



## Nagoya City University Academic Repository

学 位 の 種 類	博士（生体情報）
報 告 番 号	甲第 1 5 4 5 号
学 位 記 番 号	第 1 4 号
氏 名	三浦 陽子
授 与 年 月 日	平成 28 年 3 月 25 日
学位論文の題名	オオクチバスペプシンの構造と機能および分子進化に関する研究
論文審査担当者	主査： 森山 昭彦 副査： 櫻井 宣彦，杉谷 光司，成田 裕一

名古屋市立大学 博士学位論文

オオクチバスペプシンの構造と機能  
および分子進化に関する研究

2016 年

三浦 陽子

名古屋市立大学大学院システム自然科学研究科

## 目 次

要旨	1
略語一覧	2
第一章 序論	3
第二章 実験方法	7
第三章 結果	14
第四章 考察	39
結語	46
謝辞	47
参考文献	48
Supplement	57
用語の解説	63

## 要旨

ペプシン (Pn) は胃の外分泌性の消化酵素である。ペプシンは、A タイプと C タイプに大別されており、個体の成長や、動物種の食性により、サブタイプが存在する。これらのサブタイプは、動物の食性の変化に伴い出現してきた。近年魚類のペプシンに関する研究も進められつつあるが、魚類の食性に伴ったペプシンのサブタイプは例が示されていない。オオクチバスは、食物連鎖上トップに位置するほどの強い肉食食性を示す。この典型的な肉食魚類のペプシンの解析により、肉食食性を示す哺乳類のペプシンとは異なる魚類ペプシンのユニークな特徴が明らかになる可能性が考えられた。そこで、本研究ではオオクチバスの胃よりペプシン (Pn) の前駆体であるペプシノゲン (Pgn) を抽出・精製し、その性質を明らかにするとともに、食性や環境にどのように適応してきたのかを考察した。その結果、オオクチバスペプシノゲン (LBPgn) はこれまで報告されている魚類の Pgn 中でも最もアイソザイムの数も数多くみられ (A タイプ : LBPgn 1-1, 1-2, 2-1, 2-2, 2-3; C タイプ : LBPgn 3)、加えて LBPgn 1-1、2-2 は非常に高い潜在非活性を有していた。また、基質特異性の検討から、オオクチバスペプシン (LBPn) 2-2 はペプシンが認識しづらい Arg や Lys を含んだ基質を認識し、加水分解を行ったことから、広い基質特異性を獲得したといえる。また、LBPn 2-2 は、Porcine Pn A と比べてペプシン基質に対して  $k_{cat}/K_m$  値が高値を示した。これは LBPn 2-2 が非常に高い  $k_{cat}$  値を示していたことに起因する。さらに、LBPn 2-2 は活性化ギブスエネルギーが Porcine Pn A と比べて低値を示した。活性化エントロピーでは、LBPn 2-2の方が Porcine Pn A と比べて高値を示していた。活性化エンタルピーは分子の動きの自由度を示すことから、LBPn 2-2 は柔軟性が高いと考えられる。以上の結果から、オオクチバスペプシンはアイソザイムを増やして酵素量を増大させ、基質特異性を広げたことに加え、高い触媒能を獲得した結果、高いタンパク質分解活性を獲得したことが示唆された。

## 略語

BSA	Bovine serum albmin
CBB	Coomasie brilliant blue
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
FPLC	Fast protein liquid chromatography
HPLC	High performance liquid chromatography
LB	Largemouth bass
ML	Maximum likelihood
PCA	Perchloric acid
PCR	Polymerase chain reaction
PDB	Protein data bank
Pgn	Pepsinogen
PITC	Phenylisothiocyanate
Pn	Pepsin
PTC	Phenylthiocarbamyl
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate-Polyacrylamide gel electrophoresis
TCA	Trichloroacetic acid
TFA	Trifluoroacetic acid
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethane

## 第一章 序論

ペプシンは胃の外分泌性消化酵素で、活性中心にアスパラギン酸を有するアスパラギン酸プロテアーゼである。ペプシンは不活性前駆体のペプシノゲンとして合成および分泌される。胃の主細胞より分泌されたペプシノゲンは壁細胞から分泌された塩酸と反応し、自己触媒的に活性化ペプチドを加水分解してペプシンへと変換する。ペプシノゲンのアミノ酸一次構造は、活性化ペプチドとペプシン部分で構成されている。加えて、ペプシンの X 線構造解析による立体構造解析が進むにつれて、ペプシンの基質特異性に対する構造的な関係も明らかとなってきた。ペプシンの立体構造はブタペプシン (Cooper et al., 1990)、ヒトペプシン C (Moore et al., 1995)、atlantic cod ペプシン A (Karlsen et al., 1998)、ヒトペプシン A (Bailey et al., 2012) 等が明らかとされた。ペプシンの立体構造は中央部分にクレフトを有し、そこに活性中心のアスパラギン酸が 2 つ並んでいる。また、X 線構造解析から明らかとなったペプシンの二次構造の大部分は $\beta$ -sheet で構成される。

ペプシンは、遺伝子構造から A タイプと C タイプに大別される。この A タイプと C タイプは、酵素学的な性質も異なっており、その性質はかつてより検討されてきた。A タイプは強酸性域に至適 pH を有し、pH 3.0 以上では加水分解能が下がることが知られる (Schlamowits and Peterson, 1959)。一方、C タイプでは、至適 pH が 3.0 付近であり、pH 5.0 付近まで活性を有することが明らかとなっている (Narita et al., 1997; Suzuki et al., 1999)。さらに、アスパラギン酸プロテアーゼに対する特異阻害剤であるペプスタチンの親和性は、A タイプでは非常に強いのに対し、C タイプではおおよそ 1/100 であることが知られる (Kageyama, 2000)。ペプシンの A タイプ、C タイプにはそれぞれサブグループの損字が知られ、A タイプは四足動物型 A タイプ、F タイプ、Y タイプ、fish A タイプがある。C タイプには四足動物型 C タイプ、B タイプ、fish C タイプがある (Kageyama, 2002; Carginale et al., 2004a; Tanji et al., 2009; Yufera et al., 2012) (Table 1)。F タイプ、Y タイプのペプシンは、四足動物の A タイプの中でも主に哺乳類に特徴的にみられ、胎児から乳幼児期に発現する。特に、Y タイプは、乳児期のミルクタンパクの分解に関与する (Foltmann et al., 1981; Williams et al., 1997)。一方 B タイプは、イヌ、ネコ等の哺乳類の肉食食性を示す動物において、コラーゲン消化に適応しており、肉食食性に関連して出現したタイプと考えられている (Narita et al., 2002)。

**Table 1.** ペプシンの分類

Group	EC number	別名
<b>A タイプ</b>		
四足動物型		
pepsin A <sup>a, b</sup>	3.4.23.1	pepsin I <sup>c</sup>
pepsin F <sup>b</sup>		
pepsin Y <sup>f</sup>	3.4.23.4	chymocin <sup>d</sup> rennin <sup>e</sup> ,
魚類型		
fish pepsin A <sup>g</sup>		fish pepsin 1, 2 <sup>h</sup>
<b>C タイプ</b>		
四足動物型		
pepsin C <sup>b</sup>	3.4.23.3	gastricsin <sup>i</sup>
pepsin B <sup>b</sup>	3.4.23.2	
魚類型		
fish pepsin C <sup>g</sup>		fish pepsin 3 <sup>h</sup>

<sup>a</sup> Herriott, 1938. <sup>b</sup> Ryle, 1970. <sup>c</sup> Samloff, 1969. <sup>d</sup> Kageyama et al., 1990. <sup>e</sup> Foltmann, 1970. <sup>f</sup> Kageyama, 2002. <sup>g</sup> Tanji et al., 2009. <sup>h</sup> Tanji et al., 1988. <sup>i</sup> Tang et al., 1959.

ペプシンは各動物の多種多様な食性に対応するため、様々な特異性を獲得し、進化してきた。各動物が獲得したペプシンの特徴に、豊富なペプシンの種類と数多くのアイソザイムの存在が知られる (Kageyama, 2002)。中でもオランウータンのペプシン A タイプは 13 種類のアイソザイムが存在し、現在知られている中で最も多くのアイソザイムを有する。このように、ペプシンにみられる多数のアイソザイムの存在は、多様な摂食行動をする動物にとって基質特異性の幅が広がることを意味し、消化上有利となると考えられている (Narita et al., 2000)。また、ペプシンの多様なサブタイプの例には、先に述べた哺乳類の乳幼児期にみられる F タイプ、Y タイプはミルクに含まれるκ-カゼインの Phe<sup>105</sup>-Met<sup>106</sup> を加水分解することが知られる (Williams et al., 1997)。この 2 種類のペプシンは個体の成長に伴い、ペプシン A タイプに置き換わる特徴があり、個体の食性変化に対するペプシンの適応と考えられる (Foltmann, 1981; Kageyama et al., 1990)。ペプシンの肉食への適応例としては、哺乳類の肉食動物に特異的に発現している B タイプが、捕食した動物の皮膚や腱に含まれるコラーゲンを特異的に分解することが報告されている (Narita et al., 2002)。このように、消化酵素のペプシンは、様々な戦略をもって多様な食性に対応するよう進化を遂げたと考えられる。

では、強い肉食を示す魚類のペプシンは、どのような戦略を獲得したのであろうか。魚類の摂食行動は基本的に丸呑みである。よって、胃におけるペプシンによるタンパク質分

解が魚類の消化の第一ステップとなるため、ペプシンのタンパク質分解に関する役割は大きい。しかし、肉食食性の哺乳類にみられるペプシン B タイプは、肉食食性を示す魚類では存在が明らかでないため、四足動物に特異的に発現したと考えられている (Castro et al., 2012)。以上のことから、肉食食性の魚類のペプシンは、哺乳類の肉食動物にみられる B タイプとは異なる能力を得ていると予測された。魚類のペプシンは Pacific bluefin tuna (Tanji et al., 1988)、Atlantic cod (Gildberg et al., 1990)、Seabream (Zhou et al., 2007)、Antarctic rock cod (Brier et al., 2007)、orange-spotted grouper (Feng et al., 2008)、mandarin fish (Zhou et al., 2008)、Albacore tuna (Nalinanon et al., 2010) 等で解析が進められつつある。魚類の生息温度帯は 10~20℃程度が多いが、中には 0℃以下の冷たい海域に生息する魚類も存在する。一般に、酵素は低温になるほど分子運動 (molecular dynamics) が弱まる。このことから、魚類型ペプシンは、四足動物型ペプシンのように単にアイソザイムやサブタイプを増やすだけでなく、低温環境で十分に酵素活性を有するよう、魚類型ペプシン独自の戦略がある可能性が考えられた。しかし、魚類のペプシンが環境や食性にどのように適応したかは依然として明らかになっておらず、構造と機能、分子進化は不明な点も多い。また、四足動物の B タイプに相当する分子種の存在は肉食魚類において明らかとなっていない。近年、海水、淡水だけでなく、北極海や亜熱帯等様々な環境に生息する魚類のペプシノゲンの一次構造が明らかにされつつあることから、魚類型ペプシノゲンの詳細な検討が可能となってきた。よって、魚類型ペプシンの検討は、新たな魚類型ペプシンの特異性が見出される可能性の他、低温で十分に触媒を行う酵素機能のメカニズムが明らかとなる可能性が考えられる。

オオクチバスは (*Micropterus salmoides*) 外来魚であるが、日本における様々な地形、水深、水温等の環境に侵入し、繁殖して定着に成功している。このように、多様な環境に適応するためには、子孫を残す能力の他、食性を柔軟に変化させる能力に長けていると考えられる。実際、オオクチバスは、食物連鎖の頂点に位置するほど強い肉食食性を示す (Henshall 1881; Etnier and Starnes 1993; Philipp and Ridgway 2002)。オオクチバスが原産国とは異なる生態系の環境下でこれほどまでに適応できたのは、食環境に対し柔軟な対応がなされた結果と考えられる。オオクチバスが食物連鎖の頂点を維持するために獲得した能力は、非常に大きな口で獲物を丸呑みし、それを消化するための高いタンパク質分解能力を有すると予測される。さらに、オオクチバスの環境への適応は非常に柔軟であることから、消化のステップの第一段階にあたる胃の消化酵素のペプシンは何らかのユニークな特性を有する可能性が考えられた。以上を踏まえて、本研究では、肉食食性に特化したオオクチバスを用いて、ペプシンのアイソザイムの酵素学的な特性を明らかにするとともに、その諸性質の環境への適応に関して考察をした。オオクチバスペプシンの酵素的な特性をもたらした構造上の特徴と、ペプシン遺伝子の分子進化との関係についても考察を試みることにした。

その結果、オオクチバスペプシンの主要な酵素である LBPn 2-2 は、非常に柔軟な立体構



造を獲得し、低温環境での高いタンパク質分解能を獲得した可能性が示唆された。加えて、LBPn 2-2 では、基質認識に最重要である基質認識部位のアミノ酸が欠損・置換がみられ、幅広い基質認識を行う可能性が示された。

## 第二章 実験方法

### 2-1. 実験材料

ペプシノゲン精製用のオオクチバスは、雨池（名古屋市守山区）で採集されたオオクチバス（6匹）、cDNAクローニング用として、竜巻池（名古屋市守山区）で採取されたオオクチバス（6匹）を名古屋市多様性生物センターより提供していただいた。外来生物法に基づき、採取したオオクチバスは現地で仮死させ、胃を摘出した。ペプシノゲン精製用に摘出した胃は氷冷して研究室まで運び、 $-30^{\circ}\text{C}$ で急速冷凍して使用時まで $-30^{\circ}\text{C}$ で保管した。cDNAクローニング用として摘出した胃は、直ちにRNAlater® solution (Ambion (Austin, USA))に浸漬し、使用時まで $-30^{\circ}\text{C}$ で保管した。

ブタペプシノゲン A は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)、ウシヘモグロ빈は Worthington Biochemical Corporation (Lakewood, NJ, USA)、pepstatin は Peptide Institute (Osaka, Japan) を用いた。ペプシノゲン抽出に用いたカラムの Mono Q HR5/5 および DEAE-Sephacel は Pharmacia LKB Biotechnology (Uppsala, Sweden)、Sephadex G-100 は Amersham Biosciences (Uppsala, Sweden) を用いた。RNA 抽出に使用した RNeasy mini kit および、ゲルからの DNA 抽出に用いた QIAEX®II Gel Extraction kit、培養した大腸菌からのプラスミド抽出には QIAprep spin mini kit は Qiagen (Maryland, USA) を用いた。cDNA の合成は High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit、DNA シークエンス解析に用いた Hi-Di Formamide は Applied biosystems (Foster City, CA, USA) を用いた。5'RACE で用いた 5'/3' RACE Kit, 2<sup>nd</sup> Generation kit は Roche (Mannhem, Germany) を用いた。DNA クローニングで用いた pCR bluntII-TOPO vector using Zero Blunt TOPO Cloning Kit は Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) を用いた。ペプシン基質は Sigma Genosys Japan (Ishikari, Japan) にて合成したものを用いた。その他の試薬は和光純薬工業株式会社 (Osaka, Japan) を用いた。

### 2-2. オオクチバスの胃からのペプシノゲンの抽出および、精製

#### Step 1. ペプシノゲンの抽出

オオクチバス（6匹）の胃 13.3 g の粘膜を削ぎ、粘膜 4.3 g の 10 倍量の 0.02 M Tris (hydroxymethyl) aminomethane (Tris)-HCl, pH 8.0 を加えホモジナイズした。その後、15,000 rpm、20 分間遠心を行い、上清を Crude extract とした。

#### Step 2. DEAE-Sephacel によるイオン交換クロマトグラフィー

Step 1 で得た Crude extract を 0.02 M Tris-HCl, pH 8.0 で透析したのち、同緩衝液に平衡化した DEAE-Sephacel カラム (1.5 cm i. d. × 30 cm) へ添加した。その後、0-0.5 M NaCl の濃度勾配によりカラムに吸着されたタンパクを溶出し、10 ml ずつ採取した。各フラクションは 280 nm における吸光度測定によるタンパクの測定および、ペプシノゲン潜在

比活性を測定し、ペプシノゲン潜在活性を示した画分を集め、溶出順に Fr1、Fr2、Fr3 とした (Figure.1)。

#### Step 3. Sephadex G100 によるゲルろ過

Step 2 で得られたサンプルは飽和硫酸中で濃縮し、12,000 rpm、20 分間遠心して上清を取り除いた。沈殿を 0.02 M Tris-HCl, pH 8.0 で溶解し、再び 12,000 rpm、10 分間遠心を行い、上清は 0.02 M Tris-HCl, pH 8.0 で平衡化した Sephadex G100 (2.0 cm i. d. ×100 cm) を用いてゲルろ過を行った。サンプルは 5 ml ずつ採取し、ペプシノゲン潜在活性を示す画分を集めた。

#### Step 4. FPLC

Step 3 の後、FPLC (Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Sweden) を用いて陰イオン交換クロマトグラフィーを行った。カラムは 0.02 M Tris-HCl, pH 8.0 で平衡化した MonoQ HR5/5 を使い、流速は 1.0 ml/min で行った。カラムに吸着したタンパクの溶出は 0-0.3 M NaCl の濃度勾配で行った。

#### 2-3. Native-PAGE および SDS-PAGE

Native-PAGE は、Orstein (1964) および Davis (1964) に従って行った。分離ゲルは 10% アクリルアミドゲル、濃縮ゲルは 7.5% アクリルアミドゲルとなるように作成した。泳動 Buffer は 50 mM Tris, 40 mM Glycine buffer を用いた。各泳動サンプルは、タンパク量が各レーンで 1.5 mg となるよう調製した。調製したサンプルを濃縮ゲルの well へ注入し、180V、10 mA で泳動を行った。その後、coomasie brilliant blue R-250 (CBB) により染色した。

SDS-PAGE は、Leammli の方法に従って行った (Leammli, 1970)。分離ゲルは 15% アクリルアミドゲル、濃縮ゲルは 3% アクリルアミドゲルとなるように作成した。泳動 Buffer は 25 mM Tris, 200 mM Glycine, 0.1% SDS を用いた。サンプルを各 well へ注入し、180V、10 mA で泳動を行った。泳動後は CBB 染色した。

#### 2-4. N 端アミノ酸配列の決定

ペプシノゲンの N 端アミノ酸配列は、自動アミノ酸分析装置 (model 491 cLC Protein Sequencer, Applied Biosystems [Carlsbad, CA, USA]) を用いて、自動エドマン分解法により行った。各ペプシノゲンを 0.1M 塩酸と適当な時間反応させ、ペプシノゲンがペプシンへと活性化する際の間体を SDS-PAGE により分離した。電気泳動後、タンパク質を Poly Vinyliden DiFluoride (PVDF) membranes (IPVH09120, Milipore, Billerica, MA, USA) へウェスタンブロッティング法を行い、サンプルとした。ブロッティングは、100 mA で 30 分間行った。

## 2-5. ペプシノゲンのペプシンへの活性化

ペプシノゲンの活性化のタイムコースを検討するため、精製したサンプルの 1/5 (v/v) 量の 0.1 M 塩酸を加えて pH 2.0 にし、14°C で反応した。0 秒、30 秒、5 分、15 分、60 分のインキュベーション後、2-3 と同様に SDS-PAGE を行った。

## 2-6. ペプシン活性およびペプシノゲン潜在活性の測定

ペプシノゲンの潜在活性測定には Anson (1939) の方法を用いて行った。試験管に 2% hemoglobin, pH 2.0 を 1 ml に活性測定用サンプル 20  $\mu$ l を加えて直ちに 37°C の恒温槽に入れて反応を開始した。30 分の反応後、5% Trichloroacetic acid (TCA) を 2 ml 加えて反応を停止した。10 分間の静置後、ろ過し、ろ液を 280 nm における吸光度を測定した。本研究では、ペプシンの活性は 1 分間に 280 nm 吸光度を 1.0 上昇させる触媒量を 1 unit として表した。以降の実験では LBPgn 1-1、LBPgn 2-2、LBPgn 3 を用いた。また、以降の表記の Pgn はペプシノゲン、Pn はペプシンを示す。

至適 pH は pH 1.0 から 5.0 の間で検討を行った。LBPgn 1-1、2-2、3 および Porcine Pgn A は 1/5 (v/v) 量の 0.1 M 塩酸を加えて pH 2.0 にし、14°C で 20 分間反応させ、ペプシノゲンをペプシンへ活性化させた。各ペプシン 20  $\mu$ l を、pH 1.0 から 5.0 の 2% hemoglobin 基質溶液 1 ml へ加えて 37°C で 30 分間反応させた。5% TCA を 2 ml 加えて反応を停止し、10 分の静置後、ろ過を行い、ろ過液を 280 nm で吸光度を測定した。

至適温度は 0 から 80°C の間で検討を行った。ペプシン 20  $\mu$ l は、1 ml の 2% hemoglobin, pH 2.0 に加えて 0 から 80°C までの 10°C 間隔で 30 分間反応させた。その後、5% TCA を 2 ml 加えて反応を停止し、10 分の静置後、ろ過し、ろ液を 280 nm における吸光度を測定した。

ペプスタチンによるペプシンサンプルの阻害を検討するため、ペプシン 20  $\mu$ l に、1 ml の 0.1 M glycine buffer, pH 2.0 および、ペプスタチン (最終濃度 : 0.001-1000 mol/mol pepsin) を混和して反応溶液とし、20°C、5 分間反応させた。その後、1 ml の 2% hemoglobin, pH 2.0 反応させた溶液を加え、37°C で 30 分間反応させた。その後、5% TCA を 2 ml 加え、反応を停止し、ろ過し、ろ液を 280 nm における吸光度を測定した。

## 2-7. Hemoglobin、BSA、Casein の消化

Hemoglobin、BSA、Casein を用いて加水分解の検討を行った。Hemoglobin、BSA、Casein 各 1%、pH 2.0 の溶液 1 ml を用いて、LBPgn 1-1、2-2 または、Porcine Pgn A を 20  $\mu$ l 加えて 37°C で 15 分間反応させた。5% TCA を 2 ml 加えて反応を停止させた後、12,000 rpm、5 分間遠心した。別の試験管に、上清 1  $\mu$ l、0.05 N NaOH 198  $\mu$ l、0.5 M Borate -NaOH buffer, pH 8.5 を 2 ml を混和し、さらに fluorescamine 200  $\mu$ l 加え、遊離してきたアミノ基を蛍光分析器 (Shimazu RF-1500) で励起波長 390 nm、蛍光波長 475 nm の蛍光強度を測定した。アミノ基

の標準溶液として、L-Tyrosine を用いた。値は、LBPn 2-2 による 1% Hemoglobin 基質の加水分解率を 100%としたときの相対値で示した。

## 2-8. Hemoglobin 基質を用いた見かけ上の反応速度

魚類間のペプシン活性の強さを検討するため、Hemoglobin 基質を用いた見かけ上の反応速度を検討した。方法は Weng ら (2011) に従った。40  $\mu$ l の LBPgn 1-1、2-2 は 10  $\mu$ l の 0.1 M 塩酸を加えて pH 2.0 にし、14°C で 20 分間反応させ、ペプシノゲンをペプシンへ活性化させた。反応後、0.001N 塩酸を 450  $\mu$ l 加えて反応を停止した。0.25M sodium acetate, pH 3.0 と Hemoglobin, pH 3.0 (7.75-62  $\mu$ M) を併せて 450  $\mu$ l にし、そこへペプシンを 50  $\mu$ l 加えて 37°C で 6 分間反応させた。8% TCA を 500  $\mu$ l 加えて反応を停止し、8,000 rpm で 10 分間遠心分離し、上清を 280 nm における吸光度を測定した。Hemoglobin 加水分解における  $V_{\max}$  とミカエリス定数 ( $K_m$ ) 値は、Hemoglobin 濃度 (7.75-62  $\mu$ M) に対する加水分解を受けたペプチドモル濃度をプロットした。加水分解を受けたペプチドのモル濃度は Lowly ら (1951) の方法を用いて算出し、スタンダードとして L-tyrosine を用いた。ミカエリス定数 ( $K_m$ ) と  $k_{\text{cat}}$  は Lineweaver-Burk プロットから算出した。

## 2-9. 酸化 insulin B chain の加水分解

オオクチバスペプシンの基質特異性を検討するため、酸化 insulin B chain を用いて加水分解を行った。酸化 insulin B chain (33.3  $\mu$ g) は LBPn 1-1、2-2 (各 28 ng) を 0.1 M glycine-HCl buffer, pH 2.0 を用いて総量を 20  $\mu$ L とし、37°C、60 分間反応させた。反応後は 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) 60  $\mu$ L 加え、12,000 rpm で 2 分間遠心後、上清を HPLC で分離した。HPLC のカラム (4.6 mm i. d. x 250 mm) は ODS-120T (CAPCELLPACK, Shiseido, Tokyo, Japan) を用い、0.1% TFA DW で平衡化した。グラディエントは 0.1% TFA acetonitrile (0-50%)、流速 0.5 ml/min で行い、214 nm の波長で検出した。各ピークは分取し、N 端アミノ酸配列の決定および、MALDI-TOF Mass Spectrometer (Voyager DE Pro, Applied Biosystems) を用いて分子量を求め、酸化 insulin B chain が加水分解を受けた箇所を検討した。

## 2-10. 一連のペプシン基質のペプシンによる加水分解

バスペプシンの基質特異性の詳細はペプシン基質 (KPAEFFRL) および、一部を別のアミノ酸で置換した一連の基質ペプチド (KPAEFXRL, KPAGFXRL, KPAXFFRL) を用いて行った。最終濃度が 0.5 M sodium formate buffer, pH 4.0、50  $\mu$ M となるよう調製した基質にペプシンを 5  $\mu$ l 加えて総量を 20  $\mu$ l にし、20°C で 30 分間反応させた。反応後、3% Perchloric acid (PCA) を 80  $\mu$ l 加えて反応を停止させ、12,000 rpm、2 分間遠心分離した後、上清を HPLC で検出した。HPLC のカラム (4.6 mm i. d. x 250 mm) は ODS-120T (TOSOH, Tokyo, Japan) を用い、0.1% TFA DW で平衡化した。流速は 0.8 ml/min で行っ

た。サンプルの溶出は 0.1% TFA acetonitrile を 0-60% の濃度勾配で行い、214 nm の波長で検出した。検出したピーク面積から、加水分解されたペプチドの濃度を算出し、各ペプシン 1  $\mu\text{g}$  あたり、1 分間あたりの基質加水分解活性を算出した。結果は、3 回測定の平均値 $\pm$ 標準偏差で示した。得られた値は、one-way ANOVA および、Scheffe の多重比較検定 ( $P < 0.05$ ) により、統計学的分析を行った。

