

論文の内容の要旨

水圏生物科学 専攻

平成 16 年度博士課程進学

局 詩織

指導教員 阿部 宏喜

論文題目 魚類におけるイミダゾールジペプチド合成酵素に関する研究

イミダゾールジペプチドはヒスチジン関連化合物とも呼ばれ、カルノシン (β -アラニルヒスチジン)、アンセリン (β -アラニル- π -メチルヒスチジン)、バレニン (あるいはオフィジン; β -アラニル- τ -メチルヒスチジン) およびホモカルノシン (γ -アミノブチリルヒスチジン) などが挙げられる。近年、特にカルノシンを中心に、これらのジペプチドの持つヒトに対する機能性が注目されている。これらのジペプチドは脊椎動物筋肉中に広く分布し、嫌気的運動時のプロトン緩衝物質として機能することが知られている。また、動物の種類によって含有されるジペプチドの種類は大きく異なる。すなわち、カルノシンは陸上動物の筋肉中に豊富であり、魚類ではウナギ筋肉に多い。アンセリンはニワトリ胸筋および高速遊泳魚の普通筋中に高濃度に存在する。バレニンはクジラとヘビの筋肉中に特異的に多量に含まれている。一方、ホモカルノシンは筋肉中には存在せず、脳神経内に分布が限られている。このように、イミダゾールジペプチドの分布は種特異性が高く、進化的共通点を持たない。むしろ、生息環境や運動様式と関連するものと推定されている。しかしながら、なぜ動物種によって含有されるジペプチドの種類が異なるのかは、未だ解明されていない。

そこで、本研究では動物体内におけるイミダゾールジペプチドの生合成系に着目した。カルノシンはカルノシン合成酵素によって、 β -アラニンとヒスチジンとの縮合により合成されることが、陸上動物の筋肉で知られている。一方、アンセリンはカルノシン-*N*-メチルトランスフェラーゼによってカルノシンから合成されることが、ニワトリ胸筋で確認されて

いる。アンセリンは、また、 β -アラニンと π -メチルヒスチジンの縮合による合成も確認されている。しかしながら、これらの酵素は未だ陸上動物でも単離されておらず、その性質もほとんど不明である。魚類では *in vivo* 実験でジペプチドの生合成は確認されているが、関連酵素は明らかになっておらず、合成経路は未だ不明である。

そこで、本研究ではまず、魚類におけるカルノシン-*N*-メチルトランスフェラーゼによるカルノシンのメチル化および β -アラニンと π -メチルヒスチジンの縮合によるアンセリン合成の確認を行なった。また、ウナギ筋肉に関しては、 β -アラニンとヒスチジンの縮合によるカルノシン合成およびその他のジペプチドの合成活性を確認した。ついで、ウナギ筋肉からジペプチド合成酵素を単離精製し、精製酵素の N 末端アミノ酸配列を明らかにした。さらに、このジペプチド合成酵素がジペプチドの分解をも触媒する新規酵素であることが判明した。結果の概要は以下の通りである。

1. 魚類および筋肉におけるカルノシン-*N*-メチルトランスフェラーゼ活性の確認

イミダゾールジペプチドの合成は、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて確認することとし、はじめに HPLC による各イミダゾールジペプチドの分離定量条件を確立した。ついで、コントロールとしてニワトリ雛の胸筋を用い、既に存在が知られているカルノシン-*N*-メチルトランスフェラーゼ活性を確認することで、酵素の抽出および反応条件の検討を行なった。

この抽出および反応条件に基づき、メバチマグロおよびマカジキ普通筋について、カルノシンのメチル化によるアンセリン合成活性の有無を調べた。しかしながら、どちらの魚に関しても、アンセリン合成は認められなかった。また、ミンククジラの筋肉においても、カルノシン-*N*-メチルトランスフェラーゼによるバレニン合成は確認されなかった。したがって、イミダゾールジペプチドは本酵素によって合成されるものではないと結論された。

2. 魚類およびクジラ筋肉における β -アラニンとヒスチジン関連化合物の縮合によるイミダゾールジペプチド合成活性の確認

ウナギはカルノシンを高濃度に含有することから、カルノシン合成酵素の存在が予測された。そこで、ウナギ筋肉の硫酸 40-75%飽和沈殿画分を調製し、50mM Tris-HCl (pH 7.5) 中でそれぞれ 250 mM の β -アラニンおよび 160 mM のヒスチジンと 37°C で 1 時間反応させたところ、カルノシンの合成が確認された。なお、この反応は ATP の加水分解を必要としないことがわかった。また、 β -アラニンと π -メチルヒスチジンを反応させた場合には、アンセリンの合成が認められた。アンセリンはウナギ筋肉中に痕跡程度にしか検出されないにもかかわらず、アンセリン合成活性の方がカルノシン合成活性よりも 10 倍程度高かった。さらに、ヒスチジンの代わりに τ -メチルヒスチジンを基質としたところ、バレニンの合成も認

