

学 位 論 文 題 名

Molecular Mechanism of Solubility Improvement
of Fish and Shellfish Muscle Proteins
by Reaction with Reducing Sugars

(糖修飾による魚貝類筋肉タンパク質の水溶化とその分子機構の解明)

学位論文内容の要旨

魚貝類は人類にとって重要なタンパク質資源であり、その筋肉タンパク質が有する優れた加工機能性（ゲル形成能、乳化能、保水能など）を利用して、様々な加工食品が開発・製造されてきた。これらの加工機能性は、筋肉タンパク質の主要構成成分である筋原線維タンパク質（Mf）の塩溶液に対する溶解性と密接に関わっている。そこで、Mfをより広範な塩濃度溶液に溶解することができれば、食品素材としての魚肉の利用価値はさらに向上すると思われる。

近年、タンパク質の機能改変に様々な分子修飾法が導入されているが、なかでもメイラード反応を利用した糖分子の導入は、化学薬品を用いないため食品タンパク質への応用が期待されている。これまでに、様々な種類の食品タンパク質の機能が改変されているが、水産資源においては、糖修飾によって魚類Mfの諸機能の改変が報告されている。なかでも同手法による魚肉の水溶化は、従来の手法（酸分解・酵素分解法）とは異なり、タンパク質を低分子化させず、タンパク質の有する加工機能性を損なわないことから、水産資源の新たな利用形態の開発に貢献すると期待される。しかし、本技術の様々な魚種への適用や、修飾反応時の諸因子が機能改変に及ぼす影響などは詳細には検討されておらず、糖修飾によるMfの水溶化がどのような機構によって生じるのかもまた不明である。そこで本研究では、様々な反応条件下で糖修飾をおこなうことで、これらの諸因子が魚類および貝類Mfの溶解性変化に及ぼす影響を詳細に検討するとともに、糖修飾による魚貝類筋肉タンパク質の溶解性改変の分子機構の解明を目的とした。

第1章では、コイ、テラピアおよびホタテガイMfをグルコース修飾し、その溶解性変化について検討した。グルコースを含む凍結乾燥Mfを40~60℃（相対湿度35%、RH 35%）に保持したところ、有効性リジン含量の減少とフルクトサミンの生成が認められたことから、メイラード反応によってMf中のリジン残基にグルコースが導入できることを確認した。次に、グルコース修飾にともなうMfの0.1 M NaCl中における溶解度の変化について検討したところ、Mf中の30%（コイ、テラピア）および60%（ホタテガイ）のリジン残基をグルコース修飾することによって、溶解度の上昇が確認できた。そして、リジン修飾率が88%に達したホタテガイMfでは、0.1 M NaCl中における溶解度が87%に達し、溶解度のイオン強度依存性は完全に喪失していた。なおMfは、ミオシンやアクチンなど数種のタンパク質から構成されるが、グルコース修飾したMf中のミオシンとアクチンは相互作用を失い、それぞれ解離した状態で溶解していた。

第2章では、Mfの水溶化が最も顕著に起こる修飾反応の最適条件を探索するため、熱に対して不安定なホタテガイMfを用いて、溶解性改変におよぼす湿度とグルコース濃度の影響について検討した。Mfとグルコースの混合比が1:3, 1:6, 1:9の場合、RH 65%以上ではミオシンの変性が進行し、RH 5%ではメイラード反応が進行しにくかった。そしてこれらの条件下では、Mfを水溶化できなかつた。しかしながら、混合比が1:18の場合、RH 35%以下に制御することによってミオシンの変性を抑制しながらメイラード反応を進行させることができ、Mfは完全に水溶化した。なお、ミオシンの変性は、Mfとグルコースの混合比とは無関係にグルコース濃度を0.08 mol/g H₂O以上にすることで抑制できた。すなわち、グルコース修飾によってMfの溶解性を改変するためには、反応過程で起こるミオシンの熱変性を抑制することが重要である。

