

学 位 論 文 題 名

スルメイカ肝臓に含まれるプロテアーゼ群の酵素化学的 性質と魚肉消化ペプチドの生産に関する研究

学位論文内容の要旨

スルメイカは、日本沿岸のいずれの地域でも漁獲され、日本人にとって最も親しみの深い水産物の一つである。特に、北海道での漁獲量は国内最大で、年間 7.5 万トンに達し、全体の 34% を占めている。スルメイカは可食部分である外套膜及び、ヒレ、足のみが利用され、重量の 14% くらいを占める肝臓は、ほとんど廃棄物として処理され、この量は北海道で年間 1 - 2 万トンに達する。この廃棄物に付加価値を見出し、その高度利用を推進することはイカ水産業にとって重要であり、さらに環境に負荷をかけないゼロエミッション産業に変える可能性も出てくる。このような状況を背景として、イカ肝臓の有効利用を目指す様々な研究が行われている。高度不飽和脂肪酸を含む脂質の利用、集魚作用のある魚用飼料としての活用、また伝統的なイカ塩辛の製造への活用などが行われている。しかし、内臓部位の総排出量に比べれば、このような利用はごく少量である。本研究ではイカ肝臓に含まれているプロテアーゼを用いて、他の水産タンパク質残渣や、未低利用資源に含まれるタンパク質に作用させ、そのままでは利用できないタンパク質を有用ペプチドに変換させ、食品添加物として利用するための基礎を作ることを目的とした。

第一章では、スルメイカ肝臓のプロテアーゼを水産廃棄物に付着している筋肉タンパク質に作用させることを想定し、コイ筋原繊維 (Mf) を基質としたモデル実験を行った。その結果、E-64、PMSF 及び α -Phenanthroline で阻害されるメタロ、システイン、セリンの三種プロテアーゼがイカ肝臓の主要酵素であると結論された。この三種の阻害剤の添加で完全に阻害されることから、この阻害剤の組み合わせから一種を除くことで、それによって阻害されるはずの一種のみのプロテアーゼ活性の特性を検討する事ができた。筋原繊維中のミオシン HC の分解から見ると、中性、低温においてはメタロプロテアーゼの活性が最も高く、セリンプロテアーゼの活性が最も低いことが分かった。また、分解の特徴として、メタロプロテアーゼはミオシンを数ヶ所のみで選択的に切断する特徴を有するのに対して、システインプロテアーゼはミオシンを小断片化させる傾向が高く、アクチ

ンも分解するのが特徴であった。セリンプロテアーゼは、概して活性が低く、粗酵素による分解への寄与は小さいと判断された。さらに、三種のプロテアーゼの中で、システインプロテアーゼが最も高温(50℃)まで活性を維持し、最も安定であった。また、Mf の加熱変性は三種類のプロテアーゼ活性に異なる影響を与えた。すなわち、システイン、セリンプロテアーゼでは活性上昇を、メタロプロテアーゼでは活性低下を引き起こした。さらに、三種のプロテアーゼ活性の pH 依存性は異なり、システイン、メタロ、セリンプロテアーゼはそれぞれ、pH 5、pH 6-7、pH 8-9 に最大活性を示した。そして、Mf の pH 3 の酸処理は加熱と同じように、システインプロテアーゼによる分解促進と、メタロプロテアーゼによる活性低下を引き起こした。一方、pH 10 のアルカリ処理は、メタロプロテアーゼの活性低下は起きたが、システインプロテアーゼの活性を上昇は起こらなかった。変性手段により影響も異なることが示された。これらの結果から、筋肉タンパク質の分解には、熱安定性に優れたシステインプロテアーゼが作用しやすい弱酸性、高温の条件を選び、筋肉タンパク質も前もって加熱あるいは酸処理を行い変性させておくことが有用であると考えられた。

第二章ではタンパク質を強く小断片化するシステインプロテアーゼに注目した。まず、酵素選択的な合成基質を用いることで、システインプロテアーゼはカテプシン L であると同定した。しかし、特異的合成基質である Z-Phe-Arg-MCA を用いて諸性質を調べたところ、Mf を用いた場合と異なる点が見出された。まず、Mf のミオシン消化から得た最適 pH は pH 5 であったのに対して、pH 7 に最適 pH を示した。活性の測定方法が変わると最適 pH も変わることが示唆されたので、Mf からの酸可溶性ペプチドの生成量を活性の指標として最適 pH を再検討した。その結果、pH 5 に最適 pH を示したので、合成基質が必ずしも酵素の特性を検討するために最適であるとは限らないことを示している。また、異なる活性測定方法により活性の温度依存性も変化することを見出した。最も単純な基質である Z-Phe-Arg-MCA を用いた場合の活性化エネルギーは最も小さく 8.6 kcal/mol と計算された。これに対して、最も構造が複雑な未加熱 Mf を用いた場合の活性化エネルギーは、41.8 kcal/mol であり、4 倍以上の値を示した。さらに、前もって Mf を加熱変性させると、活性化エネルギーは 28.6 kcal/mol に低下した。

