

令和元年6月21日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K07574

研究課題名(和文) 甲殻類における銅蛋白質群の黒変現象への寄与とその反応機構について

研究課題名(英文) Studies on the contribution and reaction mechanism of cuproproteins for melanization in crustaceans

研究代表者

増田 太郎 (Masuda, Taro)

京都大学・農学研究科・助教

研究者番号：40395653

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：黒変は甲殻類における重要な品質劣化現象である。本反応ではチロシンなどを基質として最終的に不溶性の黒色素メラニンを生成する。黒変反応を触媒する酵素の候補として、フェノールオキシダーゼ(P0)と、その類縁タンパク質のヘモシアニン(Hc)が挙げられている。本研究では、国産の食用甲殻類について、その体液中のフェノールオキシダーゼ活性を指標に、黒変の主因となるタンパク質を探索した。その結果、各食用甲殻類において、P0のみが本活性を有しており、Hcの活性は認められなかった。また、P0分子には多様な成熟過程、局在などが異なる多様な分子種が見られ、主要な分子は種により大きく異なることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

黒変反応の原因酵素については、当初から知られていたフェノールオキシダーゼ(P0)の他に、近年甲殻類の酸素運搬タンパク質であるヘモシアニン(Hc)が関与する可能性も指摘されていた。本研究では、国産の主要な食用甲殻類数種におけるP0活性を指標に、甲殻類黒変現象の原因タンパク質精製し、この酵素活性はほぼP0に依存していることを明らかにした。Hcは、P0と類似の構造を持ち、甲殻類体液中に極端な高濃度で存在するが、酵素活性はほぼ認められず、極めて微弱な活性を持ち得るか否かは今後の検討課題である。

研究成果の概要(英文)：Melanization or black spot formation in crustacean is one of the most serious problems on food industry. Phenoloxidasases (P0) and hemocyanins (Hc), both of which are cuproprotein, are the candidates of the enzyme that mainly causes the melanin formation. In this study, I have investigated the real source of the enzymatic activity for melanin formation. Although Hc is an extremely abundant protein, it did not show detectable P0 activity. On the other hand, P0 showed prominent P0 activity and it contributed to almost all the P0 activity in hemolymph of some shrimp species. Further, we have identified some molecular species of P0, each of which showed distinctive feature in terms of the localization and maturation process. It was also suggested that the dominant molecular type of P0 was varied among shorimp species.

研究分野：水産生物化学

キーワード：甲殻類 黒変 メラニン形成 銅タンパク質

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

日本人にとってエビ類は極めてなじみ深い食材である。現在、本邦は世界のエビの総輸入量のうち、三分の一を消費するエビ消費大国である。これらの輸入エビは冷凍品として流通するが、添加物による酸化防止処理が施されていない場合、解凍時に急速に黒色のメラニンを生じ、その商品価値が著しく損なわれる。黒変(メラニン形成)反応では、甲殻類体液に含まれるチロシン、ドーパなどの mono-, di-フェノール化合物を基質とした酸化反応が律速となっており、この反応はフェノールオキシダーゼ(以下 PO)によって触媒される。PO は活性中心に二核の銅を含むタイプ 3 銅タンパク質に分類され、類縁タンパク質として甲殻類の酸素運搬タンパク質として機能するヘモシアニン(以下 Hc)がある。PO と Hc は互いに類似の活性中心を持っていることから、Hc もフェノールオキシダーゼ活性を持ち得るとの仮説が唱えられており、甲殻類黒変反応の主因となるタンパク質については現在議論的となっている。現在、メラニン形成抑制のため亜硫酸塩などの添加物が広く用いられているが、亜硫酸塩はエビ体内のトリメチルアミノオキシドと反応し、毒性の高いホルムアルデヒドを生成する。したがって、亜硫酸塩添加に代わるメラニン形成阻害法が求められており、そのためには黒変原因酵素を明確にし酵素反応機構を明らかにすることが肝要である。

