

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：82708

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K05529

研究課題名(和文)筋原線維結合型セリンプロテアーゼによる火戻り現象誘発メカニズムの解明

研究課題名(英文)relationship between myofibril-bound serine protease and modori-phenomenon

研究代表者

大久保 誠(Ohkubo, Makoto)

国立研究開発法人水産研究・教育機構・水産大学校・講師

研究者番号：60381092

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：

魚類の筋原線維に結合し、蒲鉾の火戻りの原因と考えられている筋原線維結合型セリンプロテアーゼ(Myofibril-bound Serine Protease, MBSP)における火戻りへの関与を調べた。筋肉中のMBSP活性は、魚種ごとに大きく異なっていた。MBSP活性が低いスケトウダラでは、MBSPではなくカテプシンLが火戻りの原因であることが分かった。マサバでは生殖腺の発達に伴い、コイでは長期間の飢餓によって筋肉中の活性が上昇することが分かった。MBSP活性が中程度であるコイでは、MBSPは精製ミオシンの頭部と尾部の間を分解し、ゲル濾過による分離ではミオシン尾部画分にMBSP活性が検出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マサバでは生殖腺の発達に伴ってMBSP活性が有意に上昇することが分かった。また、約6ヶ月間餌止めをした飢餓状態のコイでは、MBSP活性が餌止め前の約90倍に上昇した。これらの結果から、生殖内分泌中枢を介した成長と繁殖のトレードオフによるMBSPの調節機構が存在することが示唆された。

蒲鉾原料の90%以上を占めるスケトウダラ冷凍すり身では、火戻りの原因からMBSPが除外され、原因酵素がカテプシンLであると特定されたことで、蒲鉾製造現場においてより効率的な火戻り抑制法が検討され、魚肉練り製品の品質向上が期待される。

研究成果の概要(英文)：

Relationship between myofibril-bound serine protease (MBSP) and modori-phenomenon was investigated. Carp MBSP degraded intact myosin at position between myosin head and myosin rod. In gel filtration, MBSP activity was detected in fraction of the separated myosin rod. The level of MBSP activity in myofibrillar fraction was differed among fish species. In Alaska pollock muscle, which contains low MBSP activity, it was demonstrated that cathepsin L was main causative enzyme of modori-phenomenon and MBSP is not significantly participate in this phenomenon. In scomber muscle, which contains relatively higher MBSP activity, MBSP activity was significantly elevated in accompanied with progress of reproductive maturation. MBSP activity in carp muscle was elevated to 90 times by starvation for 6 month.

研究分野：水産生物化学

キーワード：蒲鉾 火戻り ミオシン プロテアーゼ

1. 研究開始当初の背景

蒲鉾の火戻り現象は、蒲鉾の製造工程で起こる弾力の著しい低下現象であり、蒲鉾の商品価値を失わせる。これまでに、火戻りは 50~60 の温度帯で生じることや、特定のプロテアーゼ阻害剤により抑制できることから、その原因は蒲鉾の原材料である「すり身」の中に存在するタンパク質分解酵素(プロテアーゼ)が原因であり、蒲鉾の内部に形成されたミオシンの網目構造がプロテアーゼの働きによって崩壊することで、火戻りが生じると考えられている。

これまでに、火戻りの原因酵素として魚類筋肉の筋形質画分(水溶性画分)に存在する複数のプロテアーゼが同定され、酵素学的特性が明らかにされている。しかし、いずれのプロテアーゼもすり身の製造工程における「水晒し」により容易に除去されることや、魚種ごとに酵素学的特性が異なる等、蒲鉾製造工程における火戻りの知見との相違があることから、真に火戻りの原因酵素が特定されるに至っていない。

筋原線維結合型セリンプロテアーゼ(Myofibril-Bound Serine Protease, MBSP)は、魚類の筋肉中で筋原線維に結合して存在するタンパク質分解酵素である。MBSP は筋原線維タンパク質に強く結合しているため、水晒し工程でもすり身から分離されない。また、精製した MBSP の酵素学的特性は、火戻りに関する知見ともよく一致しているため、火戻りの主たる原因酵素であると考えられている。

