

非洲爪蟾孵化酶的 cDNA 结构及其 部分生物化学特性的研究

樊廷俊

(山东大学生命科学学院发育所 济南市 250100)

片桐千明 箕田康一

(北海道大学理学部生物科学专攻, 札幌市 060, 日本国)

安增茂树

(上智大学生命科学专攻, 东京 101, 日本国)

摘 要 以 UVS.2 为探针从第 25 期非洲爪蟾胚胎头背部的 cDNA 文库中筛选出了一个 1.8kb 的孵化酶基因 (*xhe*), 其转录产物最早出现于第 17 期胚胎的头背部, 在第 30 期转录量达到高峰, 随后便逐渐减少。该基因含有编码 514 个氨基酸的一个开框阅读框架, 含有信号肽和原酶序列。所推测出的成熟蛋白有 425 个氨基酸, 包括位于 N-端的含有 200 个氨基酸的金属蛋白酶序列和位于 C-端的两个各 110 个氨基酸的 CUB 重复区。而 UVS.2 只代表该基因 C-端大约 3/4 的部分。同时还发现该酶分子量为 60kDa, 是一种胰蛋白酶类型的金属蛋白酶。它很不稳定, 在纯化过程中极易降解为 40kDa 分子。60kDa 分子具有很强的卵黄膜溶解活性和蛋白酶活性。其中 CUB 重复区很可能在介导卵黄膜和 40kDa 分子中起着重要作用, 而 40kDa 分子很可能是在纯化操作过程中, 由 60kDa 分子发生降解或自身降解丢失了两个 CUB 重复区而形成的, 它只是 60kDa 分子中的一个金属蛋白酶主功能区, 所以它没有卵黄膜溶解活性, 尽管仍具有很强的蛋白酶活性。

关键词 非洲爪蟾, 孵化酶, *xhe*, CUB 重复区, UVS.2

学科分类号 Q523

在非洲爪蟾中, 孵化是借助于孵化酶 (Hatching enzyme, HE) 来完成的^[1]。HE 是早期胚胎在特定发育阶段由孵化腺细胞产生和分泌的^[2]。因此, 它是在形态和分子水平上研究早期胚胎发育过程中特定阶段特定细胞分化的一个典型标示物, 其生化特性和基因结构的阐明, 为弄清早期胚胎发育过程中特定阶段特定细胞的基因表达的调控机制, 提供了一个很好的模型; 弄清孵化机制, 对于计划生育以及动物的繁育和养殖业也具有重要的应用价值。

在非洲爪蟾中, 尽管有人曾努力分离出了 HE, 但由于胚胎产生的酶量极少而未能对其作出详细鉴定^[3]。最近, 海胆^[4]和硬骨鱼 Medaka^[5,6] cDNA 克隆化的成功, 使这些特异性酶可被用作分子生物学探针。但在其它动物中, 还没有 HE 基因和基因表达方面的报道。

1990 年, 在非洲爪蟾早期胚胎的头背部发现了一种特异性表达的 UVS.2 基因^[7], 并

证明它是非洲爪蟾 HE 的基因或其中一部分。最近,我们又制备出了抗 GST-UVS.2 抗体(GST:谷胱甘肽-S-转移酶),证明该抗体就是非洲爪蟾 HE 的特异性抗体。