## 2-11. cDNA のクローニング

RNA later 中に保存してあったオオクチバスの胃粘膜組織より RNeasy mini kit (Qiagen, Maryland, USA) を用いて RNA を抽出した(遺伝子組み換え実験 承認番号: No12-302)。RNA は High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit を用いて cDNA を合成した。3' 側の配列は 5'RACE (5'/3' RACE Kit, 2<sup>nd</sup> Generation was obtained from Roche) で決定した。設計したプライマーを用いて、3'RACE で cDNA を増幅した (Table 2)。反応溶液は cDNA (0.2  $\mu\text{g}$ )、0.3  $\mu\text{M}$  プライマー (Forward: 設計したプライマー (Table 2)、Reverse: AUAP)、300  $\mu\text{M}$  dNTP、1 mM  $\text{MgSO}_4$ 、1 unit Platinum Pfx DNA polymerase で総量を 50  $\mu\text{l}$  とし、サーマルサイクラーで増幅反応した。反応温度と時間は、各 94°C、5 分 1 サイクル、94°C、45°C、68°C 各 1 分を 27 サイクル、68°C、5 分 1 サイクルで行った。増幅させた DNA は、1.2% アガロースゲルで電気泳動後、QIAEX®II Gel Extraction kit を用いて抽出し、以降のクローニングに用いた。

**Table 2.** PCR 用オリゴヌクレオチドプライマー

name	sequence (5'→3')
LBA1_F	GAA GTT GGC CTT TGT TGT GTG TGC
LBA2_F	ACT CGC CTG GAG TCC AAC AGA AC
LBC_F	CCA TCC AGA AGT GCT ATG CGT ACC

DNA のクローニングには pCR bluntII-TOPO vector using Zero Blunt TOPO Cloning Kit を用いた。pCR bluntII-TOPO vector へライゲーションした後、42°C、45 秒ヒートショックにより DH5 $\alpha$ コンピテントセルへトランスフォームした。その後、大腸菌を 37°C、200 rpm で 1 時間前培養後、LB agar 培地で 37°C over night で培養した。抗生物質はカナマイシンを用いた。培養の後、増殖したコロニーをカナマイシンの入った LB agar 培地へ継代し、37°C でさらに一晩培養した。培養の際、コロニーの一部を採取し、PCR を行い、ライゲーションの確認を行った。PCR 反応溶液は大腸菌コロニー、0.3  $\mu\text{M}$  プライマー (Forward: SP6、Reverse: T7)、Prime STAR GXL Buffer、200  $\mu\text{M}$  dNTP、1.25 unit Prime

STAR GXL DNA polymerase を用いて総量を 25  $\mu$ l とし、サーマルサイクラーで増幅反応した。各サイクルの反応温度と時間は 98°C、3 分 1 サイクル、98°C で 10 秒、55°C で 15 秒、68°C で 1 分を 30 サイクル、68°C、5 分 1 サイクルで行った。増幅させた DNA は、1.2% アガロースゲルで電気泳動を行い、インサートの確認を行った。継代培養後の大腸菌は、カナマイシンの入りの LB 培地で 37°C、over night、200 rpm で液体培養後、QIAprep spin mini prep kit でプラスミドを抽出した。このプラスミドを用いて、再度前述の PCR 反応を行い、1.2% アガロースゲルで電気泳動を行った後、プラスミドを確認した。

大腸菌から抽出したプラスミドは BigDye Terminator Ready Reaction Mix、Sequence Buffer、1 pmol Primer (Forward: SP6 and Reverse: T7) を加えて PCR 法で増幅を行った。各サイクルの反応温度と時間は 96°C、1 分 1 サイクル、96°C で 10 秒、50°C で 5 秒、60°C で 4 分を 25 サイクルで行った。PCR 産物は EDTA/エタノール沈殿法でサンプルを回収した。PCR 反応液に 100 mM EDTA 6.25  $\mu$ l、100% エタノール 60  $\mu$ l を加え、数回反転して室温で 15 分静置して 14,500 rpm で 15 分間遠心し、上清を静かに捨てた。70%エタノールを 60  $\mu$ l 加え、数回反転した後、14,500 rpm で 2 分間遠心してエタノールをデカントで取り除いた。再び 14,500 rpm で 2 分間の遠心を行い、残った上清はピペットマンを用いて全て取り除き、風乾した。Hi-Di Formamide を 15  $\mu$ l 加え、95°C で 3 分間加熱した後、ABI PRISM 3500xl Genetic Analyzer を用いて配列の決定を行った。

## 2-12. 三次構造のホモロジーモデリング

Modeller 9.12 (Sali and Blundell, 1993) を用いてバスペプシンの PDB ファイルを作成した。結晶構造は Human A (PDB: 3UTL) (Bailey et al., 2012)、Porcine A (PDB: 5PEP) (Andreeva et al., 1984; Cooper et al., 1990; Sielecki et al., 1990)、Atranttic cod A (PDB: 1AM5) (Karlsen et al., 1998) をモデルとして用いた。作成したバスペプシンの PDB ファイルは、RAMPAGE を用いて、ラマチャンドラプロットを作成した (Lovell et al., 2003)。また、ペプシンと基質の結合体のモデリングには Human pepsin A に synthetic phosphonate inhibitor (Fuzinaga et al., 2000) を結合させたモデルを用いてホモロジーモデリングを行った。

## 2-13. ペプシン基質を用いた熱力学的検討

ペプシン基質 (KPAEFFRL) を用いて、LBPn 1-1、2-2 および Porcine Pn A の熱力学的特性を検討した。ペプシン基質は 25-120  $\mu$ M となるように sodium formate buffer, pH 4.0 で調製し、LBPn 1-1、2-2、または Porcine Pn A を 5  $\mu$ l 加えて総量を 25  $\mu$ l とした。反応は 10-45°C で 30 分間行った。反応後、3% PCA を 75  $\mu$ l 加え、12,000 rpm、2 分間遠心分離した後、HPLC で検出した。HPLC の条件は 2-10 ペプシン基質とその変異体を用いた加水分解と同様とした。得られた結果から SigmaPlot v13.0 (Systat Software, San Jose, CA, USA) を用いてカーブフィッティングにより  $K_m$ 、 $V_{max}$  を算出した。 $k_{cat}$  は  $V_{max}/[E]_0$

から算出した。1/温度 ( $K^{-1}$ ) に対して  $\ln k_{cat}$  をプロットし、アレニウスプロットを作成した。アレニウスプロットから、各温度における熱力学パラメーターの活性化ギブス自由エネルギー ( $\Delta G^\ddagger$ )、エンタルピー ( $\Delta H^\ddagger$ )、エントロピー ( $\Delta S^\ddagger$ ) を、Feller ら (1992) の式を用いて算出した。 $K_m$ 、 $k_{cat}$  における結果は、3 回測定の平均値 $\pm$ 標準偏差で示した。得られた値は、one-way ANOVA および、Scheffe の多重比較検定 ( $P < 0.05$ ) により、統計学的分析を行った。

## 2-14. 系統樹の作成

Probcons (Do et al., 2015) を用いてアミノ酸の多重配列を行った。この多重配列を基に塩基配列を MrBayes v3.2 (Ronquist and Huelsenbeck, 2003) を用いて Bayes 法により系統樹を作成した。アウトグループには Human、Rabbit E を用いた。DNA 塩基置換モデルは、GTR を用いた (Tavare, 1986)。また、マルコフ連鎖モンテカルロ法に基づき、Bayes の事後確率を 20,000 世代試行して系統樹を作成した。

魚類ペプシノゲンにおける進化速度の検討には、Yang (1998) による非同義置換速度 ( $d_N$ ) と同義置換速度 ( $d_S$ ) の比  $\omega (=d_N/d_S)$  を paml 4.7a (Yang, 2007) を用いて解析を行った。系統樹は予め Tree-Puzzle 5.2 を用いて ML 法により作成した (Strimmer and von Heaseler, 1996)。DNA 塩基置換モデルには、HKY85 (Hasegawa et al., 1985) を用いた。 $d_N/d_S$  を算出は、paml 4.7a の CODML プログラムを用いて、Branch models により、Largemouth bass 2 と Snakehead の共通祖先で正の自然選択が働いたどうかの検討を行った。この Branch models に対し、進化速度がすべて均一のモデルを作成し、系統樹の尤度比較検定を行った。



## 第三章 結果

### 3-1. バスペプシノゲンの精製

バスペプシンの酵素学的特性を検討するため、オオクチバスの胃よりペプシノゲンの精製を行った。ペプシノゲン粗抽出液の DEAE-Sephacel イオン交換クロマトグラフィーによりピークが3つ得られたので (Figure 1)、溶出順に、各 Fr 1、Fr 2、Fr 3 と命名して、Sepahdex G 100 を用いたゲル濾過 (Supplement figure 1)、MonoQ カラムを用いてさらに精製を行った (Supplement figure 2)。精製を Table 3 に示した。最終的に、Fr 1 は Fr 1-1、1-2 の2種類、Fr 2 は Fr 2-1、2-2、2-3 の3種類と Fr 3 の合計6種類のアイソザイムを得て、それぞれ単一のものであることを Native-PAGE により確認した (Figure 2)。なお、本研究で示している「アイソザイム」は、酵素学的特性等で各 Fr グループ内において類似した特性を有するが、Native-PAGE 等では異なる位置にバンドが生じているものを示す。

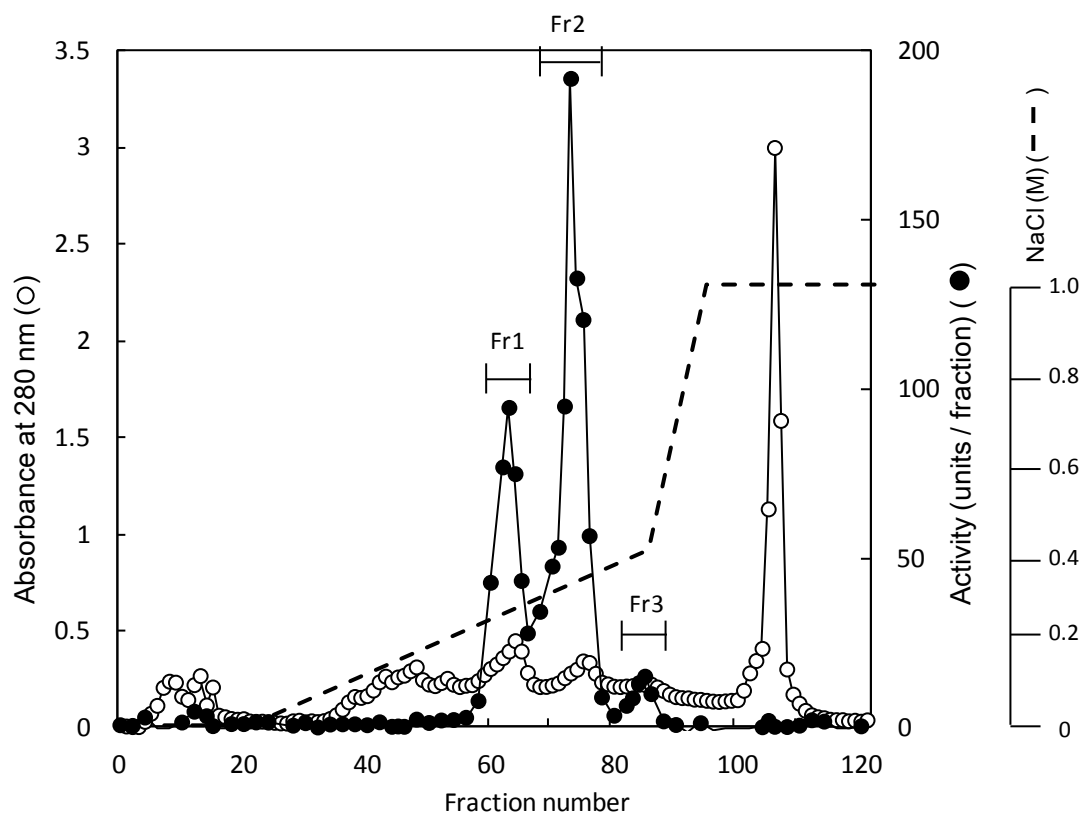
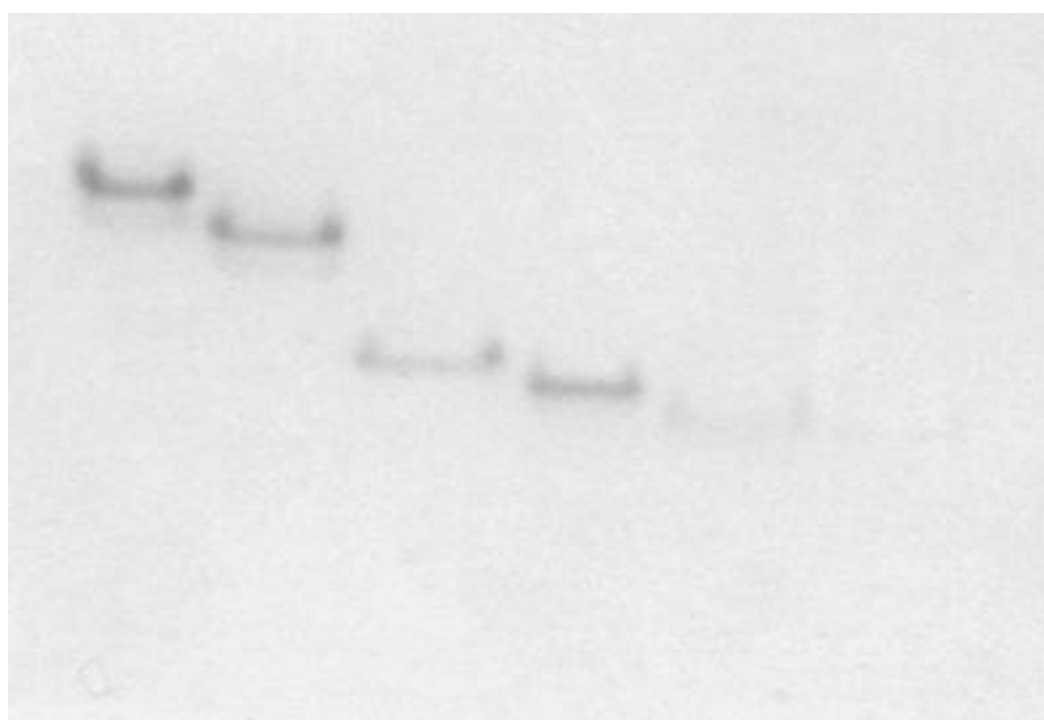


Figure 1. ペプシノゲン粗抽出液の DEAE-Sephacel イオン交換クロマトグラフィー

各フラクションの容量は 10 ml で行い、バーで示した個所のタンパクを採取した。○ : 280 nm 吸光法によるタンパク量測定した。● : 2% hemoglobin, pH2.0 の加水分解活性を測定した。図は Miura ら (2015) の Figure 1 を一部改変した。

本論文中におけるペプシンの表記は、Largemouth bass の頭文字である LB を最初に記した。加えて、ペプシノゲンを用いた際は Pgn、ペプシン活性体を用いた際は Pn を LB の後に表記した。2% hemoglobin, pH 2.0 に対する LBPgn 1-1、2-2 ならびに LBPgn 3 の潜在活性はそれぞれ 51、118、9.6 units/mg protein であった (Table 3)。これらの潜在比活性は、バスペプシノゲンの各アイソザイムの中でも最も高い値を示した。また、現在知られている中で最も活性の高いのは Tuna 2 の 41.5 units/mg protein であり (Tanji et al., 1988)、LBPgn 2-2 は Tuna 2 の値よりも高い (Table 4)。よって、LBPgn 1-1、2-2 は、オオクチバスの胃内消化活動の主要な酵素であると考えられる。以降の実験の結果は主要酵素である LBPgn 1-1、2-2 に加え、1 種類のみ精製された LBPgn 3 に関してを示した。



Fr1-1    Fr1-2    Fr2-1    Fr2-2    Fr2-3    Fr3  
(LBPgn 1-1)                      (LBPgn 2-2)                      (LBPgn 3)

**Figure 2.** 精製したペプシノゲンの Native-PAGE

Native-PAGE は Orstein (1964) と Davis (1964) の方法に従い、行った。ゲルは 10%ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行い、Coomassie brilliant blue R-250 でタンパクを染色した。図は Miura ら (2015) の Figure 2 を一部改変した。

**Table 3.** オオクチバスペプシノゲンの抽出および精製

Step (mg)	Protein (units)	Activity (units/mg protein)	Specific activity	Yield (%)
Crude extract	419	1510	3.6	100
DEAE-Sephacel Chromatography				
Fr1	14.2	249	18	16
Fr2	12.0	481	40	32
Fr3	9.0	32	3.6	2.1
Sephadex G100 Gel filtration				
Fr1	5.5	209	38	14
Fr2	5.9	303	51	20
Fr3	1.4	13	9.3	0.9
MonoQ FPLC				
Fr1-1 (LBPgn 1-1)	1.7	87	51	5.8
Fr1-2	0.33	10	30	0.7
Fr2-1	0.19	17	89	1.1
Fr2-2 (LBPgn 2-2)	1.9	224	118	15
Fr2-3	0.21	16	76	1.1
Fr3 (LBPgn 3)	0.5	4.8	9.6	0.3

表は Miura ら (2015)の Table 1 を一部改変した。

**Table 4.** 2% Hemoglobin 基質を用いた比活性の比較

Species	Pepsinogen	Specific activity (units/mg protein)
Largemouth bass	LBPgn 1-1	51
	LBPgn 2-2	118
Tuna	pepsinogen 2	41.5 <sup>a</sup>
Pig	pepsinogen A	18.5 <sup>b</sup>

2% Hemoglobin, pH 2.0 を用いた潜在活性測定は Anson (1939) の方法に従って行った。1 unit は 1 分間に 280 nm の吸光度が 1.0 上昇させる酵素量を示す。表は Miura ら (2015)の Figure 2 を一部改変した。

<sup>a</sup>Tanji et al., 1988. <sup>b</sup>Suzuki et al., 1999.

### 3-2. バスペプシンおよびペプシノゲンの N 端アミノ酸配列

バスペプシノゲンのグループを予測するため、LBPgn 1-1、2-2 の N 端部分のアミノ酸配列を決定し、Figure 3 に示した。各 LBPgn 1-1、2-2 のペプシノゲン、中間体、ペプシン活性体の 3 種類の N 端アミノ酸配列を決定した。各部分の配列は、最終決定配列の個所に斜線を記した。LBPgn 1-1 は Arg、Asp の前で、LBPgn 2-2 は Trp、Phe の前で加水分解が行われ、各中間体とペプシン活性体を生成していた。バスペプシノゲンの配列は、Flounder IIa、IIb、Tuna 1、2、Mandarin A1、A2 と比較した。LBPgn 1-1 は fish A1 に含まれ、Flounder IIa、Tuna 1、Mandarin A1 の配列と高い相同性が得られた。LBPgn 2-2 は fish A2 に含まれ、Flounder IIb、Tuna 2、Mandarin A2 の配列と相同性が得られた。

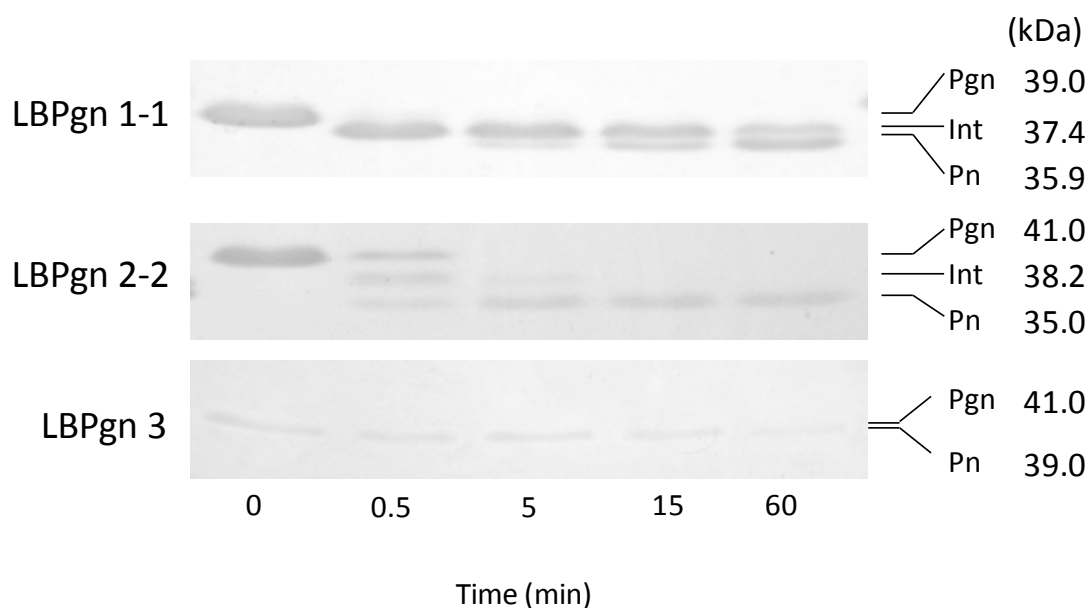
		1p ⋮		10p ⋮		20p ⋮		30p ⋮		1 ⋮		10 ⋮						
	<b>LBPgn 1-1</b>	<b>LVQV</b>	<b>PL</b>	<b>EV</b>	<b>G</b>	<b>QTA</b>	<b>R</b>	<b>EY</b>	<b>L</b>	<b>E/</b>	<b>R</b>	<b>LNYP</b>	<b>FNQMA/</b>	<b>DVXF</b>	<b>AV-GNE</b>	<b>GMT/</b>		
Fish	Flounder IIa	FLQV	PL	EK	G	KTA	R	EL	L	EEQGLWEEY	R	LKY	P	YNPMVKFDQSF	AV-GPESMTNDADL	AYYGI		
A1	Tuna 1	LLQV	PL	EK	G	QSA	R	EY	L	EEQGLWEEY	R	LKY	P	YNPMAKFDPSF	AVAG-EPMTNDADL	AYYGI		
	Mandarin A1	LIQV	PL	EK	G	KTA	R	EL	L	EEQGLWEEY	R	LKY	P	YNPMAKFDERF	AV-GSESMTNDADL	SSYGI		
	<b>LBPgn 2-2</b>	<b>LVRL</b>	<b>PL</b>	<b>IV</b>	<b>G</b>	<b>KTA</b>	<b>R</b>	<b>QA</b>	<b>L</b>	<b>LE/</b>	<b>WEKY</b>	<b>R</b>	<b>XQH</b>	<b>P</b>	<b>YNP/</b>	<b>FLQTGAEP----</b>	<b>MRNDADLSSYG</b>	<b>V/</b>
Fish	Flounder IIb	LVRT	PL	IK	G	KTV	R	ED	L	QEKGLWEQY	R	KEH	P	YNPMAKFIQTGT	ES----MTNDADL	SSYGV		
A2	Tuna 2	FHKL	PL	IK	G	KTA	R	EE	L	QERGLWEDY	R	KQY	P	YHPMAKFYQDGT	EP----ITNDADL	SSYGVV		
	Mandarin A2	FHKI	PL	IK	G	KTA	R	QA	L	QEKGLWEEY	R	KQH	P	YNPMAKFLQTGT	EP----MTNDADL	SSYGV		

Figure 3. バスペプシノゲンの N 端アミノ酸配列

LBPgn 1-1 と 2-2 のペプシノゲン N 端アミノ酸配列の決定は、ペプシノゲン、中間体、ペプシン活性体で行った。中間体および活性体は塩酸による活性反応の後、SDS-PAGE による電気泳動を行った。その後、ウェスタンブロッティングで PVDF 膜へ転写し、N 端配列を決定した。配列 (NCBI コード) は Flounder IIa (AF156787)、IIb (AF156788)、Tuna 1 (AB440200)、2 (AB440201)、Mandarin A1 (EU807925)、A2 (EU807927) と比較した。X: アミノ酸未決定、/: 決定したアミノ酸配列の最終を示す。上部の番号はブタペプシノゲンの番号に従った。図は Miura ら (2015) の Figure 4 を一部改変した。

### 3-3. バスペプシノゲンのペプシンへの活性化

ペプシノゲンを塩酸と各時間反応させ、活性化の様子を検討した (Figure 4)。LBPgn 1-1、LBPgn 2-2、LBPgn 3 の分子量は、それぞれ 39、41、41 kDa であった。LBPgn 1-1、LBPgn 2-2 はそれぞれ中間体 (Int) を経てペプシンへ活性化した。LBPgn 1-1 は、0.5 分でほぼすべて中間体となったが、60 分経過後も中間体が残存しており、中間体への反応は早い、活性型への反応は遅いことが示された。LBPgn 2-2 は、0.5 分で中間体とわずかにペプシン活性体の存在が確認でき、反応開始後 5 分でほぼすべてのペプシノゲンがペプシンへと活性化した。一方で、LBPgn 3 は中間体を経ずにペプシンへと活性化した。

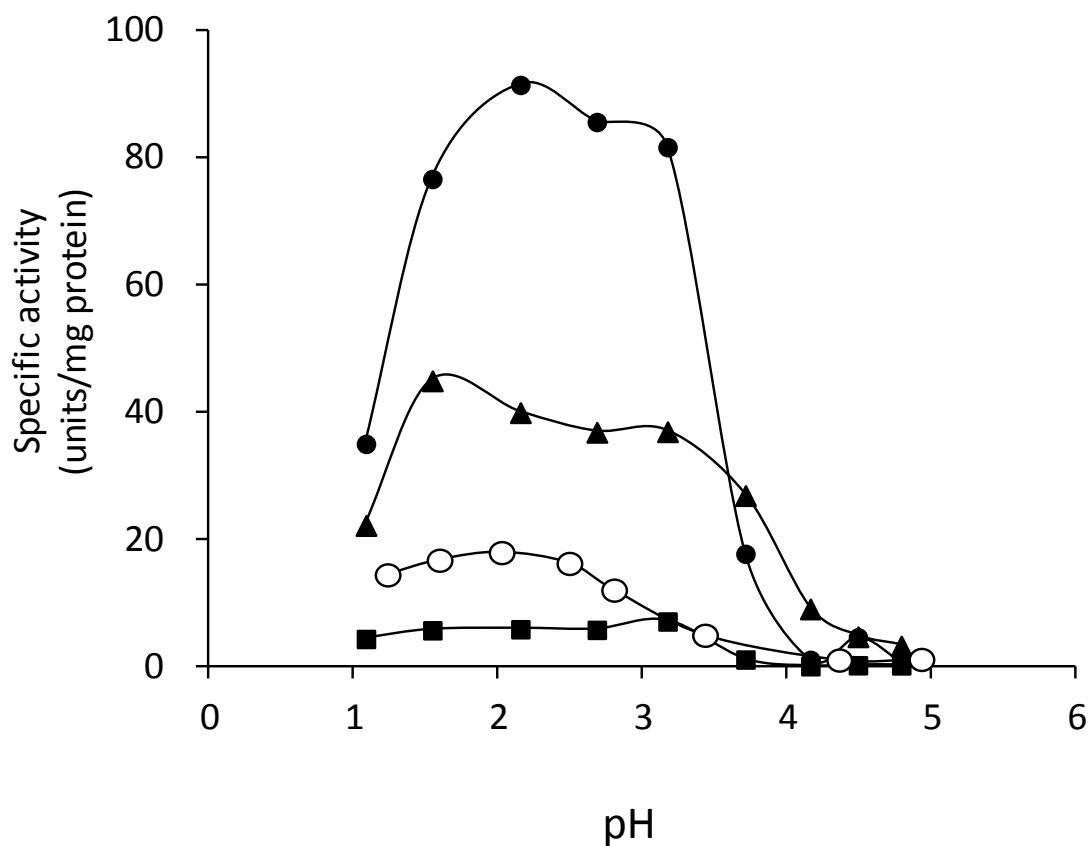


**Figure 4.** ペプシノゲンからペプシンへの活性化

ペプシノゲン溶液 (0.16 mg/ml) に 0.1 M HCl を 1/5 量加えて pH 2.0、14°C で各時間反応させ、2-mercaptoethanol, glycerol, SDS and bromphenol blue を含んだ 1.5 M Tris-HCl buffer, pH 8.8 溶液を加えて反応を止めた。その後、15%ポリアクリルアミドゲルを用いて SDS-PAGE を行い、Coomassie Brilliant Blue R-250 で染色した。その後、各ペプシノゲン、中間体、ペプシンの分子量を算出した。各レーンのタンパク量は 1.3 mg で行った。Pgn: ペプシノゲン、Int: 中間体、Pn: ペプシンを示す。図は Miura ら (2015) の Figure 3 を一部改変した。

