C)、500 nm (B, D)。 E. VI型コラーゲンの会合体形成の模式図。

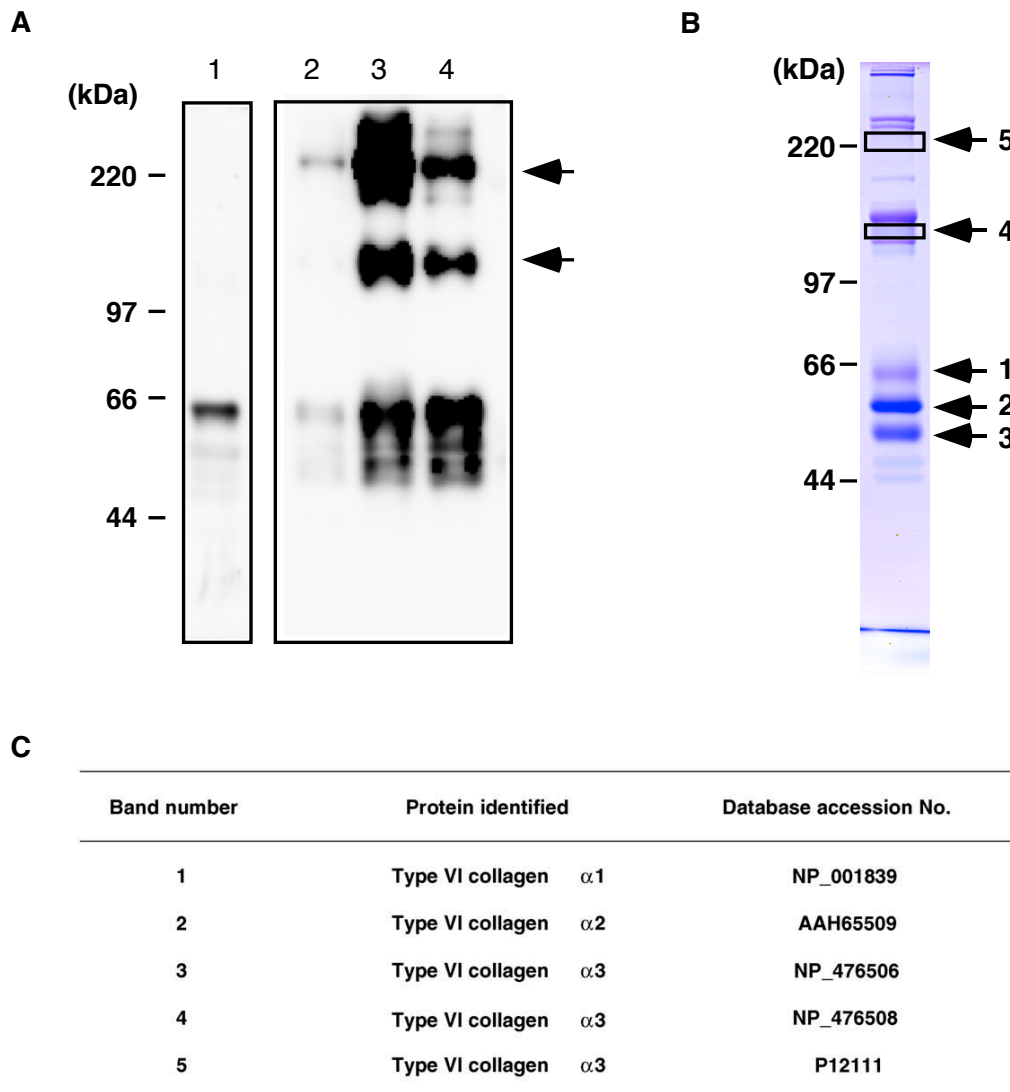


Fig. 8 抗VI型コラーゲン抗体を用いたウェスタンブロット解析と液体クロマトグラフ質量分析 (LC-MS/MS)

A. 抗VI型コラーゲン抗体を用いたウェスタンブロット。健常人皮膚（レーン1）、若年性硝子化線維腫症（JHF）症例皮膚（レーン2）、JHF症例耳介腫瘍（レーン3）、JHF症例頭部腫瘍（レーン4）からペプシンにより可溶化したコラーゲンを7.5%SDSポリアクリルアミドゲルを用いて還元条件で分離した。PVDF膜に転写し、抗VI型コラーゲン抗体で検出した。高分子化したバンドを矢印で示した。 B. JHF症例耳介腫瘍由来コラーゲンの電気泳動像。1～5のバンドをLC-MS/MSに用いた。 C. LC-MS/MSにより同定されたタンパク質リスト。

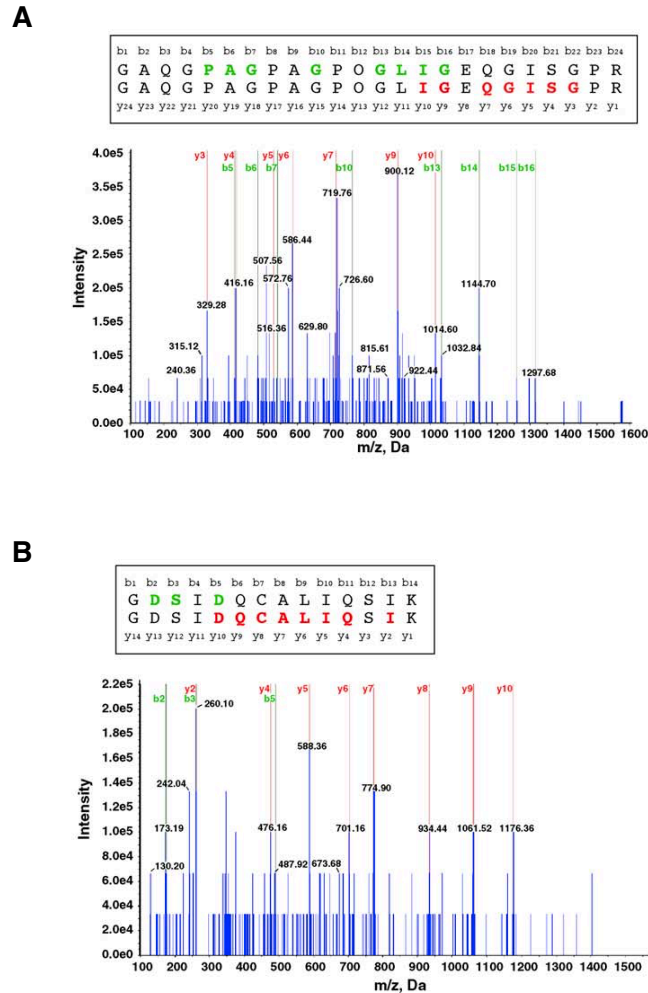


Fig. 9 バンド4で同定されたフラグメントのフラグメントパターン

A. VI型コラーゲン $\alpha 3$ 鎖の三重らせん領域（アミノ酸番号2022～2045）のフラグメントパターン。3価の親イオンのフラグメントパターンを示した。質量より予測されたアミノ酸配列は、同定されたN末端フラグメント（bシリーズ：緑）とC末端フラグメント（yシリーズ：赤）と一致した。O:ヒドロキシプロリン。 B. VI型コラーゲン $\alpha 3$ 鎖のC末端球状ドメイン（アミノ酸番号2165～2178）のフラグメントパターン。2価の親イオンのフラグメントパターンを示した。質量より予測されたアミノ酸配列は、同定されたN末端フラグメント（bシリーズ：緑）とC末端フラグメント（yシリーズ：赤）と一致した。 C:システイン残基はカルバミドメチル化システインとして同定された。

