

論文の内容の要旨

水圏生物科学専攻
平成 13 年度博士課程 進学
氏 名 福島 英登
指導教官 渡部 終五

魚類ミオシンの加熱ゲル形成能に関するタンパク質工学的研究

水産練り製品は魚肉の加熱ゲル化特性を利用した食品であるが、魚肉の加熱ゲル化には筋肉の主要構成タンパク質であるミオシンが重要な働きをすることが知られている。ミオシンは分子量約 200,000 の 2 本の重鎖と分子量約 20,000 の 4 本の軽鎖からなる巨大タンパク質で、N 末端側の球状の頭部サブフラグメント-1 (S1) は ATPase 活性およびアクチン結合能を、繊維状の尾部ロッドはフィラメント形成能を有する。このミオシンは加熱に伴い変性、集合し、網目構造を構築し、ゲルを形成する。広く練り製品の原料として用いられるスケトウダラは資源量が多く、冷凍すり身の開発により原料肉は長期保存が可能となった反面、潜在的な加熱ゲル形成能はやや弱い。一方、シログチは高い加熱ゲル形成能を有するものの、資源量は少なく、市場の需要を十分に満たすことができないのが実態である。

本研究はこのような背景の下、シログチおよびスケトウダラ普通筋を対象に、ミオシンおよびロッドの加熱ゲル化特性および熱力学的性状を調べた。次に、両魚種につき、ロッド中、C 末端側約半分の L-メロミオシン(LMM)領域を遺伝子工学的手法で調製し、上述の性状を調べた。さらに、同様の方法でキメラ体および点変異体 LMM を作製し、加熱ゲル化特性、熱力学的性状および重合化能を測定し、両魚種の加熱ゲル形成能の相違に關与する領域あるいはアミノ酸の特定を試みた。以下に得られた成果の概要を述べる。

1. シログチおよびスケトウダラ普通筋ミオシンおよびロッドの動的粘弾性および熱力学的性状

シログチ背側普通筋およびスケトウダラ冷凍すり身に 0.5 M KCl 溶液を加えて粗ミオシンを抽出した後、硫酸分画を行い、ミオシンを精製した。さらに、精製ミオシンに α -キモトリプシンを重量比で 1/130 量添加し、10°C で 30 分反応させロッドを調製した。精製標品は SDS-PAGE に供して純度を確認し、動的粘弾性測定機を用いて温度分散分析を行い、5-80°C の昇温に伴う粘弾性変化を調べた。その結果、シログチ普通筋ミオシンの貯蔵弾性率 (G') は昇温に伴い、32-38°C の低温度域および 47-54°C の高温度域で増大し、42-46°C の中温度域で減少した。一方、損失弾性率 (G'') は 32-40°C および 53-60°C で増大した。次に、スケトウダラ普通筋ミオシンの G' は 29-46°C の幅広い温度域で徐々に増大し、 G'' は 20-58°C の範囲で複数回増減を繰り返した。一方、ロッドの G' はシログチでは 34-38°C、スケトウダラでは 30-46°C で上昇し、ミオシンでみられた低温度域での上昇域に一致した。したがって、ミオシンの高温度域での G' の上昇は頭部 S1 に由来することが示唆された。

示差走査熱量測定 (DSC) の結果、シログチ普通筋ミオシンは 30-60°C、スケトウダラのそれは 20-60°C の範囲で 3 つの主要な吸熱ピークを示した。なお、円二色性 (CD) 測定で求めた加熱による α ラセンの unfolding は DSC の吸熱ピークをよく説明し、その温度・熱変性率曲線は、先に測定した G' の昇温に伴う変化と似た傾向を示した。したがって、ミオシンの加熱ゲル形成にはその加熱に伴う unfolding が密接に関わっていることが明らかとなった。なお、周波数分散分析では、シログチ・ミオシン加熱ゲルの G' 値は 200 Pa、一方、スケトウダラのそれは 100 Pa と両魚種間で大きく異なった。この原因として、前述したミオシン分子の unfolding の温度依存性の違いが関わることが考えられた。

2. シログチおよびスケトウダラ L-メロミオシンの動的粘弾性および熱力学的性状

LMM はロッドの C 末端側約 66 kDa の領域で、ほぼ 100 % の α ラセン 2 本が互いに絡まりあった 2 重コイル構造を形成している。既知のデータによると、シログチおよびスケトウダラ普通筋ミオシンの LMM 全長 564 残基中、51 残基のアミノ酸置換がみられる。Lupas (1991) に従い、コンピュータソフト PROTANAS for Win を用いて 2 重コイル構造の形成確率を調べたところ、シログチ LMM は全領域で高い値が示された。一方、スケトウダラ LMM は 482-487 残基間で形成確率が著しく低く、シログチ LMM より不安定な構造であると予想された。そこで両魚種ミオシンの加熱ゲル形成能の違いを LMM レベルで比較するため、まず、既報のシログチおよびスケトウダラ普通筋 LMM をそれぞれコードする cDNA を pET-11a ベクター (Novagene 社製) に挿入して発現ベクター pETcro および pETpol を調製した。さらに、この大腸菌の発現系を用いて LMM 標品を調製し、動的粘弾性および熱力学的性状の測定に供した。動的粘弾性の測定から、シログチ LMM の G' および G'' は 34°C 付近に大きなピークを示した。一方、スケトウダラ LMM の G' は明確なピークは示さず 80°C まで徐々に上昇し、 G'' は明確な変化を示さなかった。