筋肉タンパク質の溶解度のイオン強度依存性は、Mfの主要構成タンパク質であるミオシンの生化学的特性を反映することが知られている。また、ミオシンは水溶性の頭部（S-1）と塩溶性の尾部（ロッド）から構成されている。そこで第3章では、ホタテガイおよびコイから精製したミオシン、ミオシンS-1およびロッドをグルコース修飾し、それらの溶解性変化について検討した。Mfと同様、ミオシンおよびミオシンロッドについても、グルコース分子の導入によって0.1 M NaCl中における溶解性は著しく向上した。一方、水溶性である0.1 M NaCl中における溶解性は、リジン修飾率が50%以上に達した場合でも糖修飾の影響を受けなかつた。以上の結果から、グルコース修飾に

よるMfの水溶化はミオシンの溶解性変化を反映しており、特にミオシンロッド部位の溶解性変化が関与していることが明らかとなった。

第4章では、糖修飾によって起こるミオシンの溶解性改変に関する分子機構の解明を試みた。ミオシン分子は生理的イオン強度溶媒下では集合し不溶性のフィラメントを形成するが、ミオシンのロッド部位がこのフィラメント形成能を担っている。そこでまず、ミオシンロッドのフィラメント形成能におよぼす糖修飾の影響について検討した。電子顕微鏡およびゲルろ過分析によると、低イオン強度溶媒下で形成したロッドフィラメントは、グルコース修飾の進行にともない次第に解離し、その結果、グルコース修飾を受けたロッドは、低イオン強度溶媒下でもモノマーとして溶解した。すなわち、ロッドのフィラメント形成能はグルコース修飾によって完全に消失していた。

さらに、フィラメント形成能が糖修飾によって喪失する原因について検討した。メイラード反応が進行するにつれて、正電荷であるリジン残基がグルコースと反応することから、タンパク質の負電荷は相対的に増加する。それゆえ、ロッド分子間の負電荷による反発が増加することで、フィラメント形成能の喪失が起こる可能性が考えられる。しかし、グルコースおよびマルトース修飾したミオシンロッド溶液のpHを下げ、タンパク質の負電荷を減少させても、フィラメントの形成は全く認められなかった。したがって、糖修飾によるミオシンロッドの溶解性改変は、負電荷の変化とは関係ないことが明らかとなった。

ミオシンロッドの α -ヘリックス構造は、グルコース、マルトースおよびマルトトリオース修飾を受けても、ほとんど変化しなかった。ロッド部位のリジン残基は α -ヘリックス外周部に位置することから、ロッド分子の表面に結合した還元糖がミオシンロッド分子の自己集合を阻害する可能性が考えられる。そこで、サイズの異なる還元糖を用いてミオシンロッドを糖修飾したところ、修飾糖のサイズが大きいほど0.1 M NaClに対する溶解度が、より少ないリジン修飾率で向上した。すなわち、マルトトリオースのような分子サイズの大きい還元糖を用いた場合では、より少量の糖の導入によってミオシンロッドを可溶化させることが可能であった。以上の結果から、ロッド部位に導入された修飾糖が物理的障壁の役割を果たすことで、ミオシンのフィラメント形成を阻害させると判断した。また、生物種間で比較すると、糖修飾による溶解性

改変はフィラメント形成能の強さと密接に関わっており、ホタテガイのようなフィラメント形成能が高いものほど、水溶化にはより多くの還元糖の導入が必要であった。

以上の研究から、糖修飾による魚貝類筋肉タンパク質の水溶化はミオシンの溶解性変化を反映した現象であることが明らかとなった。そして、このミオシンの溶解性改変は、ミオシンロッド部位のフィラメント形成能の喪失によって起こり、溶解性改変に必要な糖の結合量はミオシンのフィラメント形成能と密接に関係していた。

学位論文審査の要旨

主 査 助 教 授 佐 伯 宏 樹
副 査 教 授 今 野 久 仁 彦
副 査 教 授 猪 上 徳 雄

学 位 論 文 題 名

Molecular Mechanism of Solubility Improvement of Fish and Shellfish Muscle Proteins by Reaction with Reducing Sugars

(糖修飾による魚貝類筋肉タンパク質の水溶化とその分子機構の解明)