-12	GAG AAG AAA AAG ATG GAA CTT AAA GCA CTT GCG TTA ACG GTA TCA GCC CTG CTT GTG GGT CAG TCG GTG TAT GCA TCT GAG GTG TTT GCT CAC CCG GGC A M E L K A L A L T V S A L L V G Q S V Y A S E V F A H P G M	88
89	TG CCG GTT CAA CAA AAG TTG CAG CCA AAT TTG CTG CAG CAA AGT ACC AGG CTT CAG CCA GAG CAA CAT ATC CAC GGG CTT GAA CGC ACG GAT CGG CAA TA P V Q Q K L Q P N L L Q Q S T R L Q P E Q H I H G L E R T D R Q Y	188
189	T CGT CCG ACA GAT GCT ACT CAG CAG CCG GAA CCG CCA ACG TTA CTG AAA CGT CAG GTA TCG GTT CAG CAG GAT <u>GCG GTT GAA CAG TGT GAT CTC AGC CAG</u> R P T D A T Q Q P E P P T L L K R Q V S V Q Q D <u>A V E Q C D L S Q</u>	288
289	TTT CAG ACG ACC AGC AGT AAC CAG TTG ATG GCC GCG ATT CGC CAG CAG GGC GCC AGT TGT GTC AAT GCC TTG TTT AGT GCT GAC ACG GGA GTA CAG GAA <u>G</u> F Q T T S S N Q L M A A I R Q Q G A S C V N A L F S A D T G V Q E A	388
389	<u>CC GCG TTT TCG TCC AAC CAC ATG TAT</u> AAC GTC GCA CAA TAT ACC CGA ACA CTG GCG CAG CAA TAT GCG GGC GGC AGT GAT GAA CTG GAA GCC TTA TA A F S S N H M Y <u>N V A Q Y T R T L A Q Q Y A G G G S D E L E A L Y</u>	488
489	T CTG TAT CTT CCG GCG GGG TAT TAC GCT GAG TTT TAT AAC AGC AAT ATC ACG TTT CTG TCG TGG GTG ACG CCG GCA GTG AAA <u>GGT GCC GTG GAT CCG TTT</u> L Y L R A G Y Y A E F Y N S N I T F L S W V T P A V K <u>G A V D A F</u>	588
589	<u>GTC</u> CAG AAT GCC CAT TTT TAT GAC AAC GGC GAC GCT CAT GGC AAG GTG CTG AAC GAG GTG ATC ATC ACG ATG GAC AGT GCT <u>GGG</u> CTA CAG CAT GCC TAT C V Q N A H F A I N G D A H G K V L N E V I I T M D S A G L Q H A Y L	688
689	TC GAT GTA GTG ACG CAG TGG CTG ACC CGT TGG AAT GCG CAA TAT GCC GAG CAT TGG TAT ATG CGA AAC GCA GTC AAT GGT GTC TTT ACT CTT TTG TTT GG D V V T Q W L T R W N A Q Y A E H W Y M R N A V N G V F T L L F G	788
789	C GGG CAG TGG AAC AAT CAG TAC ACC AGC CTG ATT GGC GAA CAG ACT GCG TTG GTG ACC GCG TTA CAG GCA TTT GCG CTG GAC CGT ACG AAA GTG AAC TCG G Q W N N Q Y T S L I G E Q T A L V T A L Q A F A L D R T K V N S	888
889	CCA ACG GAG TTT ATG GCG GCC AAT GCG GCC AGA GAA CTG GGG CCG TTA GCT CGC TAC ACG GAC GCG ACC ATT GCG CCT AAA GTC ACG GAA GGA TTA ACC G P T E F M A A N A A R E L G R L A R Y T D A T I A P K V T E G L T A	988
989	CG ATC TTC GGC CAG TAT CCG TCC TAT GGC GAT GGA GAT GCT ATC TGG CTG GGG GCG GCG GAT ACG GCC TCT TAT TAT GCT GAT TGC AGC CAG TTC AAC AT I F G Q Y P S Y G D G D A I W L G A A D T A S Y Y A D C S Q F N I	1088
1089	C TGT GGC TTT GAA GAC GCG CTG CGT GAT GCG GCG CTG AAC CAG ACT TTT ATC TGT AGT GAT ACG ATT AAA <u>ATT CGC TCA CAG GAT ATG TCG CAG GCA CAG</u> C G F E D A L R D A A L N Q T F I C S D T I K <u>I R S Q D M S Q A Q</u>	1188
1189	CAT CTC GCG GCT TGC GAC AAA <u>ATG GCT TAT GAA GAG TCA TTT TTC CAC ACC ACG CTT GAA</u> ACC GGT AAT CAG CCG GTG GCT GAT GAT CAT AAT ACG CAG C H L A A C D K <u>M A Y E E S F F H T T L E</u> T G N Q P V A D D H N T Q L	1288
1289	TG CAG GTG AAT ATT TTT AAT TCC GAT ACC GAT TAC GGT AAA TAT GCC GGT CCG ATA TTT GGG ATT GAT ACC AAC AAC GGC GGT ATG TAC CTC GAG GGG AA Q V N I F N S D T D Y G K Y A G P I F G I D T N N G G M Y L E G N	1388
1389	T CCG GCC AAT GTG GGC AAT ATT CCC AAT TTC ATC GCG TAT GAA <u>GCC AGC TAT GCC AAC</u> CCG GAC CAT TTT GTC TGG AAT CTT GAG CAC GAG TAC GTC CAC P A N V G N I P N F I A Y E <u>A S Y A N</u> P D H F V W N L E H E Y V H	1488
1489	TAT TTG GAT GGG CCG TTC AAT ATG TAT GGC GAT TTT GGT ACG CCT ACC GAG CTT GTG GTC TGG TGG AGC GAA GGG GTG GCC GAT GTG TCG CCG GTA A Y L D G R F N M Y G D F G T P T E L V V W W S E G V A E Y V S R V N	1588
1589	AT GAT AAT CCT CAG GCG ATT GCC ACC ATC CAG GAT GGT AGC ACG TAC ACT CTG GCG CAG GTG TTT GAC ACG ACG TAT GAC GGT TTT GAT GTG GAT CGC AT D N P Q A I A T I Q D G S T Y T L A Q V F D T T Y D G F D R I	1688
1689	C TAC CGA <u>TGG GGA TAT CTG GCG</u> GTG CGA TTC ATG TTT GAA CGT CAT CCT GAT GAA GTT CAA CGT ATG CTG AGT GCC ACC CGA CAG GGA CGC TGG GCA GAA Y R <u>W G Y L A</u> V R F M F E R H P D E V Q R M L S A T R Q G R W A E	1788
1789	TAC AAG GCG ATC ATT AGC GGT TGG GCA AAT CAG TAT CAG TCA GAA TTT GCC CAA TGG ACC GAG GCG CTG GCG AAG GGC GAC AGT GGC GCT GGG AAC GGT G Y K A I I S G W A N Q Y Q S E F A Q W T E A L A K G D S G A G N G E	1888
1889	AG GGG ACA GGC TCC GGT AAT GAA GGG GGC GGT GAA TCT GGT GGT AAT ACC GGC TTG CCG GAA AAC TGC GCA GTA CTG CCA AAA ATC AGT GAT GGG CGT TT G T G S G N E G G G E S G G N T G L P E N C A V L P K I S D G R L	1988
1989	A GCA CTG GAT GAA GCG GCC TGT CTG GCC GAC ACG GCT TCA GCG TCT GAC GTA TTG TGG TTC AGT ATT CCG GCT GTC AGT GAA TAT CAG ACC ATT GCC ATT A L D E A A C L A D T A S A S D V L W F S I P A V S E Y Q T I A I	2088
2089	ACG GCG GGC AAC GGG ACT GGC GAC CTG ACG CTG GAA TAC AGT AAC CTG AAT TGG CCA GAT GGT ACC AAT GTG CAG GCA TCA TCG GCA AAT ATG GGT AAC A T A G N G T G D L T L E Y S N L N W P D G T N V Q A S S A N M G N S	2188
2189	GT GAA TGC ATT ATT CTG GAA CAT CAG GCG AAT TAT TGG GGA TAT CTG AAA GTC TCG GGT TCC TTT GAA AAT GCA GCG TTA CTG GTG GAG GCT GGC AGT AA E C I I L E H Q A N Y W G Y L K V S G S F E N A A L L V E A G S N	2288
2289	C CAG TGT CGT CAG TAA CCC GTT TCA GCG GTG CTT CTC GCA GCC CCG CTT TTG CCG GGC TTT TTT ACT TCT GAA TGC GAT GTA TGA TTC CAG GCC GGT GAA Q C R Q *	2388

Fig. 10 *G. hollisae*由来コラゲナーゼの遺伝子配列と推定されるアミノ酸配列

74 kDaおよび60 kDaコラゲナーゼのN末端配列はボックス1に示した。ボックス2~7は以下の消化酵素による消化断片を示した。ボックス2~4: リジルエンドペプチダーゼ、ボックス5: トリプシン、ボックス6, 7: V8プロテアーゼ。亜鉛金属酵素の活性中心の相同配列HEXXHを下線で、SD配列を点線で、転写終結配列を矢印で示した。

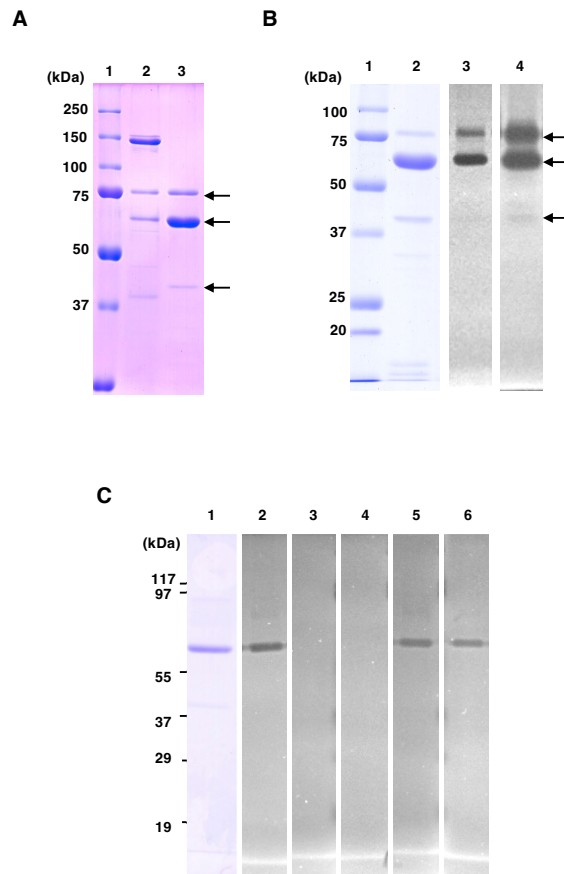


Fig. 12 ブレビバチルス培養上清からの組換えタンパク質の精製と性状解析

(A) 精製タンパク質の電気泳動像（7.5%ゲル、還元条件）。レーン1: 分子量マーカー、レーン2:ブレビバチルス培養上清、レーン3: 精製タンパク質。(B) リアルタイムゼラチンザイモグラム（10%ゲル、非還元条件）。レーン1: 分子量マーカー、レーン2: 精製タンパク質のSDS-PAGE、レーン3: 精製タンパク質のゼラチンザイモグラム（2時間）、レーン4: 精製タンパク質のゼラチンザイモグラム（19時間）。(C) ゼラチンザイモグラムにおける酵素阻害剤の効果。レーン1: SDS-PAGE、レーン2: ゼラチンザイモグラム（阻害剤なし）、レーン3: ゼラチンザイモグラム（EDTA添加）、レーン4: ゼラチンザイモグラム（*o*-phenanthroline添加）、レーン5: ゼラチンザイモグラム（NEM添加）、レーン6: ゼラチンザイモグラム（PMSF添加）。