### 3-4. バスペプシンの幅広い至適 pH および低い至適温度

バスペプシンの酵素学的特性を検討するため、至適 pH、至適温度を検討した。2% hemoglobin 基質分解活性の pH 依存性を検討した (pH 1.0-5.8) (Figure 5)。LBPn 1-1、2-2 の至適 pH は、それぞれ pH 1.5 と 2.0 であり、両者とも pH 1.5-3.5 の間で高い活性を保持した。Porcine Pn A は pH2.0 で至適 pH を示し、pH 3.0 でほとんど活性がみられなかったことから、LBPn は幅広い pH で活性を有することが示された。一方、LBPn 3 の至適 pH は 3.5 であり、LBPn 1-1、2-2 と比べて高い至適 pH を示した。



**Figure 5.** ペプシンの至適 pH

pH 1.0-5.8 の 2% hemoglobin 基質を用いてペプシンの活性測定を行った。値は最も高い活性を示した pH の活性を 100%とし、その相対値で示した。ペプシンは LBPn 1-1 (●)、LBPn 2-2 (▲)、LBPn 3 (■)、Porcine Pn A (○) を用いた。図は Miura ら (2015) の Figure 5 を一部改変した。

バスペプシンの 2% hemoglobin, pH 2.0 基質分解活性の温度依存性を検討した (0-80℃) (Figure 6)。LBPn 2-2、3 の至適温度は 40℃であり、LBPn 1-1 の至適温度は 50℃であった。Porine Pn A の至適温度である 60℃では、いずれのバスペプシンも熱変性による失活がみられた。オオクチバス生息域の温度に該当する 20℃において、LBPgn 1-1、2-2、3 の活性は至適温度時の活性と比べて 40%程度の活性を示した。一方、Porcine Pn A の 20℃での活性は至適温度時の 10%以下であった。

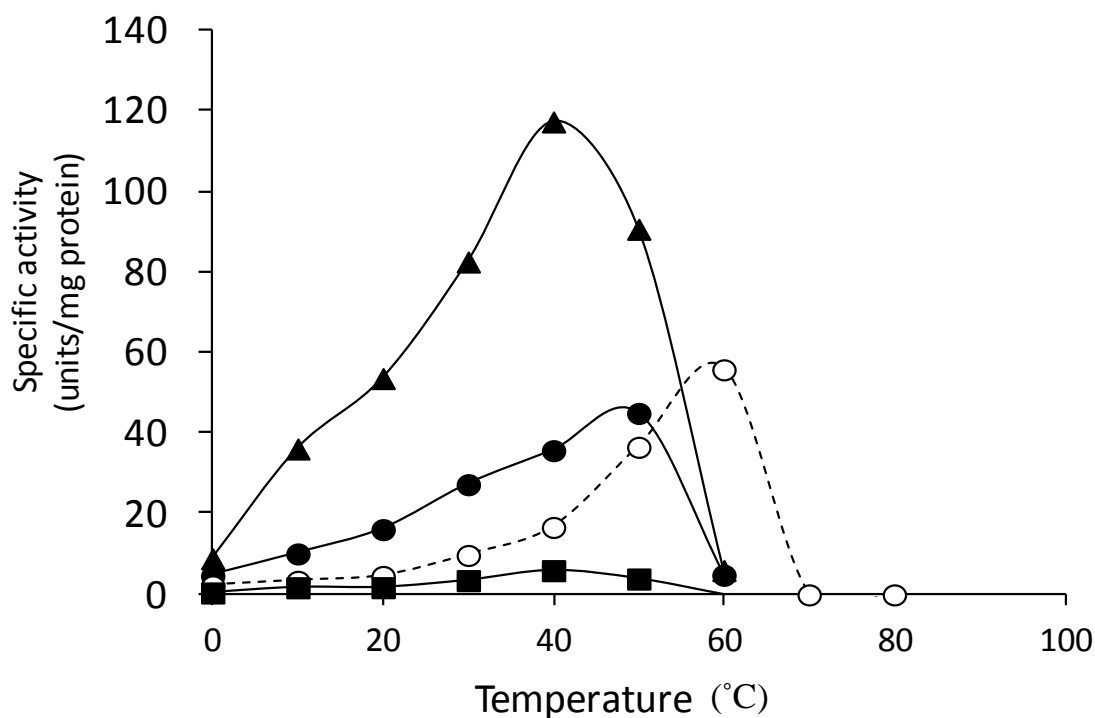


Figure 6. ペプシンの至適温度

2% hemoglobin, pH 2.0 の基質を用いて 0-70℃でペプシンの活性測定を行った。値は最も高い活性を示した pH の活性を 100%とし、その相対値で示した。ペプシンは LBPn 1-1 (●)、LBPn 2-2 (▲)、LBPn 3 (■)、Porcine Pn A (○) を用いた。図は Miura ら (2015) の Figure 6 を一部改変した。

### 3-5. バスペプシンのペプスタチンによる競合阻害

バスペプシンに対するペプスタチンの阻害作用を Figure 7 に示した。活性化ペプシンとペプスタチンの比が 0.001-1000 mol/mol/pepsin となる範囲で検討した。LBPn 1-1、2-2 は Porine Pn A と同様に、50%阻害にモル比でペプシンの約 2 倍のペプスタチンを必要とした。一方で、LBPn 3 は、50%の阻害を受けるのにペプスタチンがペプシンの約 20 倍量のモル比が必要であった。ペプシン C タイプは A タイプと比べてペプスタチンの阻害を受けにくく、四足動物の C タイプでは、ペプスタチンの阻害は A タイプと同程度の阻害を受けるのに 100 倍多くペプスタチンが必要である (Kageyama, 2002) 。一方、魚類 C タイプは Tuna の研究において、A タイプと同程度の阻害を受けるには、ペプシンに対し 10 倍多くのペプスタチンが必要であることが報告されている (Tanji et al., 1988) 。よって、LBPgn 3 は、3-2 で示した N 端アミノ酸配列の結果ではアミノ酸配列が決定できなかったが、ペプスタチンの阻害作用から fish C タイプであると考えられる。

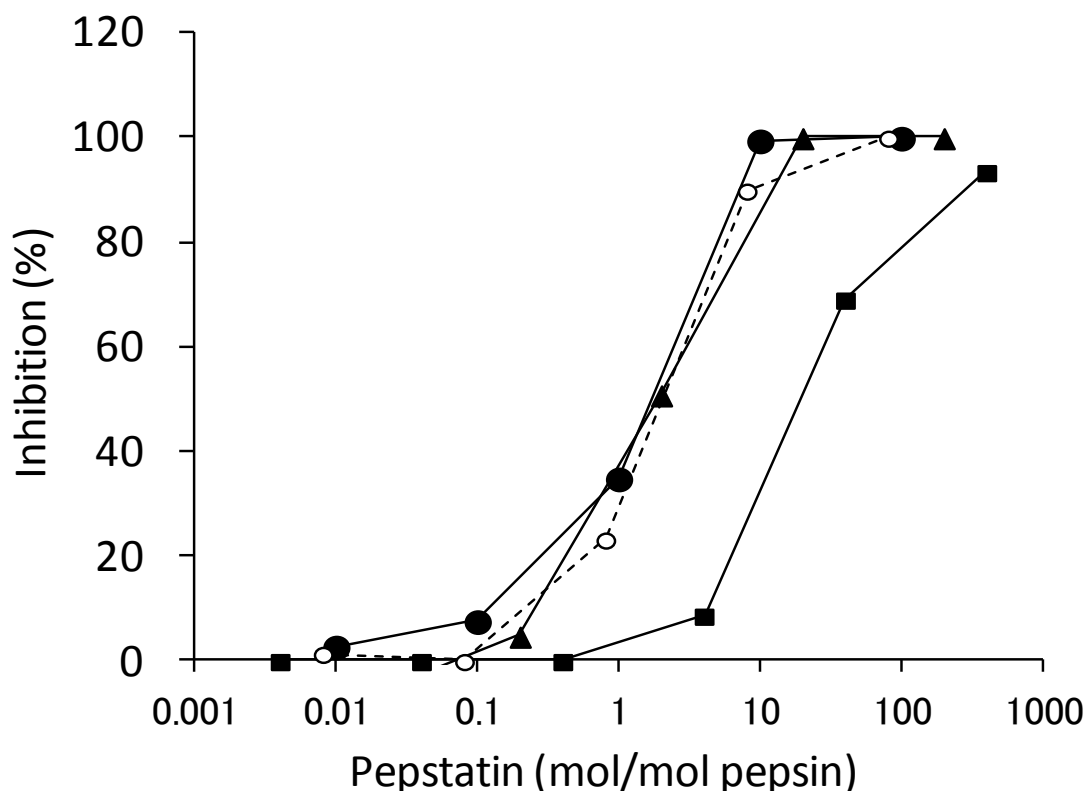


Figure 7. ペプスタチンによるペプシン阻害実験

基質は 2% hemoglobin, pH 2.0 を用いた。活性化したペプシンとペプスタチンの比が 0.001-1000 mol/mol pepsin となるよう、20℃で 5 分間反応の後ペプシンの活性測定を行った。ペプシンは LBPn 1-1 (●)、LBPn 2-2 (▲)、LBPn 3 (■)、Porcine Pn A (○) を用いた。図は Miura ら (2015) の Figure 7 を引用した。



### 3-6. Hemoglobin、BSA、Casein の消化

基質により、その消化率は異なると予想されることから、Hemoglobin、BSA、Casein の分解されやすさを検討した。分解の程度を比較するために、加水分解より生じたアミノ末端を定量した。いずれの基質においても、LBPgn 2-2 が最も高い値を示し、中でも Hemoglobin 加水分解率が一番大きいことが明らかとなった (Table 5)。LBPgn 1-1、2-2 では、Casein に対する加水分解活性が2番目に高い値を示したが、Porcine Pn AではCasein に対し、殆ど加水分解を示さなかった。また、LBPgn 2-2 は、Porcine Pgn A と比べて、これらのタンパク質を効率よく分解することが明らかとなった。

**Table 5** 様々なタンパク基質の消化能力

Pepsin	Hemoglobin (%)	BSA (%)	Casein (%)
LBPgn 1-1	23	0.2	7.2
LBPgn 2-2	100	6.2	27
Porcine Pgn A	3.2	1.2	0.0

各 1%、pH2.0 の Hemoglobin、BSA、Casein 溶液を用いて、37℃で 15 分間反応させた。値は、LBPn 2-2 による Hemoglobin 基質の加水分解率を 100%としたときの相対値で示した。

### 3-7. Hemoglobin 基質を用いたみかけ上の酵素反応速度論

バスペプシンの活性の強さを他の魚類と比較するため、魚類のペプシン活性の比較でよく用いられる方法の Hemoglobin, pH 3.0 基質による LBPn 1-1、2-2 の見かけ上の反応速度解析を行った (Table 6)。LBPn 1-1、2-2 の  $K_m$  値はそれぞれ  $3.9 \times 10^{-5} \text{ M}$  と  $2.0 \times 10^{-5} \text{ M}$  であり、他の魚類と比較して低値を示した。一方、反応速度定数の  $k_{\text{cat}}$  値は、LBPn 1-1、2-2 のそれぞれ  $52.7 \text{ s}^{-1}$ 、 $62.9 \text{ s}^{-1}$  であり、他の魚類と比較して高値を示した。酵素の触媒効率を示す  $k_{\text{cat}}/K_m$  は、LBPn 1-1、2-2 それぞれ  $1.6 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、 $3.5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  であり、他の魚類と比べて約 10 倍高い値を示した。

**Table 6.** ヘモグロビン基質を用いた見かけ上の反応速度定数の比較

Species	Pepsin	pH	$K_m$ (M)	$k_{\text{cat}}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$k_{\text{cat}}/K_m$ ( $\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ )
Largemouth bass	LBPn 1-1	3.0	$3.9 \times 10^{-5}$	52.7	$16 \times 10^5$
	LBPn 2-2	3.0	$2.0 \times 10^{-5}$	62.9	$35 \times 10^5$
Snakehead	pepsin 3	3.0	$14 \times 10^{-5}$	13.2	$0.95 \times 10^5$ <sup>c</sup>
Rice field eel	pepsin 3	3.0	$6.9 \times 10^{-5}$	42.6	$6.2 \times 10^5$ <sup>d</sup>
Pectoral rattail	pepsin A	3.0	$9.8 \times 10^{-5}$	50	$5.1 \times 10^5$ <sup>e</sup>
European eel	pepsin I	3.0	$8.8 \times 10^{-5}$	23.7	$2.7 \times 10^5$ <sup>f</sup>
Atlantic cod	pepsin IIa	2.0	$11.6 \times 10^{-5}$	32	$2.8 \times 10^5$ <sup>g</sup>
		3.5	$4.4 \times 10^{-5}$	33	$7.5 \times 10^5$ <sup>g</sup>

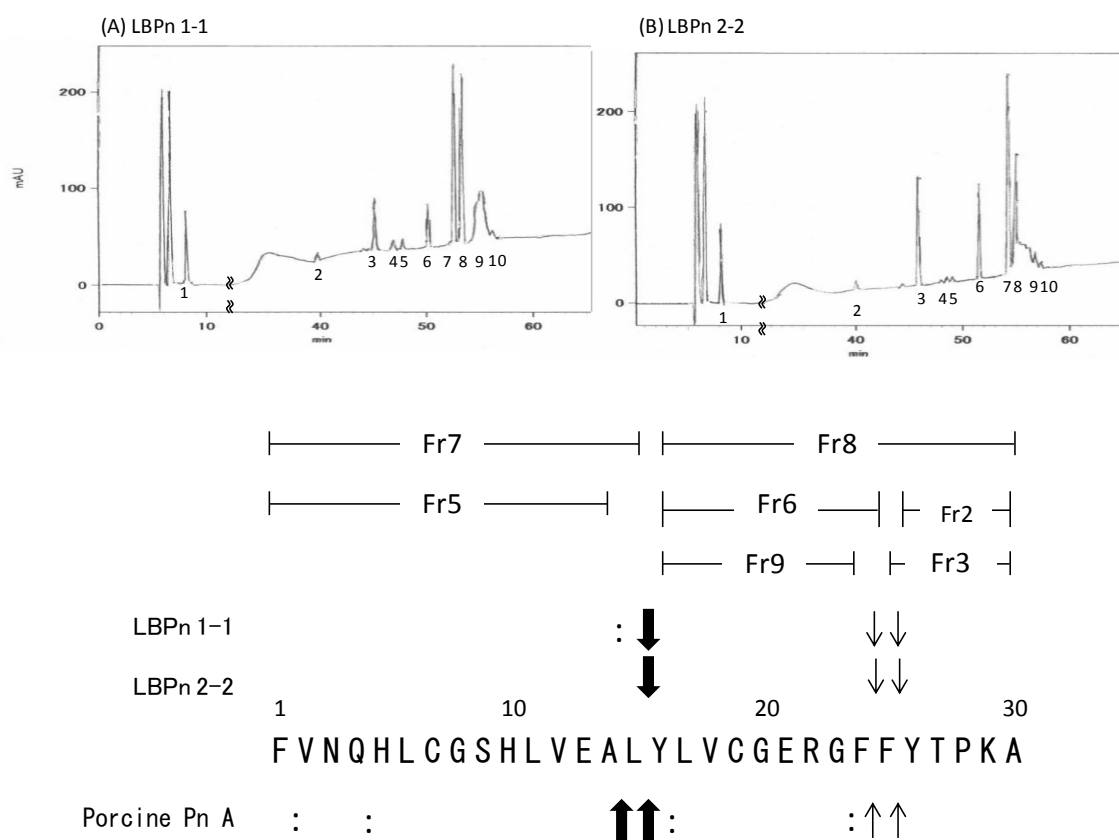
Hemoglobin, pH 3.0 を基質として用いた反応速度は Weng et al (2011) の方法に従って行った。Atlantic cod (Gildberg et al., 1990) の値は pH 2.0 および 3.5 で比較した。

<sup>c</sup>Chen et al., 2009. <sup>d</sup>Weng et al., 2011. <sup>e</sup>Klomklao et al., 2007. <sup>f</sup>Wu et al., 2009.

<sup>g</sup>Gildberg et al., 1990. 表は Miura ら (2015) の Table 3 を一部改変した。

### 3-7. バスペプシンの酸化 insulin B chain 切断特異性

LBPn 1-1、2-2 がどのような配列を好んで加水分解するか検討するため、酸化 insulin B chain (33.3  $\mu$ g) を基質とした加水分解を行った (Figure 8)。LBPn 1-1、2-2 は両者とも酸化 insulin B chain のほぼ同じ個所を加水分解しており、未分解の B 鎖は殆ど残っていなかった。最も強く加水分解を受けたのは Leu<sup>15</sup>-Tyr<sup>16</sup>であった。続いて、Phe<sup>24</sup>-Phe<sup>25</sup>、Phe<sup>25</sup>-Tyr<sup>26</sup>の結合がよく加水分解されていた。LBPn 1-1 はこれに加え、Ala<sup>14</sup>-Leu<sup>15</sup> 結合もよく加水分解していた。Porcine Pn A も LBPn 1-1、2-2 と同じ個所を加水分解していたが、LBPn 1-1、2-2 と比べ切断個所が多く、LBPn の切断個所に加えて、Phe<sup>1</sup>-Val<sup>2</sup>、Gln<sup>4</sup>-His<sup>5</sup>、Tyr<sup>16</sup>-Leu<sup>17</sup>、Gly<sup>23</sup>-Phe<sup>24</sup>でも加水分解がみられた。



**Figure 8.** 酸化 insulin B chain の加水分解

酸化 insulin B chain (33.3 mg) を 0.1 M glycine-HCl buffer (pH 2.0) 内で活性化した LBPn 1-1、2-2 と 37°C、30 分反応させた。基質分解産物は HPLC で検出して各フラクションを分取した後、N 端アミノ酸配列、Maldi-TOF Mass で加水分解位置を決定した。HPLC 溶出パターンは (A) LBPn 1-1、(B) LBPn 2-2 を示し、各ピークの下にフラクション番号を示した。分解された酸化 insulin B chain の配列の上の矢印は、最も切断の多かったところを (↑)、二番目に多かったところを (↑) 三番目に多かったところを (:) で表わした。図は Miura ら (2015) の Figure 8 を一部改変した。

### 3-8. オオクチバスペプシンの基質特異性

バスペプシンの基質特異性が Porcine Pn A と比べてどのような違いがあるかを検討するため、ペプシン基質 (KPAEFFRL) および、一部を別のアミノ酸で置換した一連の基質ペプチド (KPAEFXRL、KPAGFXRL、

KPAXFFRL) を用いて、ペプシンによる加水分解を行った。基質ペプチドの加水分解されるペプチド結合から見て、アミノ末端側の 4 アミノ酸残基 (P1～P4) とカルボキシ末端側の 3 アミノ酸残基 (P'1～P'3) をペプシンは認識することが知られる。ペプシンは P1、P'1

のアミノ酸残基の間のペプチド結合を加水分解することから、P1、P'1 に対する基質認識は非常に重要である (Figure 9)。オオクチバスペプシンの基質特異性を検討するため、ペプシン基質 (parent peptide: KPAEFFRL) とその一部のアミノ酸を置換した一連の合成基質 (KPAEFXRL、KPAGFXRL、KPAXFFRL) を用いて、ペプシンによる加水分解を行った (Table 7)。ペプシン基質 (KPAEFFRL) の加水分解活性は、LBPn 1-1 では  $3.14 \text{ nmol min}^{-1} (\mu\text{g protein})^{-1}$ 、LBPn 2-2 では  $20.6 \text{ nmol min}^{-1} (\mu\text{g protein})^{-1}$ 、Porine Pn A では  $9.48 \text{ nmol min}^{-1} (\mu\text{g protein})^{-1}$  であった。また、LBPn 1-1、2-2、Porine Pn A は共通して P'1 が芳香族アミノ酸の Trp、脂肪族アミノ酸の Ile、Leu のペプチド基質で他の P'1 を一連のアミノ酸で合成した基質と比べて高い加水分解活性を示した。一方で、芳香族、脂肪族アミノ酸に比べて各ペプシンの加水分解活性は低値を示したものの、P'1 が塩基性アミノ酸の Arg (KPAEFRRL)、Lys の場合 (KPAEFKRL)、LBPn 2-2 は、Porcine Pn A と比べて P'1Arg 合成基質 (KPAEFRRL) では 26 倍、P'1 Lys 合成基質 (KPAEFKRL) では 15 倍高い加水分解活性を示した。いずれのペプシンも、P'1Gly 合成基質 (KPAEFGRL) を加水分解しなかった (Table 7-1)。

ペプシンの基質認識部位は、Figure 9 で示したように模式的には一列で示されるが、実際は活性中心に対し、上下に交互に配置されており、S2 サイトは S'1 サイトと隣り合う (Dunn and Hung, 2000)。この基質認識部位の境界線は不明瞭であり、ペプチドのアミノ酸残基によって、P'1 のアミノ酸と S'1 サイトとの結合が多少弱くても、P2 のアミノ酸が S2 サイトと強く結合することにより、加水分解活性が高まると考えられている (Kageyama, 2002)。よって、P2 のアミノ酸残基もまた基質認識に対し影響が強い。P2 のアミノ酸残基に対する S2 の基質認識が強い場合、P'1 のアミノ酸残基に対する基質認識が弱くても加水

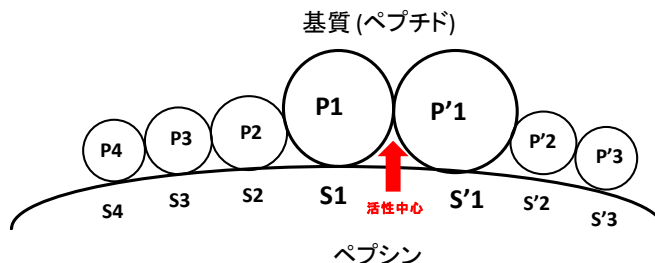


Figure 9. ペプシンの基質認識部位の模式図

ペプシン A タイプは、基質ペプチドの P' 3 から P4 の 7 つのアミノ酸残基を認識する。その相補となるペプシン側の基質認識部位を S' 1 から S4 で示す。ペプシンは基質ペプチドの P1、P' 1 のアミノ酸の間を加水分解する。

分解を行う可能性が考えられる。そこで、基質の P2 の影響を排除し、純粋な P'1 の影響を検討するため、P2 をグリシンとして合成した **KPAGFXRL** 基質を作成して加水分解を行った。いずれのペプシンにおいても、**KPAGFXRL** 基質は、**KPAEFXRL** 基質と比べて全体的に加水分解活性が 10 分の 1 程度低い傾向にあった。**KPAEFXRL** 基質と同様に、P'1 のアミノ酸残基が **Porine Pn A** では脂肪族、芳香族のアミノ酸を好んで加水分解し、P2 Gly P'1 Trp 合成基質 (**KPAGFWRL**) を最も強く加水分解した ( $5.14 \text{ nmol min}^{-1} (\mu\text{g protein})^{-1}$ )。一方で、**LBPn 2-2** は P'1 が脂肪族のアミノ酸のペプチドは殆ど加水分解を行わず、**Porine Pn A** と比べて有意に低値を示した。P'1 Arg 合成基質 (**KPAEFRRL**) と同様に、**LBPn 2-2** は **KPAGFRRL** 基質も **LBPn 1-1**、**Porine Pn A** に比べて有意に高い加水分解活性を示した ( $1.25 \text{ nmol min}^{-1} (\mu\text{g protein})^{-1}$ ) (Table 7-1)。

P2 の影響を排除した **KPAGFXRL** 基質では、全体的に活性が低値を示したことからも、P2 のアミノ酸がペプチドの基質認識にも影響を及ぼす可能性を示した。そこで、P2 のアミノ酸が加水分解に与える影響をさらに詳しく検討した。各ペプシンは **KPAXFFRL** のうち、P2 Phe 合成基質 (**KPAFFFRL**) において **KPAF↓FFRL**、**KPAFF↓FRL** (矢印は加水分解を受けた個所を示す) の 2 か所の加水分解がみられた。**KPAF↓FFRL** として得られた活性は、**KPAFF↓FRL** と比較すると僅かであった。そのため、**KPAFFFRL** における活性の値は **KPAFF↓FRL** における活性を算出した。**LBPn2-2** は P2 が脂肪族のアミノ酸のとき、**Porine Pn A** と同程度の活性を示した。一方で、P2 Arg 合成基質に対して、**LBPn 2-2** は  $10.1 \text{ nmol min}^{-1} (\mu\text{g protein})^{-1}$ 、**Porine Pn A** は  $5.11 \text{ nmol min}^{-1} (\mu\text{g protein})^{-1}$  と **LBPn 2-2** の方が有意に高い活性を示した (Table 7-2)。