これまでに、数種の魚類の筋肉から MBSP が精製され、酵素学特性が明らかにされた。さらに、遺伝子クローニングにより一次構造が決定されている。しかし、MBSP の本来の働きである筋原線維タンパク質への分解作用は明らかにされていない。

2. 研究の目的

魚類の筋原線維に結合し、蒲鉾の火戻りの原因と考えられている MBSP について、火戻りへの関与を調べた。すなわち、MBSP は筋原線維とどのように結合し、MBSP が蒲鉾内部でどのようにミオシン重鎖に作用し、その結果、ミオシンのゲル形成能にどのような影響を及ぼすのかを明らかにし、火戻りのメカニズムを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

コイ・フナ・ハクレン等のコイ科魚類の全ゲノムデータベースを解析し、MBSP の cDNA 配列及びアミノ酸配列を推定した。魚種間で保存性の高い領域をエピトープとし、ポリクロナール抗体を作成した。エソ MBSP では、現在判明している N 末端付近のアミノ酸配列の一部をエピトープとしてポリクロナール抗体を作成した。コイ及びマエソから筋原線維タンパク質を調製し、ウェスタンブロットを行った。

コイの生魚から筋肉を採取し、既知の方法に従ってミオシンを抽出した。同時に MBSP 活性を測定した。精製したミオシンを 4 で保管し、ミオシンに結合している MBSP によるミオシンの分解を SDS-PAGE で調べた。さらに分解産物をゲル濾過により分画し、MBSP 活性を測定することでミオシン中の MBSP の結合部位を調べた。

スケトウダラ、カナガシラ、マダイ、ワニエソ、シログチ、マサバを用い、筋原線維タンパク質を調製した。蛍光合成基質を用いて筋原線維タンパク質に結合している MBSP 活性を測定した。さらに、筋原線維タンパク質を 55 で加熱した後、MBSP によるミオシン重鎖の分解を SDS-PAGE で調べた。

スケトウダラ及びカナガシラの筋肉から、筋形質画分を調製し、イオン交換及びゲル濾過カラムクロマトグラフィーを用いて分離し、筋肉中に存在し、火戻りの起こる条件で活性を有するプロテアーゼを網羅的に同定した。次いで、筋形質プロテアーゼを分離し、酵素学的特性及び筋原線維タンパク質に対する分解作用を調べた。また、筋肉をホモジナイズ後、遠心分離し、水晒しによる筋形質プロテアーゼの除去を調べた。

マダイの筋肉から筋原線維タンパク質を調製し、マエソ MBSP 及びシログチ MBSP と同様の条件(pH 6.0、55、10 分間加熱)によりマダイ MBSP を可溶化した。ついでマダイ MBSP の酵素学的特性を明らかにした。

2019 年 7 月に異なる海域(長崎県沖及び島根県沖)で漁獲されたマサバについて、生殖腺の発達状況、筋肉中の MBSP 活性を比較した。

4. 研究成果

コイ及びマエソの筋肉から筋原線維タンパク質を調製し、MBSP 抗体を用いたウェスタンブロットを行ったが、MBSP のシグナルは検出できなかった。実験に使用した筋原線維タンパク質を MBSP の至適温度である 55 で加熱し、SDS-PAGE に供した結果、ミオシン重鎖の顕著な分解は見られなかった。すなわち、試料に用いた魚の筋肉中には MBSP の発現が低く、ポリクロナール抗体では MBSP を検出できなかったと考えられた。

コイ筋肉から精製したミオシンを Sephacryl S-300 に供し、蛍光合成基質を用いて各フラクションの MBSP 活性を測定した結果、MBSP 活性は約 400kDa の位置に検出された。コイ MBSP の分

子量である 28kDa の位置には活性は検出されなかった。精製したミオシンを 4 で保管した後、SDS-PAGE に供した結果、MBSP によりミオシンは頭部と尾部に分離されたことが分かった。さらに、4 で保管した後のミオシンを Sephacryl S-300 に供した結果、MBSP 活性はミオシン重鎖が溶出した分子量約 200kDa の位置に検出された。以上の結果から、コイ MBSP はミオシン重鎖に結合し、主にミオシン頭部と尾部の間を加水分解すると推定された。