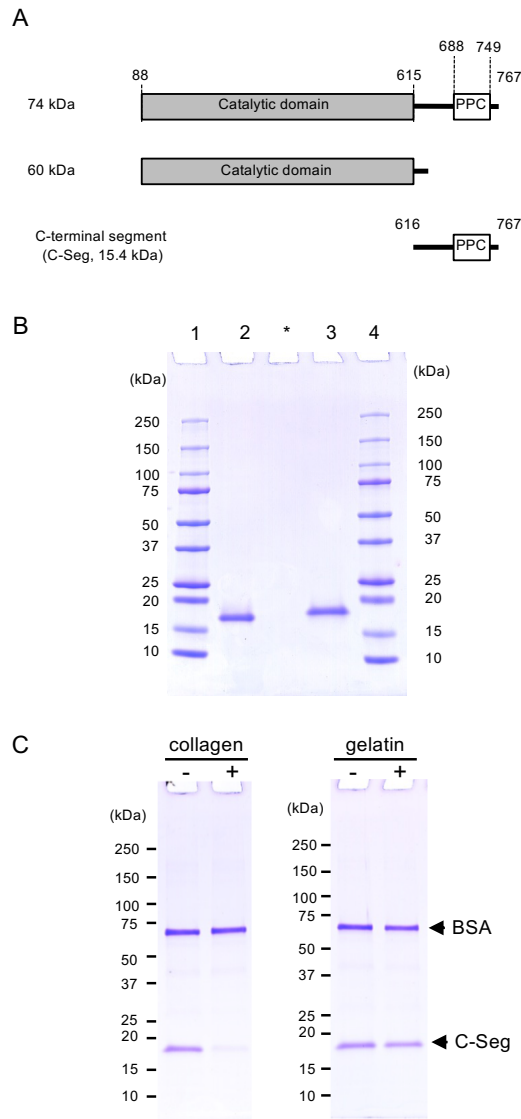


Fig. 13 *G. hollisae*コラゲナーゼの模式図とC末端領域の三重らせん構造特異的コラーゲン結合

(A) PPCドメインを含むC末端領域（アミノ酸番号616～767）の組換えタンパク質の設計。(B)組換えタンパク質の電気泳動像。組換えタンパク質はブレビバチルス培養上清からニッケルカラムクロマトグラフィーにより精製した。2 μg の組換えタンパク質を4-20%グラジエントゲルで分析した。レーン1: 分子量マーカー、レーン2: 精製タンパク質（非還元条件）、レーン3: 精製タンパク質（還元条件）、レーン4: 分子量マーカー。アスタリスク (*) はブランクのレーンを示した。(C) C末端領域のコラーゲン結合能。20 μg の組換えタンパク質を5 mgのコラーゲンファイバー（左図）あるいは50 μl のゼラチンセファロースビーズ（右図）と反応させ、2 μg 分の組換えタンパク質を4-20%グラジエントゲルで分析した。分子量マーカーの位置をゲルの左側に示した。

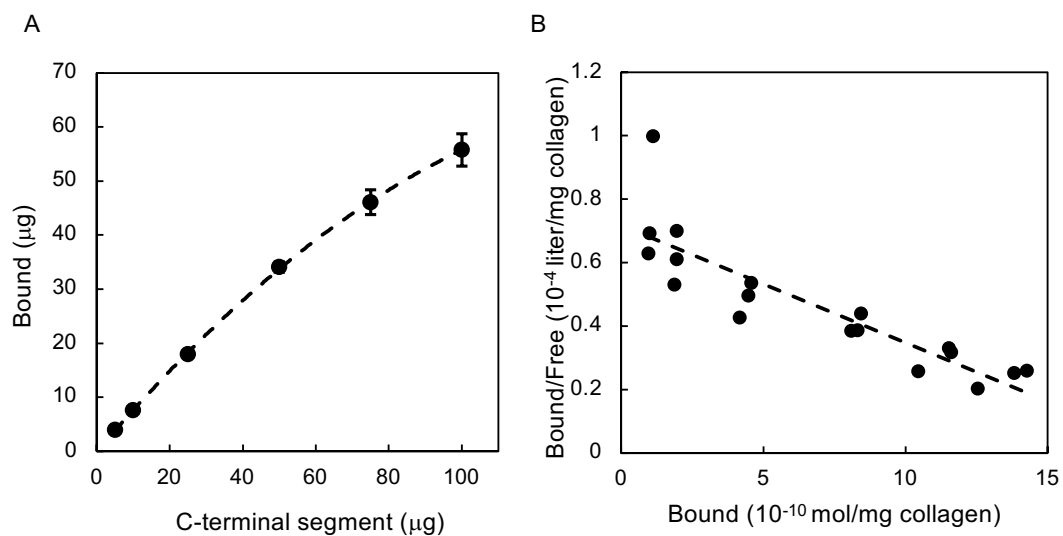


Fig. 14 C末端領域とコラーゲン線維の結合におけるScatchard解析

異なる濃度 (0.1 – 2.0 mg/ml) のC末端配列と2.5 mgのコラーゲンファイバーを用いて50 μl のバッファー中で結合実験を行なった。30分のインキュベーション後、未結合のタンパク質を含む遠心濾液を電気泳動し、CBB染色したバンドの濃さをデンストメトリーにより解析して未結合のタンパク質量を算出した。独立した三回の実験結果をScatchard plotにより解析した。(A) コラーゲン線維に対するC末端領域の結合量曲線。(B) コラーゲン線維に対するC末端領域のScatchard plot。

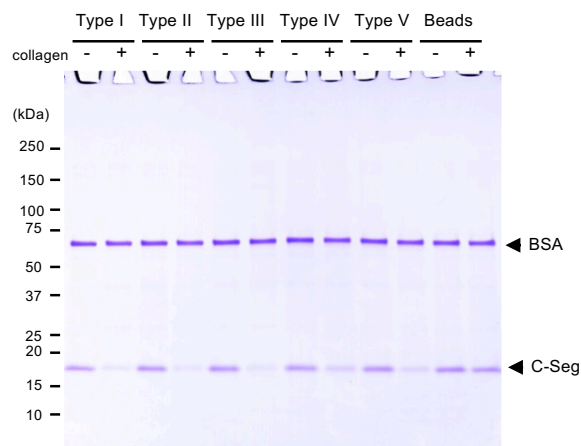


Fig. 15 各種コラーゲンに対するC末端領域の結合

5 μ gの組換えタンパク質を50 μ lのバッファー中、各種コラーゲン（I型、II型、III型、IV型、V型コラーゲン）を固定化したセファロースビーズと反応させた。30分のインキュベーション後、未結合のタンパク質を含む遠心濾液を電気泳動し、コラーゲンとの結合を評価した。分子量マーカーの位置をゲルの左側に示した。

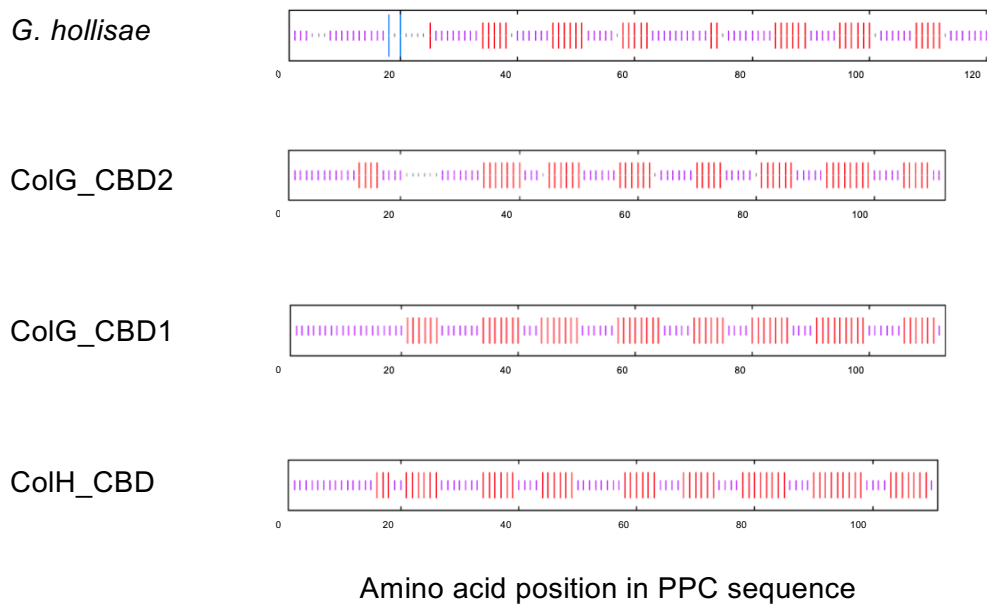


Fig. 16 *G. hollisae*および*C. histolyticum*コラゲナーゼのPPCドメインの二次構造予測

各種PPCドメインの二次構造予測はNPS@サーバーを用いて行った。予測された二次構造は色分けした棒で示した。 α ヘリックス：青、 β シート：赤、ランダムコイル：紫、未分類：灰色。

