

学位論文題名

スケトウダラ・ミオシンの加熱による  
尾部領域の構造変化と凝集機構に関する研究

学位論文内容の要旨

スケトウダラの肉は弾力性に富んだ優れたゲルを形成することから、練り製品の原料として大量に消費されている。このような肉のゲル形成する性質は魚種によって異なり、筋原線維、とくにその約45%を占めるミオシンが大きく関係していると考えられている。したがって、水産練り製品の製造工程の改良や品質向上、未利用魚の高度有効利用、新規原料魚の開発など広範な課題に資するために、スケトウダラ・ミオシンのゲル形成能に関係する性質、構造、ゲル化反応機構などについて詳細に研究する必要がある。

本研究はスケトウダラ・ミオシンの加熱凝集機構を解明することを目的として、従来あまり重視されてこなかったミオシン尾部領域に注目し、尾部の各種断片の加熱による構造変化と凝集性の相関について研究した。

第1章では、きわめて不安定なスケトウダラのミオシン、ヘビーメロミオシン（HMM）およびライトメロミオシン（LMM）を単離した後、それらの加熱による構造変化を検討した。まず、ミオシンとLMMは段階的に昇温加熱すると、それらの $\alpha$ -ヘリックスはそれぞれ35℃と50℃で崩壊転移することがCDスペクトルから明らかになった。この結果から、ミオシンの $\alpha$ -ヘリックスの崩壊は主にLMM領域に起こることがわかった。また、35℃以上の設定温度に加熱した後冷却すると、ミオシンおよびLMMの $\alpha$ -ヘリックスは不可逆的に崩壊す

ることが明らかになった。

次に、ミオシンを $\alpha$ -キモトリプシンにより種々の温度で消化すると、主に58-kDa, 56-kDa, 42-kDaと28-kDaの断片が生成し、アミノ酸配列分析結果からそれらの断片はすべてLMM領域由来であることが明らかになった。さらにミオシンを40℃以上で加熱した後に冷却し、同様に消化したところ、56-kDa, 42-kDa, 28-kDa, 25-kDaなどの断片が生成した。それらの部分アミノ酸配列から、56-kDaと42-kDaの断片はLMMのN末端に由来、また28-kDa断片は42-kDa断片の内部領域に由来、さらに25-kDa断片はLMMのC末端側約1/3領域に由来することがわかった。

そこで、LMMのN末端側に1残基のみ存在するTrpの蛍光強度を指標にしてLMMの加熱による42-kDa断片領域の構造変化を調べたところ、この領域のcoiled-coil構造は30-40℃で急激に崩壊することが明らかになった。次に、同領域が加熱により不可逆的な構造変化を起こすかどうか調べるために、LMMを種々の設定温度で加熱した後に冷却し、Trp蛍光を測定した。その結果、coiled-coil構造は35-40℃で不可逆的に崩壊することが明らかになった。

次に、ミオシンとその消化断片を加熱したときの疎水性の変化を疎水性蛍光試薬ANSを用いて検討した。ミオシンおよびHMMを段階的昇温加熱すると蛍光強度は増大したが、LMMの場合も非常に低いながらも温度依存的に変化し、構造が崩壊する35℃付近で蛍光強度は最大となることが確認された。また、種々の設定温度で加熱した後に冷却すると、ミオシンとHMMの蛍光強度は増大したのに対し、LMMではほとんど変化しなかった。したがって、HMMに比べてLMMでは疎水性はほとんど復元したと考えられた。

第2章では、ミオシンおよびその消化断片の加熱による凝集体形成について検討した。

ミオシンとHMMはそれぞれ単独で高塩濃度下で加熱すると凝集体を形成するが、LMMはほとんど形成しないことが光散乱測定によりわかった。一方、ミオシンとLMMを混合して加熱したところ、ミオシンだけでなくLMMも一緒に沈殿してきたことから、LMMはミオシンと共凝集することがわかった。その共凝集体中のミオシン重鎖とLMMのモル比は約1:1であった。さらに、LMMはHMMとは共凝集体をほとんど形成しなかった。以上のことから、LMMはミオシンのLMM領域と結合して凝集体を形成すると考えられた。