本文利用 UVS.2 探针,克隆出了非洲爪蟾 HE 基因的全长 cDNA 序列,推测出该酶的一级结构,并利用分离纯化的酶样品研究了其酶活性和部分生化特性。

1 材料和方法

1.1 材料

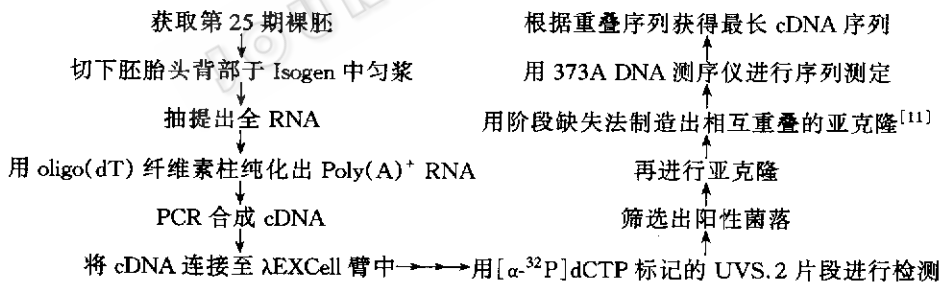
人工饲养的雌、雄非洲爪蟾由本实验室饲养。oligo(dT)-纤维素柱, Superdex 75 HR 10/30 凝胶过滤柱, Mono Q HR 5/5 阴离子交换柱(Pharmacia); Boc-Leu-Gly-Arg-MCA (丁氧羰基-亮氨酸-甘氨酸-精氨酸-甲基氧杂萘邻酮酰胺,日本多肽研究所);辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG(H+L)(Zymed);省时 cDNA 合成标记和循环测序试剂盒均为 Amersham 公司产品。所用化学试剂为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 胚胎的获得、孵化液的制备和纯化:方法参照文献[9]。Superdex 75 凝胶过滤样品作为 Superdex 75 纯化样品使用;Superdex 75 纯化样品再经 Mono Q 阴离子交换后,便作为 Mono Q 纯化样品使用。

1.2.2 Western 杂交:SDS-PAGE 参照 Laemmli 的方法^[10]。Western 杂交使用了非洲爪蟾 HE 的特异性抗 GST-UVS.2 抗体,方法参照 Katagiri 等的方法^[8]。转移有蛋白质条带的纤维素膜用 1:1 000 抗 GST-UVS.2 抗体和 1:500 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG(H+L)孵育处理后,在 BCIP/NBT 磷酸酶显色系统中进行显色。

1.2.3 cDNA 的分离:



1.2.4 各种 HE 样品的卵黄膜溶解活性分析:将 0.3ml HE 样品注入铺有琼脂的 24 孔培养板孔中,加入 6 个无胶膜未受精卵。每隔 10min 观察 1 次,记录卵黄膜被溶解的时间和个数。

1.2.5 各种蛋白酶抑制剂对 HE 的作用:纯化的 HE 样品中分别加入 20 μ l 各种蛋白酶抑制剂,室温孵育 30min 后,用特异性 Boc-Leu-Gly-Arg-MCA 底物进行酶活性测定(荧光测定:激发波长 390nm,发射波长 475nm)。

2 实验结果

2.1 Northern 杂交

xhe 从第 17 期胚胎开始转录(图 1A),于第 30~34 期达到高峰,随后便逐渐减少(图

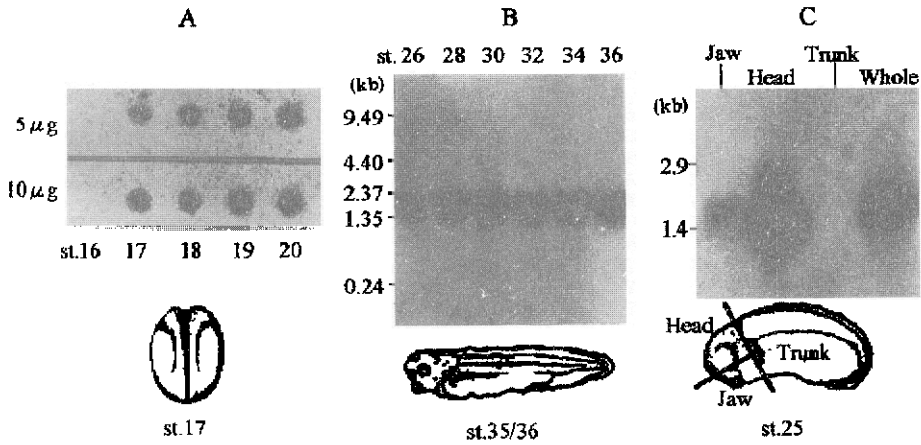


图 1 利用 UVS.2 探讨对不同时期非洲爪蟾胚胎 mRNA 的 Northern 斑点杂交

Fig.1 Northern blot hybridization of mRNA from different stages of *Xenopus* embryos with UVS.2 as a probe

