

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24780203

研究課題名(和文)魚の肉質低下に伴うタンパク質分解機構の解明 プロテオミクスと免疫細胞化学的研究

研究課題名(英文) Study of protein degradation mechanism on fish muscle softening using proteomics and immunohistochemistry techniques

研究代表者

吉田 朝美 (YOSHIDA, Asami)

長崎大学・水産・環境科学総合研究科(水産)・准教授

研究者番号：80589870

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、魚類の保存に伴う筋肉軟化現象の解明に寄与し得る基礎的知見が得られた。プロテオーム解析より、マダイ筋肉軟化に伴うミオシン重鎖の分解及び可溶化、トロポミオシンの分解が認められ、分解産物も多数検出された。更に、個々のタンパク質の分解に関与するプロテアーゼ(タンパク質分解酵素)の特定を試みた。結果、ミオシン重鎖、トロポミオシンの分解には内在性セリン並びにメタロプロテアーゼが、 α -アクチニンの分解にはシステインプロテアーゼが主に関与すると示唆された。また、各内在性プロテアーゼの構造・機能について調べ、抗体を作製・選定した。現在、免疫染色法により各プロテアーゼの局在変化を解析中である。

研究成果の概要(英文)：In this research, we found the important basic knowledge to clarify the mechanism of fish muscle softening during storage. From the results of proteomics of red sea bream muscle, myosin heavy chain was degraded and solubilized, while tropomyosin was degraded during storage. The degradation products were detected after storage of the fish. In addition, we tried to figure out the protease which related to degrade each myofibrillar protein. Our results suggested that endogenous serine proteases and metalloproteinases were involved in degradation of most of the myofibrillar components (including myosin heavy chain, tropomyosin) while α -actinin was hydrolyzed only by cysteine proteases in red sea bream muscle. Moreover, we investigated structure and function of endogenous proteases from fish muscle by purification and molecular cloning of the enzymes. From these results, the antibodies against the endogenous proteases were produced and chosen to detect them by immunohistochemistry.

研究分野：水圏生化学

キーワード：プロテアーゼ 魚肉軟化 プロテオーム解析

1. 研究開始当初の背景

(1) 魚肉軟化現象と筋肉の構造崩壊:

魚類を含む動物の骨格筋は、死後ある時間を経過すると硬直し、解硬、続いて軟化する。魚肉は、畜肉に比べて速やかに軟化現象が起こるため魚の速やかな鮮度低下の観点から水産業においては問題となっている。

これまでに、魚肉軟化現象に伴う筋肉構造の崩壊については、組織化学的アプローチがなされてきた。氷蔵中のマダイ筋肉の軟化に伴うZ線の崩壊、ニジマス筋肉及びマイワシ筋肉の軟化に伴う筋内膜コラーゲン繊維の崩壊が電子顕微鏡法により証明されている。

魚の死後の魚肉軟化現象を引き起こす要因の一つとして、魚肉自身に含まれる内在性プロテアーゼによる魚肉構成タンパク質の分解(自己消化現象)が知られているが、その詳細は未だ明らかになっていない。

(2) 魚筋肉内在性プロテアーゼ:

我々は、魚肉構成タンパク質分解に関わる内在性プロテアーゼをいくつか見出し、その構造及び機能を明らかにしてきた。ミオシン重鎖を分解するMBSP(myofibril bound serine proteinase: 筋原線維結合型セリンプロテアーゼ)については、数種の魚類筋肉からの単離精製、その一次構造の決定、遺伝子クローニング、及び大腸菌大量発現系の構築に成功している。コイカテプシンB及びL両酵素が、*in vitro*で各種筋原線維タンパク質を分解すること、遺伝子クローニングによる全一次構造の決定、特異抗体の作製に成功した。コラーゲン分解に関わるゼラチン分解酵素を魚類筋肉中に数種見出し、そのうちマダイ筋肉においては、プロテアーゼ活性の高い可溶性セリンプロテアーゼG1の性状解析並びに遺伝子クローニングに着手している。

(3) 魚筋肉の構造崩壊とプロテアーゼ:

先行研究では、魚類における筋肉の構造崩壊と内在性プロテアーゼの研究とは別々に遂行されてきた経緯があり、これらの詳細な関係は未解明のままである。近年、Caballeroらは、ヘダイの一種である Gilthead sea bream における冷蔵保存中の筋肉構成タンパク質の変化とカルパイン(システインプロテアーゼ)の局在について免疫組織化学的に研究を行っている。このように免疫組織化学的知見を得ることは、筋肉構成タンパク質分解と内在性プロテアーゼとの関係を明らかにするために不可欠であるが、この先行研究では筋肉構造の崩壊にどのプロテアーゼが寄与するかを捉えるには至っていない。