2. 研究の目的

本研究では、甲殻類体液中の PO と Hc の活性に着目し、甲殻類における黒変反応の原因酵素を明確にする。PO と Hc は、極めて類似した構造を持っていると考えられるが、その酵素活性と生体内における機能は大きく異なる。本研究では、両タンパク質の高分解能 X 線結晶構造解析による立体構造解析を行い、両者の活性中心とその周辺の詳細な立体構造を明らかにすることで、両者における活性の差異をもたらす構造的背景を解明する。また、報告者はこれまで、古くから知られてきた血球由来の PO とは異なり、甲殻類血漿に存在する「分泌型 PO(POb)」を見だし甲殻類 PO にタイプの異なる複数の分子種が存在することを示してきた。本研究においては PO の分子種にも着目し、食用エビ類における黒変反応の主因となる酵素とその分子種についても検討する。

3. 研究の方法

生体試料の入手が可能である食用エビ類(クルマエビ、イセエビ)を試料とした。生体から体液を抽出し、mono-PO 反応(基質チラミン)と di-PO 反応(基質ドーパミン)について、波長 490 nm 付近に吸収極大を持つドーパクロムの生成を指標に活性の測定を行った。ここで抽出した粗体液より、硫酸アンモニウムによる塩析と、陰イオン交換、疎水性、サイズ排除各クロマトグラフィーを用いて PO 活性画分を精製し、各段階の PO 活性から原因酵素の活性、比活性、回収率を算出した。

単一に精製した PO と Hc について、分子種の同定のため LC-MS/MS により構成タンパク質の同定を行った。また、従来から知られている一般的な PO(血球細胞型・POa)と、報告者が以前に明らかにした新規 PO(血リンパ型・POb)各々に対する特異的な抗体を用いたウェスタンブロットを行い、クルマエビ、イセエビ体液に存在する PO 分子種を解析した。

PO と Hc における PO 活性の有無に関する構造的背景を明らかにし、酵素反応の詳細な解析を可能とするため、イセエビ、クルマエビ由来の PO、Hc 各精製タンパク質について結晶化を試みた。X 線回折データは SPring-8 BL38B1 において行い、分解能向上のため HAG 法を用いた結晶の凍結を行いデータを取得した。

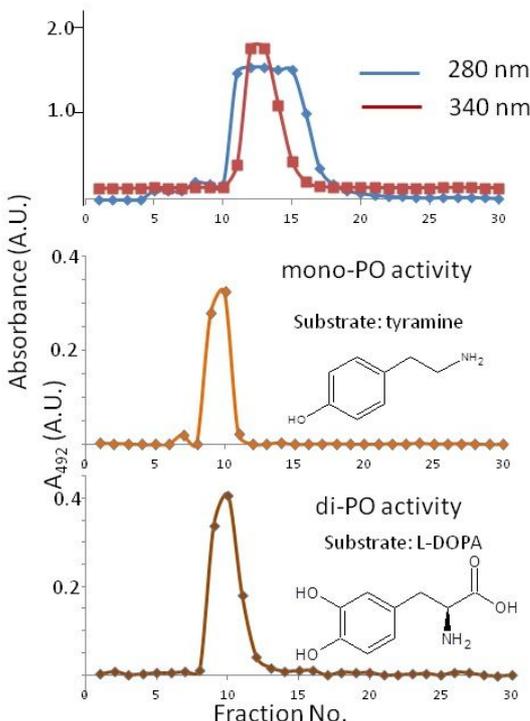


図1 イセエビ体液のPO活性本体の陰イオン交換クロマトグラフィーによる精製

4. 研究成果

4-1 クルマエビ、イセエビ体液における PO 活性の本体

報告者らは以前、クルマエビ血リンパに存在する新規 PO(POb)を見出した(Masuda T. et al. 2012, *Fish Shellfish Immunol.* 32: 61-68)。本研究においても、クルマエビ血リンパより PO 活性(mono, di)を指標に活性の本体を精製したところ、POb が精製され、最終精製タンパク質の回収率は 19.6%で比活性は 847 倍となり最終精製物にはほぼ POb のみが含まれていた。