A. Early embryos of stage 17~20; B. Stage 26~36 embryos; C. Different parts of stage 25 embryos

1B)。转录在胚胎头背部进行,转录产物约为 1.8kb(图 1C)。xhe 转录的起始和终止,与胚胎的孵化进程是一致的。

2.2 xhe 的 cDNA 序列及其推测氨基酸序列

xhe 最长的 cDNA 序列由 1 802 个碱基组成,UVS.2 仅构成了 xhe C-端大约 3/4 的区域。xhe 含有一个编码 514 个氨基酸的开框阅读框架,在靠近 N-末端处含有“HE××H××GF×HE”的保守序列,是 Astacin 家族中锌金属蛋白酶的一个特征性活性位点(图 2)。

2.3 xhe 编码蛋白的推测一级结构

xhe 编码 514 个氨基酸的前原酶(Preproenzyme),从 N-末端起依次为 19 个氨基酸的信号肽区(Met1~Ser19)、70 个氨基酸的原酶区(Ser20~Arg89)、197 个氨基酸的金属蛋白酶功能区(Ser90~Asn287)和 226 个氨基酸的两个 CUB(补体亚组分 Cir/Cis, Uegf, Bmpl)重复区(Cys288~Arg514),Astacus 蛋白酶功能区和两个 CUB 重复区则构成了成熟酶(图 3)。经计算,该成熟酶的分子量为 47.2kDa。而 UVS.2 编码蛋白仅代表其 C-末端大约 3/4 的区域。

2.4 各种 HE 样品的 Western 杂交

HE 粗品中含有一种 60kDa 的 HE 分子,有时也含有 40kDa 的 HE 分子;67% SAS 沉淀样品和 Superdex 75 纯化样品中同时含有 60kDa 和 40kDa 两种 HE 分子;而 Mono Q 纯化样品中只含有 40kDa 一种 HE 分子(图 4)。