2. 研究の目的

研究の背景より、魚肉軟化現象を解明するためには、魚筋肉自己消化機構、特に筋肉の構造崩壊と内在性プロテアーゼとの関連性を明らかにすることが不可欠である。そこで

本研究では、以下の2点を目的とした。

(1) プロテオミクス技術を用いて魚肉軟化に伴い崩壊する筋肉タンパク質を同定すると共に、その分解に関与する内在性プロテアーゼを特定する。

(2) 魚肉軟化に伴う筋肉の構造変化を組織化学的に明らかにし、更に免疫染色法により内在性プロテアーゼの組織内局在の変化も同時に捉える。

3. 研究の方法

(1) 魚肉軟化に伴い崩壊する筋肉構成タンパク質の同定(プロテオーム解析):

プロテオミクス技術を駆使して、魚肉軟化に伴い変動するタンパク質並びに分解に関与するプロテアーゼの同定を試みた。即殺後冷蔵保存したマダイ筋肉を経時的に採肉し、その破断強度の測定により肉質(物性)の変化を調べた。また、各試料について組織切片を作製し筋肉構造の変化も観察した。即殺時の筋肉及び軟化の進行した筋肉の2種類を準備し、各試料について SDS-PAGE 並びに二次元電気泳動法によりタンパク質を分離し、そのパターンを比較した。さらに、これらタンパク質を MALDI-QIT-TOFMS 質量分析計に供して同定した。分解産物については、自動エドマン法によりN末端アミノ酸配列を決定することで、プロテアーゼによる切断部位の配列情報を収集した。

(2) 保存中の筋肉タンパク質分解に関与するプロテアーゼの特定:

魚肉軟化現象に関与する筋肉内在性プロテアーゼを明らかにするために、生きたマダイのキュヴィエ氏管よりプロテアーゼ阻害剤を注入し、生理条件下に近い状態で種々の内在性プロテアーゼ活性を特異的に阻害した。その後、安楽死させた魚を25℃で保存し、筋原線維構成タンパク質の分解に対するプロテアーゼ阻害剤の影響をウェスタンブロット法により確認した。

(3) 抗魚類プロテアーゼ特異抗体の作製:

筋原線維結合型セリンプロテアーゼ(MBSP)は魚類特有のプロテアーゼであるため、抗体が市販されていない。従って、抗体作製のための抗原を得るために、大腸菌発現系を用いて酵素タンパク質を発現・精製した。また、MBSPの合成ペプチドを哺乳動物に免疫することで、本酵素に対する特異抗体(ポリクローナル抗体)を作製した。

4. 研究成果

(1) 魚筋肉軟化モデルの作製と組織観察:

筋肉軟化現象に伴い変動するタンパク質のプロテオーム解析を行うために、マダイを最長20日間氷蔵してその肉質を評価した。筋肉の破断強度の結果より、少なくとも氷蔵

1日目から筋肉軟化が進行していることを確認した。また、筋肉組織構造の変化を光学顕微鏡により観察したところ、軟化の起きている氷蔵1日目以降の筋肉で筋細胞間の広がりが認められた(図1)。このことから、筋肉軟化に伴う筋内膜構成タンパク質であるコラーゲン等の分解が示唆された。

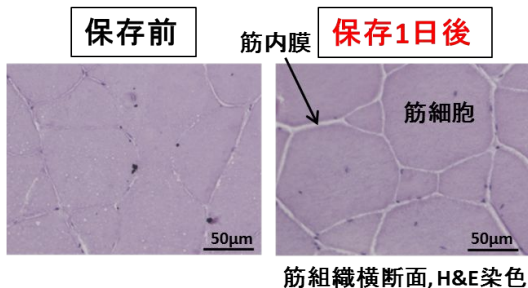


図1 冷蔵保存に伴うマダイ筋肉構造の変化

冷蔵保存1日後で既に筋内膜の崩壊が認められる。

(2) 内在性プロテアーゼ活性の測定：

コラーゲン分解あるいは筋原線維タンパク質の分解に関与する筋肉内在性プロテアーゼ活性について調べた。マダイ筋肉粗抽出液には、ゼラチン分解活性を有するセリンプロテアーゼ・メタロプロテアーゼ、及びカテプシン B, L 様酵素の存在が確認された。

