

学 位 論 文 題 名

魚類筋肉 TMAO の分解と分解酵素に関する研究

学位論文内容の要旨

海産魚介類組織は浸透圧調節のために、TMAO (トリメチルアミン-*N*-オキシド) を含有しており、特にタラ科魚類、板鰓類、軟体動物筋肉組織中には多量に存在する。産業的に重要なスケトウダラ筋肉中には60～100 mMが存在する。魚類筋肉中のTMAOは魚の貯蔵中に分解されて等モル量のジメチルアミン(DMA)とホルムアルデヒド(FA)を生成する。このTMAOの分解は魚肉の低温貯蔵、凍結貯蔵中にも進行し、生成したFAは筋肉タンパク質を変性凝集させ、魚肉の保水性低下、かまぼこゲル形成能の低下、冷凍肉のスポンジ化などを引き起こす。この問題解決のために魚肉のTMAOを水晒しで除き、凍結変性防止剤を添加して貯蔵する冷凍すり身が開発されている。しかし、スケトウダラのような白身魚はフィレーとして流通・貯蔵できれば廃棄物の減少、資源の高度有効利用を図ることができる。その方法の開発のためには魚肉中のTMAOの分解を阻害する必要がある。そこで、分解機構と分解酵素に関する知見が重要になるが、未だにTMAOの分解が酵素反応であるのか非酵素反応であるのかの結論は得られていない。さらに、酵素については精製単離はもとよりその存在さえ確固たる証拠がないのが現状である。

本研究では第1章でスケトウダラ筋肉中に酵素TMAOase (トリメチルアミン-*N*-オキシド脱メチラーゼ)が存在することを示し、第2章でその可溶化と精製方法の検討を行い、単離・精製することができた。ついで、第3章では精製酵素の酵素学的、タンパク質化学的性状の解明をおこなった。第4章ではスケトウダラ以外の魚類筋肉にも本酵素の存在を示し、TMAOがほとんど存在しない淡水魚のコイ筋肉からも

本酵素を単離し、性状を明らかにした。第5章では0℃以下での凍結貯蔵ではTMAOは非酵素的に分解されることを示した。各章の成果の概要は以下の通りである。

第1章 スケトウダラ筋肉から調製した筋原繊維画分にはTMAOase活性が存在することを明らかにした。この結果はスケトウダラすり身にも本活性が存在することを示唆している。筋原繊維画分中の本酵素活性の至適pHは7.0-7.5，活性化エネルギーは15-35℃と0-15℃でそれぞれ30.7, 55.9 kJ・mol⁻¹・deg⁻¹であった。本酵素活性は30℃以上の加熱で消失し，高濃度のNaClにより活性が抑制された。筋原繊維画分中のTMAOaseは活性化にFe²⁺, アスコルビン酸，Cysを必要とし，それら単独では効果は無かった。Fe³⁺はこれら還元剤の存在下でFe²⁺に代えることができ，Fe²⁺が活性発現に必須であることが推定された。

第2章 スケトウダラ筋原繊維画分およびそのアセトン粉末からTMAOase活性の抽出可溶化を検討したが，低塩濃度，高塩濃度溶液あるいはTriton X-100, Tween20, Brijなどの界面活性化剤では可溶化することはできなかった。しかし，アセトン粉末を1 M NaCl-20 mM Tris-acetate (pH 7.0)でゾル化させ，pH4.5で酸処理すると，可溶化できることが明らかになった。そこでこの方法をMethod Iとした。酵素の可溶化は酸処理が重要なステップであることから，筋原繊維を直接酸処理しても酵素は可溶化された。この方法で可溶化した酵素をDEAE-セルロースクロマトグラフィー，Sephacryl S-300ゲル濾過で精製し，さらにnative PAGEを用いて精製単離することができた(Method II)。

単離したTMAOaseは耐熱性の高い酵素であることが後に明らかになったので，この性質を利用してスケトウダラ筋肉から酸処理と加熱処理，native PAGEの3段階で単離精製酵素を得ることが可能になった(Method III)。

第3章 Method II で精製したTMAOaseを用いてその酵素学およびタンパク質化学的性状を調べた。本酵素の至適pHは7.0，Kmは30 mM，活性化エネルギーは38.5 kJ・mol⁻¹・deg⁻¹であった。酵素活性の発現にcofactorとしてFe²⁺を必要とした。