2.5 各种 HE 样品的卵黄膜溶解活性分析

HE 粗品、67% SAS 沉淀样品和 Superdex 75 纯化样品均具有很强的卵黄膜溶解活性,均可在 40~50min 内将卵黄膜完全溶解;而 Mono Q 纯化样品则不具有卵黄膜溶解活性,即使与卵黄膜共同孵育 120min 也不能将卵黄膜完全溶解,只能使卵黄膜发生某种程

```

1  cagagagaaggagaaatataccgatacatctttaagATGGATGTA AAAAATATCAGCCATT
                                     ↓ M D V K I S A I      8
61 CTGCTGGCCTGCATTATACAATATGCTGTGAGCTCACCTATACAGGTTTCTACTCAGGT
L L A C I I Q Y A V S ↓ S P I Q V F Y S G      28
121 GCTAAAATACTTGCTGAAGAAGATGCAATGGCCAAGGAGGACATTTCTCAAAGCAATAGAA
A K I L A E E D A M A K E D I L K A I E      48
181 AAAGCAGATCCAGGAAGCGTGAAGACACAGGACTCCATGGACATACTCAGTCAGATATTA
K A D P G S V K T Q D S M D I L S Q I L      68
241 GAGGCAAAACAAAGGTATTAAGCTGCAAACCCAAGAAGGAGACATTTATTTCAA AAACAAAGGT
E A N K G I K L Q T Q E G D I I Q K Q G      88
301 CGTAGCGCCATAAATGATGCAAGATTTCCCTTTGGCCTAAGTTGCGCGATGGGATTTGTCCCT
R ↓ S A I N D A R F L W P K S A D G I V P      108
361 GTGCCTTACAACCTCTCCTACAGCTATAATGCGGATCAGTTAGCTCTCTTTAAGAAGGCC
V P Y N L S Y S Y N A D Q L A L F K K A      128
421 ATTCAGGAGTTTGAAGCCTTAACCTGTGTGAGATTTGTACCTTGGACAACAGAAGTCAAT
I Q E F E A L T C V R F V P W T T E V N      148
481 TTTCTCAACATCATGTCTAATGGCGGTTGTGGATCTTTAATTTGGGAAAAATGGAGGAGCT
F L N I M S N G C G S L I G K N G G A      168
541 CAGGATTTGGATTTGGATGCAAATGGCTGCATGAATATGGGGATCATCCAGCATGAACTG
Q R L E L D A N G C M N M G I I Q [H] [E] L      188
601 AACCATGCCCTGGGCTTCTATCATGAACAGAACAGAAGCGACCGGGATGACTATGTTCATT
N [H] A L [G] [F] Y [H] [E] Q N R S D R D Y V I      208
661 ATACATACTGAGAATATCATACCAGACTTTCTCAA AATGTTGAAAAATACACACCAAT
I H T E N I I P D F L K M F E K Y N T N      228
721 AACCTTGGGATTTGAATATGACTACGCTTTCAGTGCATTACTACCGTTATCCTATATAGT
N L G G I E Y D Y A S V M H Y S R Y H Y S      248
781 ATCAACGGAGACATCACCATTGAGCCCAAGCCTGATCCAAATGTTCCCATTGGACAAAGG
I N G D I T I E P K P D P N V P I G Q R      268
841 GATGGACTTATGATTTCTGGACATTTCTAAGATTAACA AACTATATGAGTGCATGTGTGTC
D G L S I L D I S K I N K L Y E C N V ↓ C      288
901 TCCAATTTGCTCCCTTACTCCAATGGGATGATTTTCAGCCACTACCCTTCCCTTAC
S N L L P Y S N G M M I S A N Y P S A Y      308
961 CCTAATAATGCCAACTGTGTTGGTTGATTTAGA AACTCCATCTGGCCAGGTGACCCTGCAA
P N N A N C V W L I R T P S G Q V T L Q      328
1021 TTCCAAGCCTTTGATATCCAGTCATCTTCGGGCTGCGTCTCTGACTACATTAAGATCTAT
F Q A F D I Q S S S G C V S D Y I K I Y      348
1081 GATGGTCCCTAAGGCACTTCCCTGTGTTAGTAAACAGGGCATTYGGTACAGGACTGATC
D G P T K A F P V L V N R A C G T G L I      368
1141 CCTCTACAGATGCCTCCACTAACCAGATGCTGGTTGAGTTTGTCAGTGTAGAGCAGTT
P L Q I A S T N Q M L V E F V S D R A V      388
1201 ACTGGGACCGGCTTCAAAGCAACATATGGCTCAATTCAGTGTGTTGGAGCTTTCTATTCC
T G T G F K A T Y G S I Q C G G A F Y S      408
1261 TCACCCAAGACTTTACATCTCCGAATTACCTGGAAACTATACAACTAACACAAACTGC
S P K T F T S P N Y P G N Y T T N T N C      428
1321 ACCTGGACAATCACAGCTCCCGCTGGATTCAAGGTATCACTGCGCATCACTGTTGAA
T W T I T A P A G F K V S L R I T D F E      448
1382 CTTGAGATCGGAGCTTCGTGCAGATATGACTATCTAAACATTTACAATTTCAACTCTTGGT
L E I G A S C R Y D Y L N I Y N S T L G      468
1441 GCTGTATGGGCCCATACTGTGGCCCCATAGATTTCCATTCTGCTATTGTTTCCAAATCA
A V M G P Y C G A P I D F H S A I V S K S      488
1501 AATTCATGATGATCAGTGAACAGGACTTCTCAGGAA GCAATAAAGGCTTCAGCGCT
N S M M I T M N S D F S K Q Y T K G F S A      508
1561 ACCTATACTTTTGTGAGGtaagagaatggaaacgaaggaattcattgttactgaacaag
T Y T F V R
1621 gagagatggcgctctgcagtatcttgccacattaaatga aataaatgtgaaggatctac
1681 aagaaattatacagttaatcatttttgggaagggttg ttsctgtgtgatgataaattat
1741 gtttgaggaattttaacaagactaaataaacatgat ttttgtaaatataaaaaaaaaaaaa
1801 aa

```

图 2 非洲爪蟾 HE 最长克隆 cDNA 的核苷酸序列和推测氨基酸序列

Fig.2 Nucleotide and deduced amino acid sequences of the longest cloned cDNA of *Xenopus* HE

