

学位論文題名

The mechanism of solubilization of myosin in a low ionic strength solution containing L-histidine

(L-ヒスチジンを含む低イオン強度溶液における
ミオシンの水溶化機構に関する研究)

学位論文内容の要旨

食肉は必須アミノ酸を豊富に含んでおり、良質な動物性タンパク質の供給源として重要な食品である。しかし、高齢者など咀嚼力が弱くなった人や嚥下障害者などにとっては、食肉を摂取することが困難な場合もある。食肉タンパク質を水に溶解することができれば、様々な形で食品に利用できる、食塊として摂取できない人々にも食肉タンパク質を利用してもらえる。

しかし、主要な食肉タンパク質である筋原線維タンパク質は低塩濃度溶液に不溶性を示し、これを溶解するためには高濃度の塩が必要であり、食味性や利用性の点から食品への応用は難しい。筋原線維タンパク質を水または低イオン強度溶液に溶解させること(水溶化)ができれば、食肉タンパク質の食品への利用性は飛躍的に高まるものと思われる。また、利用価値の低かった老齢家畜・家禽の骨格筋を付加価値の高い食品素材として有効に利用することができる。

私たちはこれまでに、各種家畜・家禽骨格筋から調製した筋原線維タンパク質をL-ヒスチジンを含む低イオン強度溶液で洗浄した後、超音波処理を施すことで、その80%以上を水に溶解できることを報告している。また、鶏胸筋から調製した高イオン強度溶液に溶解しているミオシンをL-ヒスチジンを含む低イオン強度溶液に透析することで可溶化できることも明らかにしている。しかし、本来、塩溶性であるミオシンが、なぜ、低イオン強度溶液に溶解するようになるのかは不明である。そこで、本研究では、低イオン強度溶液へのミオシンの溶解機構を解明することを目的として、L-ヒスチジンを含む低イオン強度溶液中のミオシンの存在形態および分子構造を詳細に検討し、以下の知見を得た。

1. 高イオン強度溶液(0.6 M KCl)に溶解しているミオシンを低イオン強度溶液(1 mM KCl)に対して透析した場合、L-ヒスチジン不在下ではミオシンはフィラメント状の重合体を形成し不溶性を示したが、L-ヒスチジン(5 mM)存在下では重合体はみられずミオシンは溶解した。透析過程でのミオシンの溶解度および形態を調べた結果、L-ヒスチジンが存在していても生理的イオン強度下でミオシンはフィラメント状の重合体を形成し不溶性を示すこと、しかし、その後、イオン強度の低下に伴って重合体が見られなくなり溶解度が上昇することが明らかになった。以上の結果は、L-ヒスチジンが、ミオシンの重合体形成を阻害するのではなく、生理的イオン強度下で一旦形成されたミオシン重合体から単分子への解離に作用していることを示唆している。また、生理的イオン強度かつL-ヒスチジン存在下でフィラメント状の重合体を形成したミオシンをL-ヒスチジン不在下で低イオン強度溶液に対して透析してもフィラメント