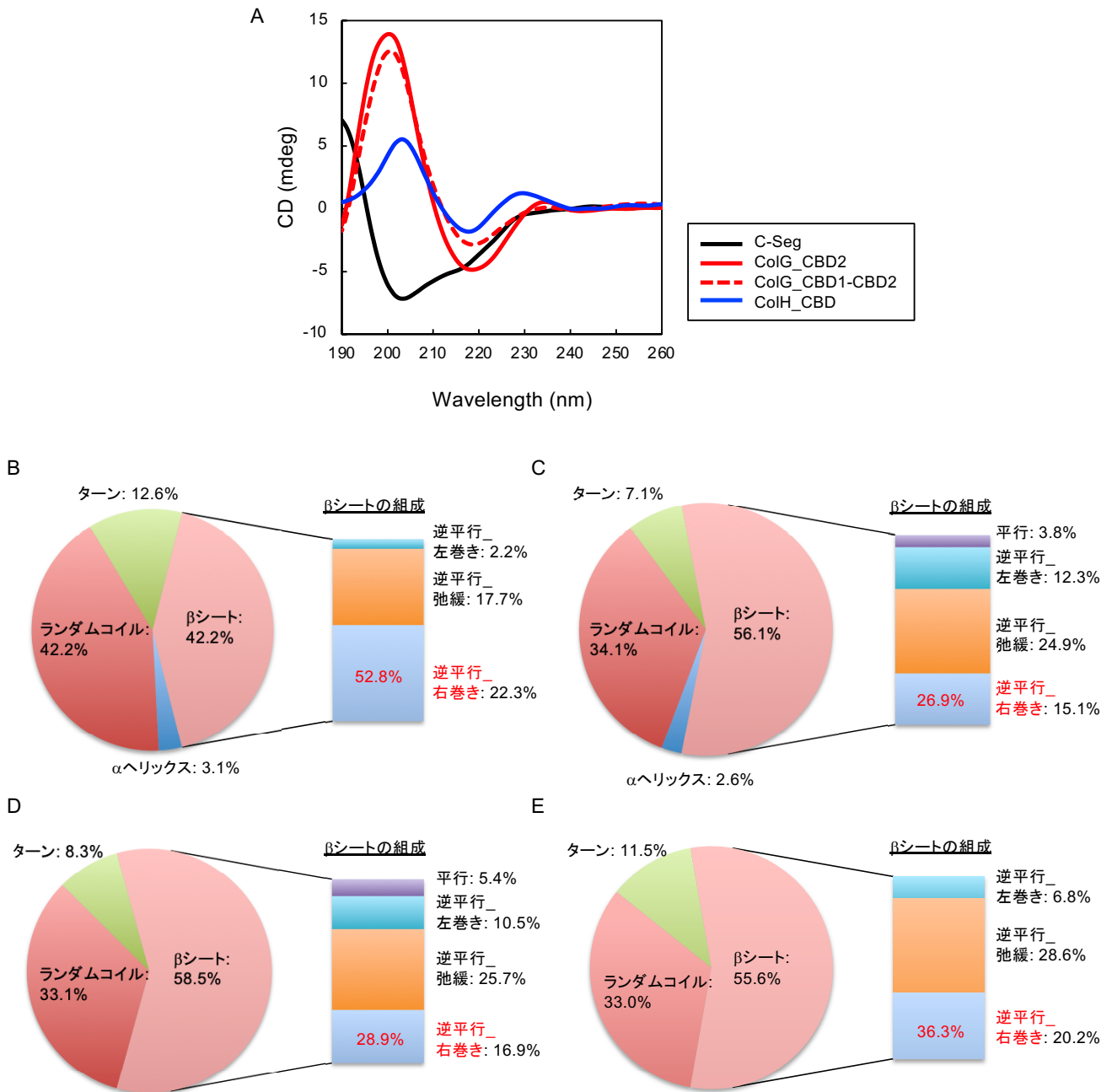


Fig. 17 *G. hollisae*および*C. histolyticum*コラゲナーゼのPPCドメインのCDスペクトルと二次構造の存在比率

(A)各種PPCドメインのCDスペクトル。各種PPCドメイン (0.1 mg/ml) のCDスペクトルは10 mM リン酸バッファー (pH7.5) 中、20°Cで測定した。*G. hollisae*のC末端領域：黒、ColG_CBD2：赤実線、ColG_CBD1-CBD2：赤点線、ColH_CBD：青。(B-E)二次構造の存在比率。BeStSelプログラムを用いてCDスペクトルを解析し、二次構造の比率を予測した。BeStSelプログラムではβシート構造逆(平行および逆平行βシート)を詳細に予測でき、さらに逆平行βシート構造は左巻き、弛緩、右巻きの三種類に分類される。(B) *G. hollisae*のC末端領域、(C) ColG_CBD2、(D) ColG_CBD1-CBD2、(E) ColH_CBD。

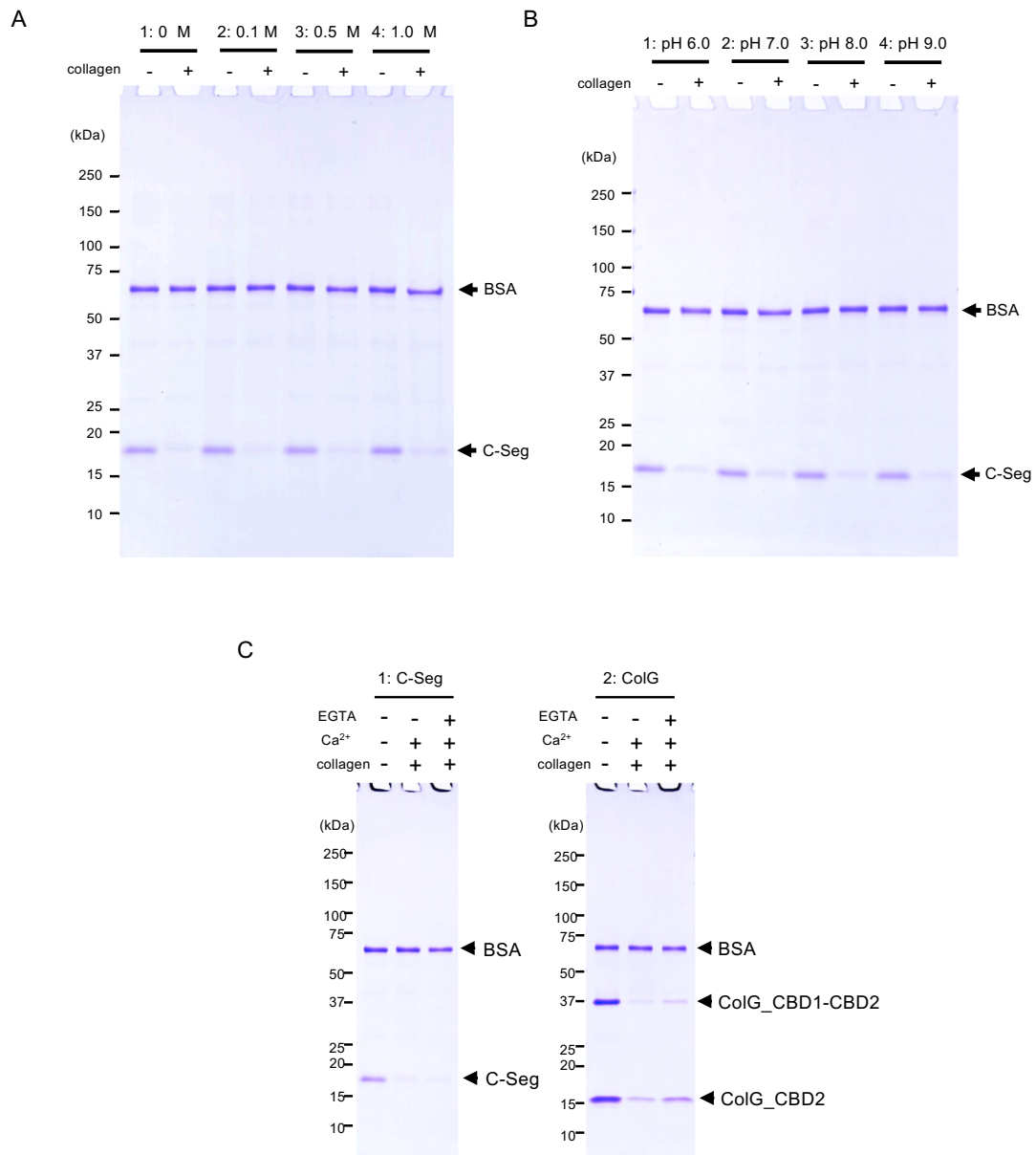


Fig. 18 *G. hollisae*コラーゲナーゼのC末端領域とColG CBDのコラーゲン結合における塩濃度、pH、カルシウム依存性

5 μ gのC末端領域およびColG CBDを50 μ lのバッファー中、2.5 mgのコラーゲン線維と反応させた。30分のインキュベーション後、未結合のタンパク質を含む遠心濾液を電気泳動し、コラーゲンとの結合を評価した。分子量マーカーの位置をゲルの左側に示した。(A) 塩濃度の影響。レーン1: 0 M、レーン2: 0.1 M、レーン3: 0.5 M、レーン4: 1.0 M。(B) pHの影響。レーン1: pH 6.0、レーン2: pH 7.0、レーン3: pH 8.0、レーン4: pH 9.0。(C) カルシウムの影響。レーン1: C末端領域、レーン2: ColG CBD。