**Table 7-1.** ペプシン基質と一連の合成基質の加水分解

substrate	sequence and cleavage site	Activity (nmol min <sup>-1</sup> (μg protein) <sup>-1</sup> )		
		LBPn 1-1	LBPn 2-2	Porcine Pn A
parent peptide	KPAEF↓FRL	3.14 ± 0.32	<b>20.6 ± 1.51</b>	9.48 ± 1.13
P'1 variants				
Trp <sup>6</sup> variant	KPAEF↓WRL	3.54 ± 0.41	<b>21.6 ± 2.97</b>	7.33 ± 0.48
Leu <sup>6</sup> variant	KPAEF↓LRL	3.60 ± 0.50	<b>15.0 ± 2.70</b>	4.87 ± 0.56
Ile <sup>6</sup> variant	KPAEF↓IRL	4.25 ± 1.01	<b>18.7 ± 3.04</b>	5.33 ± 0.81
Ala <sup>6</sup> variant	KPAEF↓ARL	2.07 ± 0.13	<b>5.57 ± 1.09</b>	2.53 ± 0.29
Gly <sup>6</sup> variant	KPAEF↓GRL	uc	uc	uc
Lys <sup>6</sup> variant	KPAEF↓KRL	0.18 ± 0.03	<b>2.96 ± 0.39</b>	0.20 ± 0.04
Arg <sup>6</sup> variant	KPAEF↓RRL	0.81 ± 0.03	<b>11.3 ± 0.70</b>	0.43 ± 0.06
P2-Gly and P'1 variants				
Gly <sup>4</sup> Trp <sup>6</sup> variant	KPAGF↓WRL	1.06 ± 0.34	6.41 ± 1.29	5.14 ± 0.56
Gly <sup>4</sup> Tyr <sup>6</sup> variant	KPAGF↓YRL	0.55 ± 0.07	2.38 ± 0.22	3.65 ± 0.17
Gly <sup>4</sup> Phe <sup>6</sup> variant	KPAGF↓FRL	0.38 ± 0.03	1.37 ± 0.48	4.84 ± 0.28
Gly <sup>4</sup> Leu <sup>6</sup> variant	KPAGF↓LRL	0.16 ± 0.01	0.20 ± 0.05	3.93 ± 0.15
Glu <sup>4</sup> Val <sup>6</sup> variant	KPAGF↓VRL	0.10 ± 0.00	0.22 ± 0.05	4.03 ± 0.62
Gly <sup>4</sup> Ala <sup>6</sup> variant	KPAGF↓ARL	0.07 ± 0.00	0.11 ± 0.01	1.59 ± 0.25
Gly <sup>4</sup> Met <sup>6</sup> variant	KPAGF↓MRL	0.42 ± 0.04	0.98 ± 0.17	4.83 ± 0.97
Gly <sup>4</sup> Asn <sup>6</sup> variant	KPAGF↓NRL	0.07 ± 0.01	0.16 ± 0.02	0.25 ± 0.02
Gly <sup>4</sup> Gln <sup>6</sup> variant	KPAGF↓QRL	0.05 ± 0.04	0.13 ± 0.00	0.10 ± 0.01
Gly <sup>4</sup> Asp <sup>6</sup> variant	KPAGF↓DRL	0.07 ± 0.02	0.12 ± 0.02	0.18 ± 0.03
Gly <sup>4</sup> Glu <sup>6</sup> variant	KPAGF↓ERL	0.13 ± 0.02	0.24 ± 0.02	0.44 ± 0.05
Gly <sup>4</sup> Lys <sup>6</sup> variant	KPAGF↓KRL	0.06 ± 0.01	<b>0.28 ± 0.02</b>	0.05 ± 0.01
Gly <sup>4</sup> Arg <sup>6</sup> variant	KPAGF↓RRL	0.20 ± 0.02	<b>1.25 ± 0.37</b>	0.22 ± 0.01

反応は 0.5 M sodium formate buffer, pH 4.0 で 20°C、30 分間行った。値は 3 回測定した後の平均 ± 標準偏差を算出した。また、LBPn 2-2 の太字は、値が Porcine Pn A と比べて有意に高い値を示した ( $P < 0.05$ )。uc はペプチドの分解活性が 0.02 nmol min<sup>-1</sup> (μg protein)<sup>-1</sup> 以下であったことを示す。表は Miura ら (2016) の Table 1 を一部改変した。

**Table 7-2.** ペプシン基質と一連の合成基質の加水分解

	sequence and	Activity (nmol min <sup>-1</sup> (μg protein) <sup>-1</sup> )		
substrate	cleavage site	LBPn 1-1	LBPn 2-2	Porcine Pn A
P2 variants				
Trp <sup>4</sup> variant	KPAWF↓FRL	0.84 ± 0.23	2.90 ± 0.37	12.6 ± 0.96
Tyr <sup>4</sup> variant	KPAYF↓FRL	1.27 ± 0.28	4.15 ± 0.57	8.72 ± 1.21
Phe <sup>4</sup> variant	KPAFF↓FRL	1.51 ± 0.61	5.60 ± 0.79	21.8 ± 2.32
Leu <sup>4</sup> variant	KPALF↓FRL	3.72 ± 1.30	15.2 ± 0.33	15.6 ± 0.57
Ile <sup>4</sup> variant	KPAIF↓FRL	3.03 ± 0.86	9.37 ± 0.51	11.9 ± 1.72
Val <sup>4</sup> variant	KPAVF↓FRL	2.73 ± 0.88	8.75 ± 0.59	9.01 ± 0.83
Ala <sup>4</sup> variant	KPAAF↓FRL	2.61 ± 0.57	8.86 ± 0.85	8.92 ± 3.64
Asn <sup>4</sup> variant	KPANF↓FRL	1.56 ± 0.44	3.88 ± 0.51	7.52 ± 1.99
Gln <sup>4</sup> variant	KPAQF↓FRL	2.96 ± 1.20	12.0 ± 0.98	9.93 ± 2.88
Asp <sup>4</sup> variant	KPADF↓FRL	2.35 ± 0.67	6.16 ± 0.61	11.2 ± 1.91
Lys <sup>4</sup> variant	KPAKF↓FRL	0.97 ± 0.30	5.46 ± 1.93	3.93 ± 1.51
Arg <sup>4</sup> variant	KPARF↓FRL	1.99 ± 0.57	<b>10.1 ± 1.88</b>	5.11 ± 0.76

反応は 0.5 M sodium formate buffer, pH 4.0 で 20°C、30 分間行った。値は 3 回測定した後の平均 ± 標準偏差を算出した。太字は LBPn 2-2 が Porcine Pn A と比べて有意に高い値を示した ( $P < 0.05$ )。表は Miura ら (2016) の Table 1 を一部改変した。

### 3-8. バスペプシノゲン cDNA クローニングによる一次構造の決定

オオクチバスペプシノゲンの cDNA 配列の全 13 クローンから LBPgn 1 (3 クローン)、LBPgn 2 (3 クローン)、LBPgn 3 (7 クローン) に対応する配列を決定した。決定した配列は N 端アミノ酸配列の類似度から、それぞれ LBPgn 1、2、3 に対応することを確認した。各 cDNA の全長は LBPgn 1 では 1134 bp、LBPgn 2 では 1128 bp、LBPgn 3 では 1158 bp であった (Supplement figure 3, 4, 5)。BLAST 検索により、オオクチバスペプシノゲンの cDNA 配列は Mandarin fish (*Siniperca chuatsi*)、Golden mandarin fish (*Siniperca scherzeri*) と相同性が非常に高く、LBPgn 1 では Mandarin fish A1 (EU807925)、Golden mandarin fish A1 (EU807926) で各 92%の相同性を示した。LBPgn 2 では Mandarin fish A2 (FJ463155)、Golden mandarin fish A2 (EU807927) と各 90%、Snakehead (*Channa argus*) A (GQ303143) とは 88%の相同性を示した。LBPgn 3 では Mandarin fish C (EU807929)、Golden mandarin fish C (EU807928) と各 91%の相同性を示した。

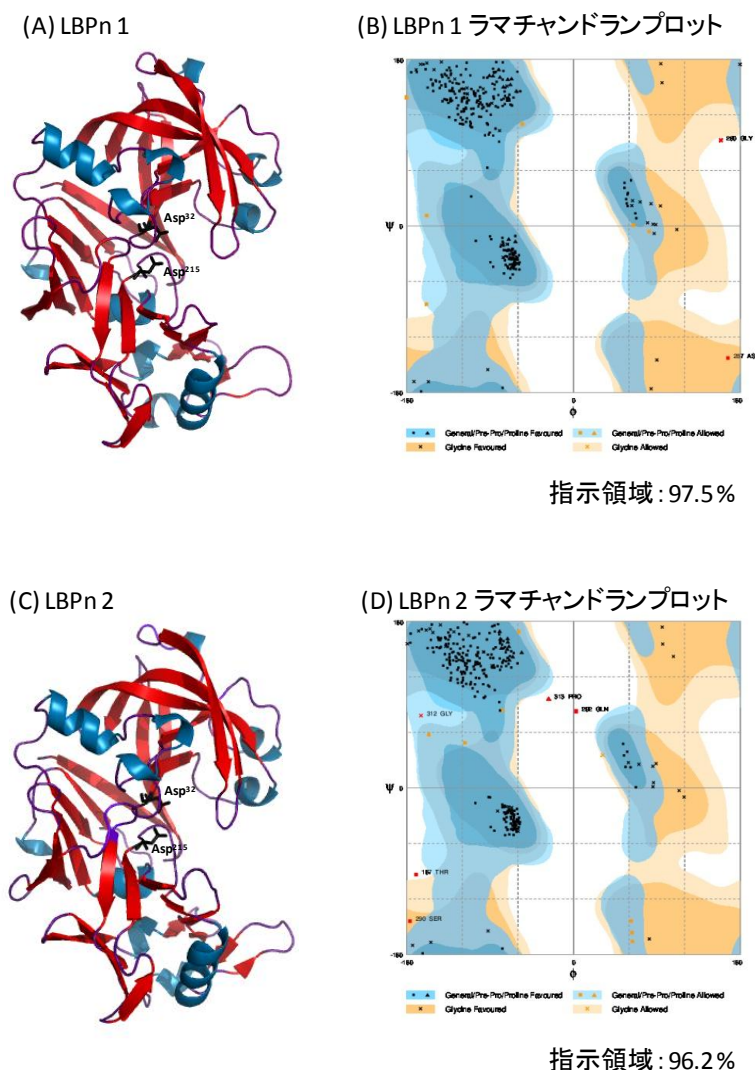
実験により得られたバスペプシノゲンの塩基配列と GenBank/EMBL/DDBJ より取得したペプシノゲン配列を併せて多重配列を行った (Figure 10)。配列は LBPgn 1 (Bass\_1, LC068952)、2 (Bass\_2, LC068953)、3 (Bass\_3, LC068954) および、Mandarin fish A1 (Mandarin\_A1, EU807925)、A2 (Mandarin\_A2, FJ463155)、Snakehead (GQ303143)、Tuna 1 (AB440200)、2 (AB440201)、3 (AB440203)、Human A (J00279-J00287)、C (J004443)、Pig A (J04601)、Cattle Y (AJ131677) のペプシノゲンの cDNA および genomic DNA を用いた。cDNA の塩基配列から演繹されるペプシノゲンのアミノ酸配列を比較すると、魚類ペプシンの A1、A2 タイプおよび、Cattle Y は、四足動物型ペプシン A タイプや C タイプ (fish ペプシン C を含む) と比較し、S'1 基質認識部位である 290 残基から 294 残基までに配列の欠損、置換が数多くみられた。





### 3-9. バスペプシンの立体構造モデルの構築

Human Pn A、Porine Pn A、Atrantic cod Pn A の X 線構造解析を基に、LBPn 1、2 の一次構造からバスペプシンの三次構造のモデリングを行った (Figure 11 (A: LBPn 1, C: LBPn 2))。ラマチャンドランプロットからも、作成した LBPn 1、2 の立体構造モデルは各 97.5%、96.2%が支持領域に入る構造であることが示された (Figure 11 B, D)。

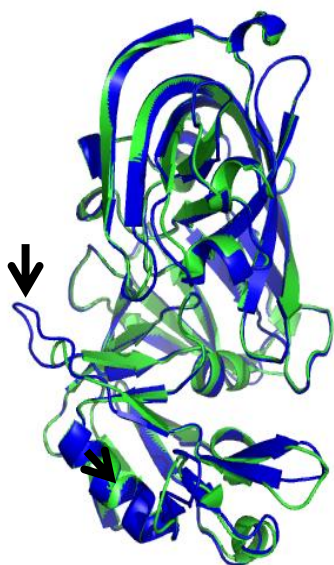


**Figure 11.** オオクチバスペプシンの三次構造モデリング

オオクチバスペプシンの三次構造モデリングは、Modeller 9.12 を用いて作成した。モデルには Human A (PDB: 3UTL)、Porcine A (PDB: 5PEP)、Atrantic cod A (PDB: 1AM5) を用いた。作成した LBPn 1、LBPn 2 の PDB ファイルは RAMPAGE のラマチャンドランプロットを作成した。LBPn 1、LBPn 2 の立体構造は各 (A)、(C)、LBPn1、LBPn 2 のラマチャンドランプロットを各 (B)、(D) に示した。ペプシンの立体構造は $\alpha$ -helix を青、 $\beta$ -sheet を赤色、その他を紫色で示し、活性中心の Asp<sup>32</sup> と Asp<sup>215</sup> はそれぞれ黒で示した。図は Miura ら (2016) の Figure 2 を一部改変した。

オオクチバスペプシン (LBPn 1: 緑、LBPn 2: 赤) の立体構造モデリングに Porine Pn A (5PEP: 青) を重ね合せた図を示した (Figure 12)。大部分の個所で LBPn 1、2 は Porine Pn A の構造と一致したが、一部、一致しない個所もみられた。大きくずれの生じている S'1 loop (residues: 289-299) の箇所を矢印で示した。オオクチバスペプシンは、290 残基から 294 残基にかけて欠損がみられる (Figure 10)。これらのアミノ酸残基の欠損は S'1 loop の形成に影響を与えており、LBPn 1、2 の S'1 サイトにある S'1 loop が Porine Pn A と比べて縮小していることが明らかとなった。

(A) LBPn 1



(B) LBPn 2

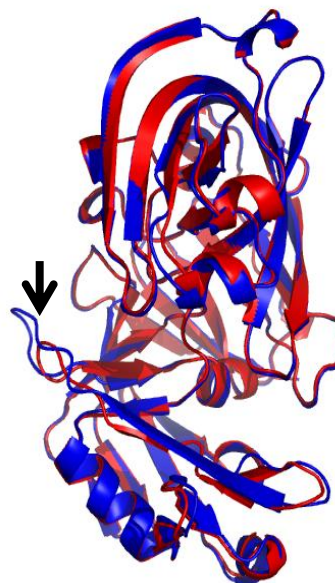


Figure 12. バスペプシンとブタペプシンの重ね合わせ

作成した LBPn 1、2 の立体構造に Porine Pn A (5PEP) を重ね合わせた。LBPn 1 を緑色で (A)、LBPn 2 を赤色で (B) に示し、Porine Pn A は青色で示した。各バスペプシン、ブタペプシンの構造に大きくずれが生じた個所を矢印で示した。図は Miura ら (2016) の Figure 2 を一部改変した。

### 3-10. バスペプシンの熱力学的特性

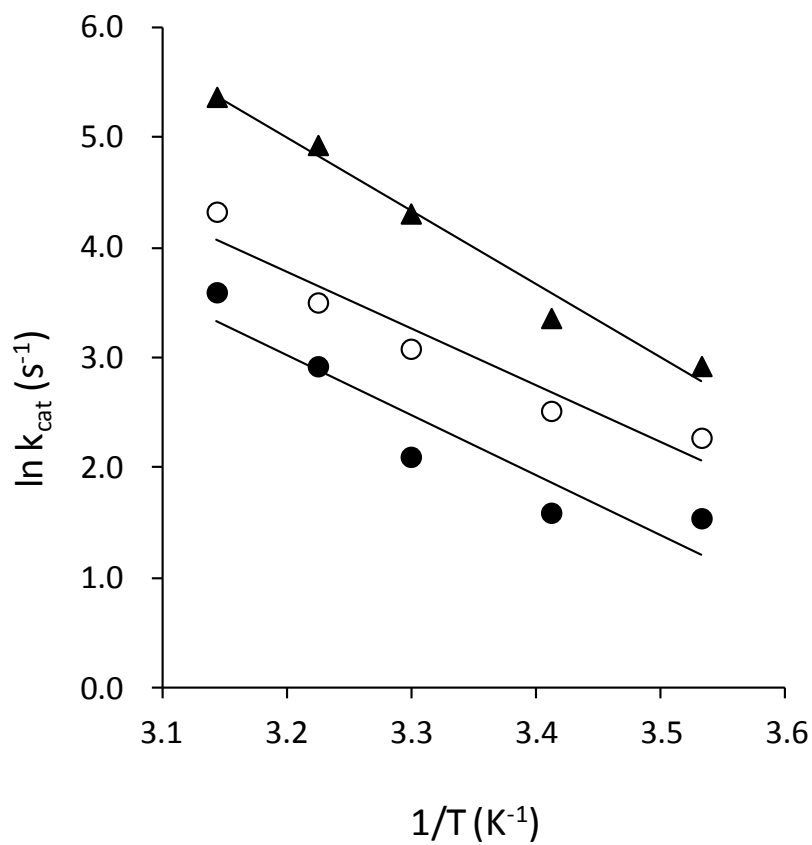
ペプシン基質 (KPAEFFRL) と LBPn 1-1、2-2 および Porine Pn A を 10-45°C で反応させ、各温度の  $K_m$  値、 $k_{cat}$  値を算出した (Table 8)。1/温度 ( $K^{-1}$ ) に対する各ペプシンの  $\ln k_{cat}$  をプロットし (Figure 13)、算出したアレニウスの式を用いて、LBPn 1-1、2-2、Porine Pn A の  $\Delta H^\ddagger$ 、 $\Delta S^\ddagger$ 、 $\Delta G^\ddagger$  の値を求めた (Table 9)。37°C における LBPn 2-2 の  $\Delta S^\ddagger$  は -0.035 kJ/mol で、Porine Pn A の -0.085 kJ/mol より高値を示した。 $\Delta H^\ddagger$  と  $\Delta S^\ddagger$  から  $\Delta G^\ddagger$  を算出したところ、LBPn 1-1、LBPn 2-2 はそれぞれ 68.5、63.3 kJ/mol であり、Porine Pn A の

$\Delta G^\ddagger$ は 67.0 kJ/mol であった。LBPn 2-2 の  $\Delta G^\ddagger$ は Porine Pn A 比べると低い値を示す傾向にあったが、LBPn 1-1 の  $\Delta G^\ddagger$ は Porine Pn A より高い値を示した。

**Table 8.** ペプシン基質に対する LBPn 1-1、2-2 および Porine Pn A の反応速度

	LBPn 1-1	LBPn 2-2	Porine Pn A
10°C			
$K_m$ (mM)	0.30 ± 0.27	0.10 ± 0.05	0.14 ± 0.03
$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	4.69 ± 2.73	<b>18.7 ± 3.46</b>	9.73 ± 2.89
$k_{cat}/K_m$ (mM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	19.9 ± 7.25	<b>218.5 ± 67.6</b>	70.2 ± 10.74
20°C			
$K_m$ (mM)	0.20 ± 0.19	0.11 ± 0.04	0.10 ± 0.10
$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	4.92 ± 0.82	<b>28.9 ± 8.81</b>	12.4 ± 5.33
$k_{cat}/K_m$ (mM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	36.8 ± 19.97	<b>283.0 ± 42.0</b>	186.2 ± 91.7
30°C			
$K_m$ (mM)	0.05 ± 0.00	0.12 ± 0.01	0.04 ± 0.03
$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	8.19 ± 0.74	<b>74.7 ± 2.49</b>	21.9 ± 5.67
$k_{cat}/K_m$ (mM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	164.6 ± 6.61	<b>604.8 ± 55.4</b>	475.4 ± 95.7
37°C			
$K_m$ (mM)	0.08 ± 0.01	0.14 ± 0.05	0.06 ± 0.01
$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	18.6 ± 0.89	<b>139.2 ± 40.2</b>	33.3 ± 5.24
$k_{cat}/K_m$ (mM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	251.3 ± 30.2	<b>999.6 ± 68.2</b>	598.9 ± 42.3
45°C			
$K_m$ (mM)	0.13 ± 0.04	0.24 ± 0.12	0.06 ± 0.01
$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	36.5 ± 7.35	<b>215.5 ± 78.8</b>	75.9 ± 1.56
$k_{cat}/K_m$ (mM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	286.3 ± 24.8	959.9 ± 250.4	1306.2 ± 208.1

ペプシン基質 (KPAEFFRL) を用いて、各ペプシンと 10–45°C で 30 分間反応させた。反応は 0.25 M sodium formate buffer, pH 4.0 で行った。値は 3 回測定した後の平均 ± 標準偏差を算出した。太字は LBPn 2-2 が Porine Pn A と比べて有意に高い値を示した ( $P < 0.05$ )。表は Miura ら (2016) の Table 2 を一部改変した。



**Figure 13.** ペプシン基質を用いた  $k_{\text{cat}}$  に対するアレニウスプロット

ペプシン基質 (KPAEFFRL) は、活性化したペプシンと 10–45°C で 30 分反応させた。算出した反応速度から、 $1/T$  (K<sup>-1</sup>) に対する  $\ln k_{\text{cat}}$  をプロットした。LBPn1-1 (●), LBPn 2-2 (▲) および porcine pepsin A (○) として示した。

**Table 9.** 各ペプシンにおける熱力学的エネルギー

Enzyme	Ea (kJ/mol)	$\Delta H^\ddagger$ (kJ/mol)	$\Delta S^\ddagger$ (kJ/mol)	$\Delta G^\ddagger$ (kJ/mol)
10°C				
LBPn 1-1	44.3	42.0	-0.083	65.6
LBPn 2-2	55.0	52.7	-0.034	62.3
Porcine Pn A	42.3	39.9	-0.085	63.9
20°C				
LBPn 1-1	45.8	43.3	-0.084	67.9
LBPn 2-2	55.4	53.5	-0.035	63.6
Porcine pepsin A	43.2	40.7	-0.085	65.6
30°C				
LBPn 1-1	46.0	43.5	-0.084	69.0
LBPn 2-2	55.4	52.9	-0.035	63.4
Porcine Pn A	43.2	40.7	-0.085	66.5
37°C				
LBPn 1-1	44.6	42.1	-0.085	68.5
LBPn 2-2	55.1	52.5	-0.035	63.3
Porcine Pn A	43.6	41.0	-0.084	67.0
45°C				
LBPn 1-1	44.4	41.7	-0.084	68.6
LBPn 2-2	55.3	52.7	-0.035	63.9
Porcine Pn A	42.1	39.4	-0.086	66.6

Table 8 で算出した反応速度から、1/温度 (K<sup>-1</sup>) に対する  $\ln k_{\text{cat}}$  をプロットし、アレニウスの式を用いて 20°C における  $\Delta H^\ddagger$ 、 $\Delta S^\ddagger$ 、 $\Delta G^\ddagger$  をそれぞれ求めた。表は Miura ら (2016) の Table 3 を一部改変した。

### 3-11. オオクチバスペプシノゲンの分子進化

オオクチバスペプシノゲンの分子進化は Bayes 法を用いて検討した (Figure 14)。配列は、3-8 で得られたバスペプシノゲンの塩基配列と GenBank/EMBL/DDBJ より取得した魚類、鳥類、両生類、哺乳類のペプシノゲンおよび、アウトグループとしてヒト、ウサギのカテプシン E の合計 70 種類を用いた。作成した分子系統樹より、ペプシノゲンは祖先型から A タイプ、C タイプに分岐し、A タイプには fish A タイプ、四足動物 A、F、Y タイプが含まれた。一方、C タイプには fish C タイプ、四足動物 C、B タイプの系統が存在した。Fish A タイプは、fish A1、A2 が単一系統で存在する可能性が高い事後確率で得られた。加えて、fish A タイプには Spotted gar および Coelacanth のペプシノゲンもサブタイプの 1 つとして存在することが明らかとなった。LBPgn 1、LBPgn 2、LBPgn 3 はそれぞれ fish A1、fish A2、fish C タイプに分類された。

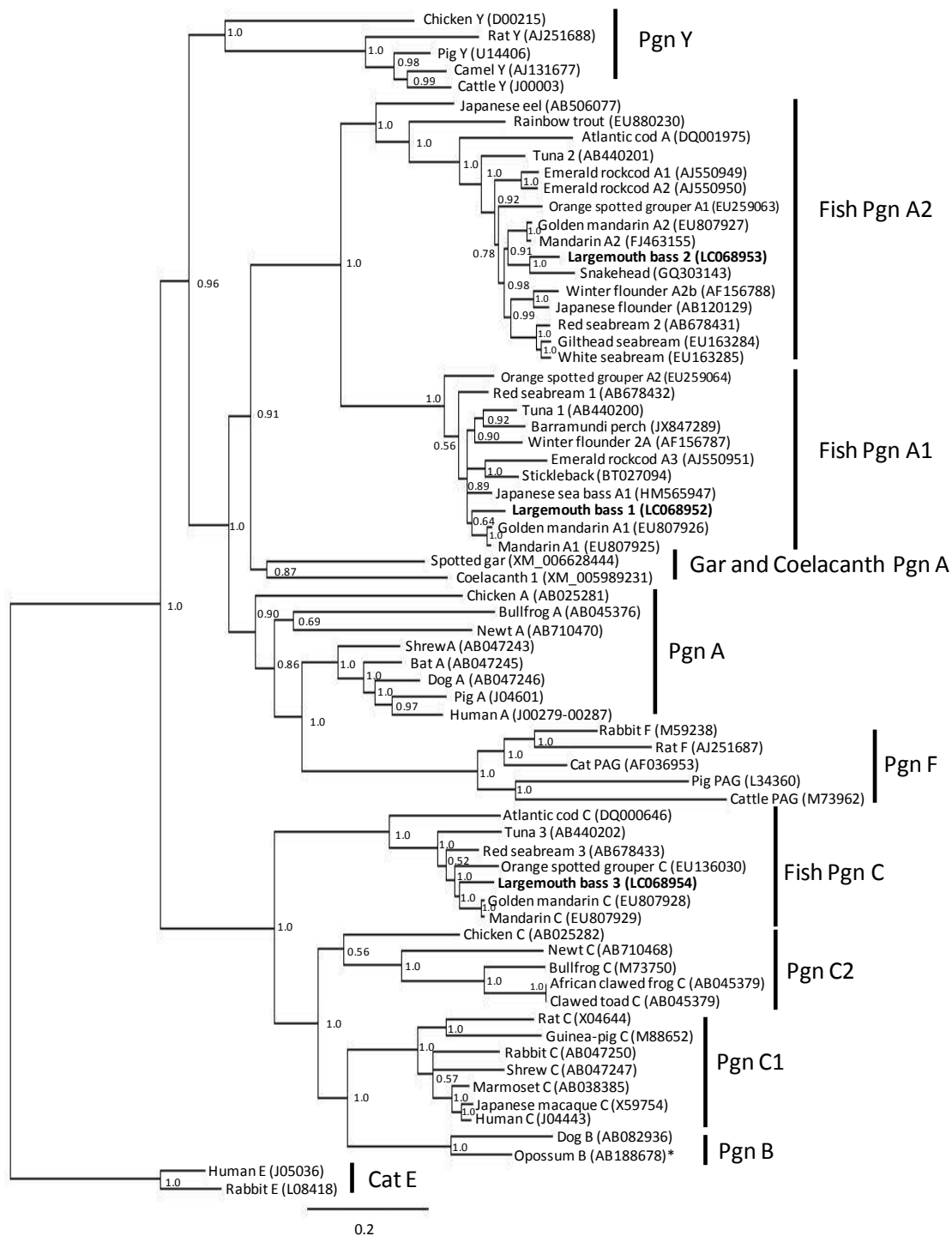
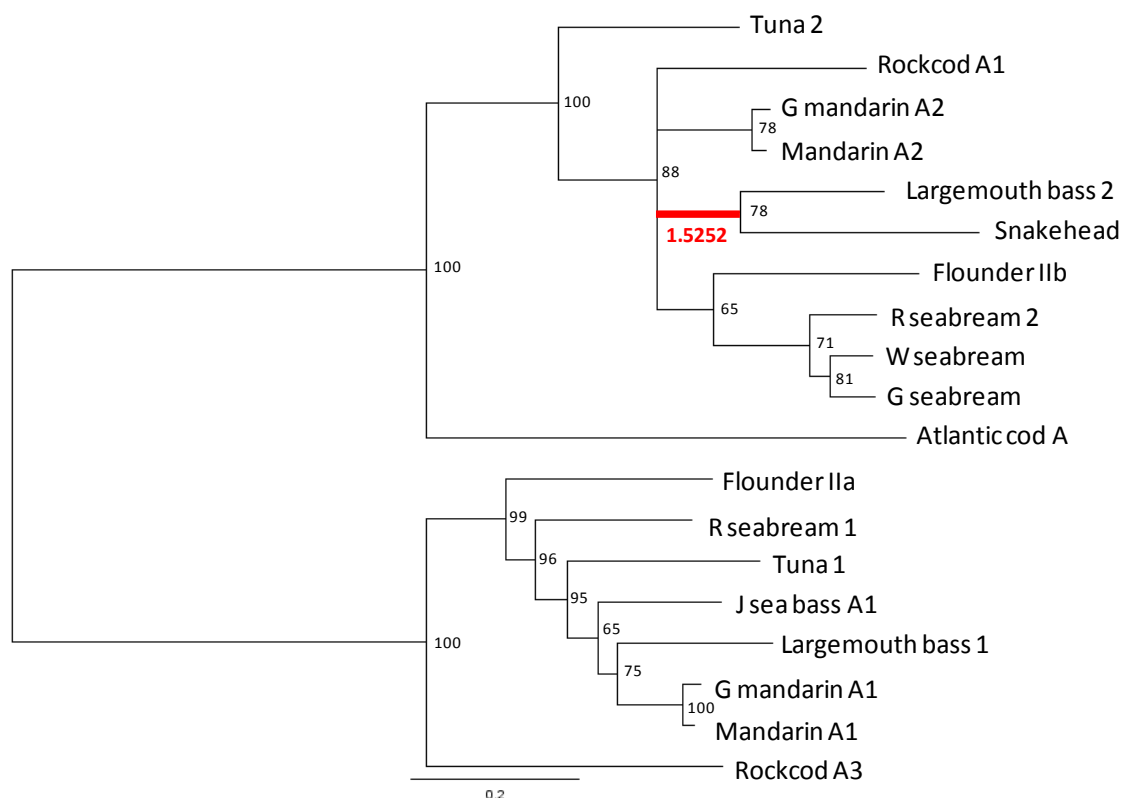