状の重合体が認められ溶解度は低いままであった。この結果は、ミオシンの水溶化には L-ヒスチジンとイオン強度の低下の両方が必須であることが示された。

2. ミオシンの水溶化現象が L-ヒスチジンというアミノ酸に特異的な作用かどうかを明らかにするために、他のいくつかのアミノ酸で同様の検討を行った。L-ヒスチジンは側鎖に芳香環（イミダゾール環）を有する塩基性のアミノ酸である。そこで、芳香環（インドール環）を有する L-トリプトファンおよび塩基性アミノ酸である L-アルギニンを用いて、ミオシンが低イオン強度溶液に溶解するかどうかを検討した結果、これらのアミノ酸ではミオシンは水溶化されなかった。しかし、イミダゾールを用いると、L-ヒスチジンを用いた場合と同程度の高い溶解度を示した。これらの結果は、L-ヒスチジン側鎖のイミダゾール基がミオシンの水溶化において重要な役割を果たしていることを示唆している。
3. ミオシンの水溶化に及ぼす pH の影響について検討した。ミオシンは低イオン強度下で、L-ヒスチジンの有無に関わらず pH3-4 で溶解し、pH5-6 で不溶性を示した。しかし、pH7 では L-ヒスチジンが存在すると L-ヒスチジン不在下に比べて高い溶解度を示した。また、中性 pH におけるその形態を観察すると、L-ヒスチジンを含まない低イオン強度溶液中では膨潤し凝集したフィラメント状の重合体がみられたが、L-ヒスチジン存在下では重合体はあまりみられなかった。以上の結果から、低イオン強度下でのミオシンの溶解性に対する L-ヒスチジンの効果は中性 pH で顕著であることが示された。
4. ミオシンの尾部断片である Light meromyosin (LMM)を用いて、L-ヒスチジンを含む低イオン強度溶液中でのミオシン尾部領域の構造変化について検討した。ロータリーシャドウイング法による透過型電顕観察を行ったところ、L-ヒスチジンを含む低イオン強度溶液中の LMM の長さは、高イオン強度溶液中の LMM に比べて約 8 nm 伸長しており、その分子構造に変化が生じていることが示唆された。そこで、CD スペクトルによる二次構造比とその熱安定性、ならびにネイティブ PAGE による総表面電荷量について検討を行ったが、いずれの分析項目においても L-ヒスチジンを含む低イオン強度溶液に溶解している LMM と L-ヒスチジンを含まない高イオン強度溶液中の LMM との間にほとんど差は認められなかった。また、LMM の表面疎水性について、蛍光プローブである 8-アニリノ-1-ナフタレンスルホン酸を用いて検討したところ、L-ヒスチジンを含む低イオン強度溶液に溶解している LMM は、L-ヒスチジンを含まない高イオン強度溶液中の LMM に比べて表面疎水性が増加していた。以上の結果は、L-ヒスチジン存在・低イオン強度下においてミオシンの尾部（LMM 領域）で構造変化が起きていることを示している。
5. ミオシン分子が自己集合してフィラメント（重合体）を形成する際には、その尾部 C 末端領域の正あるいは負に荷電したクラスター構造が重要であることが報告されている。このことと本研究の結果を考え合わせ、ミオシンの水溶化機構について以下の結論を得た。すなわち、中性 pH かつ低イオン強度下で L-ヒスチジンが存在すると、ミオシン尾部の LMM 領域が伸長し、その結果、ミオシン分子の集合に重要な C 末端領域の正／負電荷クラスターの位置がずれ、ミオシン分子同士の会合が不安定になり単分子として分散しミオシンは水溶化すると推察された。

本研究では、本来、高イオン強度溶液にしか溶解しないミオシンが低イオン強度溶液に溶解する

メカニズムの一端を明らかにした。今後、L-ヒスチジンとミオシンの相互作用、L-ヒスチジン存在下でのミオシン分子近傍の水分子の挙動などを詳細に検討することでミオシンの水溶化機構の全容が明らかになるであろう。効率的な食肉タンパク質の水溶化技術が確立されれば、食肉タンパク質の食品素材としての利用性は飛躍的に高まるとともに、未低利用食肉資源の利用拡大に繋がるものと期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 西 邑 隆 徳

副 査 教 授 中 村 富美男

副 査 教 授 玖 村 朗 人

副 査 助 教 若 松 純 一

学 位 論 文 題 名

The mechanism of solubilization of myosin in a low ionic strength solution containing L-histidine

(L-ヒスチジンを含む低イオン強度溶液における
ミオシンの水溶化機構に関する研究)

本論文は、4 章から成り、図表 29 を含む総頁数 73 の英文論文であり、他に参考論文 2 編が付されている。

食肉は良質な動物性タンパク質の供給源として重要な食品である。しかし、高齢者など咀嚼力が弱くなった人や嚥下障害者などにとっては、食肉を摂取することが困難な場合もある。食肉タンパク質を水に溶解することができれば、様々な形態の食品として利用できるようになるが、食肉タンパク質の主要成分である筋原線維タンパク質は水不溶性を示すことから食品素材としての利用性が限られている。

これまでに、筋原線維タンパク質を L-ヒスチジンを含む低イオン強度溶液で洗浄した後、超音波処理を施すことで水に溶解できること、また、高イオン強度溶液に溶解しているミオシンを L-ヒスチジンを含む低イオン強度溶液に透析することで水溶化できることを明らかにしている。しかし、本来、塩溶性であるミオシンが、なぜ、低イオン強度溶液に溶解するようになるのかは不明である。そこで、本研究では、低イオン強度溶液へのミオシンの溶解機構を解明することを目的として、L-ヒスチジンを含む低イオン強度溶液中のミオシンの存在形態および分子構造を詳細に検討し、以下の知見を得た。