次に、このカテプシン L を精製することを試みた。最初に、イカ肝臓に含まれている大量の脂質をアセトン処理により除去した。このアセトン処理によっては三種プロテアーゼの活性に影響がなかった。アセトン処理肝臓粉末が出発材料として使用できると判断した。次のステップとして、40 - 60%飽和硫酸で酵素を集め、この画分で沈殿しない不純タンパク質を除いた。次に、各種クロマトグラフィーによる精製操作に入ったが、これまでカテプシン L の精製に用いられている陽イオ

ン交換樹脂には本酵素は結合せず、逆に陰イオン交換体 TOPEAEL DEAE -650 M に結合した。この結果は本酵素がこれまで報告されているものと逆の電荷を有していることを示している。このクロマトグラフィーで、セリンプロテアーゼの全てと二種のメタロプロテアーゼのうち一種のメタロプロテアーゼを非吸着画分に除くことができた。もう一種のメタロプロテアーゼとカテプシン L は完全に分離されなかったが、活性の重ならない部分を回収した。最終的に、TOYOPEARL HW-55F のゲルろ過に供し、メタロプロテアーゼを除き、カテプシン L を精製することができた。精製したカテプシン L は、Z-Phe-Arg-MCA のみを分解し、最適 pH も pH 7.0 であり、最適温度は 55°C に示し、粗酵素で得られた結果と同じであった。SDS-PAGE からカテプシン L の分子量は 24 kDa であると推察した。この分子量は今まで報告されている哺乳類、魚類のカテプシン L の分子量に類似し、この点では違いは認められなかった。

第三章では基質として水産系廃棄物のモデルとしてコイ肉を用い、ペプチドを生産する最適条件を探索した。酸可溶性ペプチドの生産および収率計算のためにトリプトファンに由来する紫外吸収を用いた。まず、イカ肝臓に存在する三種のプロテアーゼがどのように酸可溶性ペプチド生産に関わっているのかを検討した。その結果、pH 7 では、システインプロテアーゼに加えセリンプロテアーゼも作用していたが、pH5 ではシステインプロテアーゼのみが作用すること、また、最大の生成が認められることを見出した。また、いずれの条件でもメタロプロテアーゼの関与はほとんどなかった。そして、消化温度は 50°C まで上昇させることができ、活性の促進を図れると判断した。しかしながら、カテプシン L と筋肉タンパク質の見掛けの親和力が小さく (K_m として 5 mg/ml)、ペプチド生産時にはなるべく高濃度の筋肉タンパク質を用いる方がよいことが示された。

現実的なペプチド生成の際は TCA などの酸を用いる事はできない。そこで、沸騰水中での加熱で反応を停止させる方法が使用できるか検討した。両方法によるペプチドの収量および分子量分布もほとんど同じで、平均分子量は 3,000 付近であった。さらに現実的なイカ肝臓の利用形態を想定し、魚肉にイカ肝臓のアセトン粉末を直接添加する方法を試みた。その結果、2.5 - 5% の粉末を添加し、50°C で数時間反応させると、1 g の洗浄魚肉 (想定したタンパク質量は 100mg) から 54 - 67 mg のペプチドが得られたので、十分にタンパク質からペプチドを生産することができると考えられた。なお、イカ肝臓にはカドミウムの混入の問題があるが、5% 以下のアセトン粉末の添加であれば問題ないと計算された。そして、このように調製したアセトン粉末は非常に熱安定に優れ、また、脂質酸化の影響も除かれているので、長期間の貯蔵や流通にも耐えられると判断した。

以上の結果より廃棄物であるイカ肝臓のプロテアーゼを利用し、そのままでは利用価値の少ない

残渣のタンパク質から効率的にペプチドを調製する基礎が確立したと結論した。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 今 野 久仁彦
副 査 教 授 川 合 祐 史
副 査 教 授 佐 伯 宏 樹
副 査 助 教 袁 春 紅