度的膨胀(表 1)。

为了验证 60kDa 和 40kDa HE 分子在溶解卵黄膜时的相互作用,我们将 40kDa HE 分子和浓度极低的 Superdex75 纯化样品(24 胚胎/ml)混合起来。极度稀释后的 Superdex

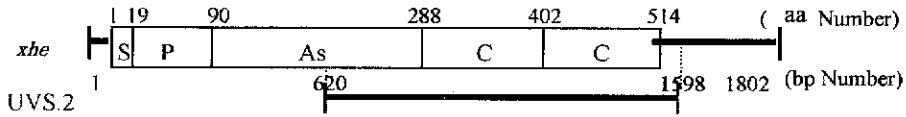


图3 *xhe* 编码蛋白即非洲爪蟾 HE 的推测一级结构

Fig.3 Deduced primary structure of *xhe*-encoded protein, *Xenopus* HE
UVS.2-encoding protein represents only about 3/4 portion of C-terminal of it

表1 各种 HE 样品的卵黄膜溶解活性

Table 1 VE-solubilizing activities of different kinds of hatching enzyme preparations

HE preparations ¹⁾	Number of eggs with VE solubilized at min				Proteolytic activity ³⁾	HE molecules kDa ⁴⁾
	30	40	50	120		
	Crude HE	3	5	6		
67% SAS ppt	3	4	6		100.1	60 + 40
Mono Q	0	0	0	0 ²⁾	98.3	40
Superdex 75	3	5	6		102	60 + 40

- 1) The concentrations of all HE preparations were 600 embryos/ml. HE, hatching enzyme; SAS, saturation of ammonium sulfate; Mono Q, Mono Q fractions; Superdex 75, Superdex 75 fractions.
- 2) VEs were swollen.
- 3) Enzyme activities on dimethyl casein.
- 4) Based on Western blot.

表2 60kDa 对 40kDa HE 分子卵黄膜溶解活性的影响

Table 2 Effect of 60kDa molecules on the VE-solubilizing activity of 40kDa molecules

Treatment ¹⁾	Numbers of eggs with VE solubilized at min			
	40	50	90	120
Q(1 000)	0	0	0	0 ²⁾
S(24)	0	0	0	0 ²⁾
Q(976) + S(24)	4	6		
S(20), 10min→Q(1 000)	0	0	6	
S(20), 10min→De Boar	0	0	0	0

- 1) Numbers in the Parentheses indicate the concentration of different HE samples. Q, Mono Q fraction; S, Superdex 75 fraction.
- 2) VEs were swollen.

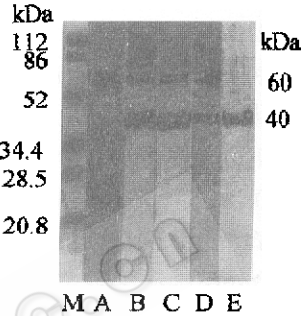


图4 各种 HE 样品的 Western 杂交

Fig.4 Western blotting of different kinds of HE preparations

The Abl used was the specific anti GST-UVS. 2 antibody of *Xenopus* HE. M, PM (prestained SDS standards) with MWs (kDa) indicated in the left of the figure; A, B, Crude hatching enzyme; C, 67% SAS ppt; D, Superdex 75 fraction; E, Mono Q fraction

75 纯化样品本身不能溶解卵黄膜,但它和 Mono Q 纯化样品(976 胚胎/ml)的混合物能完全溶解卵黄膜,而且用极度稀释的 Superdex 75 纯化样品进行 10min 短时处理后的卵黄膜能为 1 000 胚胎/ml 的 Mono Q 纯化样品完全溶解(表2)。

2.6 EDTA、金属离子和各种蛋白酶抑制剂对 HE 的作用

HE 样品对 Leupeptin、 ρ -

APMSF(ρ -咪基苯甲烷磺酸氟)、SBTI 大豆胰蛋白酶抑制剂、LBTI(利马豆胰蛋白酶抑制剂)

和 Ovomucoid、Bestatin 等非常敏感,而对 DFP(二异丙基氟磷酸)不敏感。利用不同浓度的 EDTA 和 Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 等金属离子测定其对 Superdex 75 纯化样品酶活性的影响,发现 HE 浓度依赖性地为 EDTA 所抑制,为 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 所激活,为 Zn^{2+} 和 Cu^{2+} 所抑制。