一方、イセエビ血リンパからの P0 活性精製では、活性の本体は回収率 10%、比活性 476 倍で精製され、主として従来から知られる血球型である P0a から構成されていた。しかし、イセエビ血リンパの P0 活性本体には、新規型の P0b も少量含まれていた。図 1 はイセエビ血リンパからの P0 活性精製における各段階のうち、陰イオン交換クロマトグラフィーの溶出パターンである。最上段のグラフは各溶出画分の 280 nm および 340 nm の吸光度を示しており、それぞれタンパク質と主として Hc から成る銅タンパク質の溶出パターンを示している。図から明らかのように、mono-および di-P0 活性は Hc の溶出に先だって溶出しており、イセエビ血リンパにおける P0 活性の本体は Hc ではなく P0 と考えられる。P0 を含まない Hc 画分から mono, di-P0 活性は認められなかったことから (データ示さず)、イセエビ血リンパにおける P0 活性の本体は P0 であると考えられる。また、本研究より活性の主体となる P0 分子種は、クルマエビとイセエビの間で異なっていることが明らかとなった。即ち、イセエビでの体液 P0 活性の主体は P0a (血球型) であったのに対し、クルマエビでは P0b (分泌型) である。P0a と P0b は一次構造上の差異の他、P0a が血球細胞内に局在する細胞質タンパク質である一方、P0b は N-末端にシグナルペプチドを有する分泌タンパク質であるなど、成熟過程も明確に異なっている。しかし、ゲル濾過クロマトグラフィーの結果より、両者ともに体液中に存在する成熟型は六量体を形成していることが示唆された。

4-2 甲殻類 P0 の触媒活性

本研究により精製した甲殻類 P0 分子種、すなわちイセエビ P0a とクルマエビ P0b について、同様の活性を持つチロシナーゼ (細菌由来、マッシュルーム由来) と比較することによりその触媒活性を検討した。下表は各分子の速度論パラメータである。マッシュルームチロシナーゼは市販品を用いたが、複数の構成タンパク質からなる粗精製品であるため k_{cat} は算出しなかった。

di-PO activity

| | K_m (mM) | V_{max} ($\mu\text{M}/\text{min}$) | k_{cat} (/min) | k_{cat}/K_m (/mM min) |
|----------------------|--------------------|---|---------------------|----------------------------|
| proPOa | 0.620 \pm 0.0507 | 416 \pm 10.8 | 5720 | 9230 |
| proPOb | 0.153 \pm 0.0232 | 129 \pm 6.16 | 3220 | 21000 |
| Bacterial tyrosinase | 4.10 \pm 0.790 | 291 \pm 19.6 | 7270 | 1770 |
| Mushroom tyrosinase | 1.15 \pm 0.152 | 80.8 \pm 3.21 | | |

表から明らかのように、P0a, P0b と他生物種由来のチロシナーゼと比較して極めて高い触媒活性と基質特異性を有することが分かる。特に P0b については、細菌由来のチロシナーゼと比較して、 k_{cat}/K_m が 10 倍以上となっている。

4-3 イセエビ Hc の X 線結晶構造解析

上述のように、Hc は今回用いた実験条件では P0 活性を持つに至らなかったことから、イセエビ、クルマエビ血リンパにおいて、P0 活性の主体となるのは Hc ではなく P0 であることが示唆された。では、類縁タンパク質である Hc と P0 にはどのような構造上の差異があるのだろうか。報告者はイセエビ血リンパより Hc を単一に精製し、その単結晶を調製することにより X 線結晶構造解析による立体構造解析を試みた。甲殻類 Hc は古くから注目度が高く極めて多量に存在するタンパク質でもあるため、その構造は既に報告されている。しかし、既報の構造は 1980 年代に発表されたものであり、最高到達分解能は 3.5 \AA となっており更なる分解能の向上が求められている。本研究では、SPring-8 放射光施設において X 線回折データの取得を行い、分解能向上のため HAG 法を用いることにより、1.58 \AA という高分解能で構造の決定を行った。単量体の Hc は、報告者が既に明らかにしている P0b の構造 (Masuda T. et al. 2014, *FEBS J.* 281: 2659-2673) と非常に類似した構造を有しており (図 2)、銅を含む活性中心もまた極めて類似していた (図 3)。これらの活性中心の詳細な構造解析から、Hc も潜在的に P0 活性を持つ可能性はあるものの、P0 との違いは活性中心付近に基質結合スペースを持たないことであると考えられた。