DSC 分析の結果、シログチ LMM の α らせんの unfolding による吸熱ピークは 32.1°C でのみ観察された。一方、スケトウダラ LMM の吸熱ピークは 27.7、30.5、35.8 および 43.9°C と幅広い温度域でいくつか観察され、複雑な過程を経て構造が崩壊することが示された。以上の結果から、両魚種 LMM の加熱に伴う unfolding 反応過程の違いが、加熱ゲル形成能の差の一因と考えられた。

3. シログチおよびスケトウダラのキメラ体 L-メロミオシンの動的粘弾性および熱力学的性状

加熱ゲル形成能および熱力学的性状の決定に重要な領域を同定するため、シログチおよびスケトウダラ LMM 間に存在するアミノ酸変異 51 残基中、28 残基の変異を含む N 末端側 403 残基の領域をシログチのもの、一方、C 末端側 161 残基をスケトウダラのものとするキメラ体 C403/P161 LMM、さらにはその逆の組成の P403/C161 LMM を調製した。すなわち、pETcro および pETpol 中、LMM をコードする DNA の 3'末端側 481 bp を他の遺伝子に組み換えた発現ベクターを構築してキメラ体 LMM を調製した。

動的粘弾性測定の結果、C403/P161 LMM の G' および G'' は、シログチ LMM のそれと同様に 34°C 付近にピークを示した。一方、P403/C161 LMM の G' は 35-50°C で急激に増加した後、80°C まで緩やかに増加したが、G'' に明確な変化は認められなかった。P403/C161 LMM において、スケトウダラ LMM にみられない G' の急激な増加が認められたことから、シログチ由来の LMM 領域は高いゲル形成能を有し、これがシログチ肉の高い加熱ゲル形成能の一因であることが示唆された。

DSC 分析の結果、C403/P161 LMM の吸熱ピークは、シログチ LMM と同様に 31.3°C に 1 つ観察された。一方、P403/C161 LMM では、30.8、34.5 および 42.9°C とスケトウダラ LMM と同様に、幅広い温度域でいくつか観察された。以上のように、キメラ体 LMM の熱力学的性状は N 末端側の領域に由来する性状をよく反映した。

4. シログチ、スケトウダラおよび点変異体 L-メロミオシンの加熱重合

シログチおよびスケトウダラ LMM を 80°C で 10 分加熱後、 β -メルカプトエタノールの添加による還元処理およびこの処理を行わない非還元処理の標品を調製し、SDS-PAGE 分析に供した。その結果、非還元シログチ LMM で、約 70 kDa の単量体のバンドの他に約 130 および 200 kDa などの複数の多量体のバンドが認められた。一方、還元処理したシログチ標品および非還元スケトウダラ LMM では約 70 kDa のバンドのみが認められ、多量体のバンドはみられなかった。以上のように、シログチ LMM は加熱に伴いジスルフィド結合を介して重合体を形成し、この反応もシログチおよびスケトウダラ普通筋ミオシンの加熱ゲル形成能の違いに寄与していると考えられた。

シログチ LMM のシステイン残基は、N 末端から 40 および 525 残基目に、一方、スケトウダラ LMM では 40、491 および 525 残基目に存在する。Cys40 付近では両魚種間でアミノ酸置換はみられないのに対し、Cys525 付近では多くみられる。そこで、シログチ LMM の Cys525 をアラニンに置換した点変異体シログチ C525A LMM を

U.S.E.Mutagenesis Kit (Pharmacia 社製) を用いて pET 大腸菌発現系を構築して調製した。この変異体 LMM を 80°C で 10 分加熱したところ、本来のシログチ LMM でみられた加熱重合能が消失した。したがって、シログチ LMM の加熱重合化には、Cys525 が関与することが明白に示された。

以上、本研究により、シログチ普通筋ミオシンは加熱に伴い狭い温度域で急激に unfolding するのに対し、スケトウダラ普通筋ミオシンは、幅広い温度域で unfolding が徐々に進行することが示された。これらの変化は動的粘弾性の測定パターン之差をよく反映したことから、熱力学的性状之差が両魚種の異なる加熱ゲル形成能の一因であると考えられた。さらに、加熱に伴うジスルフィド結合はシログチ LMM のみに観察され、この反応もシログチ肉の高い加熱ゲル形成能を支持した。なお、この加熱重合化に関与するアミノ酸は Cys525 と同定された。これらの成果は魚類ミオシンの種特異的な加熱ゲル化特性の一端を示したもので、食品科学上に資するところが大きいものと考えられる。