次に試験管内でのミオシンのゲル化反応に対するLMMの影響を検討した結果、LMMはゲル形成を阻害することが明らかになった。

第3章では、スケトウダラLMMの42-kDa断片および25-kDa断片を用いて、LMMとの結合部位を明らかにしようとした。

42-kDa断片と25-kDa断片を段階的昇温加熱すると、それらの $\alpha$ -ヘリックスはそれぞれ50℃と35℃で崩壊転移した。したがって、ミオシンはLMM領域内のN末端領域よりもC末端領域の方が熱安定性が低いと考えられた。

一方、LMMと42-kDa断片はよく類似したANS蛍光強度の温度依存性すなわち40℃に最大値をもち、全体に高い強度を示したが、25-kDa断片は35℃で最大値をもつ低い強度を示した。また、種々の設定温度で加熱した後に冷却すると、LMMの蛍光強度は50℃で最大値を示し、42-kDa断片も全般にLMMより約30%低いがよく類似した変化を示した。25-kDa断片は35℃で最大値をもつ類似の強度変化を示した。それらの断片の $\alpha$ -ヘリックスが崩壊する転移温度から、coiled-coil構造の熱安定性は疎水性発現に関与していることが示唆された。また、LMMの疎水性発現にはN末端側の42-kDa断片領域の構造変化が大きく寄与していると考えられた。

さらに、42-kDa断片および25-kDa断片をミオシンと混合して加熱すると、

いずれの断片もミオシン重鎖と共凝集したが、HMMとは共凝集せず、両断片はともにミオシンのLMM領域で結合すると考えられた。また、ミオシンとの共凝集体の生成量はLMM、42-kDa断片、25-kDa断片の順で多かった。

最後に、42-kDa断片と25-kDa断片がミオシンのゲル形成に影響をおよぼすかどうか検討した。その結果、いずれの断片もミオシンのゲル形成を阻害したが、LMMの場合とは違い、添加量が増加してもゲルが徐々に脆弱化するという現象は見られなかった。

以上の結果を総括して、次のように結論できる。すなわち、スケトウダラのミオシン尾部の $\alpha$ -ヘリックスは加熱によって主に35℃と50℃付近で急激に崩壊した。一方、ミオシン尾部のcoiled-coil構造は35℃以上で大部分が崩壊したが、それに伴って疎水領域が露出した。その露出はLMM領域の主にN端側領域に起こることが、42-kDa断片と25-kDa断片それぞれのANS蛍光強度の比較から推定された。一方、ミオシンおよびHMMは加熱すると凝集するが、LMMおよびその消化断片はほとんど凝集しないことが光散乱によりわかった。しかし、LMMおよびその消化断片は別々にミオシンと混合加熱すると共凝集体を形成したが、HMMと混合加熱しても共凝集体を形成しなかった。したがって、LMM、42-kDa断片および25-kDa断片はいずれもミオシンとLMM領域において結合すると考えられ、特にLMMのN末端側が高い共凝集能を有していることがわかった。さらに、それらの断片はいずれもミオシンの加熱によるゲル形成を阻害した。これは、ミオシン頭部は加熱により凝集するが、共存するLMMおよびその消化断片がミオシンの尾部領域に結合するため、ミオシン分子の尾部同士間での結合が出来なくなり、その結果としてゲルの網状構造が形成されなくなったことを強く示唆している。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 西 田 清 義  
副 査 教 授 関 伸 夫  
副 査 教 授 今 野 久 仁 彦  
副 査 助 教 授 尾 島 孝 男

学 位 論 文 題 名

スケトウダラ・ミオシンの加熱による

尾部領域の構造変化と凝集機構に関する研究

スケトウダラの筋肉は弾力性に富んだ優れたゲルを形成することから、練り製品の原料として利用されている。魚肉のゲル形成能は筋原線維の主要タンパク質であるミオシンの性状特に凝集能に密接に関係していることは周知の事実であるが、その凝集・ゲル化反応機構については詳しいことは不明であり、水産練り製品の品質向上、未利用魚の高度有効利用などのためにもその解明が必要である。本研究はスケトウダラ・ミオシンの加熱凝集機構を解明することを目的として、従来あまり重視されてこなかったミオシン分子の尾部領域に注目し、各種断片の加熱による構造変化と凝集性の相関について研究したもので、その成果を要約すると以下の通りである。