Figure 14. ペプシノゲン cDNA の系統樹

決定したバスペプシノゲンおよび GenBank/EMBL/DBJ より取得した合計 68 種類のペプシノゲン、カテプシン E の塩基配列を併せて多重配列した後、Bayes 法で系統樹を作成した。アウトグループには Human、Rabbit カテプシン E を用いた。系統樹の各内部枝における数値は、事後確率に基づく結果を示した。図は Miura ら (2016) の Figure 3 を引用した。



魚類におけるペプシノゲン分子進化の詳細を検討するため、19 種類の魚類ペプシノゲン A タイプを用いて、ML 法で分子系統樹を作成した。作成した系統樹から、Branch models を用いて、非同義置換と同義置換の比 ( $d_N/d_S (= \omega)$ ) を算出した (Figure 15)。Branch models により計算した  $\omega$  の値を各枝の下に赤字で示した。各枝における  $\omega$  値は 0.2179 を示したが、赤い太線で示した Largemouth bass 2 および Snakehead が分岐した枝において  $\omega$  値が 1.5252 を示した。また、進化速度がすべての系統で均一であるというモデル系統樹を作成し、Branch models 作成した系統樹との対数尤度を比較検討したところ、カイ二乗値 14.6、P 値 0.00014 であり、1%の水準で有意な差が認められた。



**Figure 15.** 魚類ペプシノゲンの cDNA 配列を基に解析した ML 系統樹

19 種類の魚類ペプシノゲン cDNA 配列を用いて、tree-puzzle-5.2 を用いて ML 系統樹を作成した後、PAML (Yang, 2007) をもちいて、Branch models による尤度検定を行った。分岐点の数値は tree-puzzle-5.2 の 1000 回サンプリングした quartet puzzling の値を示す (%)。枝下の赤字は  $d_N/d_S (= \omega)$  の値を示し、 $d_N/d_S$  の値が 1.5252 を示した Largemouth bass 2 と Snakehead は太く示した。

## 第四章 考察

### オオクチバスペプシノゲンの高いタンパク質分解能

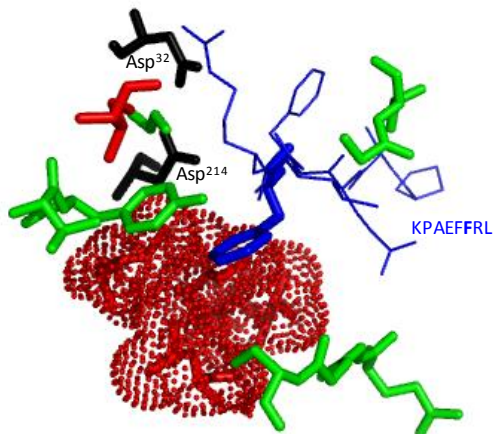
本研究では、オオクチバスの胃よりペプシノゲンを精製し、その構造、特異性、分子進化に関する検討を行った。ペプシノゲンの抽出・精製の結果、バスペプシノゲンのアイソザイムは fish A1 (LBPgn 1) が 2 種類、fish A2 (LBPgn 2) では 3 種類、fish C (LBPgn 3) では 1 種類の合計 6 種類を得た (Table 3)。現在まで報告されている魚類のペプシノゲンは fish pepsinogen A1、A2、C の分類において各 1 種類であるという Tuna (Tanji et al., 1988)、Snakehead (Chen et al., 2009) の他、Mandarin fish (Zhou et al., 2008) や Seabream (Zhou et al., 2007) では 4 種類のアイソザイムの存在が報告されている。これらのことから、バスペプシノゲンは他の魚類と比べてアイソザイムの数が多いといえる。アイソザイムの数が増えることは、多様な摂食行動をする動物にとって基質特異性が広がり (Narita et al., 2000)、遺伝子の重複により酵素のタンパク量を増加させることも意味し、食物を消化するうえで有利に働くと考えられている (Carginale et al., 2004a, b)。いいかえると、オオクチバスは他の魚類と比べ、一次に多量のペプシノゲンを生成することが可能であると考えられ、より消化能に長けているといえる。

さらに、バスペプシノゲンの中でも LBPgn 1-1、2-2 の潜在比活性は各 51、118 units/mg protein であり、非常に高い潜在比活性を有していた。哺乳類の比活性は 20 units/mg protein を示すことが多く、これまで最も高い比活性を有するのは Tuna 2 の 41.5 units/mg protein であるされていた (Tanji et al., 1988) (Table 4)。現在報告されている魚類ペプシンの hemoglobin 基質に対する触媒効率を比較したところ、LBPn 1-1、2-2 は、hemoglobin, pH 3.0 に対する  $k_{cat}/K_m$  値が最も高い値を示した。オオクチバスを除く他の魚類の中で最も高い  $k_{cat}/K_m$  値を示していた Atlantic cod pepsin IIa と比較しても、LBPn 1-1、2-2 は 2 倍から 5 倍近く高い値を示した (Table 6)。以上のことから、オオクチバスペプシンは哺乳類だけでなく、魚類の中においても非常に加水分解能に特化した酵素である可能性が示された。

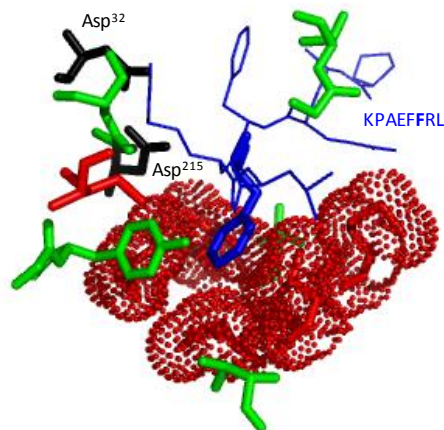
### オオクチバスペプシンの構造と基質特異性

LBPgn 1-1、2-2 は一次構造から、オオクチバスに限らず、他の fish pepsinogen A タイプも含め、基質認識部位の S'1 サイトを構成するアミノ酸残基の欠損や Gly への置換がみられた (residues: 289-299, Figure 10)。加えて、LBPn 1-1、2-2 と Porcine Pn A (SPEP) の立体構造モデリングを重ね合せた結果からも、LBPn 1、2 は S'1-loop が小さい構造であると予測された (Figure 12)。通常、基質認識部位の S1、S'1 サイトは対応するペプチドの P1、P'1 のアミノ酸残基を認識し、その間のペプチド結合を加水分解する。そのため、S1、S'1 サイトにおける基質認識は非常に重要であると考えられる。さらに、S1 サイトは動物種間で S1 サ

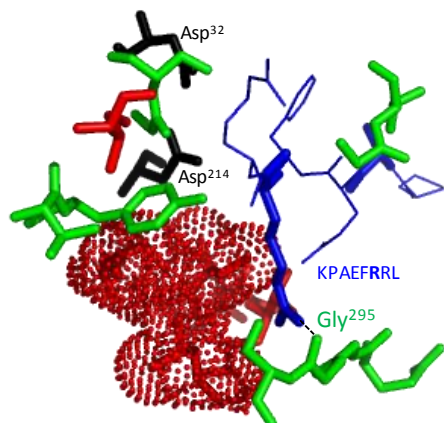
(A) LBPn 2とKPAEFFRLの結合



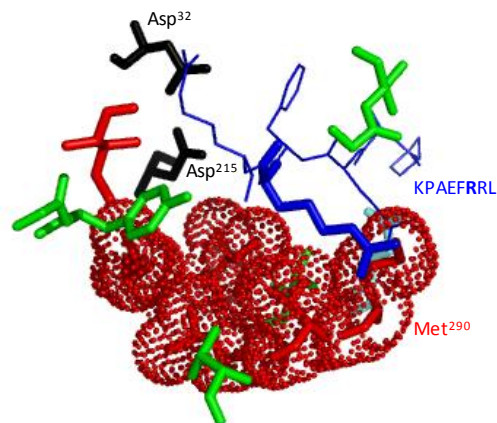
(B) Porcine AとKPAEFFRLの結合



(C) LBPn 2とKPAEFRRLの結合



(D) Porcine AとKPAEFRRLの結合

**Figure 16.** LBPn 2、Porcine Pn Aの基質結合モデリング

ペプシンの基質結合部位と三次構造モデリングは、Modeller 9.12 を用いて作成した。(A) LBPn 2、(B) Porcine Pn A (5PEP) は基質 KPAEFFRL と結合させ（青）、基質の P' 1 部位の Phe は太く示した。(C) LBPn 2、(D) Porcine Pn A (5PEP) は基質 KPAEFRRL と結合させ（青）、基質 P' 1 部位の Arg を太く示した。ペプシンの基質結合部位は、非極性アミノ酸を赤色、極性無電化アミノ酸を緑色で示した。また、活性中心の Asp<sup>31</sup> と Asp<sup>215</sup> はそれぞれ黒で示した。ドットは分子表面を示す。図は Miura ら (2016) の Figure 6 を一部改変した。

を構成するアミノ酸残基の保存性が高い (Figure 10)。一方で、S'1 サイトを構成するアミノ酸は、fish A と同様に Y タイプにおいても置換、欠損がみられることが既に報告されている (Kageyama et al., 2010)。このことから、fish A タイプは Y タイプと類似した基質特異性を有

する可能性が考えられた。そこで、ペプシン基質 (KPAEFFRL) と一連のアミノ酸合成基質

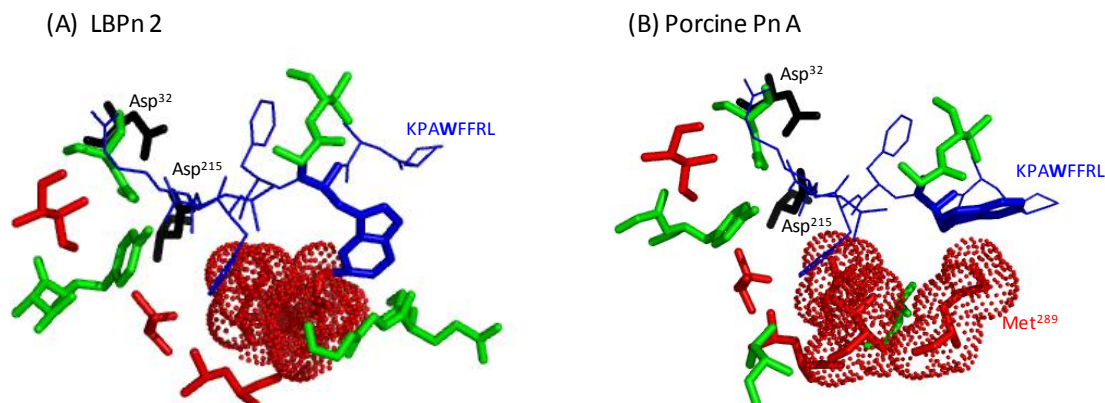


Figure 17. LBPn 2、Porcine A の基質結合モデリング

ペプシンの基質結合部位と三次構造モデリングは、Modeller 9.12 を用いて作成した。(A) LBPn 2、(B) Porcine A (5PEP) は基質 KPAWFFRL と結合させ (青)、P2 の Trp は太く示した。ペプシンの基質結合部位は、非極性アミノ酸を赤色、極性無電化アミノ酸を緑色で示した。また、活性中心の Asp<sup>31</sup> と Asp<sup>215</sup> はそれぞれ黒で示した。ドットは分子表面を示す。

を用いて (KPAEFXRL、KPAGFXRL、KPAXFFRL)、詳細なバスペプシンの基質特異性の検討を行った。その結果、バスペプシンと Porcine Pn A は、共に P1、P'1 が疎水性、芳香族アミノ酸の基質を強く加水分解した (Table 7-1、7-2)。加えて、P'1 が塩基性アミノ酸の Arg、Lys の場合、LBPn 2-2 は、Porcine Pn A と比べて P'1Arg 合成基質 (KPAEFFRRL) では 26 倍、P'1 Lys 合成基質 (KPAEFKRL) では 15 倍高い加水分解活性を示した。これらのことから、バスペプシンは疎水性アミノ酸残基だけでなく、塩基性のアミノ酸残基も認識できる可能性が示された。このバスペプシンの特性を立体構造上からさらに検討を行うため、LBPn 2 および、Porcine Pn A にそれぞれペプシン基質 (KPAEFFRL)、P'1Arg 合成基質 (KPAEFFRRL) を結合させた立体構造モデリングを作成した。その結果、LBPn 2 の S'1 サイトは一次構造の欠損、置換により疎水部分の構成領域が Porcine Pn A と比べて狭くなっていることが予測された (Figure 16)。LBPn 2 とペプシン基質を結合させた際は、S'1 サイトの非極性部分と基質の P'1 Phe が疎水相互作用により結合する可能性が示された (Figure 16 A)。一方、LBPn 2 と P'1Arg 合成基質の結合予測では、基質の P'1Arg は LBPn 2 の S'1 サイトの最外殻に当たる Gly<sup>295</sup> の酸素原子と水素結合していると予測された (Figure 16 C)。LBPn2 にみられた結合の様子と同様の特徴が Y タイプにおいても報告されている (Kageyama et al., 2010)。立体構造モデリングの結果から、バスペプシンが広い基質特異性を示したのは S'1 loop 部分の Gly への置換、アミノ酸残基の欠損により成り得たことに起因する可能性が推察された。

ペプシンの基質認識部位は、模式的には一列で示されるが、実際は活性中心に対し、上下に交互に配置されているため、S2 サイトは S'1 サイトと隣り合う (Dunn and Hung,

2000)。よって、P2 のアミノ酸残基もまた基質認識に多大な影響を与える。P2 合成基質を用いた加水分解において、LBPn 1-1、2-2 は大きな側鎖である P2 Phe、Tyr、Trp 合成基質では LBPn 1-1、2-2 は Porine Pn A と比べて 3~4 倍低い活性を示した (Table 7-2)。LBPn 2-2、Porine Pn A を KPAWFFRL と結合させた立体構造モデリングを作成した結果、Porine Pn A では、P2 Trp と S2 サイトを構成する Met<sup>289</sup> が疎水性相互作用により結合をしている可能性が示された。一方、LBPn 2-2 では一次構造の 280 残基から 300 残基にかけての配列の欠損、置換により、P2 Trp が S2 サイトを構成するアミノ酸残基と疎水相互作用を形成しづらいことがモデリングされた (Figure 17)。LBPn 2-2 は、Porine Pn A と比べて S2 サイトが小さくなり、大きな側鎖を有するアミノ酸が疎水結合しづらい可能性が予想された。以上の結果から、fish A タイプに共通してみられる一次構造の 280 残基から 300 残基にかけての配列の欠損、置換は、四足動物型ペプシンの基質特異性と異なる性質を有する要因の 1 つであることが明らかとなった。

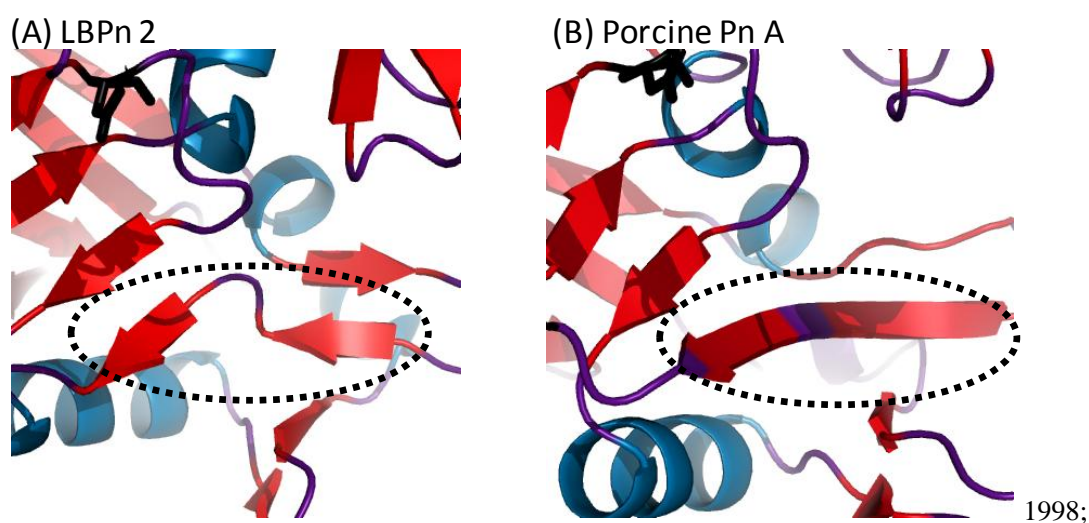
#### バスペプシンの反応速度論的解析および熱力学的特性

酵素活性は温度に強く影響される。動物種により酵素の至適温度は異なり (Low et al, 1973)、魚類のペプシンは至適温度が四足動物のペプシンより低いと報告されている (Gildberg et al., 1990; Brier et al., 2007)。LBPn 1-1、2-2 も同様に、Porine Pn A と比べて至適温度が低いことから、魚類のペプシンは低温適応をしているといえる (Zao et al., 2011)。速度論的にみると、このように至適温度が低い酵素は、高い触媒作用 ( $k_{cat}$ ) を有することに加え (Siddiqui and Cavicchioli, 2006)、 $K_m$  値が高い傾向にあり、基質との結合が弱いと示されている (Fields and Somero, 1998; Suzuki et al, 2001)。LBPn 2-2 の  $k_{cat}$  値はすべての温度で Porine Pn A と比べて有意に高い値を示した (Table 8)。LBPn 2-2 の  $K_m$  値は、反応温度が 30°C を超えると Porine Pn A と比べて高い値を示すようになった。これらの結果は、一次構造上、S'1 サイトを構成するアミノ酸残基が Gly への置換や欠損から基質との相互作用を低下させていると考えられる。以上の結果から、オオクチバスペプシンは高い触媒能力を有し、かつ低温適応酵素の特徴を備えていることが示唆された。

$k_{cat}$  値は酵素が基質と複合体を形成し、遷移状態となるとときに生じる活性化ギブスエネルギー ( $\Delta G^\ddagger$ ) と深く関わる。低温適応酵素の高い触媒作用は、ギブスの自由エネルギーの減少により生じることが示されている (Low et al, 1973; Feller et al., 1992)。活性化ギブスエネルギーは活性化エンタルピー ( $\Delta H^\ddagger$ ) と活性化エントロピー ( $\Delta S^\ddagger$ ) から算出される (Low et al., 1973)。魚類ペプシンは至適温度が低下していることから (Gildberg et al., 1990; Brier et al., 2007)、低温適応酵素である可能性が考えられるが、その原因となり得る活性化自由ギブスエネルギーは、まだ検討されていない。オオクチバスペプシンの活性化ギブスエネルギー ( $\Delta G^\ddagger$ ) を検討したところ、LBPn 2-2 では Porine Pn A と比べて低値を示した (Table 9)。このような活性化ギブスエネルギーの低下は、構造の柔軟性が増すことで見出され、中



でも構造上の loop 構造の形成によるところが大きいことが示されている (Fields and Somero,



**Figure 18.** S' 1 基質認識部位の立体構造の違い

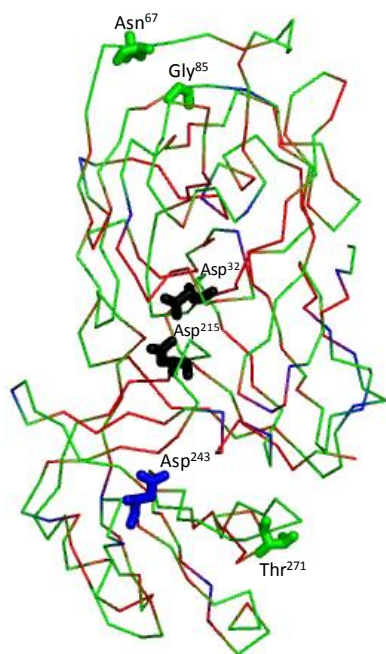
LBPn 2 (A) および Porcine Pn A (B) の S' 1 基質認識部位の立体構造を示した。破線は LBPn 2 と Porcine Pn A で構造に違いのあった個所を示した。 $\alpha$ -helix は青、 $\beta$ -sheet は赤、ループ構造は紫で示した。

Malabanan et al., 2010; Isaksen et al., 2014)。ブタペプシンでは $\beta$ -sheet 構造を有する箇所が、LBPn 2-2 においては loop 構造へ変化しているとモデリングにより予測された (Figure 18)。柔軟性を獲得した酵素の特徴で広く知られるのが、ループ構造がタンパク質表面、または活性中心付近に存在するという特徴である (Isaksen et al., 2014)。特に、活性中心付近にループが存在する場合、酵素と基質が複合体を形成しづらく、 $K_m$  値の増加につながると示されている (Papaleo et al., 2011)。これらのことから、バスペプシンは構造上の柔軟性を高めることで基質との親和性を抑制し、高い触媒作用 ( $k_{cat}$ ) を生じたことが示された。一方、LBPn 1-1 のギブスエネルギーは Porcine Pn A よりも高値を示した。このような現象は他の低温適応した酵素にもみられ、理由として、今回用いた基質が LBPn 1-1 に適切な基質でなかった可能性が考えられる (Lonhienne et al., 2001)。ヘモグロビン基質を用いた潜在活性では LBPn 1-1 は Porcine Pn A と比べると倍以上高い活性を有していたことから (Table 4)、LBPn 1-1 は基質結合部位の形状が四足動物型だけでなく、LBPn 2-2 と異なる可能性が考えられる。

#### バスペプシノゲンの分子進化

以上を要約すると、オオクチバスはペプシンアイソザイムの増加による酵素量の増加、ペプシン分子の構造の柔軟性による高い触媒効率、広い基質特異性を有することにより、

高いタンパク質分解能を有することが明らかとなった。このように、バスペプシンが高いタンパク質分解能を得るに至った背景を分子進化の面から検討した。ペプシノゲン分子進化の検討により、ペプシノゲン A、B、C、F、Y、fish A、fish C タイプの 7 種類に加えて、Fish A タイプの中には fish A1、fish A2 が高い事後確率で存在することも示された(Figure



**Figure 19.** LBPn 2 における正の自然選択を受けたアミノ酸残基

LBPn 2 の cDNA に働いた正の自然選択を paml 4.7a を用いて枝-サイトモデル比較の後、尤度検定を行った。正の自然選択を受けたアミノ酸残基、活性中心をワイヤースケルトンで太く示した。他のアミノ酸残基は骨格のみを示し、各色の識別は、赤色が疎水性アミノ酸、緑色が非極性無電荷アミノ酸、青色が非極性電荷アミノ酸、黒色が活性中心のアスパラギン酸を示す。図は Miura ら (2016) の Figure 5 を引用した。

14)。LBPgn 1、2、3 は各 fish A1、A2、C に分類された。Fish A タイプは、一次構造が Y タイプと類似することを先に記した (Kageyama et al., 2010)。Y タイプと fish A の分子進化の関係に関しては遺伝座においても一致することが示されており (Castro et al., 2014)、Y タイプと fish A はオーソログスであると示唆される。加えて、四足動物の A タイプおよび Y タイプの間にはオーソログスな関係はないことも報告されている (Castro et al., 2014)。

魚類ペプシンの  $d_N/d_S$  ( $=\omega$ ) の検討では、Largemouth bass 2 および Snakehead の共通祖先型に加速進化を受けたという結果を得た (Figure 15)。LBPn 2-2 において、有意に自然選択が働いたとされるアミノ酸残基は、Asn<sup>67</sup> であり ( $0.01 < P < 0.05$ )、Gly<sup>85</sup>、Asp<sup>243</sup> and Thr<sup>271</sup> においても自然選択が働いたと推測された。これらのアミノ酸残基は、立体構造上、ペプシンの外郭を構成する位置にあり、ペプシンの構造の柔軟性を高めていると予想される (Narita et al., 2010) (Figure 19)。しかし、この検討では、胃内でペプシノゲンが機能することが明らかである魚類のペプシノゲン配列のみを用いて解析を行っており、Largemouth bass 2 と Snakehead が他の魚類よりも高い $\omega$ 値を示したのは、魚類の進化に即しているものではないことによる可能性もある。今後、更なる検討が必要であると考えられる。

以上の結果から、オオクチバスペプシンの高いタンパク質分解活性の特徴には以下の 3 点が明らかとなった。1) バスペプシノゲンはアイソザイムの数を増加させ、大量の酵素を生成する能力を得た。2) バスペプシンの立体構造上、極性、非極性の両方の特性を有するアミノ酸の基質認識が可能となった。3) 熱エネルギー学的検討から、バスペプシンは構造

の柔軟性が大きいことが明らかとなった。バスペプシンが高いタンパク質分解活性を有し、柔軟に食性適応することは、オオクチバスの原産生息域、並びに生息環境の異なる日本においても環境に適応し、繁殖して定着するうえで必須であったと考えられる。そのため、バスペプシンは本研究で明らかになった以上 3 つの特徴を備えたことで食物連鎖上トップに位置するほどの強い肉食食性を示すに至った可能性が示唆された。