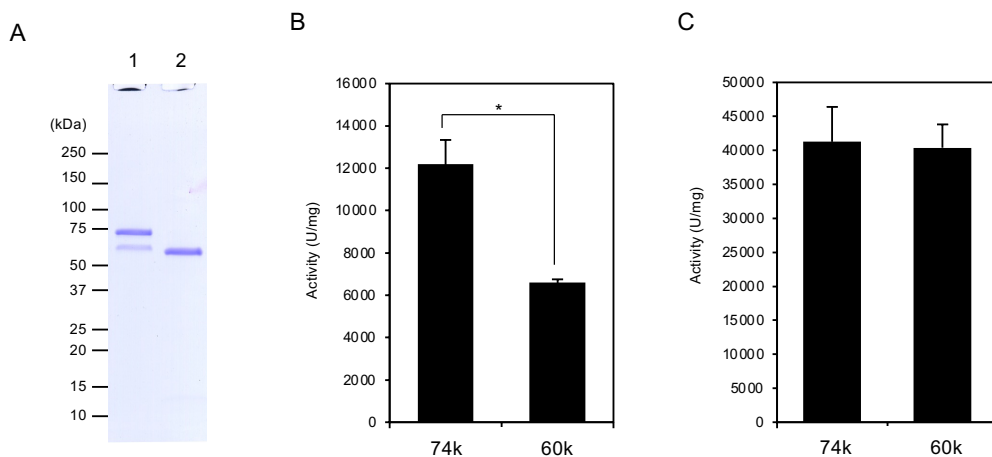


Fig. 19 74 kDaおよび60 kDaコラゲナーゼのコラーゲン分解活性とゼラチン分解活性

(A) 74 kDaおよび60 kDaコラゲナーゼの電気泳動像。組換えコラゲナーゼはブレヴィバチルス培養上清からDEAEセファロースカラムを用いて精製した。2 μ gのコラゲナーゼを4-20%グラジエントゲルで分析した。レーン1: 74 kDaコラゲナーゼ、レーン2: 60 kDaコラゲナーゼ。分子量マーカーの位置をゲルの左側に示した。(B) コラーゲン分解活性。74 kDaおよび60 kDaコラゲナーゼのコラーゲン分解活性はFITCラベル化コラーゲンを用いて測定した。(C)ゼラチン分解活性。74 kDaおよび60 kDaコラゲナーゼのゼラチン分解活性はFITCラベル化ゼラチンを用いて測定した。データは三回の独立した実験の平均値 \pm SDで表示した。 $*P < 0.01$ 。

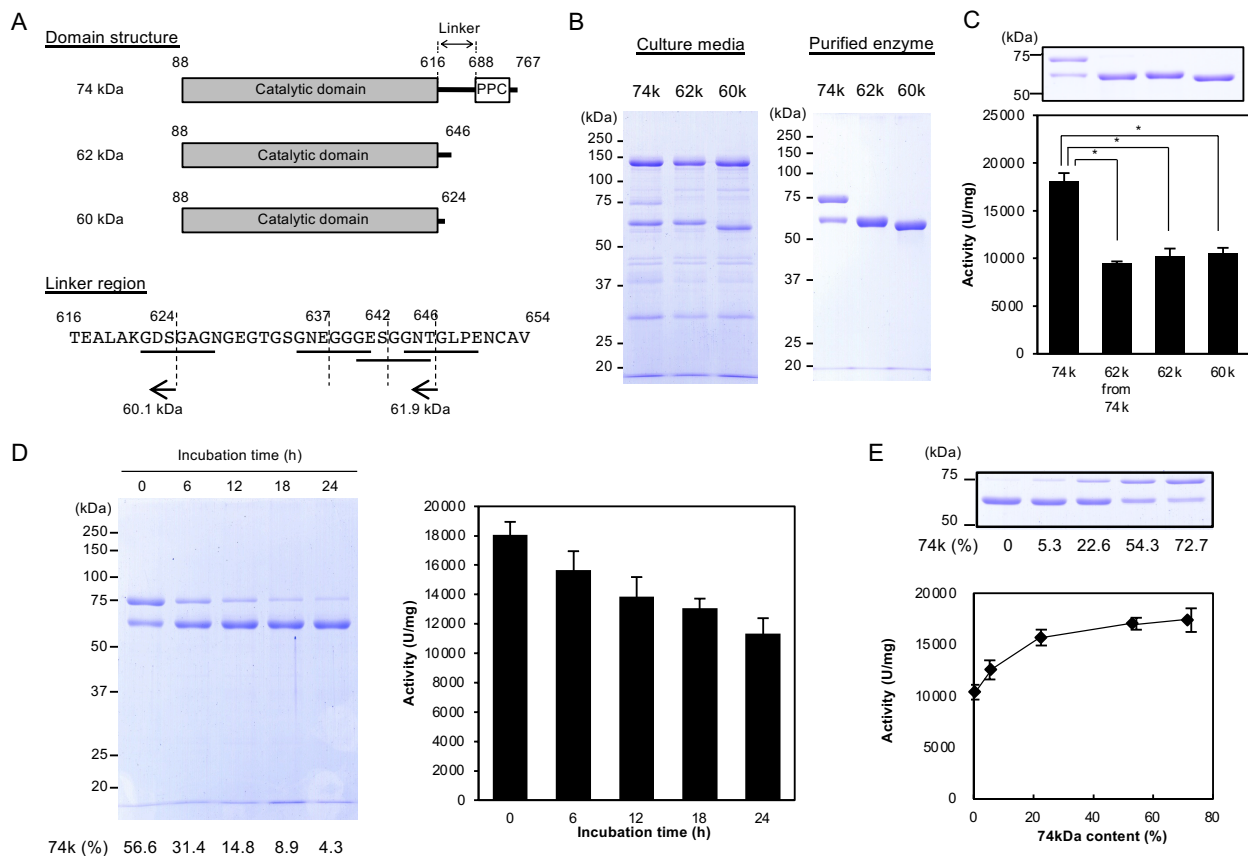


Fig. 21 組換えタンパク質の設計とそのコラゲナーゼ活性

(A) 74 kDa (アミノ酸番号88～767、PPCドメインを含む)、62 kDa (アミノ酸番号88～646)、60 kDa (アミノ酸番号88～624) の *G. hollisae* コラゲナーゼの組換えタンパク質。リンカー配列の Gly-Xaa-Yaa の繰り返し配列を下線で示した。(B) 培養上清と精製酵素の電気泳動像。DEAEカラムクロマトグラフィーによりブレビバチルス培養上清から組換えコラゲナーゼを精製した。10 μ l の培養上清と 2 μ g の精製組換えコラゲナーゼを 7.5% ポリアクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE で解析した。(C) FITC ラベル化コラーゲンに対する組換えコラゲナーゼの比活性。データは三回の独立した実験の平均値 \pm SD で表示した。* $P < 0.01$ 。(D) 74 kDa コラゲナーゼの安定性試験。74 kDa コラゲナーゼを 50 mM Bis-Tris-HCl (pH 7.5)、0.2 M NaCl、5 mM CaCl_2 に溶解し、37°C で 24 時間インキュベートした。6 時間ごとにサンプリングし、SDS-PAGE (左図) とコラーゲン分解活性 (右図) を測定した。データは三回の独立した実験の平均値 \pm SD で表示した。(E) 74 kDa コラゲナーゼと 62 kDa コラゲナーゼの比率が異なる酵素溶液のコラーゲン分解活性。データは三回の独立した実験の平均値 \pm SD で表示した。

