

## 論文の内容の要旨

水圏生物科学 専攻  
平成 20 年度博士課程 入学  
氏名 池口 弘毅  
指導教員 渡部 終五

### クロマグロのトランスグルタミナーゼに関する生化学的研究

マグロ類は漁獲物の中で最も重要な魚類の 1 つである。近年、世界的な資源量の減少が大きな問題となっているが、最近、わが国でもクロマグロ *Thunnus orientalis* の養殖生産が急速に拡大し、消費者の需要を満たしつつある。マグロ類は高鮮度のまま寿司や刺身などで生食されることから、調理加工中に多くの残渣が発生し、その有効利用が大きな課題となっている。このような調理加工中に生ずる高鮮度の残渣については、魚類筋肉タンパク質特有の加熱ゲル化能力を利用した練り製品の原料としての利用が考えられる。魚肉練り製品は弾力性のあるテクスチャーが品質を決定する要因であるが、そのテクスチャー発現には内在性トランスグルタミナーゼ (TGase) が機能することが知られている。本酵素はアミノアシル基転移反応を触媒するトランスフェラーゼで、筋肉タンパク質の主成分であるミオシンの分子内および分子間に共有結合の  $\epsilon$ -( $\gamma$ -glutamyl)lysine イソペプチド結合による架橋を形成して、魚肉のゲル化特性を向上させる。したがって、マグロ類筋肉に内在すると思われる TGase を有効に活用できれば、調理加工中に発生する筋肉残渣をねり製品原料として利用可能と考えられるが、マグロ類の TGase の性状に

についてはほとんど知見がない。

本研究はこのような背景の下、マグロ類有効利用の開発研究の一環として、近年養殖が盛んなクロマグロの普通筋から TGase を精製し、酵素化学的性状を解析した。次に、cDNA クローニングによりクロマグロ TGase 遺伝子を単離し、その一次構造を解析して既報の他魚種 TGase と詳細に比較したもので、得られた成果の概要は以下の通りである。

## 1. クロマグロ・トランスグルタミナーゼの精製

まず市販のクロマグロ普通筋 200 g を細切後、氷冷下、3 倍量の 20 mM Tris-HCl (pH 7.5)、5 mM EDTA、1 mM dithiothreitol (DTT) および 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride を含む溶液中でホモジナイズし、遠心分離(10,000g x 30 分)した。この上清を粗抽出液として、monodansyl cadaverine (MDC) および 1 mg *N, N'*-dimethylcasein を含む反応液中、37°C で一晩反応させ、SDS-PAGE 分析に供したところ、MDC の *N, N'*-dimethylcasein への取り込みがみられた。このことから、クロマグロ筋肉中に TGase の存在が示唆されたので、次にクロマグロ TGase の精製を試みた。

先に調製した粗抽出液 600 mL を種々のクロマトグラフィーに付し、得られた各画分を TGase 活性測定および SDS-PAGE 分析に供した。TGase 活性は、1 mg *N, N'*-dimethylcasein、15 μM MDC、10 mM CaCl<sub>2</sub>、5 mM DTT、50 mM Tris-HCl (pH 7.5) および各画分 100 μL を含む合計 1 mL の反応液を調製し、37°C でインキュベートした後、励起波長を 350 nm として 480 nm の蛍光強度から測定した。粗抽出液を DEAE-650M 陰イオン交換クロマトグラフィーに供し、0-0.5 M NaCl の直線的濃度勾配で吸着タンパク質を溶出したところ、単一ピークを示す活性画分を得た。本画分に含まれるタンパク質を Sephacryl S-300 ゲルろ過クロマトグラフィーに供したところ、活性は幅広い溶出画分にみられた。このうち、最も高い活性を示した画分を合一し、Mono Q 陰イオン交換クロマトグラフィーに付した。得られた活性画分を SDS-PAGE 分析に供したところ、120 kDa、97 kDa、41 kDa および 25 kDa の少なくとも 4 つの主要なバンドが観察された。これらの活性画分につき、Superdex 75 ゲルろ過クロマトグラフィーに供し、標的タンパク質を排除限界の画分に溶出させた。得られた活性画分を SDS-PAGE 分析に供したところ、分子サイズ 120 kDa の単一成分を示す電気泳動パターンが観察された。

本精製法による TGase 回収効率は 0.14% と非常に低かった。これまで、魚類 TGase の多くはその分子サイズが 70-80 kDa と報告されており、クロマグロ TGase はそれらに比べてやや大きかった。なお、本タンパク質を含む画分を polyvinylidene difluoride 膜に転写して、Applied Biosystems 社製 476A 型プロテインシーケンサーに付して N 末端アミノ酸配列分析を行ったが、供試量が少なかったため配列情報は読み取れなかった。

## 2. クロマグロ・トランスグルタミナーゼの酵素化学的性状

クロマグロ TGase の精製では、筋肉粗抽出液から当該成分の回収量が少なく、また精製途中で活性が著しく低下した。そこで酵素化学的性状を調べるため、精製 TGase でまず活性の温度依存性をみた。TGase 活性は 37°C で 1 分間に 1 mg *N, N'*-dimethylcasein に取り込まれる MDC 量で

