

## 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、膝関節移植のための膝関節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  $\beta$  シート構造の分布と含量は類似していたが、逆平行  $\beta$  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。