められ、 γ -アミノ酪酸とヒスチジンからは僅かながらホモカルノシンの合成が認められた。また、カルノシンおよびアンセリンの合成に対する 2 価金属イオンの要求性を調べたところ、カルノシンとアンセリン合成ともに、2mM の Zn^{2+} によって活性化された。

ついで、メバチマグロ普通筋の硫安 0-75%飽和沈殿画分を調製し、300mM の β -アラニンおよび π -メチルヒスチジンと反応させたところ、2mM の Co^{2+} 添加によってアンセリン合成が認められた。なお、マカジキのアンセリン合成については、 Co^{2+} あるいは Mn^{2+} が必要とされた。ミンククジラに関しては、金属イオン無添加でも、 β -アラニンと π -メチルヒスチジンの縮合によるバレニンの合成が確認された。また、 Zn^{2+} によってその活性は約 4 倍に増加することが認められた。

3. ウナギ筋肉からのイミダゾールジペプチド合成酵素の精製および諸性質の検討

ウナギ筋肉の硫安 50-75%飽和沈殿画分を調製し、DEAE-Toyopearl, Ether-Toyopearl, His-Trap, Hydroxyapatite, MonoQ および Superdex 200 の各クロマトグラフィーを用いてジペプチド合成酵素の精製を行ない、最終的におよそ 1,130 倍に精製した。精製酵素を SDS-PAGE に供したところ、約 43kDa 付近に活性に対応するバンドが認められた。Superdex 200 ゲルろ過クロマトグラフィーによる結果を考慮すると、本酵素は 6 もしくは 7 量体構造をとることが推測された。精製酵素も粗酵素と同様にカルノシン、アンセリン、バレニンおよびホモカルノシン合成活性を示し、アンセリン合成活性が最も高かった。また、2 mM の Zn^{2+} および Co^{2+} の添加によって、それぞれ 5 倍および 4 倍に活性が増大した。精製酵素の諸性質を検討したところ、最適 pH は 9.5 付近、最適温度は 60°C であった。 β -アラニンと π -メチルヒスチジンに対する K_m 値はそれぞれ 44 および 89mM と高く、本酵素は基質親和性が低いことが示唆された。 V_{max} 値はそれぞれ 7.4 および 11 μ mol/min \cdot mg であった。精製酵素の N 末端アミノ酸配列の 25 残基 LVGGSLTRNVPWQVLLQFSDSVLWG が決定され、Protein-protein BLAST (blastp)データベースによる検索の結果、精製酵素はゼブラフィッシュのハプトグロビン β 鎖の部分配列と高い相同性を示すことがわかった。

4. 精製酵素によるジペプチドの加水分解

ハプトグロビンの β 鎖の一次構造がトリプシン様セリンプロテアーゼと類似していることから、本酵素がジペプチド分解活性を持つ可能性が示唆された。そこで、精製酵素をカルノシン、アンセリンあるいはバレニンとともにインキュベートしたところ、これらジペプチドはいずれも加水分解された。ジペプチド合成と同様に、アンセリン分解活性が最も高かった。このことから、イミダゾールジペプチド合成酵素が、ジペプチドの加水分解も触媒することがわかった。SDS-PAGE でごく僅かに認められた他のバンドの N 末端アミノ酸配列が、従来知られているカルノシナーゼなどのジペプチド分解酵素と相同性を示さな

かったことから、精製標品中に、合成酵素と分解酵素が別個に存在する可能性は低いと考えられた。ついで、2mMのプロテアーゼインヒビターおよび10mM EDTAによるジペプチドの加水分解に対する阻害効果を調べた。ジペプチド加水分解は、金属キレーターである *o*-phenanthroline によって完全に阻害され、ジペプチダーゼの阻害剤である bestatin によっても70%阻害された。PCMBによる阻害効果は50%程度で、PMSF および EDTA はほとんど阻害活性を示さなかった。これらのことから、本酵素がメタロプロテアーゼの一種である可能性が示唆された。

以上本研究により、ウナギ筋肉より精製されたイミダゾールジペプチド合成酵素は、同一酵素が複数のジペプチドを合成することがわかった。この反応は β -アラニンとヒスチジン関連化合物の縮合により、ATPを必要としないことから、従来陸上動物で知られていたカルノシン合成酵素とは別のものと考えられた。また、本酵素はジペプチドの合成と分解の両方の反応を行なう新規酵素であると結論された。これらの成果は今後イミダゾールジペプチドの種特異的分布を解明するための基礎となり、またジペプチドの生理機能の究明のために、カルノシン以外の入手困難なイミダゾールジペプチドを供給するための資となるものと考えられる。