

論文の内容の要旨

水圏生物科学専攻
平成 14 年度博士課程 入学
氏名 植木 暢彦
指導教官 渡部 終五

Molecular biological studies on the structural stability of fish myoglobins (魚類ミオグロビンの構造安定性に関する分子生物学的研究)

ミオグロビン(Mb)は筋細胞中に存在し、分子状酸素を貯える分子量約 15,000 の球状タンパク質である。Mb 分子は一般に 8 つの α -ヘリックス構造を含み、N 末端側からそれぞれセグメント A-H と名づけられる。魚類の Mb は哺乳類のものとは比べて非常に不安定であり、自動酸化や凝集を起こしやすいことが知られている。このような不安定性は魚類の生息環境に密接に関連するものと考えられる。魚類では一般に環境水温に応じて体温が変化するために、タンパク質の構造が概して不安定である。また、Mb の変性は筋肉の色調に直接反映されるため、特にマグロ類など Mb 含量の高い赤身魚では著しい褐変を伴うことがあり、有効利用上の大きな障害となっている。しかし、魚類 Mb の不安定性および魚種間の安定性の違いについて、分子レベルでの解明はこれまでほとんど行われていなかった。

本研究はこのような背景の下、特に Mb 含量の高いサバ科魚類、すなわち、メバチ *Thunnus obesus*、クロマグロ *Thunnus thynnus*、キハダ *Thunnus albacares*、カツオ *Katsuwonus pelamis* およびマルソウダ *Auxis rochei* の Mb につき、その構造と安定性の関連性を明らかにすることを目的として行われたもので、成果の概要は以下の通りである。

Mb の cDNA クローニングと一次構造解析

これまで一次構造についての情報がなかったメバチおよびマルソウダの Mb につき、それぞれの普通筋(速筋)から cDNA をクローニングし、アミノ酸配列を演繹した。両魚種 Mb の cDNA は 444 bp の翻訳領域を有し、147 アミノ酸をコードしていた。しかし、非コード領域についてはメバチで 5'側に 81 bp、3'側に 267 bp、マルソウダではそれぞれ 75 および 247 bp と、わずかながら両魚種で差が認められた。

演繹アミノ酸配列につき、他の魚類、哺乳類および軟体類の Mb と比較した結果、サバ科魚類の Mb 間ではアミノ酸同一率が非常に高く(76.0-100.0%)、哺乳類(39.5-49.0%)および軟体類(16.6-21.4%)との同一率は低かった。特に、メバチとクロマグロの Mb ではコード領域の塩基配列にわずかな差が認められたもののアミノ酸配列がまったく同じであり、またメバチとキハダの Mb では 2 残基の置換しか認められなかった。そのほか、例えば、カツオ Mb の Ala13, Lys90, Gln91 や、マルソウダ Mb の Gly49, Gly62, Gln112 など、それぞれの Mb に特異的なアミノ酸置換が認められた。一方、ヘムとの結合に重要な遠位 His60 および近位 His89 は上記のすべての Mb で保存されていた。

さらに近隣接合法を用いた系統解析によって、メバチおよびマルソウダの Mb はサバ科魚類 Mb で形成されるクラスターに属することが判明した。また、メバチはクロマグロと、マルソウダはカツオと、それぞれ最も近縁であることが示唆された。

サバ科魚類 Mb の熱安定性

前述した 5 種類のサバ科魚類の血合筋(遅筋)から精製した Mb につき、示差走査熱量分析(DSC)によって遷移温度(T_m)を、また円二色性(CD)分析によって α -ヘリックス含量の温度依存的変化を調べ、安定性を比較した。 T_m 値はカツオ(79.9°C)>クロマグロ(78.6°C)>キハダ(78.2°C)>メバチ(75.7°C)>マルソウダ(75.0°C)の順であった。上述のように、メバチとクロマグロの Mb ではアミノ酸配列がまったく同じであり、メバチとキハダの Mb では 2 残基の置換しか認められていないにもかかわらず、その安定性は互いに明確に異なっていた。また、魚類 Mb の T_m 値は対照のウマ心臓 Mb(84.2°C)と比べていずれも低く、サバ科魚類 Mb の不安定性が明らかにされた。

一方、いずれの Mb においても α -ヘリックス含量は測定温度の上昇とともに減少した。10°Cにおける含量はカツオ Mb で最も高く(44.8%)、マルソウダ Mb で最も低かった(34.5%)。他の 3 魚種の Mb については、いずれも約 40%と大きな差は認められなかった。これらの結果から、わずかなアミノ酸配列の変異が Mb の安定性に少なからぬ影響を及ぼすこと、一次構造が同じでも高次構造の違いや翻訳後修飾等により安定性が異なることが示唆された。

