

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 池口 弘毅

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。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 の性状についてはほとんど知見がない。そこで本研究は、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するとともに、cDNA クローニングにより TGase 遺伝子を単離し、その一次構造を解析することを目的とした。

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 を含む溶液で調製した粗抽出液 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 μ M MDC、10 mM CaCl₂、5 mM DTT、50 mM Tris-HCl (pH 7.5) および各画分 100 μ L 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。順次、DEAE-650M 陰イオン交換クロマトグラフィー、Sephacryl S-300 ゲルろ過クロマトグラフィー、Mono Q 陰イオン交換クロマトグラフィー、Superdex 75 ゲルろ過クロマトグラフィーで精製したところ、SDS-PAGE で分子サイズ 120 kDa の単一成分を示す精製標品が得られた。

次に、精製 TGase 活性の温度依存性をみた。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 \cdot 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 \cdot 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 \cdot mg と、やや比活性が高かった。さらに、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。その結果、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。

次に、クロマグロ (体重約 20 kg) の背部から普通筋を採取して全 RNA を抽出し、1 本鎖 cDNA を合成するとともに、既報の魚類 TGase 遺伝子の塩基配列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 Ca²⁺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。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近隣接合法の分子系統樹を作成したところ、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ー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。これらの成果は学術上、応用上資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。