アスコルビン酸, Cys, DTT, グルタチオンのような還元剤は Fe^{2+} の酸化を防止して、反応を維持するために必要であった。

単離した本酵素は80℃, 30分間の加熱によっても失活することではなく、耐熱性のタンパク質であった。加熱によって酵素の構造が変化することはnative PAGEとCDスペクトルの変化から推定されたが、冷却すると、可逆的に構造と活性は完全に回復することが認められた。筋原繊維画分中の本酵素活性が30℃以上で低下する(第1章)理由は多量に存在する筋原繊維タンパク質の変性のために酵素タンパク質が共沈澱し、酵素の構造(活性)が可逆的に回復できなくなるためと推定された。本酵素はアセトン, SDS, 尿素, プロテアーゼに対しても強い抵抗性を示した。

本酵素からはリン酸基, 糖は検出されなかったので、単純タンパク質と考えられた。SDS-PAGEによる分子量は25kで、等電点pH5.0の酸性タンパク質であった。本酵素を酸分解し、アミノ酸組成を調べたところ、その90%がAspで占められており、またN末端から少なくとも15残基目まではすべてAspから成る特異な酸性タンパク質であることが明らかになった。

TMAOaseは低塩濃度下でミオシンと結合して、共沈澱することが示された。それと同時に、活性が抑制された。また、塩類の共存で活性が抑制された。これらの活性低下は可逆的であることから、静電的な非特異的結合と推定される。

第4章 TMAOaseはスケトウダラに限らずスケトウダラよりは多少活性が低いもののホッケやクロソイ, マガレイおよびメバチマグロ筋肉には1~2 unit/g-筋原繊維程度の活性が存在しており、さらにTMAOがほとんど存在しない淡水魚のコイ, ニジマス筋肉にも海産魚と同程度の活性が検出された。また、ニワトリ胸筋にも活性が検出されたことから、本酵素は各種動物筋肉中に広く存在することが明らかになった。コイ筋肉のTMAOaseはMethod IIで単離することができた。コイのTMAOaseはKm値が100 mMとスケトウダラの酵素よりも3倍大きい値であった。分子量20kとスケトウダラのものより多少小さかったが、至適pH7.0, 熱安定性などの

性状は似ていた。

第5章 海産魚類筋肉中のTMAOの分解は凍結貯蔵中にも進行することから、その酵素のおよび非酵素的分解機構を Fe^{2+} と還元剤 (アスコルビン酸とCys)の存在下に *in vitro*で調べた。TMAOaseはスケトウダラ筋肉から調製した。-4℃過冷却未凍結溶液中ではTMAOaseにより酵素濃度依存的にDMAが生成したが、非酵素的分解はほとんど起らなかった。一方、-4℃凍結状態では酵素分解は停止し、非酵素的にDMAとTMAが生成された。これは-20および-40℃でも同様であった。DMAはFe-Cys系では-4℃より-20と-40℃で多量に生成され、微量のトリメチルアミン (TMA)も生成された。酵素のおよび非酵素的DMAの生成にはいずれも Fe^{2+} と還元剤が必要であった。筋原繊維と糖の存在はTMAOaseの非酵素的分解を抑制した。

第1章から第5章までの結果から、筋肉細胞における本酵素の局在部位は不明であるが、TMAOaseはAspを多量に含む酸性タンパク質であり、そのために静電的にミオシンに結合し、活性が抑制されていることが予想された。TMAOは溶液中では酵素により分解され、DMAとFAを等モル量生成するが、凍結状態では非酵素的に分解されていることが推定された。いずれの場合も Fe^{2+} をcofactorとするので、反応の継続には Fe^{2+} の酸化を防止するために還元剤を必要とする。したがって、 Fe^{2+} の酸化は酵素反応と非酵素反応のいずれをも阻害させることができる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 関 伸 夫
副 査 教 授 今 野 久仁彦
副 査 助教授 川 合 祐 史

学 位 論 文 題 名

魚類筋肉 TMAO の分解と分解酵素に関する研究

海産魚介類組織は浸透圧調節のために、TMAO (トリメチルアミン・*N*-オキシド) を含有しており、特にタラ科魚類、板鰓類には多量に存在する。TMAOの分解は魚肉の低温貯蔵、凍結貯蔵中にも進行し等モル量のジメチルアミン(DMA)とホルムアルデヒド(FA)を生成する。生成したFAは筋肉タンパク質を変性凝集させ、魚肉の保水能低下、かまぼこゲル形成能の低下、冷凍肉のスポンジ化などを引き起こす。このような品質劣化を防止するために魚肉中のTMAOの分解防止を図ることが必要であるが、分解機構と分解酵素に関する知見は充分ではない。特に分解が酵素反応であるのか、非酵素反応であるのかも不明で、酵素については未だ単離精製されていないことから、その性状も解っていない。そこで、本研究ではスケトウダラ筋肉から酵素を精製単離してその性状を明らかにし、TMAOの分解抑制について検討している。本論文は5章からなり、各章の成果の概要は以下のようである。

