

マダイ筋肉中のコラーゲン分解酵素の構造及び機能に関する研究

長崎大学大学院 生産科学研究科 吉田 朝美

魚肉は、畜肉よりもはるかに速く軟化現象が起こることから、流通過程においてその品質が低下しやすい。そのため、魚の品質保持を考えるうえで、魚肉軟化機構を解明することは非常に重要である。また、魚の刺身において、そのテクスチャは品質を左右する重要な要素であり、刺身の保存に伴うテクスチャの変化には、筋肉構成タンパク質の一つであるコラーゲンの崩壊が関与すると考えられている。そこで、本研究では、魚肉軟化機構を解明する一環として、マダイ筋肉中のコラーゲン分解に関わるプロテアーゼの構造及び機能の解析を行った。

コラーゲン分解に関わるプロテアーゼとしては、コラゲナーゼ並びにゼラチン分解酵素が挙げられる。コラーゲン分子は三重らせん構造をとる安定なタンパク質であり、生体内ではコラゲナーゼによってのみ三重らせん部位が限定分解される。限定分解されたコラーゲン分子の熱変性温度が低下することにより、生体内の温度でコラーゲンが変性しゼラチンとなり、ゼラチン分解酵素がこれを分解する。本論文の第1章～第5章ではマダイゼラチン分解酵素について、第6章ではマダイコラゲナーゼについて記述した。

第1章では、マダイ筋肉よりゼラチン分解酵素を部分精製し、その性状を明らかにした。なお、ゼラチン分解活性の測定は、ゼラチンザイモグラフィを用いて行った。マダイ筋肉のホモジネートを遠心分離後、その上清を硫酸塩析し、Q-Sepharoseカラムに供したところ、分子量の異なる4種類のゼラチン分解酵素が検出された。これらを、活性の強い順にG1（約90 kDa）、G2（約65 kDa）、G3（約60 kDa）、G4（約100 kDa）とし、各々の性状を調べた。G1及びG4は、Pefabloc SCにより阻害されたことからセリンプロテアーゼであること、特にG1はその基質特異性からトリプシン型セリンプロテアーゼであることがわかった。G2及びG3はEDTA並びに*o*-phenanthrolineにより阻害され、4-aminophenylmercuric acetate (APMA)により活性化されたことからメタロプロテアーゼであることがわかった。また、これらゼラチン分解酵素の至適pHは7-9、至適温度は20-40°Cであり、さらに、魚体死後の筋肉中のpHである酸性条件下、及び魚の流通・保存時の温度である0-10°Cにおいてもこれらの酵素は活性を有していた。このことから、これらのゼラチン分解酵素が魚体の死後のマダイ筋肉中で筋肉タンパク質分解に関与することが示唆された。

第2章では、マダイ筋肉よりゼラチン分解酵素 G1 を精製し、その構造を明らかにした。G1 の SDS-PAGE (還元条件下) による推定分子量は約 38 kDa であり、その N 末端アミノ酸配列 32 残基 (ILGGLKVSPGSIPWQVSVQVRPQNSNLPFKHT) を決定した。本酵素の N 末端配列の NCBI BLAST による相同性検索の結果より、本酵素は血液中に存在するトリプシン型セリンプロテアーゼである hyaluronan binding protein 2 (HABP2) と高い相同性を示すことがわかった。このことから、G1 が血液由来の酵素であることが予想された。

そこで第3章では、G1 をマダイ血清より探索した。その結果、マダイ血清中には G1 様酵素の存在が確認され、その N 末端配列 10 残基 (ILGGLKVSPG) を決定した。これはマダイ筋肉由来 G1 の N 末端配列と完全に一致した。従って、マダイ筋肉より精製されたゼラチン分解酵素 G1 は血液由来の酵素であることが明らかになった。

第4章では、ゼラチン分解酵素 G1 の生理機能解析の足がかりとして、その全一次構造を決定するために、G1 の cDNA クローニングを行った。本酵素の N 末端配列と相同性を示した HABP2 が肝臓において生合成され血液中に存在することから、G1 も肝臓で生合成されることが予想された。そこで、マダイ肝臓より全 RNA を抽出し、RT-PCR 法、3'-RACE 法及び 5'-RACE 法を用いて、マダイ G1 cDNA の部分塩基配列を決定した。G1 cDNA の塩基配列より演繹されたアミノ酸配列は、筋肉からの精製酵素の N 末端配列 32 残基と完全に一致する配列を含んでおり、さらにセリン酵素の活性中心である Ser、His 及び Asp も保存されていた。また、G1 は HABP2, tissue plasminogen activator (tPA) のような線溶系酵素と同様に、EGF (epidermal growth factor) 様ドメイン、クリングドメイン、トリプシン様ドメインを有することが明らかになった。従って、G1 は肝臓で生合成される線溶系酵素である可能性が示唆された。

第5章では、マダイ G1 の mRNA 及び酵素活性の組織分布について検討した。その結果、G1 mRNA は肝臓において強い発現が認められたが、その酵素活性は肝臓、筋肉、腎臓、心臓、卵巣において認められた。従って、マダイ G1 は肝臓で生合成され、血液を介して筋肉及び他の臓器へ運ばれ、各臓器において機能することが示唆された。

第6章では、マダイ筋肉よりコラゲナーゼを部分精製し、その性状を調べた。その結果、マダイ筋肉中に I 型コラーゲン分解能を有するコラゲナーゼの存在を確認し、その至適 pH は 7 であることがわかった。今後、マダイ筋肉コラゲナーゼのさらなる精製、構造決定、及び機能解析が必要である。

以上の結果より、元々筋肉中に存在するコラゲナーゼ、G2、及び G3 のようなメタロプロテアーゼと、血液中に存在し毛細血管を介して筋肉へと浸潤するセリンプロテアーゼ G1 が協同して、魚体死後のマダイ筋肉中のコラーゲン分解を行っていることが示唆された。