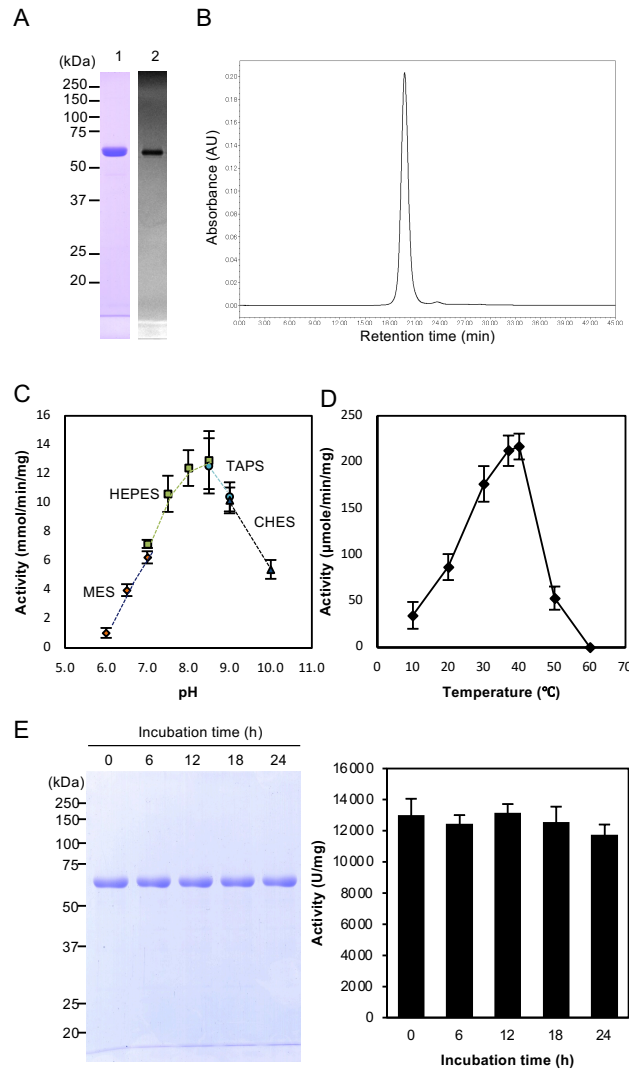


Fig. 22 組換え62 kDaコラゲナーゼの性状解析

(A) 精製組換え62 kDaコラゲナーゼの電気泳動像（レーン1）とリアルタイムゼラチンザイモグラム（レーン2）。(B)組換え62 kDaコラゲナーゼのサイズ排除クロマトグラム。サイズ排除クロマトグラフィーはSuperdex 200 HR10/30カラムを用いたAlliance 2895システムにより行なった。サンプルの溶出は、溶媒として50 mM Bis-Tris-HCl (pH 7.5)、0.2 M NaClを用い、流速0.75 ml/minで行い、分離したタンパク質は220 nmの吸光度により検出した。(C)組換え62 kDaコラゲナーゼのpH依存性。コラゲナーゼと合成基質FALGPAを以下のpHのバッファーと混合し、30°Cで5分反応させた。pH 6.0~7.0: 50 mM MES、pH 7.0~8.5: 50 mM HEPES、pH 8.5~9.0: 50 mM TAPS、pH 9.0~10.0: 50 mM CHES。(D)組換え62 kDaコラゲナーゼの温度依存性。コラゲナーゼと合成基質Pzペプチドを50 mM HEPES (pH 7.5)、0.2 M NaCl、5 mM CaCl₂と混合し、10~60°Cで反応させた。(E)組換え62 kDaコラゲナーゼの安定性試験。62 kDaコラゲナーゼを50 mM Bis-Tris-HCl (pH 7.5)、0.2 M NaCl、5 mM CaCl₂に溶解し、37°Cで24時間インキュベートした。6時間ごとにサンプリングし、SDS-PAGE（左図）とコラーゲン分解活性（右図）を測定した。データは三回の独立した実験の平均値±SDで表示した。

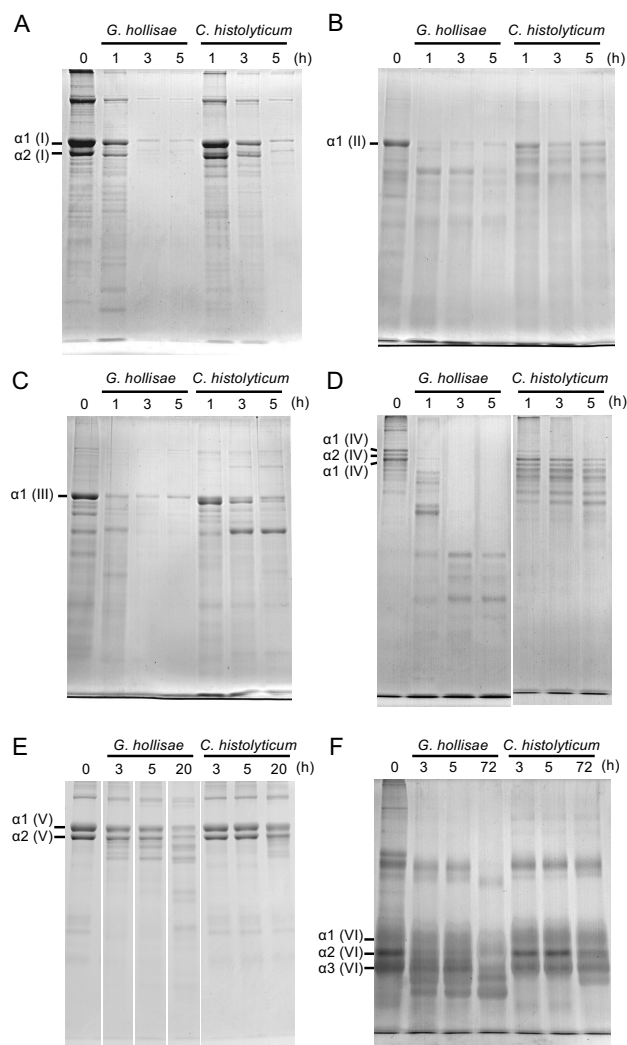


Fig. 23 組換え62 kDaコラゲナーゼを用いたコラーゲン分解実験

組換え62 kDaコラゲナーゼとI型 (A)、II型 (B)、III型 (C)、IV型 (D)、V型 (E)、VI型コラーゲン (F) と混合し、30°Cでインキュベートした。図に示した反応時間において、1/4量のSDSサンプルバッファーを添加して反応停止し、SDS-PAGEにより分解の程度を検証した。

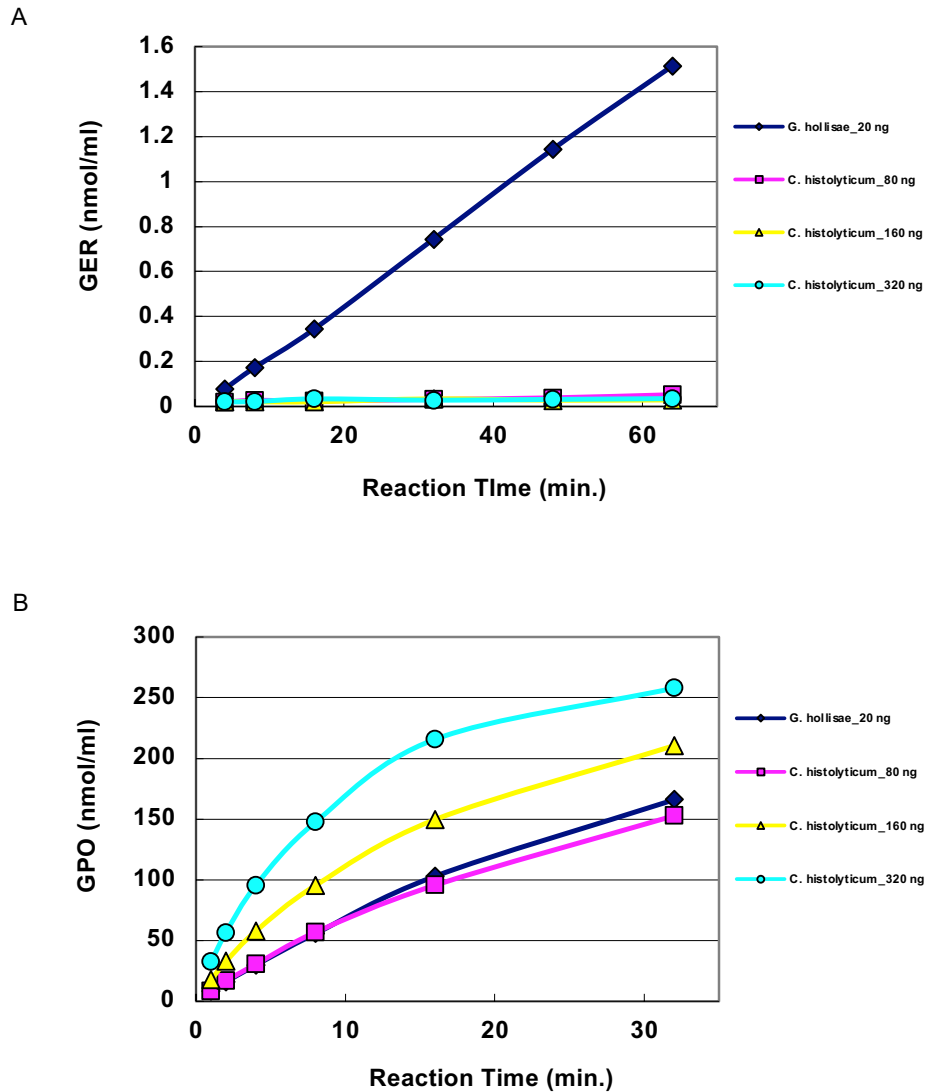


Fig. 24 組換え62 kDaコラゲナーゼおよび*C. histolyticum*由来コラゲナーゼを用いたヘキサペプチド分解実験

ウシI型コラーゲン由来ヘキサペプチドGERGFO(A)およびGPOGPO(B)を基質とし、組換え62 kDaコラゲナーゼおよび*C. histolyticum*由来コラゲナーゼと37°Cでインキュベートした。経時的に50 μ lの反応液をサンプリングし、等量の1%ギ酸を添加して反応停止した後、質量分析計を用いて生成したGER(A)およびGPO(B)を定量した。データは一回の結果を示した。