示した。その結果、本酵素の至適温度は 50°C であることが明らかとなった。一方、至適 pH を調べるため、pH 4.5-7.5、6.5-9.5 および 8.5-11.5 範囲で、それぞれ 50 mM 酢酸ナトリウム、Tris-HCl およびグリシン緩衝液を用いて、TGase 活性を測定した。その結果、pH 8.5 で 27 nmol/ min · mg と最も高い比活性を示した。また、酸性域の pH 4.5 および 5.5 では 7 nmol/ min · mg と比活性が低かった。一方、アルカリ性域の pH 9.5 および 10.5 ではそれぞれ、25 および 22 nmol/ min · mg と、やや比活性が高かった。このアルカリ域での高い比活性は既報のティラピア *Oreochromis niloticus* 普通筋 TGase と同様の傾向にあった。

一方、クロマグロ TGase のアイソフォームの存否を調べるため、精製酵素につき一次元目を等電点電気泳動、二次元目を SDS-PAGE とする二次元電気泳動に供した。Coomassie Brilliant Blue 染色の結果、分子サイズ 120 kDa で等電点 7.4 の主成分のほか、微量成分がわずかにアルカリ性側にみられた。これまで同一の組織由来 TGase のアイソフォームはニジマス卵巣およびマガキ閉殻筋につき、タンパク質レベルで知られている。

### 3. クロマグロ・トランスグルタミナーゼの cDNA クローニング

クロマグロ（体重約 20 kg）の背部から 1 g の普通筋を採取して 5 倍量の RNeasy Lysis Buffer に浸漬し、ISOGEN により全 RNA を抽出した。これを DNase 処理してゲノム夾雑物を除き、Superscript III による逆転写反応で 1 本鎖 cDNA を合成した。次に、既報の魚類 TGase の保存領域を参照してプライマーを設計し、クロマグロ TGase 遺伝子の部分領域を PCR 増幅して塩基配列を決定した。さらに、得られた配列から遺伝子特異的プライマーを設計し、rapid amplification of cDNA ends (RACE) 法により完全長 cDNA を得た。完全長クロマグロ TGase 遺伝子は 2,872 bp からなり、678 アミノ酸残基をコードしていた。本アミノ酸残基から推定される分子サイズは 74 kDa と、精製クロマグロ TGase に比べて著しく小さかった。一次構造の配列情報から、N 型糖鎖結合部位および O 型糖鎖結合部位はそれぞれ、5 つおよび 1 つみられ、翻訳後修飾による糖鎖付加を受けて分子サイズが大きくなったものと考えた。活性部位の Cys269、His326 および Asn349 は他の脊椎動物と同様に transglutaminase/protease-like homologous (TGc) ドメインに保存されていた。推定 Ca<sup>2+</sup>結合部位は 7 つあり、その中、3 部位は高度に保存されていた。哺乳類 TGase と比較すると、クロマグロ TGase は GTP 結合部位が認められず、活性制御が哺乳類とは異なることが示唆された。前述のように、クロマグロ TGase にも Ca<sup>2+</sup>結合部位が認められ、既報の TGase と同様に Ca<sup>2+</sup>が結合することで、活性部位の構造変化が起こると考えられた。

BLAST 検索に供したところ、本 cDNA の演繹アミノ酸配列は大西洋サケ *Salmo salar* TGase と 75% の高いアミノ酸同一率を示したが、マダイ *Pagrus major* のそれとは 38% と低かった。哺乳類および魚類 TGase のアミノ酸配列をもとに、MEGA 4.0 プログラムによる近隣接合法の分子系統樹を作成した。その結果、クロマグロ TGase は大西洋サケと最も近縁で 1 つのクラスターを形成した。TGase は組織型と血漿型が知られており、組織型はさらに 1-7 型が報告されている。本

クラスターが哺乳類 TGase2 と同じグループで、その他のアイソフォームから分岐していることから、クロマグロ TGase は組織型 TGase2 と判断した。

本 cDNA の開始コドンから 134 アミノ酸残基までをコードする領域につき、digoxigenin でラベルしたプローブを合成し、クロマグロ普通筋から調製したゲノム DNA の *Pst* I および *Kpn* I 消化産物を用いてサザンブロット解析を行った。その結果、異なるサイズの 2 つのバンドが観察され、クロマグロの TGase 遺伝子はゲノム上、少なくとも 2 コピー存在していることが示された。

以上、本研究ではまず、クロマグロ普通筋から TGase の単離を試みた。種々のクロマトグラフィを試みて精製したところ、クロマグロ TGase は分子サイズ 120 kDa と他生物種のそれに比べて大きいことが明らかとなった。一方、酵素化学的性状は他の魚類 TGase と類似した。なお、cDNA クローンの演繹アミノ酸配列から推定された分子サイズは 74 kDa と、精製 TGase とは異なっていた。一次構造を解析したところ、翻訳後修飾による O 型糖鎖付加部位が 1 つと N 型糖鎖付加部位が 5 つみられたことから、精製酵素と cDNA クローンから得られた分子量の差は糖鎖の存在が一因と考えられた。以上、本研究はクロマグロ TGase の生化学的性状を明らかにしたもので、比較生化学に資するとともに、廃棄未利用のマグロ類筋肉の有効利用に基礎的知見を与えることから、食品化学に資するところも大きいと考えられる。