

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 植木 暢彦

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。魚類の Mb は哺乳類のもの比べて不安定で、自動酸化や凝集を起こしやすい。また、Mb の変性は筋肉の色調に直接反映され、とくにマグロ類など Mb 含量の高い赤身魚では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、とくに Mb 含量の高いサバ科魚類、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。

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 Mb を cDNA クローニングし、アミノ酸配列を演繹した。他の魚類、哺乳類および軟体類 Mb の演繹アミノ酸配列と比較した結果、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。とくに、メバチとクロマグロ Mb ではアミノ酸配列が同一で、メバチとキハダ Mb では 2 残基の置換しか認められなかった。

前述した 5 種類のサバ科魚類の血合筋から精製した 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。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、10°Cにおける α -ヘリックス含量はカツオ 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ず影響を及ぼすこと、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。

キハダおよびマルソウダ Mb につき、質量分析により翻訳後修飾についての検討を行った結果、キハダ Mb では、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、マルソウダ 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。

メバチ、クロマグロおよびマルソウダ Mb につき大腸菌発現系を構築し、これら 3 魚種の組換え Mb (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に対する抵抗性を調べ、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た。その結果、rMb ではマルソウダで

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。native Mb の安定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く、前述の DSC および CD 分析の結果と一致した。また、いずれの魚種でも native Mb に比べて rMb の方が不安定であった。

次に、メバチの Mb をもとに 5 種類の点変異体 Mb、すなわち変異体 P13A、I21M、V57I、A62G および I21M/V57I を調製し、上述の方法で安定性を比較した。その結果、メバチ野生型 rMb (WT) と比べて変異体 P13A では安定性が高く、変異体 A62G では低かった。一方、変異体 I21M の安定性は WT と同程度であった。これに対して、変異体 V57I および I21M/V57I は WT よりも安定であった。これらの結果から、 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。

以上、本研究は、新たに 2 種類のサバ科魚類 Mb の一次構造が明らかにした。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にしたもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は本論文が博士(農学)の学位論文として価値あるものと認めた。