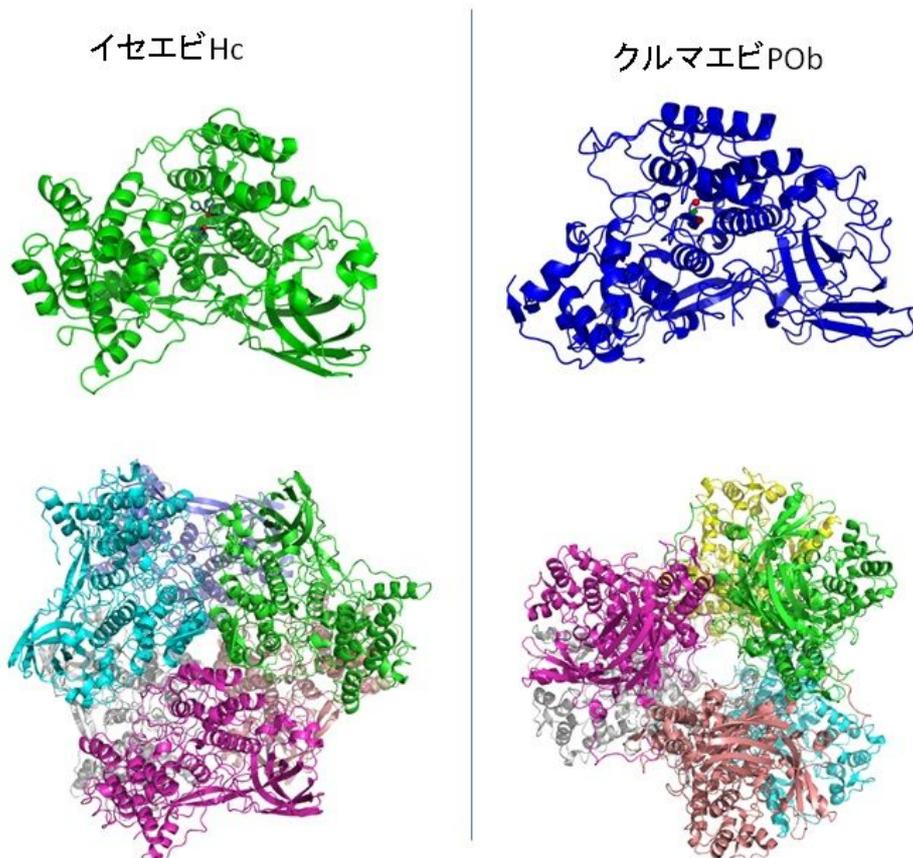


図2 イセエビ Hc(左)とクルマエビ POB(右)の立体構造
(上)単量体、(下)六量体構造

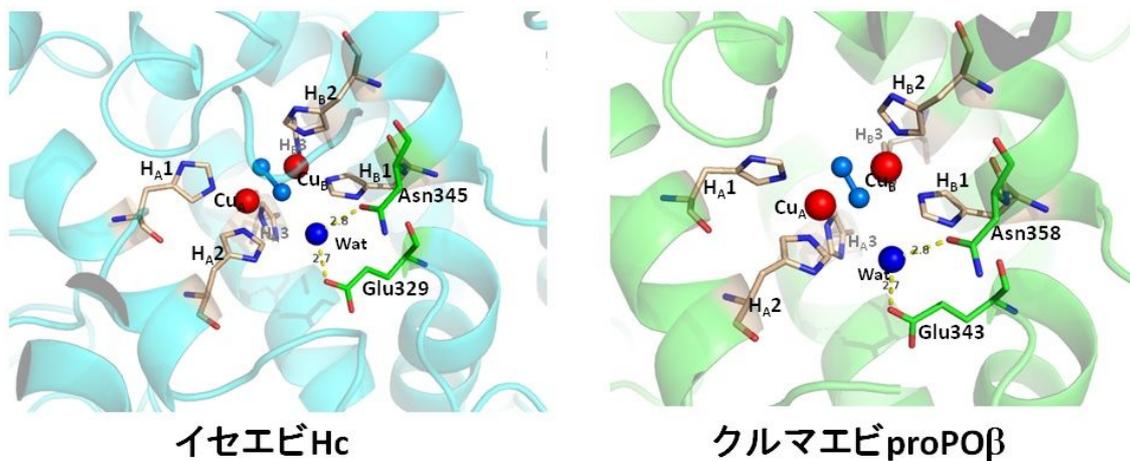


図3 イセエビ Hcとクルマエビ POBの活性中心付近の立体構造

P0 と Hc は共にタイプ 3 銅タンパク質に分類される類縁タンパク質で、本研究の結果から共に甲殻類血リンパにおいて六量体を形成していることが明らかとなった。これまで行われてきた研究では、Hc は甲殻類血リンパに極端な高濃度で存在するため、Hc の精製には超遠心分離やサイズ排除クロマトグラフィーによる一段階の精製法が用いられてきた。これらの精製法では、血リンパで六量体として存在する P0a, P0b と Hc を分離することが出来ないため、これまで国内外で行われてきた研究では Hc 試料に対して P0 が混入していた可能性があると考えられる。本研究の結果が示すように、甲殻類 P0 は極めて高い触媒活性を有しているため、微量の混入が活性本体の誤認につながる。今後は、甲殻類体液中に Hc と同じ六量体を形成する P0 が存在することを念頭に P0 活性を論じるべきであると考えられる。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Taro Masuda*, Jiachen Zang, Guanghua Zhao, Bunzo Mikami (2018) The first crystal structure of crustacean ferritin that is a hybrid type of H and L ferritin. *Protein Sci.* VOL 27:1955–1960,. doi: 10.1002/pro.3495.

Taro Masuda*, Tatsuki Kawauchi, Yuya Yata, Yasuyuki Matoba, Haruhiko Toyohara (2018) Two types of phenoloxidases contribute to hemolymph PO activity in spiny Lobster. *Food Chem.* 260, 166-173 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.03.110>