学 位 論 文 題 名

スルメイカ肝臓に含まれるプロテアーゼ群の酵素化学的 性質と魚肉消化ペプチドの生産に関する研究

スルメイカは、日本人にとって最も親しみの深い水産物の一つであり、北海道での漁業に占める価値は高い。スルメイカは可食部分である外套膜及び、ヒレ、足のみが利用され、重量のかなりを占める肝臓を主体とする内臓は、廃棄物として処理され、この量は北海道で年間 1 - 2 万トンに達する。ゼロエミッションの考え方から、廃棄物に付加価値を見出し、その高度利用を推進することはイカ水産業にとって重要である。これまで、高度不飽和脂肪酸を含む脂質の利用、集魚作用のある魚用飼料としての活用、また伝統的なイカ塩辛の製造への活用などが行われている。しかし、内臓部位の総排出量に比べれば、このような利用はごく少量である。本研究ではイカ肝臓に含まれているプロテアーゼを用いて、他の水産タンパク質残渣や、未低利用資源に含まれるタンパク質に作用させ、そのままでは利用できないタンパク質を有用ペプチドに変換させ、食品添加物として利用しようとするゼロエミッションの考え方に基づいた水産資源の利用の基礎を作ることを目的とした。

まず、スルメイカ肝臓のプロテアーゼを水産廃棄物に付着している筋肉タンパク質に作用させることを想定し、コイ筋原繊維 (Mf) を基質としたモデル実験を行った。その結果、E-64、PMSF 及び *o*-Phenanthroline で阻害されるメタロ、システイン、セリンの三種プロテアーゼがイカ肝臓の主要酵素であると結論された。この三種の阻害剤の組み合わせから一種を除くと、阻害されない一種のプロテアーゼが活性を発現するので、その特性を検討する事ができる。筋原繊維中のミオシン HC の分解から見ると、メタロプロテアーゼの活性が最も高いことが分かった。また、分解の特徴として、メタロプロテアーゼはミオシンを数ヶ所のみで選択的に切断する特徴を有するのに対して、システインプロテアーゼ

はミオシンを小断片化させる傾向が高く、アクチンも分解するのが特徴であった。セリンプロテアーゼは、概して活性が低く、粗酵素による分解への寄与は小さいと判断された。さらに、三種のプロテアーゼの中で、システインプロテアーゼが最も高温(50℃)まで活性を維持し、最も安定であった。また、Mfの加熱変性は三種類のプロテアーゼ活性に異なる影響を与えた。すなわち、システイン、セリンプロテアーゼでは活性上昇を、メタロプロテアーゼでは活性低下を引き起こした。さらに、システイン、メタロ、セリンプロテアーゼはそれぞれ、pH 5、pH 6-7、pH 8-9 に最大活性を示した。そして、Mfの pH 3の酸処理は加熱と同じように、システインプロテアーゼによる分解促進と、メタロプロテアーゼによる活性低下を引き起こした。条件を選べば、変性している筋肉タンパク質のほうに逆に分解されやすいことが示された。

変性タンパク質を強く小断片化したシステインプロテアーゼは酵素選択的な合成基質を用いた解析から、カテプシン L と同定した。しかし、合成基質を用いて諸性質と Mf を用いた場合では異なる点が見出された。まず、Mf のミオシン消化から得た最適 pH は pH 5 であったのに対して、合成基質では pH 7 に最適 pH を示した。酸可溶性ペプチドの生成量を活性の指標として最適 pH を求めたところ Mf からの生成でも pH 5 に至適 pH を示した。また、活性の温度依存性も変化することを見出した。複雑な構造を持つ未加熱 Mf を用いた場合の活性化エネルギーは合成基質を用いた場合の 4.5 倍の値を示した。この結果は合成基質が必ずしも酵素の特性を検討するために最適であるとは限らないことを示している。

このカテプシン L は、イカ肝臓のアセトン処理、40 - 60%飽和硫酸分画、および、クロマトグラフィーを組み合わせて精製した。本酵素は陽イオン交換樹脂には結合せず、陰イオン交換体に結合したので異なる電荷を有することが示された。SDS-PAGE からカテプシン L の分子量は 24 kDa であると推察したが、この分子量は今まで報告されている哺乳類、魚類のカテプシン L の分子量に類似していた。

この肝臓のプロテアーゼを用いて魚肉からペプチドを生産する最適条件を探索した。その結果、pH5 でカテプシン L が作用する条件が最適であると判断した。そして、優れた熱安定性から消化温度は 50℃ まで上昇させることで高い収量を得ることができると判断した。現実的なペプチド生成を想定し、沸騰水中での加熱で反応を停止させる方法が使用できるか検討した。ペプチドの収量および分子量分布には差が無いことが分かった。さらに現実的なイカ肝臓の利用形態を想定し、魚肉にイカ肝臓のアセトン粉末を直接添加する方法を試みた。その結果、2.5 - 5%の粉末の使用で高収量でペプチドが得られることから現実的な方法として使用できることを確認した。そして、このように調製したアセトン粉末は非常に熱安定に優れ、また、脂質酸化の影響も除かれているので、長期間の貯蔵や流通にも耐えられると判断した。

これらの研究成果は、北海道、函館に重要な資源であるイカの総合利用を提案し、新たな可能性を示している。よって、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があると判定した。