## 結語

ペプシンに関する研究は、様々な動物の食性とペプシンの関連に関する検討がされてきた。酵素の構造と基質特異性に関する研究は報告例があるが、触媒に関しても網羅的に検討がなされた例はない。本研究では、非常に肉食に特化したオオクチバスの胃を用いて、ペプシノゲンを抽出・精製し、その特性と構造、触媒との関連を検討した。その結果、LBPgn はこれまで報告されている魚類のペプシノゲン中でも最もアイソザイムの数も多くみられ、加えて LBPgn 1-1、2-2 は非常に高い潜在非活性を有していた。この高いタンパク質分解活性の理由を、酵素の基質特異性および、触媒の観点から検討した。基質特異性の検討から、LBPn 2-2 はペプシンが認識しづらい Arg や Lys を含んだ基質を認識し、加水分解を行ったことから、広い基質特異性を獲得したといえる。立体構造モデリングからも、LBPn 2-2 は基質認識部位の一部を親水性にすることで疎水性アミノ酸以外も認識できる可能性を示していた。触媒に関する検討において、LBPn 2-2 は、Porcine Pn A と比べてペプシン基質に対して  $k_{cat}/K_m$  値が高値を示した。これは LBPn 2-2 が非常に高い  $k_{cat}$  値を示していたことに起因していた。さらに、LBPn 2-2 は活性化ギブスエネルギーが Porcine Pn A と比べて低値を示した。活性化エントロピーでは、LBPn 2-2 の方が Porcine Pn A と比べて高値を示していた。活性化エンタルピーは分子の動きの自由度を示すことから、LBPn 2-2 は柔軟性が高いと考えられる。以上の結果から、オオクチバスペプシンはアイソザイムの数を増やして酵素量を増大させ、基質特異性を広げたことに加え、高い触媒能を獲得した結果、高いタンパク質分解活性を獲得したことが示唆された。しかし、本研究で示したオオクチバスペプシンの構造は全てモデリングによるものである。ペプシン基質と一連の合成基質を用いた加水分解の結果は、バスペプシンの構造モデリングをある程度反映しており、恐らく本来の構造に近いモデリングがなされたと予想しているが、必ずしも本来のバスペプシンの構造がモデリングの結果と一致するとは限らない。よって、バスペプシンの X 線構造解析等による立体構造の検討は、基質特異性並びに触媒機構に関する更なる解明に必要であると考えられる。

## 謝辞

本研究を進めるにあたり熱心な御指導、御鞭撻を賜りました名古屋市立大学大学院システム自然科学研究科 森山昭彦教授に厚く御礼申し上げます。森山教授には御忙しい中、研究内容、研究発表、本論文作成に至るまで様々な視点よりご指導をして頂きました。

終始にわたり、多大な有益なご指導を賜りました、名古屋文理大学健康生活学部 景山節教授に深謝いたします。景山教授には論文作成におけるご助言、具体的な実験操作など、多岐にわたり懇切丁寧なご指導をいただきました。心より御礼申し上げます。

研究や発表に際し、親身にご指導、ご協力を賜りました名古屋市立大学大学院システム自然科学研究科 鈴木（松原）美恵子様に厚く御礼申し上げます。

研究を遂行するにあたり、名古屋市多様性生物センター 野呂達哉様をはじめ、センターの皆さまにはオオクチバスをご提供いただきました。ここに感謝の意を表します。

最後に、名古屋文理大学健康生活学部の先生方には、仕事の合間を使って研究を進めることへ理解を示していただいたとともに、多大なご支援を頂きました。名古屋市立大学大学院システム自然科学研究科の皆さまには終始研究生活を支えて頂きました。皆さまの数々のご協力により、滞りなく研究を遂行できたことを心から感謝申し上げます。

2016 年 吉日

## 参考文献

- Andreeva, N.S., Zdanov, A.S., Gustchina, A.E., Fedorov, A.A., 1984. Structure of ethanol-inhibited porcine pepsin at 2-Å resolution and binding of the methyl ester of phenylalanyl-diiodotyrosine to the enzyme. *J. Biol. Chem.* 259, 11353-11365.
- Anson, M.L., 1939. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *J. Gen. Physiol.* 22, 79-89.
- Bailey, D., Carpenter, E.P., Coker, A., Coker, S., Read, J., Jones, A.T., Erskine, P., Aguilar, C.F., Badasso, M., Toldo, L., Rippmann, F., Sanz-Aparicio, J., Albert, A., Blundell, T.L., Roberts, N.B., Wood, S.P., Cooper, J.B. 2012, An analysis of subdomain orientation, conformational change and disorder in relation to crystal packing of aspartic proteinases. *Acta Crystallogr., Sect. D* 68, 541-552.
- Branden, C. I. and Tooze, J., 1999. Introduction to protein structure. Garland Science.
- Brier, S., Maria, G., Carginale, V., Capasso, A., Wu, Y., Taylor, R.M., Bortto, N.B., Capasso, C., Engen, J.R., 2007. Purification and characterization of pepsins A1 and A2 from the Antarctic rock cod *Trematomus bernacchii*. *FEBS J.* 274, 6152-6166.
- Briggs, J.C., 1986. Introduction to the zoogeography of North American fishes. The Zoogeography of North American Freshwater Fishes. John Wiley and Sons, New York, 1-16.
- Carginale, V., Trinchella, F., Capasso, C., Scudiero, R., Riggio, M., Parisi, E., 2004a. Adaptive evolution and functional divergence of pepsin gene family. *Gene* 333, 81-90.
- Carginale, V., Trinchella, F., Capasso, C., Scudiero, R., Riggio, M., Parisi, E., 2004b. Gene amplification and cold adaptation of pepsin in Antarctic fish. A possible strategy for food digestion at low temperature. *Gene* 336, 195-205.
- Castro, L.F.C., Lopes-Marques, M., Goncalves, O., Wilson, J.M., 2012. The evolution of pepsinogen C genes in vertebrates: duplication, loss and functional diversification. *PLoS ONE* 7, e32852.

- Castro, L.F.C., Goncalves, O., Mazan, S., Tay, B.H., Venkatesh, B., Wilson, J.M., 2014. Recurrent gene loss correlates with the evolution of stomach phenotypes in gnathostome history. *Proc. Biol. Sci.* 281, 20132669.
- Chen, W.Q., Cao, M.J., Yoshida, A., Liu, G.M., Weng, W.Y., Sun, L.C., Su, W.J., 2009. Study on pepsinogens and pepsins from snakehead (*Channa argus*). *J. Agric. Food Chem.* 57, 10972-10978.
- Chen, S., Costa, V., Bija-Pereira, A., 2011. Evolutionary patterns of two major reproduction candidate genes (Zp2 and Zp3) reveal no contribution to reproductive isolation between bovine species. *BMC Evol. Biol.* 11,24.
- Cooper, J.B., Khan, G., Taylor, G., Tickle, I.J., Blundell, T.L., 1990. X-ray analyses of aspartic proteinaes. II. Three-dimensional structure of the hexagonal crystal from of porcine pepsin at 2.3 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 214, 199-222.
- Davis, B.J., 1964. Disk electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. *Ann. NY Acad. Sci.* 121, 404-427.
- Do, C.B., Mahabhashyam, M.S., Brudno, M., Batzoglou, S., 2005. ProbCons: Probabilistic consistency-based multiple sequence alignment. *Genome Res.* 15, 330-340.
- Dunn, B.H., Hung, S.H., 2000. The two sides of enzyme-substrate specificity: lessons from the aspartic proteinases. *Biochemica et Biophysica Acta*, 1477:231-240.
- Etnier, D.A., and Starnes, W.C., 1993. *The Fishes of Tennessee*. University of Tennessee Press, Knoxville, TN.
- Feng, S., Li, W., Lin, H., 2008. Characterization and expression of the pepsinogen C gene determination of pepsin-like enzyme activity from orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). *Comp. Biochem. Physiol. part B* 149, 275-284.
- Feller, G., Lonhienne, T., Deroanne, C., Libiouille, C., Van Beeumen, J., Gerday, C., 1992. Purification, characterization, and nucleotide sequence of the thermolabile  $\alpha$ -amylase from the Antarctic psychrotroph *Alteromonas*

- haloplanctis* A23. J. Biol. Chem. 267, 5217-5221.
- Fields, P.A. and Somero, G.N., 1998. Hot spots in cold adaptation: localized increases in conformational flexibility in lactate dehydrogenase A<sub>4</sub> orthologs of Antarctic notothenioid fishes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 11476-11481.
- Filip, L. C. and Mundy N. I., 2004. Rapid evolution by positive Darwinian selection in the extracellular domain of the abundant lymphocyte protein CD45 in primates. Mol. Biol. Evol. 21, 1504-1511.
- Foltmann, B., 1970. Prochymosin and chymosin. Methods Enzymol. 19, 421-436.
- Foltmann, B., 1981. Gastric proteinases - structure, function, evolution and mechanism of action. Essays Biochem. 17, 52-84.
- Fujinaga, M., Cherney, M.M., Tarasova, N.I., Bartlett, P.A., Hanson, J.E., James, M.N., 2000. Structural study of the complex between human pepsin and a phosphorus-containing peptidic-transition-state analog. Acta. Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 56, 272-279.
- Gildberg, A., Olsen, R.L. Bjarnason, J.B. 1990. Catalytic properties and chemical composition of pepsins from Atlantic cod (*Gadus morhua*). Comp. Biochem. Physiol. B 96, 323-330.
- Goldman, N. and Yang, Z. 1994. A codon-based model of nucleotide substitution for protein-coding DNA sequences. Mol. Biol. Evol. 11, 725-736.
- Hasegawa, M., Kishino, H., Yano, T., 1985. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. J. Mol. Evol. 22, 160-174.
- Henshall, J.A., 1881. Book of the Black Bass. Robert Clarke and Company, Cincinnati, OH.
- Herriot, R. M., 1938. Isolation, crystallization, and properties of swine pepsinogen. J. Gen. Physiol. 21, 501-540.
- Isaksen, G. V., Aqvist, J., Brandsdal, B. O., 2014. Protein surface softness is the origin

- of enzyme cold-adaptation of trypsin. *Plos Comput. Biol.* 10, e1003813.
- Kageyama T, Tanabe K, Koiwai O. 1990. Structure and development of rabbit pepsinogens. Stage-specific zymogens, nucleotide sequences of cDNAs, molecular evolution, and gene expression during development. *J. Biol. Chem.* 265, 17031-17038.
- Kageyama, T., 2000. New world monkey pepsinogens A and C, and prochymosins. Purification, characterization of enzymatic properties, cDNA cloning, and molecular evolution. *J. Biochem.* 127, 761-770.
- Kageyama, T., 2002. Pepsinogens, progastricsins, and prochymosins: structure, function, evolution, and development. *Cell. Mol. Life Sci.* 59, 288-306.
- Kageyama, T., 2004. Role of S'1 loop residues in the substrate specificities of pepsin A and chymosin. *Biochemistry* 43, 15122-15130.
- Kageyama, T., 2006. Roles of Tyr13 and Phe219 in the unique substrate specificity of pepsin B. *Biochemistry* 45, 14415-14426.
- Kageyama, H., Ueda, H., Tezuka, T., Ogasawara, A., Narita, Y., Kageyama, T., Ichinose, M., 2010. Differences in the P'1 substrate specificities of pepsin A and chymosin. *J. Biochem.* 147, 167-174.
- Karlsen, S., Hough, E., Olsen, R.,L., 1998. Structure and proposed amino-acid sequence of a pepsin from atlantic cod (*Gadus morhua*). *Acta Crystallogr., Sect. D* 54, 32-46.
- Klomklao, S., Kishimura, H., Yabe, M., Benjakul, S., 2007. Purification and characterization of two pepsins from the stomach of pectoral rattail (*Coryphaenoides pectoralis*). *Comp. Biochem. Physiol. B* 147, 682-689.
- Koelz, HR., 1992. Gastric acid in vertebrates. *Scand. J. Gastroenterol Suppl.* 193: 2-6.
- Leammli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 15, 680-685.

- Lonhienne, T., Baise, E., Feller, G., Bouriotis, V., Gerday, C., 2001. Enzyme activity determination on macromolecular substrates by isothermal titration calorimetry: application to mesophilic and psychrophilic chitinases. *Biochimica. et Biophysica. Acta.* 1545, 349-356.
- Lovell, S.C., Davis, I.W., Arendall III, W.B., de Bakker, P.I.W., Word, J.M., Prisant, M.G., Richardson, J.S., Richardson, D.C., 2003. Structure validation by Calpha geometry: phi,psi and Cbeta deviation. *Proteins: Struct. Funct. Genet.* 50, 437-450.
- Low, P.S., Bada, J.L., Somero, G.N., 1973. Temperature adaptation of enzymes: roles of the free energy, the enthalpy, and the entropy of activation. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 70, 430-432.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Lundberg, J.G., Kottelat, M., Smith, G.R., Stiassny, M.L.J., Gill, A.C., 2000. So many fishes, so little time: an overview of recent ichthyological discovery in continental waters. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 87, 26-62.
- Malabanan, M.M., Amyes, T.L., Richard J.P., 2010. A role for flexible loops in enzyme catalysis. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 20, 702-710.
- Michelangeli, F., Ruiz, M. C., Dominguez, M. G., Parthe, V., 1988. Mammalian-like differentiation of gastric cells in the shark *Hexanchus griseus*. *Cell Tissue Res.* 251, 225-227.
- Miura, Y., Kageyama, T., Moriyama, A., 2015. Pepsinogens and pepsins from largemouth bass, *Micropterus salmoides*: Purification and characterization with special reference to high proteolytic activities of bass enzymes. *Comp. Biochem. Physiol. B* 183, 42-48.
- Miura, Y., Suzuki-Matsubara, M., Kageyama, T., Moriyama, A., 2016. Structure, molecular evolution, and hydrolytic specificities of largemouth bass pepsins. *Comp. Biochem. Physiol. B* 192, 49-59.

- Moore, S.A., Sielecki, A.R., Chernaia, M.M., Tarasova, N.I., James, M.N. 1995. Crystal and molecular structures of human pepsinogen at 1.62 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 247, 466-485.
- Nalinanon, S., Benjakul, S., Kishimura, H., 2010. Biochemical properties of pepsinogen and pepsin from the stomach of albacore tuna (*Thunnus alalunga*). *Food Chemistry* 121, 49-55.
- Narita, Y., Oda, S., Moriyama, A., Takenaka, O., Kageyama, T., 1997. Pepsinogens and pepsins from house musk shrew, *Suncus murinus*: purification, characterization, determination of the amino-acid sequences of the activation segments, and analysis of proteolytic specificities. *J. Biochem.* 121, 1010-1017.
- Narita, Y., Oda, S., Takenaka, O., Kageyama, T., 2000. Multiplicities and some enzymatic characteristics of ape pepsinogens and pepsins. *J. Med. Primatol.* 29, 402-410.
- Narita, Y., Oda, S., Moriyama, A., Kageyama, T., 2002. Primary structure, unique enzymatic properties, and molecular evolution of pepsinogen B and pepsin B. *Arch. Biochem. Biophys.* 15, 177-185.
- Narita, Y., Oda, S., Takenaka, O., Kageyama, T., 2010. Lineage-specific duplication and loss of pepsinogen genes in hominoid evolution. *J. Mol. Evol.* 70, 313-324.
- Ornstein, L., 1964. Disk electrophoresis. I. Background and theory. *Ann. NY Acad. Sci.* 121, 321-349.
- Papaleo, E., Tiberti, M., Invernizzi, G., Pasi, M., Ranzani, V., 2011. Molecular determinants of enzyme cold adaptation: comparative structural and computational studies of cold- and warm-adapted enzymes. *Curr. Protein Pept. Sci.*, 12, 657-683.
- Palumbi, S. R., 1994. Genetic divergence, reproductive isolation and marine speciation. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 25, 547-572.
- Powers, J.C., Harley, A.D., Myers, D.V., 1977. Subsite specificity of porcine pepsin. *Adv. Exp. Med. Biol.* 95, 141-157.



- Polley, S. D. and Conway D. J., 2001. Strong diversifying selection on domains of the *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 gene. *Genetics* 158, 1505-1512.
- Philipp, D.P., and Ridgway M.S., 2002. Black Bass : Ecology, Conservation and management. American Fisheries Society, Symposium 31, Bethesda, Maryland.
- Ronquist, F., Huelsenbeck, J.P., 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19,1572–1574.
- Ryel, A. P., 1970. The porcine pepsins and pepsinogens. *Methods Enzymol.* 19, 316-336.
- Samloff, I. M., 1969. Slow moving protease and the seven pepsinogens: electrophoretic demonstration of the existence of eight proteolytic fractions in human gastric mucosa. *Gastroenterology* 57, 659-669.
- Sali, A. and Blundell, T.L., 1993. Comparative protein modeling by satisfaction of spatial restraints. *J. Mol. Biol.* 234, 779-815.
- Schlamowitz, M., and Peterson, L. U., 1959. Studies on the optimum pH for the action of pepsin on 'native' and denatured bovine serum albumin and bovine hemoglobin. *J. Biol. Chem.* 234, 3137-3145.
- Siddiqui, K.S. and Cavicchioli, R., 2006. Cold-adapted enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* 75, 403-33.
- Sielecki, A.R., Fedorov, A.A., Boodhoo, A., Andreeva, N.S., James, M.N., 1990. Molecular and crystal structures of monoclinic porcine pepsin refined at 1.8 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 214, 143-170.
- Strimmer, K. and von Haeseler, A., 1996. Quartet puzzling: a quartet maximum-likelihood method for reconstructing tree topologies. *Mol. Biol. Evol.* 13, 964-969.
- Suzuki, M., Narita, Y., Oda, S., Moriyama, A., Takenaka, O., Kageyama, T., 1999, Purification and characterization of goat pepsinogens and pepsins, *Comp.*

Biochem. Physiol. B 122, 453-460.

Suzuki, T., Yasugi, M., Arisaka, F., Yamagishi, A., Oshima, T., 2001. Adaptation of a thermophilic enzyme, 3-isopropylmalate dehydrogenase, to low temperatures. Protein Engineering, 14, 85-91.

Tang, J., Wolf, S., Caputto, R., and Trucco, R. E., 1959. Isolation and crystallization of gastricsin from human gastric juice. J. Biol. Chem. 234, 1174-1178.

Tanji, M., Kageyama, T., Takahashi, K., 1988. Tuna pepsinogens and pepsins. Eur. J. Biochem. 177, 251-259.

Tanji, M., Yakabe, E., Kubota, K., Kageyama, T., Ichinose, M., Miki, K., Ito, H., Takahashi, K., 2009. Structural and phylogenetic comparison of three pepsinogens from Pacific bluefin tuna: Molecular evolution of fish pepsinogens. Comp. Biochem. Physiol. B 152, 9-19.

Tavare, S., 1986. Some probabilistic and statistical problems in the analysis of DNA sequences. Lectures on Mathematics in the Life Sciences 17, 57-86.

Weng, W.Y., Wu, T., Chen, W.Q., Liu, G.M., Osatomi, K., Su, W.J., Cao, M.J., 2011. Purification and characterization of pepsinogens and pepsins from the stomach of rice field eel (*Monopterus albus* Zuiew). Fish Physiol. Biochem. 37, 543-552.

Williams, M.G., Wilsher, J., Nugent, P., Mills, A., Dhanaraj, V., Fabry, M., Sedláček, J., Uusitalo, J.M., Penttilä, M.E., Pitts, J.E., Blundell, T.L., 1997. Mutagenesis, biochemical characterization and X-ray structural analysis of point mutants of bovine chymosin. Protein Eng. 10, 991-997.

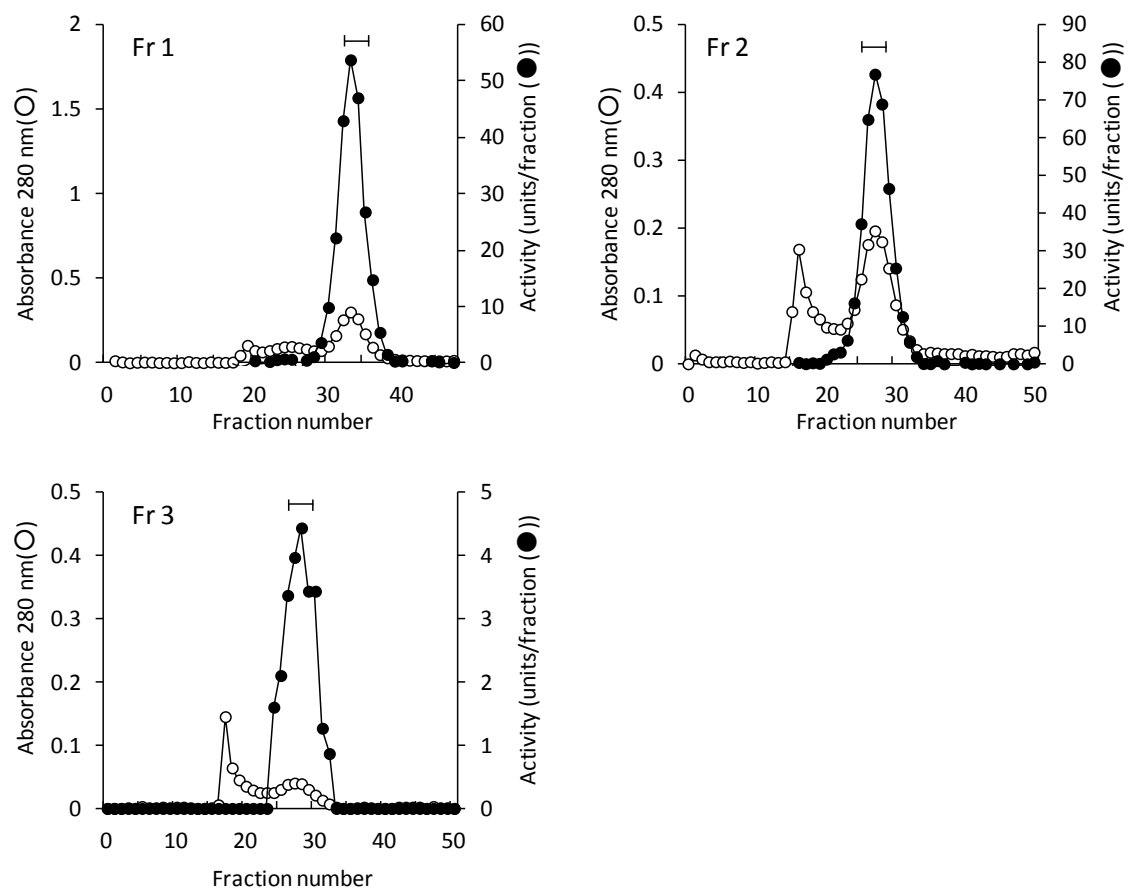
Wu, D. D., Wang, G. D., Irwin, D. M., Zhang, Y. P., 2009. A profound role for the expansion of trypsin-like serine protease family in the evolution of hematophagy in mosquito. Mol. Biol. Evol. 26, 2333-2341.

Yang, Z. and Nielsen, R., 2000, Estimating synonymous and nonsynonymous substitution rates under realistic evolutionary models. Mol. Biol. Evol. 17, 32-43.