3 讨 论

本文从非洲爪蟾第 25 期胚胎头背部克隆出了一个有 1 802 个碱基的 *xhe* 基因,其转录的起始和终止,与胚胎的孵化进程完全一致。它的特点是,近 N-端处含有一个“HE × × H × × GF × HE”的保守序列,为 Astacin 家族中锌-金属蛋白酶的一个特征性活性位点,如喇咕 *Astacus* 的消化酶(Astacin)、人成骨蛋白(BMP-1)和果蝇的 Tolloid 分化因子、小鼠肾的一种膜蛋白酶(Meprin)、鱼 Medaka 的孵化酶 HCE(高卵壳溶解酶)和 LCE(低卵壳降解酶)以及参与鸸鹋蛋壳基质降解的 QuCAM-1 因子^[12]。*xhe* 编码蛋白(即非洲爪蟾 HE)的 N-端氨基酸序列与该家族的这些成员有 33% ~ 52% 的同源性。其中,与 HCE (51.3%)、LCE(47.1%)和 QuCAM-1(50.5%)具有最高同源性^[13]。Astacin 家族中这些高度保守的蛋白酶在功能上非常相似,它们在发育过程中都是以一种严格调控的方式参与了胚胎外被的破裂或降解;同时暗示非洲爪蟾 HE 可能也具有类似的功能。序列分析的结果表明,UVS.2 仅构成了 *xhe* C-端大约 3/4 的区域,只是非洲爪蟾 HE 基因中的一部分。*xhe* 含有一个编码 514 个氨基酸的开框阅读框架,其编码蛋白是一种分子量为 47.2kDa 的前原酶(Preproenzyme),在其推测一级结构中,含有一个信号肽序列、一个原酶序列和一个 425 个氨基酸的成熟酶;成熟酶又包括一个 *Astacus* 家族的金属蛋白酶功能区和两个 CUB 重复区。

xhe 的另外一个特点是,在金属蛋白酶功能区的 C-末端出现有两个 CUB 重复区。QuCAM-1 只有一个 CUB 重复区,HCE 和 LCE 没有 CUB 重复区;其它多种蛋白中同时含有金属蛋白酶功能区和 CUB 重复区,如 Tolloid、BMP-1、Uegf 和 A5 蛋白,它们均参与了发育过程的调控^[14]。属于此类的另一个蛋白是猪精子粘接蛋白(Spermadhesin),它位于精子头部,作为透明带和碳水化合物的一个结合蛋白起作用^[15]。鉴于与精子粘接蛋白在功能上的相似性,非洲爪蟾 HE 中的 CUB 重复区很可能是作为胚胎外被的一个结合区域而起作用,从而有助于对底物膜分子的成功降解。

实验中我们发现它对 EDTA 和 Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 等金属离子非常敏感,而对 DFP 不敏感,表现出了金属蛋白酶(Met alloprotease)的特征。又因其基因中存在有“HE × × H × × GF × HE”活性位点,证明它是一种金属蛋白酶。该酶对 Leupeptin、 ρ -APMSF、SBTI 和 LBTI 等胰蛋白酶的特异性抑制剂非常敏感,表明它是属于胰蛋白酶类型的一种金属蛋白酶。

根据 Western 杂交结果,非洲爪蟾 HE 的分子量为 60kDa。此分子量比依 *xhe* 的氨基酸序列所计算出的 47.2kDa 要大,这种差异可能是由 SDS-PAGE 的迁移假象所致,也可能是由功能酶的糖基化所致,我们的观点趋向于后者。在纯化过程中有时也会又出现一种 40kDa 分子,其出现的时间和量的变化表明 40kDa 分子是 60kDa 分子的降解产物,60kDa 分子具有很强的蛋白酶活性和卵黄膜溶解活性;40kDa 分子无卵黄膜溶解活性,尽管它具有很强的蛋白酶活性。生物活性分析的结果表明,60kDa 分子或其中某部分结构对 40kDa 分子的卵黄膜溶解活性是必须的。60kDa 分子在降解为 40kDa 分子时,所丢失