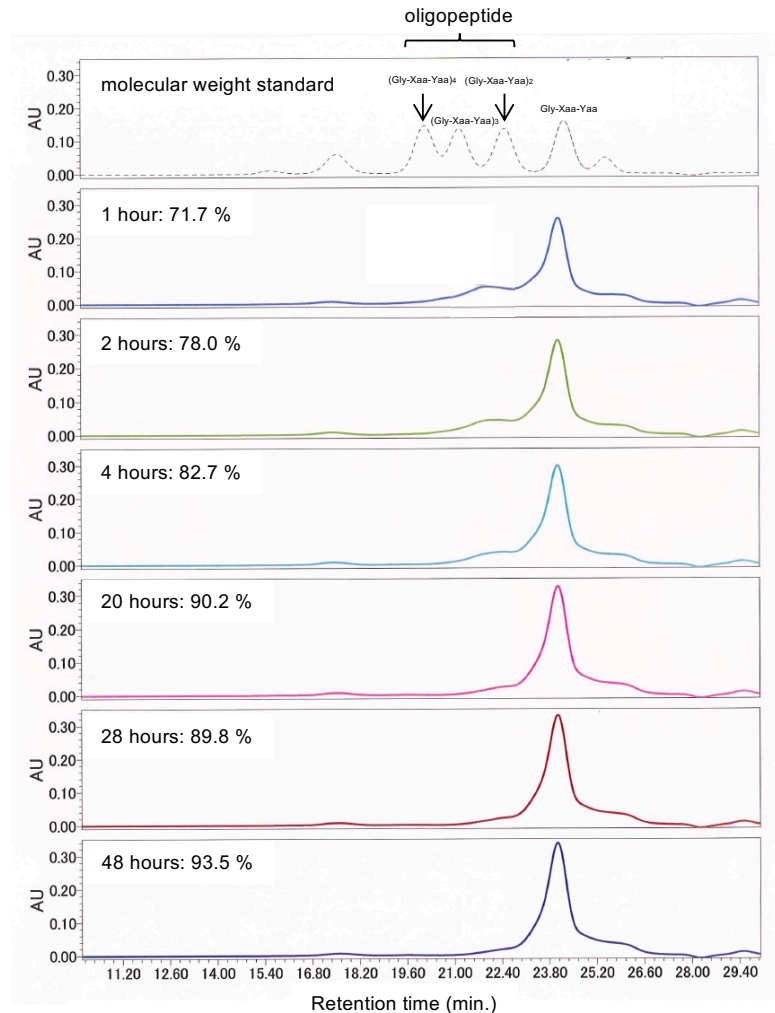


Fig. 25A 組換え62 kDaコラゲナーゼを用いたI型コラーゲンの完全消化実験

組換え62 kDaコラゲナーゼとウシ腱由来酸抽出I型コラーゲンを混合し、30°Cでインキュベートした。経時的に反応液をサンプリングし、熱変性により反応停止した後、サイズ排除クロマトグラフィーを用いて分子量分布を測定し、生成したトリペプチドの面積比を算出した。サイズ排除クロマトグラフィーはSuperdex Peptide10/30 HRカラムを用いたAlliance 2895システムにより行なった。サンプルの溶出は、溶媒として0.1 M重炭酸アンモニウム、20%アセトニトリルアセトニトリルを用い、流速0.75 ml/minで行い、分離したタンパク質は220 nmの吸光度により検出した。

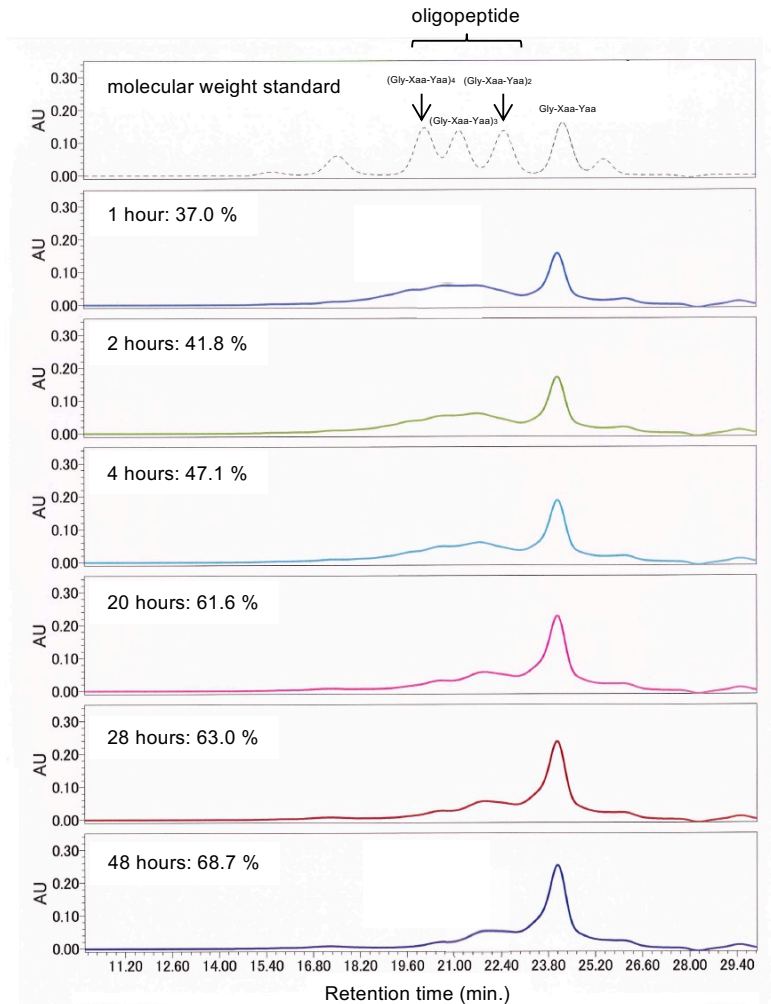
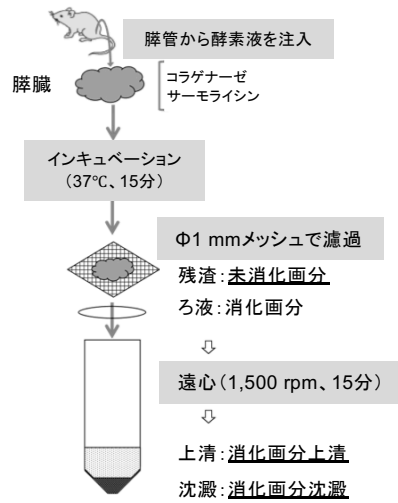


Fig. 25B *C. histolyticum*由来コラーゲナーゼを用いたI型コラーゲンの完全消化実験

*C. histolyticum*由来コラーゲナーゼとウシ腱由来酸抽出I型コラーゲンを混合し、30℃でインキュベートした。経時的に反応液をサンプリングし、熱変性により反応停止した後、サイズ排除クロマトグラフィーを用いて分子量分布を測定し、生成したトリペプチドの面積比を算出した。サイズ排除クロマトグラフィーはSuperdex Peptide10/30 HRカラムを用いたAlliance 2895システムにより行なった。サンプルの溶出は、溶媒として0.1 M重炭酸アンモニウム、20%アセトニトリルアセトニトリルを用い、流速0.75 ml/minで行い、分離したタンパク質は220 nmの吸光度により検出した。

A



B

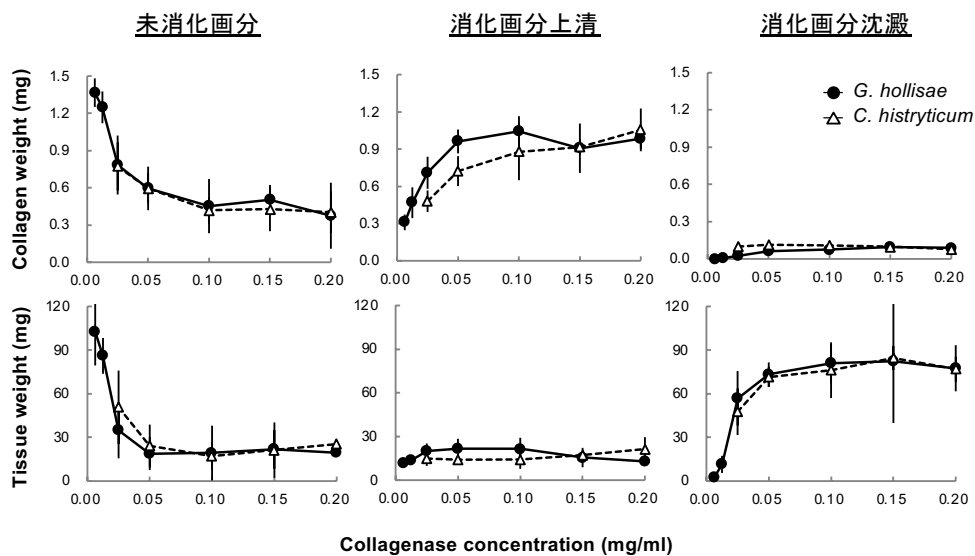


Fig. 26 組換え62 kDaコラゲナーゼおよび*C. histolyticum*由来コラゲナーゼを用いたマウス膵臓の消化実験

(A) マウス膵臓消化実験のプロトコル。マウス膵臓に酵素液（コラゲナーゼおよびサーモライシン）を注入し、37°Cで15分インキュベートした。反応後、未消化画分、消化画分上清および消化画分沈殿に分離した。(B) 各フラクションのコラーゲン量（上段）と組織量（下段）。各フラクションを110°C、20時間で塩酸加水分解した。質量分析計を用いてヒドロキシプロリン（Hyp）量を定量し、Hyp量よりコラーゲン量を算出した。アミノ酸分析計を用いて総アミノ酸量を定量し、総アミノ酸量より組織量を算出した。組換え62 kDaコラゲナーゼの結果を実線で、*C. histolyticum*由来コラゲナーゼの結果を破線で示した。

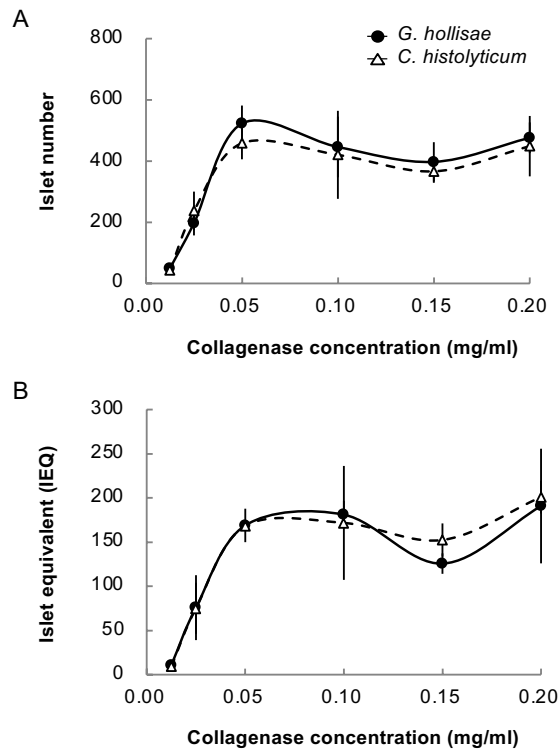


Fig. 27 マウス膵臓消化画分沈殿から単離した膵島数(A)およびIEQ (islet equivalent)(B)