Yang, Z., 1998. Likelihood ratio tests for detecting positive selection and application to

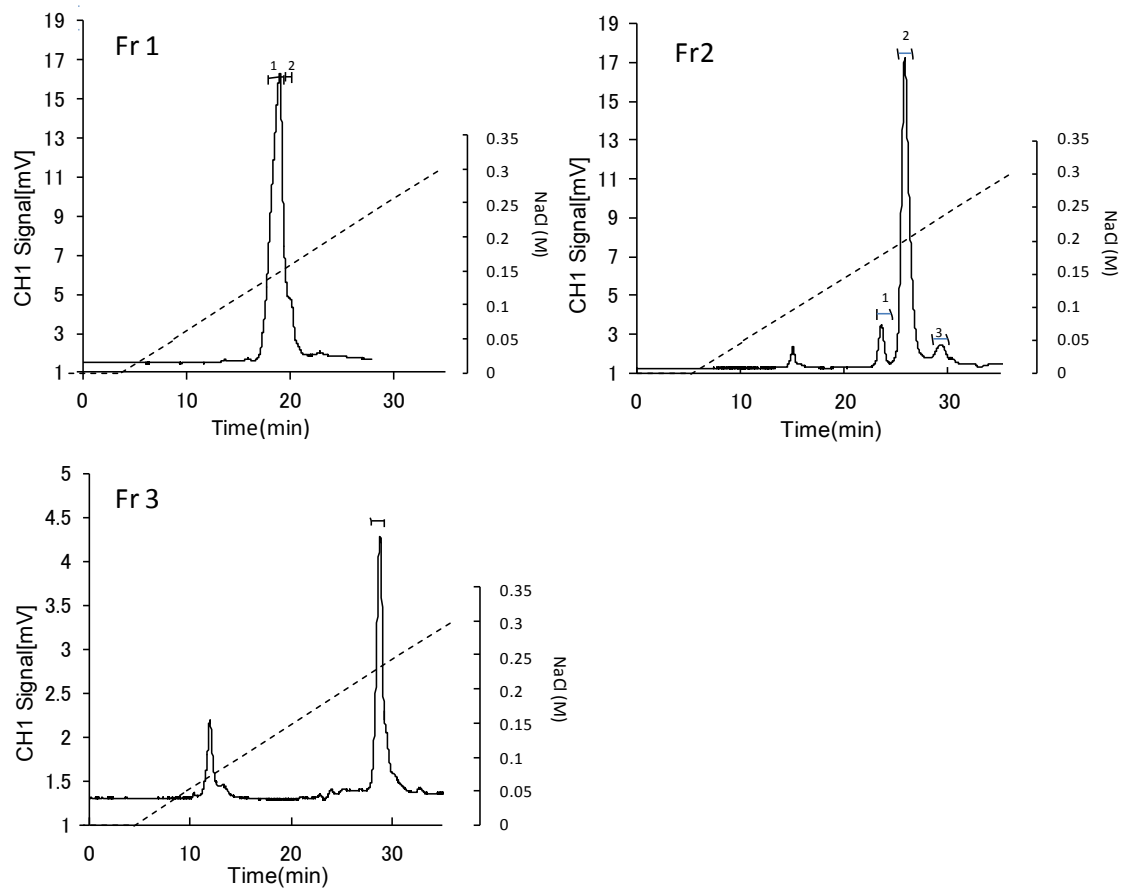
- primate lysozyme evolution. Mol. Biol. Evol. 15, 568-573.
- Yang, Z., 2007. PAML 4: phylogenetic analysis by maximum likelihood. Mol. Biol. Evol. 24, 1586-1591.
- Yang, Z., 2009, 分子系統学への統計的アプローチー計算分子進化学ー, 共立出版株式会社
- Yufera, M., Moyano, F.J., Astola, A., Ferrina, P.P., Rodorigez GM., 2012, Acidic digestion in a teleost: postprandial and circadian pattern of gastric pH, pepsin activity, and pepsinogen and proton pump mRNAs expression. PLoS ONE, 7, e33687.
- Zhang, C., Wang, J., Xie, W., Zhou, G., Long, M., Zhang, Q., 2011, Dynamic programming procedure for searching optimal models to estimate substitution rates based on the maximum-likelihood method. PNAS, 108, 7860-7865.
- Zhao L., Budge, M.S., Ghaly, E.A., Brooks, S.M., Dave, D., 2011, Extraction, purification and characterization of fish pepsin: A critical review. J. Food Process. Technol. 2, 6.
- Zhou, Q., Fu, X, Zhang, L., Su, W., Cao, M., 2007. Purification and characterization of seabream (*Sparus latus* Houttuyn) pepsinogens and pepsin. Food Chem. 103, 795-801.
- Zhou, Q., Liu, G.M., Huang, Y.Y., Weng, L., Hara, K., Su, W.J, Cao, M.J., 2008. Pepsinogens and pepsins from Mandarin fish (*Siniperca chuatsi*). J. Agric. Food Chem. 56, 5401-5406.
- 根井正利、S. クマー, 2006. 分子進化と分子系統樹 培風館

## Supplement



**Supplement figure 1. ゲル濾過**

DEAE-Sephacel で得たフラクションのゲル濾過を行い、バーで示した個所のタンパクを採取した。○ : 280 nm 吸光法によるタンパク量測定した。● : 2% hemoglobin, pH2.0 の加水分解活性を測定した。



**Supplement figure 2. FPLC**

DEAE-Sephacel で得たフラクションをゲル濾過したのち、MONO Q を用いて FPLC クロマトグラフィーを行い、各ピークを分取した。バーで示した個所のタンパクを採取した。

1

LBPgn1\_a ATGAAGTGGGCCTTTGTCTGTGTGCCATGGTGGCACTGTCTGAGTGCCTCTGCAGGTCCTCTGGAGAGGGTAAAGACAGCCAGGAGTACCTGGAGGAGCAGGGTCTATGGGAAAGAG  
LBPgn1\_b ATGAAGTGGGCCTTTGTCTGTGTGCCATGGTGGCACTGTCTGAGTGCCTCTGCAGGTCCTCTGGAGAGGGTAAAGACAGCCAGGAGTACCTGGAGGAGCAGGGTCTATGGGAAAGAG  
LBPgn1\_c ATGAAGTGGGCCTTTGTCTGTGTGCCATGGTGGCACTG-----CCTCTGGAGAGGGTAAAGACAGCCAGGAGTACCTGGAGGAGCAGGGTCTATGGGAAAGAG  
\*\*\*\*\*

277

LBPgn1\_a TTCAGGCTCAAGTACCCATTTAACCCCATGGCCAAAGTTTGAACATCGCTTTGCACTGGGCAACGAGGGCATGACCACGATGCTGATCTGTCTTACTATGAGTCATCTCCATTGGAACC  
LBPgn1\_b TTCAGGCTCAAGTACCCATTTAACCCCATGGCCAAAGTTTGAACATCGCTTTGCACTGGGCAACGAGGGCATGACCACGATGCTGATCTGTCTTACTATGAGTCATCTCCATTGGAACC  
LBPgn1\_c TTCAGGCTCAAGTACCCATTTAACCCCATGGCCAAAGTTTGAACATCGCTTTGCACTGGGCAACGAGGGCATGACCACGATGCTGATCTGTCTTACTATGAGTCATCTCCATTGGAACC  
\*

LBPgn1\_a CCTCCTCAGTCCCTTCAGGGTCATCTTTGACAGCGGCTCACTAACCTGTGGGTGCCCTCCATCTACGACGAGTGCAGGCTGCAGCAACCATAAAGGTTTAAACCTACCCAGCAGT  
LBPgn1\_b CCTCCTCAGTCCCTTCAGGGTCATCTTTGACAGCGGCTCACTAACCTGTGGGTGCCCTCCATCTACGACGAGTGCAGGCTGCAGCAACCATAAAGGTTTAAACCTACCCAGCAGT  
LBPgn1\_c CCTCCTCAGTCCCTTCAGGGTCATCTTTGACAGCGGCTCACTAACCTGTGGGTGCCCTCCATCTACGACGAGTGCAGGCTGCAGCAACCATAAAGGTTTAAACCTACCCAGCAGT

434

LBPgn1\_a ACCACAGAAACAAATGGCAATCCTCTCAGATCCAGTATGGCAACGGCAGCATGACTGGCTTCCTTGAACGACACTGTGACAGTCGGTGAATTGCTGTGACCAACAGATCTTTGGC  
LBPgn1\_b ACCACAGAAACAAATGGCAATCCTCTCAGATCCAGTATGGCAACGGCAGCATGACTGGCTTCCTTGAACGACACTGTGACAGTCGGTGAATTGCTGTGACCAACAGATCTTTGGC  
LBPgn1\_c ACCACAGAAACAAATGGCAATCCTCTCAGATCCAGTATGGCAACGGCAGCATGACTGGCTTCCTTGAACGACACTGTGACAGTCGGTGAATTGCTGTGACCAACAGATCTTTGGC  
\*

LBPgn1\_a TTGAGCCAGACTGAGGCTCCCTTCATGCAGTACATGCGTGTGATGGTATCTTGGGCTGGCAACCAAGCCTGTCGGCTTCCGGCGCTACAACGCTTTCGACAACTGATGACTGAG  
LBPgn1\_b TTGAGCCAGACTGAGGCTCCCTTCATGCAGTACATGCGTGTGATGGTATCTTGGGCTGGCAACCAAGCCTGTCGGCTTCCGGCGCTACAACGCTTTCGACAACTGATGACTGAG  
LBPgn1\_c TTGAGCCAGACTGAGGCTCCCTTCATGCAGTACATGCGTGTGATGGTATCTTGGGCTGGCAACCAAGCCTGTCGGCTTCCGGCGCTACAACGCTTTCGACAACTGATGACTGAG

LBPgn1\_a GGCCTGGTCAATGAGGACATCTTCTGTGTACCTGAGCTCAAACTCTCAGCAAGGAGTGTGGTGACCCTTGGTGGTGTGACCCCAACCACTATATGGCCCATCACTGGATTCCC  
LBPgn1\_b GGCCTGGTCAATGAGGACATCTTCTGTGTACCTGAGCTCAAACTCTCAGCAAGGAGTGTGGTGACCCTTGGTGGTGTGACCCCAACCACTATATGGCCCATCACTGGATTCCC  
LBPgn1\_c GGCCTGGTCAATGAGGACATCTTCTGTGTACCTGAGCTCAAACTCTCAGCAAGGAGTGTGGTGACCCTTGGTGGTGTGACCCCAACCACTATATGGCCCATCACTGGATTCCC

LBPgn1\_a CTCTCCAGAGACCTGTACTGGCAGATCACAGTACAGAGTGTACTGTCAATGGTCAAGTTGTGGCTTGCATGGTGGTGTGAGGCTATTGTGGACACAGGCACTTCTCTGATTGTTGGA  
LBPgn1\_b CTCTCCAGAGACCTGTACTGGCAGATCACAGTACAGAGTGTACTGTCAATGGTCAAGTTGTGGCTTGCATGGTGGTGTGAGGCTATTGTGGACACAGGCACTTCTCTGATTGTTGGA  
LBPgn1\_c CTCTCCAGAGACCTGTACTGGCAGATCACAGTACAGAGTGTACTGTCAATGGTCAAGTTGTGGCTTGCATGGTGGTGTGAGGCTATTGTGGACACAGGCACTTCTCTGATTGTTGGA

LBPgn1\_a CCTCAGAGCAGCATAAGCAACATCAACAGTGTCTTGGGAGCTACCAGCCAGAACGGAGATATGTTGTCAACTGTAAACAGCGTTGGCCAAATGCCTGATTTGACCTTCCACATCCACGGGA  
LBPgn1\_b CCTCAGAGCAGCATAAGCAACATCAACAGTGTCTTGGGAGCTACCAGCCAGAACGGAGATATGTTGTCAACTGTAAACAGCGTTGGCCAAATGCCTGATTTGACCTTCCACATCCACGGGA  
LBPgn1\_c CCTCAGAGCAGCATAAGCAACATCAACAGTGTCTTGGGAGCTACCAGCCAGAACGGAGATATGTTGTCAACTGTAAACAGCGTTGGCCAAATGCCTGATTTGACCTTCCACATCCACGGGA

LBPgn1\_a CAGGCAATTCACCTCCAGGCTCTGCCAGTCCGTGCTCAATACCTAGGCTGCGCTACTGGCTTGGCAACGGAGGTGACAACCTGTGGATCTGGGTGATGTCTTCATCAGACAG  
LBPgn1\_b CAGGCAATTCACCTCCAGGCTCTGCCAGTCCGTGCTCAATACCTAGGCTGCGCTACTGGCTTGGCAACGGAGGTGACAACCTGTGGATCTGGGTGATGTCTTCATCAGACAG  
LBPgn1\_c CAGGCAATTCACCTCCAGGCTCTGCCAGTCCGTGCTCAATACCTAGGCTGCGCTACTGGCTTGGCAACGGAGGTGACAACCTGTGGATCTGGGTGATGTCTTCATCAGACAG

LBPgn1\_a TACTATTCCATCTTCAACAGAGCCAGAAATATGGTGGGTCTGGCCAAAGGCTAGA  
LBPgn1\_b TACTATTCCATCTTCAACAGAGCCAGAAATATGGTGGGTCTGGCCAAAGGCTAGA  
LBPgn1\_c TACTATTCCATCTTCAACAGAGCCAGAAATATGGTGGGTCTGGCCAAAGGCTAGA

### Supplement figure 3. LBPgn 1 の塩基配列

実験により得られた LBPgn 1 の塩基配列を示した。配列は Signal peptide、Activation segment、Active enzyme moiety の全塩基配列を示した。配列の下のアスタリスクは 3 種類の配列の不一致を示す。ハイフンは配列の未決定を示す。

Supplement table 1. LBPn 1 における塩基配列の非同義置換箇所

	アミノ酸残基置換のみられた塩基	
	277	434
LBPgn 1-a	Ile	Arg
LBPgn 1-b	Phe	Arg
LBPgn 1-c	Ile	Lys

1

LBPgn2\_a ATGAAGTGGCTCATCTGCTGACAGCCCTCTGGGCTTTCCTCTGAATGCTTTGTTAGGCTTCCCCTAATCAAGGGAAGACTGCCAGGCAAAGCCCTGAAGGAGAAAAGGACTATGGGAGAG  
LBPgn2\_b ATGAAGTGGCTCATCTGCTGACAGCCCTCTGGGCTTTCCTCTGAATGCTTTGTTAGGCTTCCCCTAATCAAGGGAAGACTGCCAGGCAAAGCCCTGAAGGAGAAAAGGACTATGGGAGAG  
LBPgn2\_c ATGAAGTGGCTCATCTGCTGACAGCCCTCTGGGCTTTCCTCTGAATGCTTTGTTAGGCTTCCCCTAATCAAGGGAAGACTGCCAGGCAAAGCCCTGAAGGAGAAAAGGACTATGGGAGAG

LBPgn2\_a TACAGGAAGCAGCATCCATACAACCCACTGTTAAGTTCCTCAGACTGGTACTGAGCCAATGACCAACGATGCTGACTTGTCCTACTATGGTGTGCTCCATTGGCAACCCTCCTCAG  
LBPgn2\_b TACAGGAAGCAGCATCCATACAACCCACTGTTAAGTTCCTCAGACTGGTACTGAGCCAATGACCAACGATGCTGACTTGTCCTACTATGGTGTGCTCCATTGGCAACCCTCCTCAG  
LBPgn2\_c TACAGGAAGCAGCATCCATACAACCCACTGTTAAGTTCCTCAGACTGGTACTGAGCCAATGACCAACGATGCTGACTTGTCCTACTATGGTGTGCTCCATTGGCAACCCTCCTCAG  
\*\*\*\*\*

LBPgn2\_a TCTTTCATTGTCATCTTTGACACCGGCTCCCTCAACCTGTGGGTCCCTGAGTGGGCTGTTCAGTCAAGGCTGCGCAGAACCAACATGTTCAACCCACAGCAGTCACTCCACCTTCCAA  
LBPgn2\_b TCTTTCATTGTCATCTTTGACACCGGCTCCCTCAACCTGTGGGTCCCTGAGTGGGCTGTTCAGTCAAGGCTGCGCAGAACCAACATGTTCAACCCACAGCAGTCACTCCACCTTCCAA  
LBPgn2\_c TCTTTCATTGTCATCTTTGACACCGGCTCCCTCAACCTGTGGGTCCCTGAGTGGGCTGTTCAGTCAAGGCTGCGCAGAACCAACATGTTCAACCCACAGCAGTCACTCCACCTTCCAA

375

LBPgn2\_a TCGAAGGGCAGTCCCTGTCAATCCAGTATGGCACTGGCAGCATGACCGAATATCTGGGAGTGAACACTGTTACGGGTGGGCGCATCTCTGTGCAACACAGGTTTGTGGCTTACGCAA  
LBPgn2\_b TCGAAGGGCAGTCCCTGTCAATCCAGTATGGCACTGGCAGCATGACCGAATATCTGGGAGTGAACACTGTTACGGGTGGGCGCATCTCTGTGCAACACAGGTTTGTGGCTTACGCAA  
LBPgn2\_c TCGAAGGGCAGTCCCTGTCAATCCAGTATGGCACTGGCAGCATGACCGAATATCTGGGAGTGAACACTGTTACGGGTGGGCGCATCTCTGTGCAACACAGGTTTGTGGCTTACGCAA  
\* \*

LBPgn2\_a ACAAGGGCTCCTTTATGGCTAGCATGAGGCTGATGGCATCTGCGAATGCGCTTCAGTCCATTGCCCTGACAAAGTGCCTGCTGTTTTCGACAAACATGATCAGCAGGGAATGCTGGT  
LBPgn2\_b ACAAGGGCTCCTTTATGGCTAGCATGAGGCTGATGGCATCTGCGAATGCGCTTCAGTCCATTGCCCTGACAAAGTGCCTGCTGTTTTCGACAAACATGATCAGCAGGGAATGCTGGT  
LBPgn2\_c ACAAGGGCTCCTTTATGGCTAGCATGAGGCTGATGGCATCTGCGAATGCGCTTCAGTCCATTGCCCTGACAAAGTGCCTGCTGTTTTCGACAAACATGATCAGCAGGGAATGCTGGT  
\*

LBPgn2\_a TCCAGGCCATGTTCTCTGTCTACCTGAGCGGCAACAGCAGCAGGCGAGTGAAGTGGTCTTCGGTGGTGTGACAGCAGCAGTACACAGGAACAAATACCTGGATCCCTCTGACCTCT  
LBPgn2\_b TCCAGGCCATGTTCTCTGTCTACCTGAGCGGCAACAGCAGCAGGCGAGTGAAGTGGTCTTCGGTGGTGTGACAGCAGCAGTACACAGGAACAAATACCTGGATCCCTCTGACCTCT  
LBPgn2\_c TCCAGGCCATGTTCTCTGTCTACCTGAGCGGCAACAGCAGCAGGCGAGTGAAGTGGTCTTCGGTGGTGTGACAGCAGCAGTACACAGGAACAAATACCTGGATCCCTCTGACCTCT

LBPgn2\_a GGCACCTACTGGCAGATCCAAATGGACAGTGTACCATCAATGGAAGCAGTGTGGCTGCTCTGGTGGCTGGCAGGCCATTATTGACACTGGTACCCTCTCATCTGTTGGCCCAACAGT  
LBPgn2\_b GGCACCTACTGGCAGATCCAAATGGACAGTGTACCATCAATGGAAGCAGTGTGGCTGCTCTGGTGGCTGGCAGGCCATTATTGACACTGGTACCCTCTCATCTGTTGGCCCAACAGT  
LBPgn2\_c GGCACCTACTGGCAGATCCAAATGGACAGTGTACCATCAATGGAAGCAGTGTGGCTGCTCTGGTGGCTGGCAGGCCATTATTGACACTGGTACCCTCTCATCTGTTGGCCCAACAGT  
\*

LBPgn2\_a GACATCAGCAACATGAATTCCTGGGTTGGAAGCCACAACACTGACAGTACGGAATGCTACAAGTGAACAGTGCAGAAATGTCAGAGCATGCTGATGTCACCTTTCATCTCAATGGAAGGCC  
LBPgn2\_b GACATCAGCAACATGAATTCCTGGGTTGGAAGCCACAACACTGACAGTACGGAATGCTACAAGTGAACAGTGCAGAAATGTCAGAGCATGCTGATGTCACCTTTCATCTCAATGGAAGGCC  
LBPgn2\_c GACATCAGCAACATGAATTCCTGGGTTGGAAGCCACAACACTGACAGTACGGAATGCTACAAGTGAACAGTGCAGAAATGTCAGAGCATGCTGATGTCACCTTTCATCTCAATGGAAGGCC

LBPgn2\_a TTACCATCCCTGCAACTGCCATGCTCTCAGACCTCCATGGTTCGAACACTGGCTTTGGCAGGGTGGCTCTGACAGCTCTGGATCTGGAGATGTCCTTATCAGGAGTACTAC  
LBPgn2\_b TTACCATCCCTGCAACTGCCATGCTCTCAGACCTCCATGGTTCGAACACTGGCTTTGGCAGGGTGGCTCTGACAGCTCTGGATCTGGAGATGTCCTTATCAGGAGTACTAC  
LBPgn2\_c TTACCATCCCTGCAACTGCCATGCTCTCAGACCTCCATGGTTCGAACACTGGCTTTGGCAGGGTGGCTCTGACAGCTCTGGATCTGGAGATGTCCTTATCAGGAGTACTAC

LBPgn2\_a GCTGTTTTAATACCAGGGTCCATACATTGGTCTGGCCCACTCTGCA  
LBPgn2\_b GCTGTTTTAATACCAGGGTCCATACATTGGTCTGGCCCACTCTGCA  
LBPgn2\_c GCTGTTTTAATACCAGGGTCCATACATTGGTCTGGCCCACTCTGCA

## Supplement figure 4. LBPgn 2 の塩基配列

実験により得られた LBPgn 2 の塩基配列を示した。配列は Signal peptide、Activation segment、Active enzyme moiety の全塩基配列を示した。配列の下のアスタリスクは 3 種類の配列の不一致を示す。ハイフンは配列の未決定を示す。