翻訳後修飾に関する検討

メバチ、キハダおよびマルソウダ Mb をリシルエンドペプチダーゼで限定分解して得られた断片につき、MALDI-TOF マススペクトロメトリーにより翻訳後修飾の有無について検討した。キハダ Mb の消化断片を解析した結果、ペプチド 101-108(N 末端からの残基番号)に何らかの修飾がある可能性が示されたが、その同定には至らなかった。一方、メバチおよびマルソウダの Mb では、N 末端の Met が除去され、次の Ala がアセチル化されていることが明らかとなった。

大腸菌発現系の構築および組換え Mb の安定性

メバチ、クロマグロおよびマルソウダの Mb につき大腸菌発現系を構築した。すなわち、pGEX-2T ベクターを用いて GST 融合タンパク質としてヘミンの存在下、可溶性画分に組換え Mb (rMb)を過剰発現させ、アフィニティーカラム、スロンビンによる GST の除去などの手法により、高純度の rMb を得た。ヘミンの添加により、精製中に起こるタンパク質分解が抑制され、さらにフォールディングが促進されることを見出した。

このようにして得られた 3 つの rMb につき、 α -ヘリックス含量の変化および Soret 帯吸収を指標として変性剤の尿素および塩酸グアニジン(GdnHCl)に対する耐性を調べ、安定性を比較した。他方、血合筋から精製した native Mb についても同様に安定性を調べ、一次構造との関連性について検討した。その結果、マルソウダ rMb で変性剤に対する安定性が最も低く、またメバチおよびクロマグロのものは同程度の安定性を示した。さらに、10°C における α -ヘリックス含量もマルソウダ rMb で最も低く(29.0%)、他の rMb では 35%前後とほぼ同程度であった。これらの値はいずれの魚種でも native Mb に比べて 5%程度低く、rMb の脆弱性が示唆された。他方、native Mb の変性剤に対する耐性はクロマグロで最も高く、メバチおよびマルソウダで低かった。

メバチ Mb 変異体の作成と安定性の比較

メバチ Mb cDNA につき、PCR を用いて点変異 DNA を作成し、大腸菌発現系で次の 5 種類の点変異体 Mb を調製した。すなわち、カツオ Mb のみに変異が認められた部位を置換した変異体 P13A、マルソウダ Mb のみに変異が認められた部位を置換した変異体 A62G、メバチとキハダの Mb 間で異なる 2 残基のいずれか、あるいは両方を置換した変異体 I21M、V57I および I21M/V57I につき、前項と同じ方法で α -ヘリックス含量の温度依存的変化および変性剤に対する耐性を調べた。

5 種類の Mb 変異体の Soret 帯吸収は尿素濃度 4.0-6.0 M および GdnHCl 濃度 1.25-2.0 M

付近で急激に減少し、ヘムの解離に伴う高次構造の崩壊が示唆された。メバチ野生型 rMb (WT)の尿素および GdnHCl 変性における自由エネルギー $-\Delta G_D^0$ 、それぞれ 3.74 および 2.37 kcal/mol と比べて変異体 P13A ではそれぞれ 4.78 および 2.84 kcal/mol と安定で、 α -ヘリックス含量もすべての温度域で WT より常に高かった。逆に、変異体 A62G の変性剤に対する耐性は上記の順にそれぞれ 2.76 および 2.10 kcal/mol と WT に比べて著しく低く、 α -ヘリックス含量も常に低かった。Pro13 はセグメント A に位置し、 α -ヘリックス構造の形成を阻害していると考えられる。他方 Ala62 は、ヘムとの結合に重要な遠位 His60 を含み疎水性のヘムポケット形成に関わるセグメント E に位置している。これらのことから、Mb の構造安定性に重要な領域に存在するアミノ酸残基を置換すると、ヘリックス形成能や疎水性のわずかな変化によっても、Mb 分子全体の安定性が影響を受けることが示唆された。

一方、変異体 I21M の安定性(上述した変性剤に対する自由エネルギー $-\Delta G_D^0$ はそれぞれ 3.67 および 2.35 kcal/mol)は WT と類似していた。これに対して、変異体 V57I (それぞれ 3.88 および 2.53 kcal/mol)および変異体 I21M/V57I (それぞれ 3.90 および 2.60 kcal/mol)は両変性剤に対して WT よりも安定であった。また、これら 2 つの変異体の α -ヘリックス含量は 35.0-52.5°Cにおいて WT に比べて高かった。これらの結果から、メバチおよびキハダの native Mb の安定性は I21M の置換よりも V57I の置換の影響を大きく受けることが示唆された。この結果は Val57 がセグメント E に位置することが原因と考えられた。

以上、本研究により、新たに 2 種類のサバ科魚類 Mb の一次構造が明らかにされた。さらに、点変異体を用いた実験から、 α -ヘリックス形成部位や疎水性のヘムポケット周辺など、Mb の構造安定化に重要な領域では、わずか 1 残基のアミノ酸置換が Mb の安定性に影響を及ぼす場合があることが明らかとなった。これらの結果は、サバ科魚類 Mb においてアミノ酸同一率が高いにもかかわらず、その安定性が明確に異なる理由の一端を示すもので、比較生化学上ならびに食品化学上、資するところが大きいと考えられる。