第1章：スケトウダラ筋肉から調製した筋原繊維画分にはTMAOase活性が存在することを明らかにした。この結果は産業的に重要なスケトウダラすり身にも本酵素活性が存在することを示している。筋原繊維画分中の本酵素活性の至適pHは7.0～7.5, 30℃以上の加熱で活性が低下し、高濃度のNaClにより活性が抑制された。筋原繊維画分中のTMAOaseは活性化に Fe^{2+} 、アスコルビン酸, Cysを必要とした。

第2章：スケトウダラ筋原繊維画分およびそのアセトン粉末からTMAOase活性の抽出可溶化方法を種々検討した結果、酸処理でpH4.5にすると、完全に可溶化できることを見いだした。そこでこれをクロマトグラフィー、ゲル濾過で精製し、さらにnative PAGEで精製単離することができた。TMAOaseは耐熱性の酵素であることが後に明らかにされたので、この性質を利用してスケトウダラ筋肉から酸処理と加熱処理、native PAGEの3段階で単離精製酵素を得ることが可能になった。

第3章：精製したTMAOaseを用いてその酵素学的およびタンパク質化学的性状を調べた。本酵素の至適pHは7.0, K_m は 30 mM, 活性化エネルギーは9.2 kcal/mol/degreeであった。酵素活性の発現にcofactorとして Fe^{2+} を必要とした。還元剤は Fe^{2+} の酸化を防止して、反応を維持するために必要であることを明らかにした。本

酵素は80℃、30分間の加熱によっても失活しない耐熱性のタンパク質である。加熱による酵素の構造変化をnative PAGEとCDスペクトル測定から推定し、冷却すると活性と構造は可逆的に完全に回復することを示した。筋原繊維画分中の本酵素活性が30℃以上で低下する原因は共存する多量の筋原繊維タンパク質の熱変性で酵素の構造が可逆的に回復できなくなるためである。本酵素はアセトン、尿素、SDS等の変性剤およびプロテアーゼに対しても強い抵抗性を示した。

本酵素タンパク質からはリン酸基、糖は検出されなかったが、コマジー色素に染色されず、280 nm付近に吸収を有しなかった。SDS-PAGEによる分子量は25kで、等電点pH5.0の酸性タンパク質である。本酵素タンパク質の酸分解物のアミノ酸組成はその90 %がAspで占められており、N末端から少なくとも15残基目まではすべてAspから成る特異な酸性タンパク質であることが明らかになった。

TMAOaseは低塩濃度下でミオシンと結合して、共沈殿することが示され、それと同時に、活性が抑制された。また、塩類の共存で活性が抑制された。これらの活性低下は可逆的であることから、静電的な非特異的結合であると推定される。

第4章：TMAOaseはスケトウダラに限らず海産魚類筋肉に存在しており、さらにTMAOがほとんど存在しない淡水魚のコイ、ニジマス筋肉、ニワトリ胸筋にも活性を検出したことから、各種動物筋肉中に広く存在することを明らかにした。コイ筋肉の精製TMAOaseはKm値がスケトウダラの酵素よりも3倍大きな値であったが、分子量20k、至適pH7.0、熱安定性などの性状は似ていた。

第5章：海産魚類筋肉中のTMAOの分解は凍結貯蔵中にも進行することから、その酵素的および非酵素的分解機構を調べた。-4℃過冷却未凍結溶液中ではTMAOaseにより酵素濃度依存的にDMAが生成したが、非酵素的分解は起らなかった。一方、-4℃凍結状態では酵素分解は停止し、非酵素的に多量のDMAが生成された。これは-20および-40℃でも同様であった。酵素および非酵素的TMAOの分解にはいずれも Fe^{2+} と還元剤が必要であった。したがって、 Fe^{2+} の酸化処理、還元剤の除去は酵素反応と非酵素反応のいずれをも阻害させることができる。この原理に基づいて肉中のTMAOの分解とFAの生成が防止できることを提案した。

本研究はTMAOaseを初めて精製単離し、その性状に関する新規な知見を得ている。また、新たなTMAOの分解条件と抑制方法を発見しており、スケトウダラ肉フィレートの品質向上と高度利用に寄与するところが非常に大きい。

したがって、審査員一同は本論文の審査結果に基づき博士（水産科学）の学位を授与される資格のあるものと判定した。