マウス膵臓に酵素液（コラゲナーゼおよびサーモライシン）を注入し、37°Cで15分インキュベートした。反応後、未消化画分、消化画分上清および消化画分沈殿に分離した。密度勾配遠心法を用いて消化画分沈殿より膵島を単離し、ジチゾンで染色した。得られた膵島を写真撮影し、膵島数とIEQを算出した。組換え62 kDaコラゲナーゼの結果を実線で、*C. histolyticum*由来コラゲナーゼの結果を破線で示した。

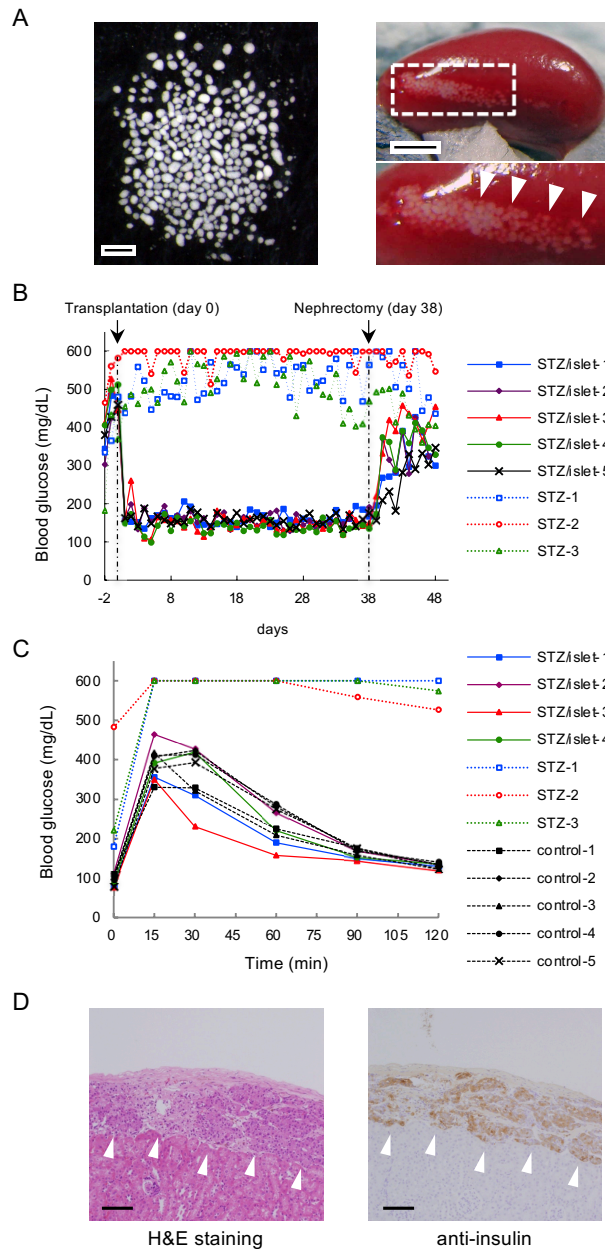


Fig. 28 単離した膵島の糖尿病モデルマウスへの移植実験

(A) 単離膵島 (左図) と腎被膜下に移植された300個の膵島 (右図) の光学顕微鏡像。スケールバー: 500 μm (左図)、2 mm (右図)。(B) 膵島移植マウス (実線) と糖尿病モデルマウス (破線) の血糖値変化。移植後38日目に移植腎を摘出した。(C)膵島移植マウス (実線)、糖尿病モデルマウス (色付き破線) および健常マウス (黒破線) の腹腔内ブドウ糖負荷試験。(D) 摘出腎の組織染色像。ヘマトキシリン/エオジン染色 (左図) および抗インスリン抗体染色 (右図) を行なった。スケールバー: 100 μm 。

学 位 論 文 要 旨

Grimontia hollisae 由来コラゲナーゼの遺伝子クローニングと
組換えタンパク質を用いた機能解析に関する研究

Cloning of a collagenase gene from *Grimontia hollisae* 1706B and
functional analysis of its recombinant protein

田中 啓友

KEISUKE TANAKA

細菌性コラゲナーゼは未変性コラーゲンおよび変性コラーゲン（ゼラチン）の両者を分解できる酵素であり、コラーゲン三重らせん領域の特徴的配列である Gly-Xaa-Yaa のトリペプチド単位にまで分解する（Xaa、Yaa は任意のアミノ酸）。細菌性コラゲナーゼはこのような特長を持つため、細胞単離のための組織分散用酵素といった研究用途として用いられ、膵島移植のための膵島分離やデュピュイトラン拘縮の治療といった医療用途として広く用いられている。市販されている細菌性コラゲナーゼは *Clostridium histolyticum* 由来のコラゲナーゼがほとんどである。*C. histolyticum* 由来コラゲナーゼ製剤には ColG と ColH の二種類のコラゲナーゼが含まれており、さらには、複数の中性プロテアーゼも含まれる製剤もある。一つの製剤に複数の酵素を混合することはロット間やロット内で活性のバラツキなど製剤の安定性が損なわれるリスクがあり、細菌性コラゲナーゼ製剤として改善の余地がある。

MEROPS データベースにおいて細菌性コラゲナーゼは M9 に分類され、さらに M9A、M9B のサブクラスに細分化される。*Clostridium* 属由来コラゲナーゼは M9B に分類され、M9A には *Vibrio* 属由来コラゲナーゼが分類されている。一方、鈴木らはゼラチン存在下で活性の強いコラゲナーゼを産生する *Grimontia hollisae* 1706B 株を単離した。*G. hollisae* 1706B 株由来コラゲナーゼの産業利用を考えた場合、遺伝子配列の同定、安定な組換えタンパク質の作製および生化学的解析が必要である。

本研究において、まず *G. hollisae* 1706B 株由来コラゲナーゼの全遺伝子配列を同定した。同定した遺伝子配列は 2,301 塩基から成り、767 アミノ酸をコ

ードする遺伝子であった。*Vibrio* 属由来コラゲナーゼとの相同性解析の結果、*G. hollisae* 由来コラゲナーゼは M9A サブグループに属する酵素であり、触媒ドメインとプレペプチダーゼ C 末端 (PPC) ドメインから成る 74 kDa タンパク質として分泌されることを明らかとした。また、ブレビバチルス発現系を用いて組換えタンパク質の作製に成功し、74 kDa タンパク質として分泌後、大部分の酵素が自己消化により C 末端領域が切断されて触媒ドメインのみの約 60 kDa タンパク質となることを明らかとした。

つぎに、74 kDa タンパク質として分泌されたのちに切断される PPC ドメインの機能解析を行った。*C. histolyticum* 由来コラゲナーゼの PPC ドメインはコラーゲン結合ドメイン (CBD) として働くことが知られているが、*G. hollisae* 由来コラゲナーゼの PPC ドメインが新規の CBD であることを証明した。本 CBD は *C. histolyticum* 由来コラゲナーゼの CBD と同様に三重らせん構造を認識してコラーゲンに結合した。二次構造予測の結果、両 CBD は β シート構造の分布と含量は類似していたが、逆平行 β シート構造の組成比が異なることが明らかとなった。その結果、既存の CBD とは立体構造が若干異なっている可能性が示唆された。さらには、74 kDa 酵素と約 60 kDa 酵素はコラーゲン分解活性が異なり、*G. hollisae* 由来コラゲナーゼにおいて PPC ドメインを含む C 末端領域がコラーゲン分解活性を促進することを見出した。

G. hollisae 由来コラゲナーゼをコラゲナーゼ製剤として応用するためには、均一性と安定性の課題を克服する必要がある。そこで、約 60 kDa の *G. hollisae* 由来コラゲナーゼを設計し、ブレビバチルス発現系を用いて組換えタンパク質を産生できるか検証した。その結果、PPC ドメインを除いた触媒ドメインのみの安定な 62 kDa コラゲナーゼ組換えタンパク質の作製に成功した。この組換えコラゲナーゼは *C. histolyticum* 由来コラゲナーゼよりも可溶性の基質に対して比活性が 3 倍以上高く、生体に豊富に存在する I~V 型コラーゲンを分解できる。さらには、*C. histolyticum* 由来コラゲナーゼでは分解できない VI 型コラーゲンを分解できる特長を持つ。また、コラーゲンの一次配列における基質特異性が広く、*C. histolyticum* 由来コラゲナーゼでは切断できないグルタミン酸を含むペプチドも消化することができるため、効率的にコラーゲンをトリペプチドにまで分解することができる。上記のような酵素としての性質の違いのほか、マウスの膵臓を消化することにより活性を維持した膵島を単離することができることを確認した。

本組換えコラゲナーゼは *C. histolyticum* 由来コラゲナーゼと異なる特長を持つコラゲナーゼであり、膵島移植や幹細胞移植といった臨床用組織分散酵素として有用である。さらには、既存のコラゲナーゼでは分解できない VI 型コラーゲンを分解できるので、VI 型コラーゲンが過剰蓄積する若年性硝子化線維腫症の腫瘍の除去を目的とした組織溶解注射剤としての応用や、病態解明のための腫瘍由来細胞の単離にも有用であると考えられる。