1. 高イオン強度溶液 (0.6 M KCl) に溶解しているミオシンを低イオン強度溶液 (1 mM KCl) に対して透析した場合、L-ヒスチジン不在下ではミオシンはフィラメント状の重合体を形成し不溶性を示したが、L-ヒスチジン (5 mM) 存在下では重合体はみられずミオシンは溶解した。イオン強度低下に伴うミオシンの溶解度および形態を調べた結果、L-ヒスチジンが存在していても生理的イオン強度下ではミオシンはフィラメント状の重合体を形成し不溶性を示すこと、しかし、さらにイオン強度を低下すると重合体はみられなくなり溶解度が上昇することが明らかになった。以上の結果は、L-ヒスチジンが、ミオシンの重合体形成を阻害するのではなく、生理的イオン強度下で一旦形成された重合体から単分子への解離に作用していることを示している。

2. 低イオン強度下におけるミオシンの水溶化が L-ヒスチジンに特異的な作用かどうかを明らかにするために、他のいくつかのアミノ酸で検討を行ったが、L-ヒスチジンほど高い溶解度を示すアミノ酸はなかった。L-ヒスチジンは側鎖に芳香環（イミダゾール環）を有する塩基性のアミノ酸である。そこで、イミダゾールを用いて同様の検討を行った結果、L-ヒスチジンを用いた場合と同程度の高い溶解度を示した。このことは、L-ヒスチジン側鎖のイミダゾール基がミオシンの水溶化において重要な役割を果たしていることを示唆している。
3. ミオシンの水溶化に及ぼす pH の影響について検討した。低イオン強度下では、L-ヒスチジンの有無に関わらず、ミオシンは pH3-4 で溶解し、pH5-6 で不溶性を示した。しかし、pH7 では L-ヒスチジン存在下では L-ヒスチジン不在下に比べて高い溶解度を示した。また、中性 pH 低イオン強度溶液中で、L-ヒスチジン不在下ではフィラメント状の重合体がみられたが、L-ヒスチジン存在下では重合体はほとんどみられなかった。以上の結果から、低イオン強度下でのミオシンの溶解性に対する L-ヒスチジンの効果は中性 pH で顕著であることが示された。
4. ミオシンの尾部断片である Light meromyosin (LMM)を用いて、L-ヒスチジンを含む低イオン強度溶液中でのミオシン尾部領域の構造変化について検討した。ロータリーシャドウイング法による透過型電顕観察を行ったところ、L-ヒスチジンを含む低イオン強度溶液中の LMM の長さは、高イオン強度溶液中の LMM に比べて約 8 nm 伸長していた。CD スペクトルによる二次構造比と熱安定性、およびネイティブ PAGE による総表面電荷量について検討を行ったが、いずれの分析項目においても両者間にほとんど差は認められなかった。そこで、LMM の表面疎水性について検討したところ、L-ヒスチジンを含む低イオン強度溶液中の LMM は、L-ヒスチジンを含まない高イオン強度溶液中の LMM に比べて表面疎水性が増加していた。以上の結果は、L-ヒスチジン存在・低イオン強度下においてミオシンの尾部領域で構造変化が起きていることを示している。
5. ミオシン分子が自己集合してフィラメント（重合体）を形成する際には、その尾部 C 末端領域の正あるいは負に荷電したクラスター構造が重要であることが報告されている。このことと本研究の結果を考え合わせ、ミオシンの水溶化機構について以下の結論を得た。すなわち、中性 pH かつ低イオン強度下で L-ヒスチジンが存在するとミオシン尾部領域が伸長し、ミオシン分子の集合・安定化に重要な C 末端領域の正／負電荷クラスターの位置がずれ、ミオシン分子同士の会合が不安定になり単分子として分散するのでミオシンは水溶化すると推察された。

以上のように、本論文は、高イオン強度溶液にしか溶解しないとされてきたミオシンが L-ヒスチジン存在下で低イオン強度溶液に溶解するメカニズムを分子形態学および生化学的に解明し、食肉タンパク質の水溶化機構に関する新知見を得ている。本研究の成果は、食肉タンパク質を食品素材として利用するための応用研究に繋がるものであり、その学術的意義は大きい。

よって、審査員一同は、早川徹が博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。