近年、タンパク質の機能改変に様々な分子修飾法が適用されているが、なかでもメイラード反応を利用した糖分子の導入は、化学薬品を用いないため食品タンパク質への応用が期待されている。同手法による魚肉の水溶化は、従来の手法（酸分解・酵素分解法）とは異なり、タンパク質を低分子化させず、タンパク質の有する加工機能性を損なわないことから、水産資源の新たな利用形態の開発に貢献すると期待される。本研究では、様々な反応条件下で糖修飾をおこなうことで、諸因子が魚類および貝類 Mf の溶解性変化におよぼす影響を詳細に検討するとともに、糖修飾による溶解性改変の分子機構の解明を試みた。提出された主論文は4つの章より構成されている。以下に各章の概要を示す。

第1章では、コイ、テラピアおよびホタテガイ Mf をグルコース修飾し、その溶解性変化について検討した。グルコースを含む凍結乾燥 Mf を 40~60°C（相対湿度 35%、RH 35%）に保持したところ、メイラード反応によって Mf 中のリジン残基にグルコースが導入できることを確認した。次に、グルコース修飾にともなう Mf の 0.1 M NaCl 中における溶解度の変化について検討したところ、Mf 中の 30%（コイ、テラピア）および 60%（ホタテガイ）のリジン残基をグルコース修飾することによって、溶解度の上昇が確認できた。そして、リジン修飾率が 88%に達したホタテガイ Mf では、0.1 M NaCl 中における溶解度が 87%に達し、溶解度のイオン強度依存性は完全に喪失していた。なお Mf は、ミオシンやアクチンなど数種のタンパク質から構成されるが、グルコース修飾した Mf 中のミオシンとアクチンは相互作用を失い、それぞれ解離した状態で溶解していた。

第2章では、Mfの水溶化が最も顕著に起こる修飾反応の最適条件を探索するため、熱に対して不安定なホタテガイMfを用いて、溶解性改変におよぼす湿度とグルコース濃度の影響について検討し、グルコース修飾によってMfの溶解性を改変するためには、反応過程で起こるミオシンの熱変性を抑制することの重要性を示した。

第3章では、ホタテガイおよびコイから精製したミオシン、ミオシンS-1およびロッドをグルコース修飾し、それらの溶解性変化について検討した。そして、グルコース修飾によるMfの水溶化はミオシンの溶解性変化を反映しており、特にミオシンロッド部位の溶解性変化が関与していることを明らかとした。

第4章では、糖修飾によって起こるミオシンの溶解性改変に関する分子機構の解明を試みた。ミオシン分子は生理的イオン強度溶媒下では集合し不溶性のフィラメントを形成するが、ミオシンのロッド部位がこのフィラメント形成能を担っている。そこでまず、ミオシンロッドのフィラメント形成能におよぼす糖修飾の影響について検討した。電子顕微鏡およびゲルろ過分析によると、低イオン強度溶媒下で形成したロッドフィラメントは、グルコース修飾の進行にともない次第に解離し、その結果、グルコース修飾を受けたロッドは、低イオン強度溶媒下でもモノマーとして溶解し、フィラメント形成能は完全に消失していた。

なお、グルコースおよびマルトース修飾したミオシンロッド溶液のpHを下げてタンパク質の負電荷を減少させても、フィラメント形成は全く認められなかったので、糖修飾によるミオシンロッドの溶解性改変は、負電荷の変化とは関係ないことが明らかとなった。

ミオシンロッドの α -ヘリックス構造は、グルコース、マルトースおよびマルトトリス修飾を受けても変化せず、修飾糖のサイズが大きいほど0.1 M NaClに対する溶解度が、より少ないリジン修飾率で向上した。すなわち、マルトトリオースのような分子サイズの大きい還元糖を用いた場合では、より少量の糖の導入によってミオシンロッドを可溶化させることが可能であった。ロッド部位のリジン残基は α -ヘリックス外周部に位置することから、ロッド分子の表面に結合した還元糖がミオシンロッド分子の自己集合を阻害すると判断した。

本研究によって、糖修飾による魚貝類筋肉タンパク質の水溶化はミオシンロッド部位のフィラメント形成能の喪失によって起きるミオシンの溶解性変化を反映した現象であることが解明された。主論文発表会においては審査員より7件、一般聴講者より4件の研究内容に関する質問がなされたが、申請者はいずれも適切な回答をおこない、研究に対する理解を深めさせた。以上、論文内容の吟味と発表会における討論を通して、審査員一同は主論文の学術的価値を認め、本研究の申請者が博士（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。