スケトウダラ、カナガシラ、マダイ、ワニエソ、シログチ、マサバの筋肉から筋原線維タンパク質を調製し、MBSP 活性を調べた結果、いずれの魚種にも筋原線維画分に MBSP が存在することが分かった。さらに、いずれの魚種においても、MBSP はトリプシン型セリンプロテアーゼとして類似した酵素学的特性を示した。

実験に用いた魚種間で MBSP 活性の強さを比較した結果、スケトウダラ、カナガシラ、マダイは MBSP 活性が低く、ワニエソ、シログチは中程度であり、マサバは MBSP 活性が高かった。これらの結果は、既に報告されている「魚種ごとの戻りやすさ（志水ら，日本水産学会誌，47，95-104，1981）」と明らかに異なっていた。すなわち、既に報告されている戻りやすい魚種とは、筋形質プロテアーゼの一部が水晒しにより除去されることなくすり身中に残存し、MBSP とともに筋原線維タンパク質を分解している可能性が示唆された。従って、火戻りが生じるメカニズムを明らかにするためには、MBSP による作用のみならず、魚種ごとにすり身に残存する筋形質プロテアーゼの種類、酵素学的特性及び活性の強さを明らかにし、MBSP 及び筋形質プロテアーゼの両者によるミオシン重鎖の分解を調べなければならないことが考えられた。

これまでの結果から、火戻りが非常に強いことから蒲鉾の原料に使用されていないカナガシラを試料魚とし、筋形質プロテアーゼを網羅的に探索した。その結果、多機能プロテアーゼ (Multi Catalytic Protease, MCP)、カテプシン L、筋形質セリンプロテアーゼ (Muscle Soluble Serine Protease, MSSP) の 3 種が同定された。いずれのプロテアーゼも、火戻りが生じる条件である 50、0.5M 塩化ナトリウム存在下、pH7~8 で活性を示した。これら 3 種のプロテアーゼのうち、MSSP が最も高いミオシン分解作用を示した。また、カナガシラの筋肉をホモジナイズ後、遠心分離した後に、筋原線維画分に残存する筋形質プロテアーゼ活性を調べた結果、カナガシラ MSSP は複数回水晒しを行わなければ筋原線維タンパク質から除去できないことが分かった。カナガシラ MSSP を精製し、N 末端アミノ酸配列を決定した結果、2-マクログロブリンと高い相同性を示した。すなわち、カナガシラ MSSP は既知のマエソ MSSP と同様に、2-マクログロブリンと複合体を形成したプロテアーゼであると推定された。カナガシラ筋肉に含まれる MBSP 活性は低かったことから、カナガシラにおける強い火戻りは、すり身に残存する MSSP が原因酵素であることが分かった。

カナガシラと同様に、スケトウダラの筋形質プロテアーゼを探索した結果、MCP、高分子型及び低分子型テプシン L、MSSP の 4 種が同定された。スケトウダラ MSSP は塩化ナトリウム添加により活性化し、さらにトロンピン阻害剤である argatroban により阻害されたことから、同酵素はトロンピン様セリンプロテアーゼであることが分かった。冷凍すり身でも同様の実験を行った結果、同重量のスケトウダラ筋肉とほぼ同等の低分子型テプシン L 活性が検出されたが、MCP、MSSP、高分子型カテプシン L の活性はほとんど検出されなかった。これらの結果から、スケトウダラ筋肉中に存在する MCP、MSSP、高分子型カテプシン L はすり身製造時の水晒し工程において除去されたが、低分子型カテプシン L はすり身中に残存していることが分かった。スケトウダラ筋肉をホモジナイズ後に遠心分離し、水晒しによる各プロテアーゼの除去を調べた結果、カテプシン L 活性は 4 回の操作でも筋原線維タンパク質中から検出された。以上の結果から、我が国の蒲鉾製造における原材料の 90% を占めているスケトウダラ冷凍すり身では、MBSP は火戻りにはほとんど関与せず、低分子型カテプシン L が主な火戻りの原因酵素であることが分かった。