〔学会発表〕(計 4 件)

日本蛋白質科学会 2019 年度大会

増田太郎、馬場清喜、松尾光一、三上文三

「立体構造から読み解くタイプ 3 銅タンパク質の機能分化について」

日本農芸化学会 2018 (平成 30) 年度大会

増田太郎、河内達暉、的場康幸、豊原治彦、三上文三 「似て非なる二種のタイプ 3 銅タンパク質フェノールオキシダーゼとヘモシアニン」

日本蛋白質科学会 2017 年度 (平成 28 年) 度大会

Taro Masuda, Olga Protchenko and Caroline Philpott

Iron chaperone PCBP1 facilitates the iron loading to human ferritin.

第 23 回 HiSOR 研究会「分子キラリティの計測・理論技術の革新から迫る生命機能研究の新展開」

増田太郎 「放射光技術で紐解くタイプ 3 銅タンパク質の機能分化について」

〔図書〕(計 1 件)

Taro Masuda*, Hai Chen and Guanghua Zhao* (2017) Structure, Function, and Nutrition of Ferritin from Foodstuffs. Chapter 1 in 'Mineral Containing Proteins', pp1-31. Springer

ISBN 978-981-10-3596-8 DOI 10.1007/978-981-10-3596-8

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年 :

国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年 :

国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。