まず、非常に不安定なスケトウダラ・ミオシンを、ソルビトールを変性防止剤として使用することにより調製に成功した。そのミオシンおよびその消化断片LMMは昇温加熱すると、 $\alpha$ -ヘリックスがそれぞれ35℃と50℃で崩壊転移し、主にLMM領域に不可逆的に構造変化をもたらすことを円二色性の測定から明らかにした。次に、ミオシンを $\alpha$ -キモトリプシン消化することにより、LMM領域由来の主に58-kDa, 56-kDa, 42-kDaと28-kDaの断片の生成を見出した。さらにミオシンを40℃以上で加熱した後に冷却し、同様に消化し、生成した断片を単離してアミノ酸配列を調べた結果から、LMMのN末端由来の56-kDaおよび42-kDa断片、42-kDa断片内部由来の28-kDaおよびLMMのC末端側由来の25-kDaの断片が生成したことを明らかにした。

そこで、LMMのN末端付近にただ1残基存在するTrpの蛍光強度を指標にして、加熱による42-kDa領域の構造変化を調べた結果、そのcoiled-coil構造は30-40℃で急激に不可逆的な崩壊を起こすことがわかった。また、ミオシンとHMMを加熱すると疎水性の露出は大きく増加し、冷却後も崩壊は完全には戻らなかった。LMMの場合も構造崩壊が認められた35℃付近で、程

度は低いが疎水性露出は最大となったが、冷却後は完全に回復した。

次に、ミオシンとHMMは単独で加熱しても凝集体を形成するが、LMMはほとんど凝集しないことが光散乱により明らかになった。しかし、LMMはミオシンと混合して加熱すると、モル比で1:1の共凝集体を形成したが、HMMとは共凝集体を形成しなかった。この事実は、LMMはミオシンのLMM領域と結合して共凝集体を形成することを示唆した。ただし、試験管内でのミオシンのゲル化反応に対してはLMMはゲル形成を阻害することが明らかになった。

続いて、上記の42-kDa断片および25-kDa断片を用いて、LMMとの結合部位をさらに詳細に検討した。その結果、42-kDa断片と25-kDa断片の $\alpha$ -ヘリックスはそれぞれ50℃と35℃で崩壊する一方、ANS蛍光強度は40℃と35℃で最大となり、 $\alpha$ -ヘリックスの崩壊と疎水性発現が密接に関連していること、換言すればcoiled-coil構造の熱安定性は疎水性発現に関与していることを示唆した。また、ANS蛍光強度の高さから、LMMの疎水性発現にはN末端側の42-kDa断片領域の構造変化の寄与が大きいことも考えられた。さらに、42-kDa断片および25-kDa断片をミオシンと混合して加熱すると、いずれもミオシンと共凝集し、ミオシンのLMM領域で結合すると考えられた。一方、両断片ともにミオシンのゲル形成を阻害したが、LMMの場合のように添加量が増加するとゲルが徐々に脆弱化するということはなかった。

以上を総括して、次のように結論した。すなわち、スケトウダラミオシンの加熱によって、尾部の $\alpha$ -ヘリックスは主に35℃と50℃付近で急激に崩壊する一方、coiled-coil構造は35℃以上で崩壊し、それに伴って疎水領域の露出がLMM領域の主にN端側領域に起こることを示した。一方、ミオシンおよびHMMは加熱凝集しやすいが、LMMおよびその42-kDaおよび25-kDa消化断片は大きな凝集体を形成しないが、ミオシンと混合加熱すると共凝集体を形成した。したがって、LMMとその消化断片はいずれもミオシンのLMM領域において結合するが、特にLMMのN末端側と結合しやすいことがわかった。一方、それらの断片はミオシンの加熱によるゲル形成を阻害した。これは、加熱によりミオシン頭部は凝集するが、LMMおよびその消化断片がミオシンの尾部領域に結合するためにミオシン分子の尾部間の結合・凝集が阻害され、その結果としてゲルの網状構造が形成されなくなったことを支持している。

以上、本研究がスケトウダラ・ミオシンの凝集機構を、ミオシン尾部領域に注目して分子レベルで解明したことは高く評価され、審査員一同は申請者が博士（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。