2019 年 7 月に長崎県沖で漁獲されたマサバの生殖腺重量指数 (GSI) は、同日に島根県沖で漁獲されたマサバの約 5 倍であり、長崎県沖で漁獲されたマサバは島根県沖で漁獲されたマサバに比べて性成熟が進行していることが分かった。筋原線維画分中の MBSP 活性は、島根県沖で漁獲されたマサバは長崎県沖で漁獲されたマサバの約 4 倍であり、有意に高かった。一方、約 6 ヶ月にわたって餌止めを行って飢餓状態にしたコイの筋肉から筋原線維タンパク質を調製し、MBSP 活性を測定した結果、MBSP 活性は餌止めを行う前と比較して約 90 倍に上昇した。これらの結果から、MBSP 活性は成長と繁殖のトレードオフによって調節されていると推定された。すなわち、産卵期や飢餓状態の魚では、生殖腺の発達や産卵行動、生命の維持のための栄養源として筋肉タンパク質が利用される。そのため、同条件下では従来から知られているオートファジーに加えて、筋肉中の MBSP 活性が上昇して筋原線維タンパク質を分解する可能性が示唆された。そして分解産物は栄養素として生殖腺へ運搬される、或いは糖質へと変換されてエネルギー源として利用される。このような学術的考察は、産卵期のワニエソ筋肉では非産卵期のよりも強い火戻りが生じる（八島ら，長崎大学水産学部研究報告，74/75，65-71，1993）産卵のための河川に遡上するサケの筋肉ではオートファジーによるタンパク質分解が活性化する（山下，日本水産学会誌，60(4)，439-442，1994）という既知の知見とも一致している。

本研究における当初の目的は、MBSP がどのように筋原線維タンパク質に結合し、どのようにミオシンを分解して火戻りを起こすのかを明らかにすることであった。そして生化学的実験によって、MBSP はミオシン尾部に結合し、ミオシン頭部と尾部の間を加水分解すると推定された。一方で、免疫組織化学による MBSP の細胞内分布やミオシンの分解産物の詳細な解析については、有益な成果が得られなかった。これは組織内に発現している MBSP が非常に少ないことが原因で

あると考えられる。また、本研究において、MBSP は様々な魚種の筋肉中に存在し、ほぼ同様の酵素学的特性を示すことが分かった。しかしながら、筋肉中の MBSP 活性は魚種ごとに大きく異なっており、特に MBSP 活性が低いカナガシラやスケトウダラでは、MBSP ではなく MSSP やカテプシン L が火戻りの主な原因酵素であることが分かった。さらに、火戻りの原因は MBSP のみではないことから、魚種ごとに異なるプロテアーゼに対する抑制方法を検討することで、効果的に火戻りの抑制が可能となると期待される。

マサバ及びコイで明らかになったように、MBSP 活性は魚の生殖腺状況や栄養状況によっても活性が変動するという新しい知見が得られた。今後は、成長と繁殖のトレードオフにおける MBSP の関与を調べるという新しい研究を展開することによって、MBSP の発現が上昇した試料を用いることで、MBSP の細胞内分布やミシンへの作用を明らかにすることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Makoto Ohkubo, Shigenori Yaguchi, Masakazu Kondo, Toshimichi Maeda	4. 巻 68
2. 論文標題 Identification of Myofibril-bound Serine Protease from Red Seabream (Pagrus major) Ordinary Muscle	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of National Fisheries University	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大久保誠・谷口成紀・前田俊道
2. 発表標題 スケトウダラ筋肉から発見されたトロンピン様セリンプロテアーゼ
3. 学会等名 令和4年度日本水産学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大久保誠・中山洸・小林望・中澤奈穂・谷口成紀・前田俊道
2. 発表標題 カナガシラ筋形質画分からのセリンプロテアーゼの精製
3. 学会等名 令和3年度日本水産学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大久保誠・中山洸・小林望・谷口成紀・前田俊道
2. 発表標題 カナガシラの蒲鉾製造特性～火戻り誘因プロテアーゼの同定～
3. 学会等名 令和2年度日本水産学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大久保誠・谷口成紀・前田俊道
2. 発表標題 スケトウダラ冷凍すり身に含まれる火戻り原因プロテアーゼの同定
3. 学会等名 平成31年度日本水産学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	谷口 成紀 (Yaguchi Sigenori) (10549942)	国立研究開発法人水産研究・教育機構・水産大学校・助教 (82708)	
研究分担者	前田 俊道 (Maeda Tosimichi) (20399653)	国立研究開発法人水産研究・教育機構・水産大学校・教授 (82708)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------