的某部分结构很可能就是 CUB 重复区, 而此 CUB 重复区可能是作为一个胚胎外被结合区域而起作用, 以助于对底物膜分子的成功降解, 它很可能在对卵黄膜分子结构的识别、修饰或改造中具有重要作用。而 40kDa 分子只代表非洲爪蟾 HE 中的蛋白酶主功能区, 所以它虽具有很强的蛋白酶活性, 但却丧失了卵黄膜溶解活性。

参 考 文 献

- 1 Carroll E J, Hedrick J L. *Dev Biol*, 1974, **38**: 1~13
- 2 Yoshizaki N. *Fac Sci Hokkaido Univ Ser VI Zool*, 1974, **18**: 469~480
- 3 Urch U A, Hedrick J L. *Archives Biochem Biophys*, 1981, **206**: 424~431
- 4 Nomura K, Tanaka H, Kikkawa Y *et al.* *Biochemistry*, 1991, **30**: 6115~6123
- 5 Yasumasu S, Iuchi I, Yamagami K. *Develop Growth Differ*, 1992, **36**: 241~250
- 6 Yasumasu S, Yamada K, Akasaka K *et al.* *Dev Biol*, 1992, **153**: 250~258
- 7 Sato S M, Sargent T S. *Dev Biol*, 1990, **137**: 135~141
- 8 Katagiri C h, Maeda R, Yamasika C *et al.* *Int J Dev Biol*, *in press.*
- 9 樊廷俊等. *生物化学与生物物理学报*, 1998, **30**: 75~80
- 10 Laemmli U K. *Nature*, 1970, **227**: 680~685
- 11 Heinkof S. *Gene*, 1984, **28**: 351~359
- 12 Dumermuth E, Sterchi E E, Jiang W *et al.* *J Biol Chem*, 1991, **266**: 21381~21385
- 13 Yasumasu S *et al.* *Dev Biol*, 1992, **153**: 250~258
- 14 Bork P, Beckmann G. *J Mol Biol*, 1993, **231**: 539~545
- 15 Sanz L, Calvete J J, Mann K S *et al.* *Feb Sletters*, 1992, **300**: 231~218

cDNA Structure and Some Biochemical Properties of Hatching Enzyme from *Xenopus laevis*

Fan Tingjun

(College of Life Sciences, Shandong University, Jinan 250100)

Koichi Mita Chiaki Katagiri S Yasumasu*

(Division of Biological Sciences, Graduate School of Science, Hokkaido University, Sapporo 060, Japan)

(Institute of Life Sciences, Sophia University, Tokyo 101, Japan)*

Abstract To determine its molecular identity and biochemical functions, *Xenopus* hatching enzyme was purified and assayed biochemically, and its cDNA was cloned and analyzed in this study. UVS. 2 has been known as a cloned cDNA expressed selectively in the hatching gland cells of *Xenopus laevis*. Its transcripts first appeared at stage 17, increased in amount and intensity to stage 30-34, and then decreased gradually thereafter. With UVS. 2 as a probe, a 1 802bp insert (designated *xhe*) was cloned from a cDNA library from the dorsoanterior portion of stage 25 embryos. It contains an open reading frame encoding 514 amino acids including both signal and propeptide sequences. The predicted mature enzyme comprising 425 amino acids consists of about 200 amino acid-long metalloprotease sequence of astacin family at the N-terminus, followed by two 110 amino acid-long repeats of CUB domain at the C-terminus. We conclude that UVS. 2 represents only an approximately 3/4 C-terminal portion of *xhe*. It was determined that HE has a molecular weight of 60kDa, and is a trypsin-type metalloprotease. It was very unstable and digested easily into 40kDa molecules. Sixty kDa molecules had a high VE-solubilizing activity and proteolytic activity. Probably the CUB repeats play an important role in mediating the VE and 40kDa molecule. Forty kDa molecules represent only the main metalloprotease domain of 60kDa molecules, with the two CUB repeats lost during purification. Therefore, 40kDa molecules had no VE-solubilizing activity, even it still had high proteolytic activity.

Key words *Xenopus laevis*, hatching enzyme, CUB domain, *xhe*, UVS. 2