(3) 魚肉軟化に伴うタンパク質の変化、及びそれに関わる内在性プロテアーゼの特定：

氷蔵マダイより経時的に採肉した筋肉から可溶性画分及び不溶性画分を調製し、SDS-PAGE 並びに二次元電気泳動によりタンパク質を分離した。次に、筋肉軟化に伴い崩壊したタンパク質並びに分解産物について、自動エドマン法、質量分析により解析・同定した。その結果、不溶性画分では、197 kDa (MHC と同定) 及び 22 kDa タンパク質 (トロポミオシンと同定) が軟化に伴い減少した。一方可溶性画分では、200 kDa タンパク質が増加し MHC であると同定されたことから、MHC は軟化に伴い可溶化することが示唆された(図2)。従って、軟化に伴いミオシン重鎖が分解及び可溶化され、トロポミオシンも分解されることが明らかとなった。加えて、可溶性画分の SDS-PAGE 及び二次元電気泳動像において、軟化に伴い生じた分解産物が 60 kDa 以下に多数検出された(図2)。これら分解産物の N 末端配列及び MS スペクトルの情報を収集しプロテアーゼによるタンパク質の切断部位を推定したが、魚類ゲノムデータの不足のため分解に関与するプロテアーゼの特定までには至らなかった。しかし、これらの情報より、プロテアーゼによる筋肉タンパク質の切断部位の推定を行っているところであり、魚類筋肉軟化現象と内在性プロテアーゼの関連性を明らかにする上で有意義な結果を得ている。これらの研究成果は、今後の魚類筋肉軟化研究の発展に寄与し得る貴重

な成果である。

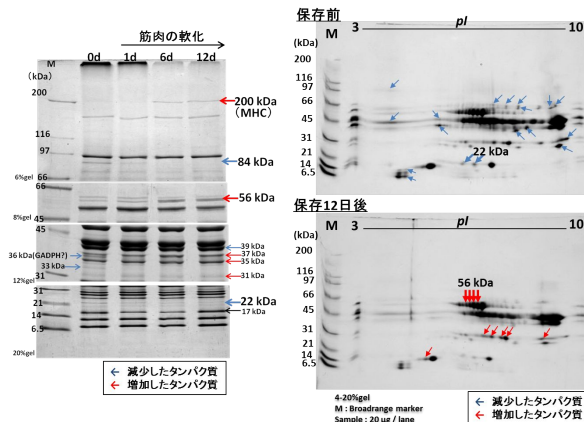


図2 筋肉軟化に伴う可溶性タンパク質の変化

左：SDS-PAGE 像，右：二次元電気泳動像

(4) 魚筋肉内在性プロテアーゼによる筋原線維タンパク質の分解：

(3)ではプロテアーゼの特定までには至らなかったため、個々の筋原線維タンパク質の分解に着目し筋肉自己消化に関与するプロテアーゼの特定を試みた。活マダイの血中にプロテアーゼ阻害剤を注入し即殺後、魚体を保存した。その筋肉をウェスタンブロットに供した結果、ミオシン重鎖、トロポミオシン、-コネクチン、トロポニン I の分解には内在性セリン並びにメタロプロテアーゼが、-アクチニンの分解にはシステインプロテアーゼが主に関与すると示唆された(図3)(発表論文)。

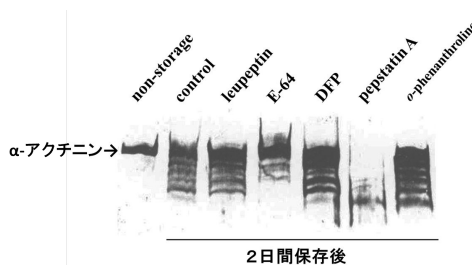


図3 マダイ筋肉保存に伴う -アクチニンの分解

特異阻害剤である E-64 による顕著な分解阻害より、システインプロテアーゼの関与が示唆される。

(5) 魚筋肉内在性プロテアーゼの構造・機能：

ゼラチン分解酵素としてマダイ筋肉より発見された可溶性セリンプロテアーゼ G1 については、酵素タンパク質の性状解析及び遺伝子クローニングによる全一次構造の解明により、ヒト hyaluronan-binding protein 2 (HABP2) と近縁なタンパク質であることが明らかとなった(図4, 5)(発表論文, 学会発表)。このため、免疫染色法による本酵素の検出には、市販の抗ヒト HABP2 抗体を用いることとした。

また、マアジ筋肉カテプシン B の筋肉からの精製、性状解析、cDNA クローニングにより一次構造を明らかにした(学会発表)。その結果より、免疫染色法には抗哺乳類カテ

吉田朝美ら. マダイ筋肉内在性プロテアーゼ G1 の遺伝子構造解析. 平成 26 年度日本水産学会秋季大会, 九州大学箱崎キャンパス (福岡県福岡市), 2014 年 9 月 20 日

Asami Yoshida et al. Characterization of endogenous cathepsin B responsible for the gel disintegration of horse mackerel. *The 10th Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference*, Taipei, Taiwan (May 6th, 2014)

〔図書〕(計 1 件)

長富 潔・**吉田朝美**・原 研治. 恒星社厚生閣, 魚介肉内在性プロテアーゼの最新タンパク質生化学 基礎から水産食品加工への応用まで (仮題). 2016 年発行予定, ページ数未定.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

吉田 朝美 (Asami Yoshida)

長崎大学水産・環境科学総合研究科(水産)
准教授

研究者番号 : 80589870