## Supplement table 2. LBPn 2 における塩基配列の非同義置換箇所

アミノ酸残基置換のみられた塩基	
375	
LBPgn 2-a	Pro
LBPgn 2-b	Ser
LBPgn 2-c	Ser

LBPgn3_1	ATGAAGTGTCTG6TTGCTGTTTGGTCTGTGTGGTGTCTGCAGAGGGAATCGTCAAGATCCCTCTGCGTAAACAAAGTCTATGCGTGAGGCCCTGAGAGATAAAGGGAATCGAGCTGCGCT
LBPgn3_2	ATGAAGTGTCTG6TTGCTGTTTGGTCTGTGTGTGCTGTGCAGAGGGAATCGTCAAGATCCCTCTGCGTAAACAAAGTCTATGCGTGAGGCCCTGAGAGATAAAGGGAATCGAGCTGCGCT
LBPgn3_3	ATGAAGTGTCTG6TTGCTGTTTGGTCTGTGTGTGCTGTGCAGAGGGAATCGTCAAGATCCCTCTGCGTAAACAAAGTCTATGCGTGAGGCCCTGAGAGATAAAGGGAATCGAGCTGCGCT
LBPgn3_4	ATGAAGTGTCTG6TTGCTGTTTGGTCTGTGTGTGCTGTGCAGAGGGAATCGTCAAGATCCCTCTGCGTAAACAAAGTCTATGCGTGAGGCCCTGAGAGATAAAGGGAATCGAGCTGCGCT
LBPgn3_5	ATGAAGTGTCTG6TTGCTGTTTGGTCTGTGTGTGCTGTGCAGAGGGAATCGTCAAGATCCCTCTGCGTAAACAAAGTCTATGCGTGAGGCCCTGAGAGATAAAGGGAATCGAGCTGCGCT
LBPgn3_6	ATGAAGTGTCTG6TTGCTGTTTGGTCTGTGTGTGCTGTGCAGAGGGAATCGTCAAGATCCCTCTGCGTAAACAAAGTCTATGCGTGAGGCCCTGAGAGATAAAGGGAATCGAGCTGCGCT
LBPgn3-7	ATGAAGTGTCTG6TTGCTGTTTGGTCTGTGTGTGCTGTGCAGAGGGAATCGTCAAGATCCCTCTGCGTAAACAAAGTCTATGCGTGAGGCCCTGAGAGATAAAGGGAATCGAGCTGCGCT
	*****
LBPgn3_1	TACCAGGATCGAGCTCTGAAGTACCAGAACTATGAGTTTGGCACTGCAAACATGTACATCAACAACTATGCTGATACCACCCTATGAGCCATCACTGGAACACCCCCAGTCC
LBPgn3_2	TACCAGGATCGAGCTCTGAAGTACCAGAACTATGAGTTTGGCACTGCAAACATGTACATCAACAACTATGCTGATACCACCCTATGAGCCATCACTGGAACACCCCCAGTCC
LBPgn3_3	TACCAGGATCGAGCTCTGAAGTACCAGAACTATGAGTTTGGCACTGCAAACATGTACATCAACAACTATGCTGATACCACCCTATGAGCCATCACTGGAACACCCCCAGTCC
LBPgn3_4	TACCAGGATCGAGCTCTGAAGTACCAGAACTATGAGTTTGGCACTGCAAACATGTACATCAACAACTATGCTGATACCACCCTATGAGCCATCACTGGAACACCCCCAGTCC
LBPgn3_5	TACCAGGATCGAGCTCTGAAGTACCAGAACTATGAGTTTGGCACTGCAAACATGTACATCAACAACTATGCTGATACCACCCTATGAGCCATCACTGGAACACCCCCAGTCC
LBPgn3_6	TACCAGGATCGAGCTCTGAAGTACCAGAACTATGAGTTTGGCACTGCAAACATGTACATCAACAACTATGCTGATACCACCCTATGAGCCATCACTGGAACACCCCCAGTCC
LBPgn3-7	TACCAGGATCGAGCTCTGAAGTACCAGAACTATGAGTTTGGCACTGCAAACATGTACATCAACAACTATGCTGATACCACCCTATGAGCCATCACTGGAACACCCCCAGTCC
LBPgn3_1	TTCCAGGTGCTGTTTACACCCGGCTCTGCCAACCTGTGGGTGACTCAAGTAACTCAGGCCCTGCAATACACACAAAGTTCAACCCCCAGCAATCTCCACCTACTCTGCC
LBPgn3_2	TTCCAGGTGCTGTTTACACCCGGCTCTGCCAACCTGTGGGTGACTCAAGTAACTCAGGCCCTGCAATACACACAAAGTTCAACCCCCAGCAATCTCCACCTACTCTGCC
LBPgn3_3	TTCCAGGTGCTGTTTACACCCGGCTCTGCCAACCTGTGGGTGACTCAAGTAACTCAGGCCCTGCAATACACACAAAGTTCAACCCCCAGCAATCTCCACCTACTCTGCC
LBPgn3_4	TTCCAGGTGCTGTTTACACCCGGCTCTGCCAACCTGTGGGTGACTCAAGTAACTCAGGCCCTGCAATACACACAAAGTTCAACCCCCAGCAATCTCCACCTACTCTGCC
LBPgn3_5	TTCCAGGTGCTGTTTACACCCGGCTCTGCCAACCTGTGGGTGACTCAAGTAACTCAGGCCCTGCAATACACACAAAGTTCAACCCCCAGCAATCTCCACCTACTCTGCC
LBPgn3_6	TTCCAGGTGCTGTTTACACCCGGCTCTGCCAACCTGTGGGTGACTCAAGTAACTCAGGCCCTGCAATACACACAAAGTTCAACCCCCAGCAATCTCCACCTACTCTGCC
LBPgn3-7	TTCCAGGTGCTGTTTACACCCGGCTCTGCCAACCTGTGGGTGACTCAAGTAACTCAGGCCCTGCAATACACACAAAGTTCAACCCCCAGCAATCTCCACCTACTCTGCC
LBPgn3_1	CTGGGAACATCCCTTACCTGCCCTACGGGCTGGAAGCCTTGATGGAATCTTTGGCTATGACACTGTCATGTTGGGGCATTGTGATCCCAACAGGAGATTGGTCTGAGACAAAC
LBPgn3_2	CTGGGAACATCCCTTACCTGCCCTACGGGCTGGAAGCCTTGATGGAATCTTTGGCTATGACACTGTCATGTTGGGGCATTGTGATCCCAACAGGAGATTGGTCTGAGACAAAC
LBPgn3_3	CTGGGAACATCCCTTACCTGCCCTACGGGCTGGAAGCCTTGATGGAATCTTTGGCTATGACACTGTCATGTTGGGGCATTGTGATCCCAACAGGAGATTGGTCTGAGACAAAC
LBPgn3_4	CTGGGAACATCCCTTACCTGCCCTACGGGCTGGAAGCCTTGATGGAATCTTTGGCTATGACACTGTCATGTTGGGGCATTGTGATCCCAACAGGAGATTGGTCTGAGACAAAC
LBPgn3_5	CTGGGAACATCCCTTACCTGCCCTACGGGCTGGAAGCCTTGATGGAATCTTTGGCTATGACACTGTCATGTTGGGGCATTGTGATCCCAACAGGAGATTGGTCTGAGACAAAC
LBPgn3_6	CTGGGAACATCCCTTACCTGCCCTACGGGCTGGAAGCCTTGATGGAATCTTTGGCTATGACACTGTCATGTTGGGGCATTGTGATCCCAACAGGAGATTGGTCTGAGACAAAC
LBPgn3-7	CTGGGAACATCCCTTACCTGCCCTACGGGCTGGAAGCCTTGATGGAATCTTTGGCTATGACACTGTCATGTTGGGGCATTGTGATCCCAACAGGAGATTGGTCTGAGACAAAC
LBPgn3_1	GAGCCTGGTCAAGAACTTTGTGGTGCCAGTTTGATGGCATCTTGGCTGTCTTACCATTCCATCTCAAGCTGGAGGAGAGACTCCTGTATGGACAACTATGATGTCTCAAACCTGCTT
LBPgn3_2	GAGCCTGGTCAAGAACTTTGTGGTGCCAGTTTGATGGCATCTTGGCTGTCTTACCATTCCATCTCAAGCTGGAGGAGAGACTCCTGTATGGACAACTATGATGTCTCAAACCTGCTT
LBPgn3_3	GAGCCTGGTCAAGAACTTTGTGGTGCCAGTTTGATGGCATCTTGGCTGTCTTACCATTCCATCTCAAGCTGGAGGAGAGACTCCTGTATGGACAACTATGATGTCTCAAACCTGCTT
LBPgn3_4	GAGCCTGGTCAAGAACTTTGTGGTGCCAGTTTGATGGCATCTTGGCTGTCTTACCATTCCATCTCAAGCTGGAGGAGAGACTCCTGTATGGACAACTATGATGTCTCAAACCTGCTT
LBPgn3_5	GAGCCTGGTCAAGAACTTTGTGGTGCCAGTTTGATGGCATCTTGGCTGTCTTACCATTCCATCTCAAGCTGGAGGAGAGACTCCTGTATGGACAACTATGATGTCTCAAACCTGCTT
LBPgn3_6	GAGCCTGGTCAAGAACTTTGTGGTGCCAGTTTGATGGCATCTTGGCTGTCTTACCATTCCATCTCAAGCTGGAGGAGAGACTCCTGTATGGACAACTATGATGTCTCAAACCTGCTT
LBPgn3-7	GAGCCTGGTCAAGAACTTTGTGGTGCCAGTTTGATGGCATCTTGGCTGTCTTACCATTCCATCTCAAGCTGGAGGAGAGACTCCTGTATGGACAACTATGATGTCTCAAACCTGCTT
	* * *
LBPgn3_1	AATGCTAACATATTTGCTTTCTACCTTCCAGGGATGAACAGCAGGGAAGTGTGCTTCTTTTGGAGATGTGGACAAAGCCTGTACCAAGGCCAGATCTACTGGACCCCTGTCACTGCT
LBPgn3_2	AATGCTAACATATTTGCTTTCTACCTTCCAGGGATGAACAGCAGGGAAGTGTGCTTCTTTTGGAGATGTGGACAAAGCCTGTACCAAGGCCAGATCTACTGGACCCCTGTCACTGCT
LBPgn3_3	AATGCTAACATATTTGCTTTCTACCTTCCAGGGATGAACAGCAGGGAAGTGTGCTTCTTTTGGAGATGTGGACAAAGCCTGTACCAAGGCCAGATCTACTGGACCCCTGTCACTGCT
LBPgn3_4	AATGCTAACATATTTGCTTTCTACCTTCCAGGGATGAACAGCAGGGAAGTGTGCTTCTTTTGGAGATGTGGACAAAGCCTGTACCAAGGCCAGATCTACTGGACCCCTGTCACTGCT
LBPgn3_5	AATGCTAACATATTTGCTTTCTACCTTCCAGGGATGAACAGCAGGGAAGTGTGCTTCTTTTGGAGATGTGGACAAAGCCTGTACCAAGGCCAGATCTACTGGACCCCTGTCACTGCT
LBPgn3_6	AATGCTAACATATTTGCTTTCTACCTTCCAGGGATGAACAGCAGGGAAGTGTGCTTCTTTTGGAGATGTGGACAAAGCCTGTACCAAGGCCAGATCTACTGGACCCCTGTCACTGCT
LBPgn3-7	AATGCTAACATATTTGCTTTCTACCTTCCAGGGATGAACAGCAGGGAAGTGTGCTTCTTTTGGAGATGTGGACAAAGCCTGTACCAAGGCCAGATCTACTGGACCCCTGTCACTGCT
	* * *
LBPgn3_1	GAGACCTACTGGCAGATTGGCGTTCAAGGATTCAGATTAAATGGTCAAGAGACTGGCTGGTGTCTCAGGGCTGTCACTATTGTGGACACTGGAACCTCCATGTGATCTGCCCAACAG
LBPgn3_2	GAGACCTACTGGCAGATTGGCGTTCAAGGATTCAGATTAAATGGTCAAGAGACTGGCTGGTGTCTCAGGGCTGTCACTATTGTGGACACTGGAACCTCCATGTGATCTGCCCAACAG
LBPgn3_3	GAGACCTACTGGCAGATTGGCGTTCAAGGATTCAGATTAAATGGTCAAGAGACTGGCTGGTGTCTCAGGGCTGTCACTATTGTGGACACTGGAACCTCCATGTGATCTGCCCAACAG
LBPgn3_4	GAGACCTACTGGCAGATTGGCGTTCAAGGATTCAGATTAAATGGTCAAGAGACTGGCTGGTGTCTCAGGGCTGTCACTATTGTGGACACTGGAACCTCCATGTGATCTGCCCAACAG
LBPgn3_5	GAGACCTACTGGCAGATTGGCGTTCAAGGATTCAGATTAAATGGTCAAGAGACTGGCTGGTGTCTCAGGGCTGTCACTATTGTGGACACTGGAACCTCCATGTGATCTGCCCAACAG
LBPgn3_6	GAGACCTACTGGCAGATTGGCGTTCAAGGATTCAGATTAAATGGTCAAGAGACTGGCTGGTGTCTCAGGGCTGTCACTATTGTGGACACTGGAACCTCCATGTGATCTGCCCAACAG
LBPgn3-7	GAGACCTACTGGCAGATTGGCGTTCAAGGATTCAGATTAAATGGTCAAGAGACTGGCTGGTGTCTCAGGGCTGTCACTATTGTGGACACTGGAACCTCCATGTGATCTGCCCAACAG
LBPgn3_1	CAGCTTATGGGTAGCATATCGAGGCAATTGGTGCCCAACAGAACAGAAATGGAATGTATATGGTGGACTGAGGCCAGGTGAGCAACTTGCCAACCTCAGCTTTGTTATCAGCGGGCTT
LBPgn3_2	CAGCTTATGGGTAGCATATCGAGGCAATTGGTGCCCAACAGAACAGAAATGGAATGTATATGGTGGACTGAGGCCAGGTGAGCAACTTGCCAACCTCAGCTTTGTTATCAGCGGGCTT
LBPgn3_3	CAGCTTATGGGTAGCATATCGAGGCAATTGGTGCCCAACAGAACAGAAATGGAATGTATATGGTGGACTGAGGCCAGGTGAGCAACTTGCCAACCTCAGCTTTGTTATCAGCGGGCTT
LBPgn3_4	CAGCTTATGGGTAGCATATCGAGGCAATTGGTGCCCAACAGAACAGAAATGGAATGTATATGGTGGACTGAGGCCAGGTGAGCAACTTGCCAACCTCAGCTTTGTTATCAGCGGGCTT
LBPgn3_5	CAGCTTATGGGTAGCATATCGAGGCAATTGGTGCCCAACAGAACAGAAATGGAATGTATATGGTGGACTGAGGCCAGGTGAGCAACTTGCCAACCTCAGCTTTGTTATCAGCGGGCTT
LBPgn3_6	CAGCTTATGGGTAGCATATCGAGGCAATTGGTGCCCAACAGAACAGAAATGGAATGTATATGGTGGACTGAGGCCAGGTGAGCAACTTGCCAACCTCAGCTTTGTTATCAGCGGGCTT
LBPgn3-7	CAGCTTATGGGTAGCATATCGAGGCAATTGGTGCCCAACAGAACAGAAATGGAATGTATATGGTGGACTGAGGCCAGGTGAGCAACTTGCCAACCTCAGCTTTGTTATCAGCGGGCTT
	*
LBPgn3_1	ACCTTCOCCTCTGCTCCTCTCTGCTTACATCATTGTGAGCAACAGAAATGGAATACAGTACTGCTCAGTGGGCATCAACCCACCCTACCTGCCCTCTCAAATGGGCAGCCCTGTGGATC
LBPgn3_2	ACCTTCOCCTCTGCTCCTCTCTGCTTACATCATTGTGAGCAACAGAAATGGAATACAGTACTGCTCAGTGGGCATCAACCCACCCTACCTGCCCTCTCAAATGGGCAGCCCTGTGGATC
LBPgn3_3	ACCTTCOCCTCTGCTCCTCTCTGCTTACATCATTGTGAGCAACAGAAATGGAATACAGTACTGCTCAGTGGGCATCAACCCACCCTACCTGCCCTCTCAAATGGGCAGCCCTGTGGATC
LBPgn3_4	ACCTTCOCCTCTGCTCCTCTCTGCTTACATCATTGTGAGCAACAGAAATGGAATACAGTACTGCTCAGTGGGCATCAACCCACCCTACCTGCCCTCTCAAATGGGCAGCCCTGTGGATC
LBPgn3_5	ACCTTCOCCTCTGCTCCTCTCTGCTTACATCATTGTGAGCAACAGAAATGGAATACAG—CTGCTCAGTGGGCATCAACCCACCCTACCTGCCCTCTCAAATGGGCAGCCCTGTGGATC
LBPgn3_6	ACCTTCOCCTCTGCTCCTCTCTGCTTACATCATTGTGAGCAACAGAAATGGAATACAGTACTGCTCAGTGGGCATCAACCCACCCTACCTGCCCTCTCAAATGGGCAGCCCTGTGGATC
LBPgn3-7	ACCTTCOCCTCTGCTCCTCTCTGCTTACATCATTGTGAGCAACAGAAATGGAATACAGTACTGCTCAGTGGGCATCAACCCACCCTACCTGCCCTCTCAAATGGGCAGCCCTGTGGATC
	* * *
LBPgn3_1	TTTGGAGAGGTGTTCTCAGAGAGTACTACTGCTGTACGACGCGACCAACAAACAAAGTTGGCTTTGCTACAAGCTGGC
LBPgn3_2	TTTGGAGAGGTGTTCTCAGAGAGTACTACTGCTGTACGACGCGACCAACAAACAAAGTTGGCTTTGCTACAAGCTGGC
LBPgn3_3	TTTGGAGAGGTGTTCTCAGAGAGTACTACTGCTGTACGACGCGACCAACAAACAAAGTTGGCTTTGCTACAAGCTGGC
LBPgn3_4	TTTGGAGAGGTGTTCTCAGAGAGTACTACTGCTGTACGACGCGACCAACAAACAAAGTTGGCTTTGCTACAAGCTGGC
LBPgn3_5	TTTGGAGAGGTGTTCTCAGAGAGTACTACTGCTTTACGACGCGACCAACAAACAAAGTTGGCTTTGCTACAAGCTGGC
LBPgn3_6	TTTGGAGAGGTGTTCTCAGAGAGTACTACTGCTGTACGACGCGACCAACAAACAAAGTTGGCTTTGCTACAAGCTGGC
LBPgn3-7	TTTGGAGAGGTGTTCTCAGAGAGTACTACTGCTGTACGACGCGACCAACAAACAAAGTTGGCTTTGCTACAAGCTGGC
	*

## Supplement figure 5. LBPgn 3 の塩基配列

実験により得られた LBPgn 3 の塩基配列を示した。配列は Signal peptide、Activation segment、Active enzyme moiety の全塩基配列を示した。配列の下のアスタリスクは 7 種類の配列の一致を示す。ハイフンは配列の未決定を示す。



Supplement table 3. LBPn 3 における塩基配列の非同義置換箇所

	アミノ酸残基置換のみられた塩基			
	492	529	596	1046
LBPgn 3-a	Gln	Leu	Leu	Tyr
LBPgn 3-b	Gln	Val	Leu	Tyr
LBPgn 3-c	Gln	Leu	Leu	Ser
LBPgn 3-d	Gln	Leu	Leu	Tyr
LBPgn 3-e	Gln	Leu	Leu	Tyr
LBPgn 3-f	His	Leu	Gln	Tyr
LBPgn 2-g	Gln	Leu	Leu	Tyr

## 用語の解説

### 胃の構造と機能

胃は摂食した食物を一時的に貯める他、食物のタンパク質を消化酵素のペプシンによって加水分解する臓器である。胃腺は 3 億 5 千万年前頃に出現し、硬骨魚類以上の有顎脊椎動物で特に発達してきた。しかし、脊椎動物の中には胃のない動物も存在する (Koelz, 1992)。胃腺には主細胞、壁細胞、副細胞の 3 種類の外分泌細胞がある。哺乳類では主細胞からはペプシンの前駆体であるペプシノゲン、壁細胞から塩酸、副細胞から粘液が分泌されるが、大部分の魚類、鳥類、爬虫類は *oxynopeptic cell* と呼ばれる 1 種類の細胞からペプシノゲンと塩酸が同時に分泌される (Koelz, 1992)。一方で、サメの 1 種である *Hexanchus griseus* のように 2 種類の細胞を有するものもある (Michelangeli et al., 1988)。

### オオクチバス (別名：ブラックバス, *Micropterus sarmoides*)

オオクチバスの原産は北アメリカ大陸のミシシッピ川流域である。ミシシッピ川流域に生息する生き物は多種多様であり、獰猛な肉食魚類も数多く生息する。また、生息する生物の多様性から進化的にも大変興味深く、これまで多くの研究がなされてきた (Briggs 1986; Lundberg et al. 2000)。オオクチバスは多様な生物の中でも食物連鎖上トップレベルに位置する (Henshall 1881; Etnier and Starnes 1993; Philipp and Ridgway 2002)。日本へは約 100 年前に湖へオオクチバスが放流され、食用、釣り対象とした養殖の容易な魚として政府の許可の下に行われたのが最初である。オオクチバスは、日本における様々な地形、水深、水温等の環境に侵入し、繁殖して定着に成功している。このように、多様な環境に適応するためには、子孫を残す能力の他、食性を柔軟に変化させる能力に長けていると考えられる。実際、オオクチバスの有する強い肉食食性は、生物間相互作用という面で日本の河川の生態系に多大な影響を与えてきた。しかし、オオクチバスは日本の在来種を絶滅に追いやるほど強い肉食性を示したことから、現在、特定外来生物に指定されている。

## ペプシンの基質認識部位

酵素は基質と複合体を構成し、基質を触媒する。酵素が基質と複合体を形成する際は、酵素の基質認識部位に基質が結合する。酵素の基質認識部位は **Subsite** の **S** を用いて表され、基質認識部位に対する基質を **Peptide** の **P** を用いて表される。ペプシンにおいては、基質が加水分解を受ける個所のアミノ酸を **P1**、**P'1** と示す。よって、基質の **P1**、**P'1** を認識するペプシンの基質認識部位を **S1**、**S'1** と表す。ペプシンには基質認識部位が 7 か所あり、**S'3** から **S4** で示される。近年、ペプシン基質 (**KPAEFFRL**) がペプシンの基質認識部位の形状に合わせて合成された (Dunn and Hung, 2000)。ペプシンの基質親和性はペプシン基質やその変異体を用いて検討されている (Kageyama, 2004; Kageyama, 2006; Kageyama et al, 2010)。各動物種のペプシンは、ほぼ共通して **P1**、**P'1** がフェニルアラニンやチロシン、ロイシンといった疎水性のアミノ酸を好で加水分解する (Dunn and Hung, 2000; Kageyama, 2002)。これらのアミノ酸残基と疎水結合するため、ペプシンの **S1**、**S'1** サイトは主に疎水性のアミノ酸構成されていることが知られる (Dunn and Hung, 2000; Kageyama, 2002)。魚類型ペプシン A タイプにおいても、**P'1** がロイシン、バリンのような脂肪族アミノ酸を加水分解しやすいとされるが、アスパラギン酸のような酸性アミノ酸も加水分解することが確認されている (Brier et al., 2007)。

## ペプチド切断部位

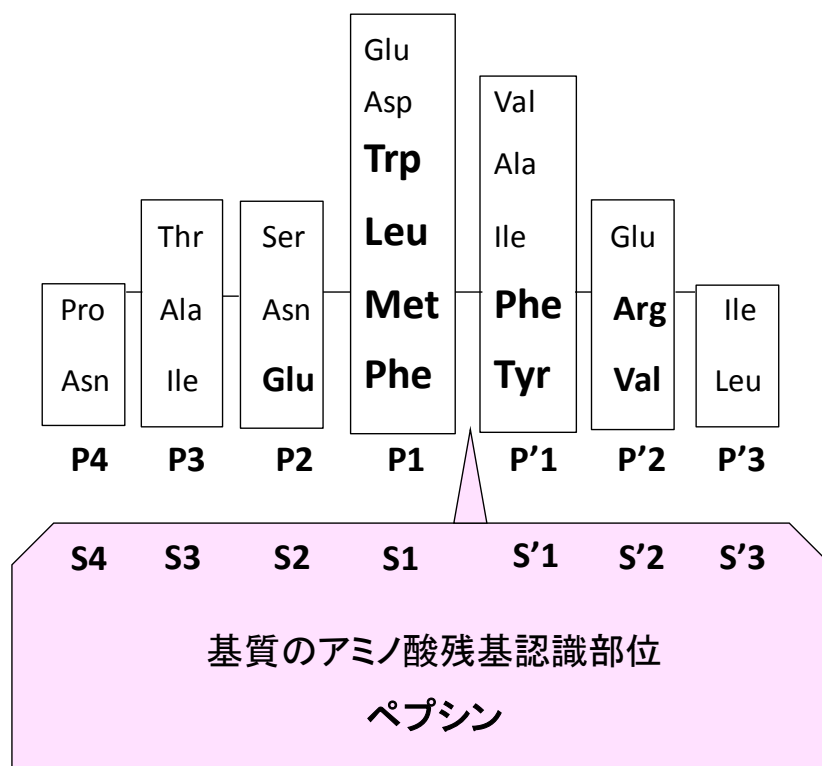


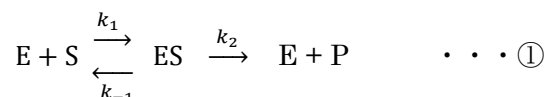
Figure 1. ペプシンの基質認識部位と特異性

## エドマン分解法

エドマン分解法は、タンパク質のアミノ酸配列分析に用いられる方法である。この方法は、タンパク質の N 末端から順にアミノ酸残基を切り離し、次々に PTH アミノ酸として同定が可能である。フェニルイソチオシアネート (PITC) を弱アルカリ性でタンパク質の N 末端アミノ基に作用させ、フェニルチオカルバモイル (PTC) を付加させる。この付加体はトリフルオロ酢酸を用いるとタンパク質の N 末端アミノ酸残基のみがチアゾリノン誘導体として遊離する。チアゾリノンアミノ酸を有機溶媒で抽出し、より安定なフェニルチオヒダントイン (PTH) 誘導体に変換し、HPLC で同定する。

## 酵素の反応速度論

不可逆的な酵素反応において、酵素と基質の反応は以下のように示される。



E は酵素、S は基質、P は生成物を示す。また、ES は酵素－基質の複合体である。基質は活性化状態の酵素と静電的、水素結合、疎水相互作用、原子価結合等により複合体を形成する。酵素量に対して基質量が大過剰のとき、反応の初期の遷移時期を除く酵素－基質複合体の濃度 [ES] は、基質がなくなるまで一定の定常状態であると考えられる。

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] - k_2[ES] - k_{-1}[ES] = 0 \quad \cdots \textcircled{2}$$

酵素の全濃度を [E<sub>0</sub>] としたとき、酵素の濃度は以下の通りに示される。

$$[E_0] = [E] + [ES] \quad \cdots \textcircled{3}$$

②に③をあてはめて解くと、

$$\omega = \frac{k_2[E_0][S]}{K_m + [S]} \quad \cdots \chi$$

となり、K<sub>m</sub> は以下の通りに示される。

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad \cdots \textcircled{5}$$

式④のω値は、酵素と基質の反応速度に依存しており、Michaelis-Menten の式として知られる。式⑤の K<sub>m</sub> 値は、Michaelis 定数であり、基質濃度の unit として計算される。加えて、Michaelis-Menten の式④より、反応速度は酵素濃度と比例し、基質濃度とは反比例する特徴がある。K<sub>m</sub> 値は反応速度が最大値 (V<sub>max</sub>) の半分のときの基質濃度を示す。よって、酵

素の  $K_m$  値が小さいとき、基質濃度が低くても酵素は最大活性で反応することが可能となる。

酵素反応速度のパラメーターは触媒効率に関係する。酵素の触媒効率定数は  $k_{cat}$  で示され、触媒活性部位 1 つあたり、単位時間に何回反応するかを示し、回転数ともいわれる。 $k_{cat}$  は以下のとおり定義されている。

$$k_{cat} = \frac{V_{max}}{[E_0]} \quad \dots \textcircled{6}$$

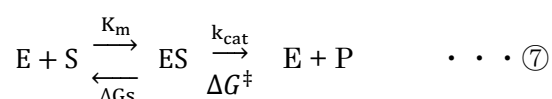
Michaelis-Menten では、①の式より  $k_{cat} = k_2$  と考えられている。 $k_{cat}/K_m$  はその酵素反応の見かけの二次反応速度定数とみなされる。反応速度は酵素と基質が溶液中で衝突する回数に比例し、比例定数の  $k_{cat}/K_m$  値は酵素の触媒効率を示す指標となる。

### 酵素の低温適応とギブスの活性化自由エネルギー

酵素の触媒は、酵素－基質複合体の遷移状態時に高いエネルギー障壁を生じ、生成物を生じる。基底状態 (X) から遷移状態 ( $X^\ddagger$ ) となる時に発生するエネルギーがギブスの自由エネルギー ( $\Delta G^\ddagger$ ) である。活性化ギブスエネルギーは活性化エンタルピー ( $\Delta H^\ddagger$ ) と活性化エントロピー ( $\Delta S^\ddagger$ ) に絶対温度 ( $T$ ) を乗じ、 $\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T\Delta S^\ddagger$  の式で算出される (Low et al., 1973)。

タンパク質の構造において、エンタルピー (enthalpy) はポリペプチド鎖中の非共有結合、すなわち疎水性相互作用、水素結合、イオン結合のエネルギーから生じる。タンパク質の一次構造が折りたたまれた三次構造では、緊密な疎水性コアの球状分子を形成するため、非共有結合の数が最大となり、エンタルピー増大する。一方、三次構造の変性時は、アミノ酸側鎖等に隙間ができ、緩んだ状態となる。よって、エンタルピーは、高い値を示すほど構造が剛直であると考えられる。エントロピー (entropy) は、熱力学の第二法則である、秩序をもたらすにはエネルギーが必要という概念に基づくもので、熱流動の至量性状態量を示す。タンパクの構造生物学上では、折りたたまれた三次構造のタンパクは、ある特定のコンフォメーションをとる秩序だった状態と考える。よって、エントロピーが高い値を示すほど、構造は柔軟であると考えられる (Branden and Tooze, 2000)。

低温適応酵素の特徴には至適温度が低い他、高温で不安定、 $K_m$  値、 $k_{cat}$  値が高い値を示す傾向にある。 $K_m$  値は、ミカエリス定数であり、基質と酵素の親和性を示し、値が低いほど親和性が高いことを示す。一方で、 $k_{cat}$  値は、速度論としては反応速度定数であり、 $k_{cat}$  値が高い値を示すほど高い触媒性を有する酵素である。よって、 $k_{cat}/K_m$  値は遊離の酵素が遊離の基質と反応して生成物になる反応定数を指し、値が高いほど効率よく生成物が生じることを示す。反応速度と活性化エネルギーの関係は以下の式で表わされる。



触媒作用に関する考え方は遷移状態理論のうえに成り立つものが多く、最も簡単なのは

衝突理論である。酵素の構造や反応論の研究から、酵素 (E) の基質結合部位は基質 (S) を結合させて中間体 (ES) となる。このとき、エネルギー的には一旦基底状態となる場合が多いが、この後、反応経路におけるもっとも不安定な分子種である遷移状態 ( $ES^\ddagger$ ) を生じる。遷移状態とは、化学結合が一方では形成されつつあり、一方では壊されつつある状態を指す。反応速度を求めるには、遷移状態と基底状態とが熱力学的に平衡状態にあると仮定して、遷移状態の濃度をこれらのエネルギーの差から求める。仮に、遷移状態 ( $X^\ddagger$ ) と基底状態 (X) のギブスの自由エネルギーの差を  $\Delta G^\ddagger$  としたとき、平衡状態の熱力学エネルギーは以下のように表わされる。

$$[X^\ddagger] = [X] \exp(-\Delta G^\ddagger / RT) \quad \dots \textcircled{8}$$

R は気体定数 ( $8.31 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ )、T は絶対温度である。遷移状態の崩壊の頻度は、反応系の速度定数となる。反応を単反応の  $S \leftrightarrow P$  とした場合、反応速度 ( $k_1$ ) を求める式は②の式を利用し、以下の通りに表わされる。

$$[k_1] = [kT/h] \exp(-\Delta G^\ddagger / RT) \quad \dots \textcircled{9}$$

遷移状態理論に従うと、遷移状態である  $ES^\ddagger$  と  $E+S$  の間の平衡定数は  $k_{cat}/K_M$  のギブスの自由活性化エネルギー ( $\Delta G_T^\ddagger$ ) に比例する。そのため、基質と酵素が結合し、遷移状態となるときの平衡状態は以下の通りに示される。



②、③の式より、反応速度は温度に依存することが分かる。よって、酵素反応は温度の上昇に伴い、反応速度が速くなる。低温適応酵素は、中温から高温域に適応する酵素と比べ、低温での反応速度が速い。

### 最尤法を用いた同義、非同義塩基置換速度の推定

タンパク質のアミノ酸配列をコードする塩基は 3 つの並びで構成され (コドン)、コドンの一部が別の塩基に置換してもアミノ酸に変化がない場合を同義置換 (synonymous substitution) という。一方で、コドンの一部が異なる塩基に置換することでアミノ酸が変化することがあり、これを非同義置換 (nonsynonymous substitution) という。一般に、同義置換の速度は多くの遺伝子ではほぼ同じであるが、非同義置換の速度は同義置換と比べて遅く、遺伝子の間でも差が大きい。そのため、非同義置換の速度が速い遺伝子はダーウィンの適応進化を受けていると考えられる (根井、クマー, 2006)。同義置換と非同義置換の速度を推

定する方法は、いくつか提案されているが、Goldman と Yang (1994)、Yang と Nielsen (2000) は最尤法を用いた方法を考案した。 $\omega$ は非同義置換速度 ( $d_N$ ) と同義置換速度 ( $d_S$ ) の比である ( $\omega=d_N/d_S$ )。  $\omega>1$  のとき、正の自然選択を受けたと考えられ、遺伝子は新機能を獲得した可能性が考えられる。

### 適応進化した遺伝子

$\omega$ 比に基づいて適応進化を受けていると判断された遺伝子の大部分は、以下の3つのカテゴリに分類される (Yang, 2009)。

- ① 宿主の防御から逃れるためのウイルスや病原体側、ウイルス、病原体、寄生虫からの攻撃に対する防御や免疫に関連する宿主側の遺伝子

病原体の遺伝子は、宿主の防御機構に認識されない形へと進化し、宿主側は病原体に順応して認識するような選択圧を受けやすい。前者の例として、リンパ球タンパク質 CD45 (Filip and Mundy, 2004)、後者の例として、マラリア原虫の膜抗原 (Polley and Conway, 2001) 等がある。

- ② 生殖に関連するタンパク質または、フェロモン

精子は卵子を早く認識し、受精することが最善であるが (Palumbi, 1994)、卵子は複数の精子による受精 (多精子受精 (polyspermy)) を避けるため、精子による卵子認識に係る時間を遅らせるよう選択圧がかかる (Chen et al., 2011)。

- ③ 遺伝子重複後に新しい機能を獲得したタンパク質

遺伝子重複は、遺伝子、ゲノム、また遺伝的システムの進化の主要な駆動力の1つであり、新規の遺伝子機能の進化に重要な役割を果たす。多くの重複遺伝子は、有害突然変異によって機能を失い、欠失するか、偽遺伝子へと退化するが、ときに元来の遺伝子の機能とは異なる機能の必要性から、適応進化に駆動されて新しい機能を獲得することがある。消化酵素における適応進化は、霊長類の lysozyme (Zhang et al., 2011)、mosquito における Trypsin-like serine protease family (Wu et al., 2009) 等が報告されている。