

学 位 論 文 題 名

魚類トリプシンの構造・機能解析およびその環境適応に
関する研究

学位論文内容の要旨

水産生物由来の酵素の至適温度や温度安定性はほ乳動物のそれらと比較して低く、水圏という低温環境に対する適応の結果であると考えられている。しかしながら、水産生物由来酵素のこのような低温適応特性がどのような構造に由来するかは明らかにされていない。そこで本研究では、種々ある酵素の中でも古くから研究されているトリプシンに着目し、様々な環境に棲息する魚類トリプシンの温度安定性と構造との関係を体系的に比較・検討した。トリプシンを選択した利点として、分子量が小さい単量体であり、その精製方法も容易であることや、その触媒メカニズム等が詳細に解明されているため、温度安定性と構造との関係を研究するモデル酵素として適することが挙げられる。

まず本研究の第1章では、棲息水温を異にする海産魚類（寒帯性、温帯性および熱帯性の魚類）のトリプシンの一次構造および立体構造を決定し、海産魚類トリプシンの温度安定性と構造との関係について考察した。次に第2章では、淡水魚類の中でも比較的冷水域に棲息し、遡河回遊という特徴的な生活史を有するサケ科魚類のトリプシンの温度安定性を測定し、海産魚類トリプシンとの差異を検討した。さらに、サケ科魚類トリプシン（サケ・トリプシン）の一次構造を決定し、温度安定性と構造の関係について検討した。最後に第3章では、棲息水温の異なる様々な淡水魚類トリプシンの温度安定性と一次構造を明らかにし、両者の関係について検討した。

以上の研究結果から、『魚類トリプシンの温度安定性と魚類の棲息温度の関係』および『魚類トリプシンの温度安定性の決定に関与する構造特性』を明らかにした。そして、これら2つの知見から『魚類トリプシンから見た魚類の進化と環境適応』について考察したので以下に要約する。

【1】魚類トリプシンの温度安定性と魚類の棲息温度の関係

従来、魚類トリプシンの温度安定性はほ乳動物のものに比べて低いという一元的な解釈がなされてきたが、本研究において、その温度安定性は魚種によって大きく異なることが明らかになった。すなわち、トリプシンを50%失活させる際の温度（ T_{50} 値）は、寒帯性（6種）、温帯性（6種）および熱帯性海産魚類（3種）トリプシンでは、それぞれ38～48℃、52～58℃および62～66℃であった。一方、サケ科魚類5種のトリプシンの T_{50} 値は59～66℃であり、淡水魚類4種のトリプシンで62～66℃であった。

以上のように、海産魚類トリプシンでは温度安定性と棲息温度の間に明確な正の相関関係を認められ、サケ科魚類を含む淡水魚類トリプシンは棲息水温に関わらず高い温度安定性を有することが明らかになった。これまで、サケ科魚類が生活史の大部分を寒帯性海域で過ごすことから、サケ・トリプシンは低温適応型酵素の研究モデルとされてきた。しかし、本研究においてサケ・トリプシンは温帯性および熱帯性海産魚類トリプシンと同様の高い温度安定性を有することが明らかとなった。本知見はサケ・トリプシンが低温適応酵素であるという従来の定説とは全く異なるものである。今後、低温適応トリプシンの構造-機能解析研究においては、寒帯性海域に棲息する海産魚類由来のトリプシンを用いるべきである。

【2】魚類トリプシンの温度安定性の決定に関与する構造特性

【1】の結果を受け、種々の魚類トリプシンの構造を解析し、その差異を本研究で得た温度安定性と比較・検討したところ、「自己消化ループ」、「N-末端」および「Ca²⁺ 結合ループ」の3領域が温度安定性の決定に関与する構造要因であることが判明した。まず、第1の「自己消化ループ」領域であるが、熱帯性海産魚類トリプシンではトリプシン分子表面に添って折れ畳んだ構造であったが、寒帯性および温帯性海産魚類トリプシンではY¹⁵¹の欠損とP¹⁵²Gへの置換により、分子から外に向かって開いた構造特性を有していた。第2の「N-末端」領域では、温度安定性の高いトリプシンほど構造表面に分布する荷電アミノ酸残基が少なく、疎水性アミノ酸残基が多かった。第3の「Ca²⁺ 結合ループ」領域において、熱帯性海産魚類トリプシンではCa²⁺ 結合の配位子となるアミノ酸残基が全て保存されていたが、寒帯性および温帯性海産魚類では欠損および置換が認められた。また、温度安定性の高いトリプシンほど本領域内表面に分布する正電荷アミノ酸残基数が少なかった。一方、サケ科魚類トリプシンでは「自己消化ループ」領域が寒帯性および温帯性海産魚類、「N-末端」および「Ca²⁺ 結合ループ」領域が熱帯性海産魚類トリプシンの構造に類似し、淡水魚類トリプシンではいずれの領域も熱帯性海産魚類トリプシンの構造に類似した。特に、トリプシンの温度安定性に関わる3領域の中でも、「N-末端」および「Ca²⁺ 結合ループ」領域の構造が温度安定性に密接に関わるという知見はこれまでになく、本研究で初めて明らかにした知見である。

【3】魚類トリプシンから見た魚類の進化と環境適応

【1】および【2】で得られた魚類トリプシンに関する知見をもとに、魚類の進化と環境適応の関係を考察した。

淡水魚類トリプシンは棲息水温に因らず非常に高い温度安定性と安定な構造を有した。その理由は、淡水魚類の棲む河川的环境が海洋のそれよりも過酷な環境であり、温度に対して安定なトリプシンを有する必要があるためと考える。すなわち、河川や湖沼は天候や季節によって水温変化が大きい、水量が

著しく異なるなど変化が大きく、淡水魚類はそのような過酷な環境下で生存しなければならない。一方、海産魚類は広域な海洋を移動することにより、各々に適した棲息環境を容易に選択することが可能である。また、サケ科魚類が比較的溫度に安定なトリプシンを有する理由は、サケ科魚類が本来淡水魚であることに加え、以下に記すようにサケ科魚類が降海を始めた時期とも密接な関係があるものと考えられる。

魚類は約5億年前に無顎類として海洋に誕生し、次いで河川に進出してそこで軟骨魚類、硬骨魚類へと進化した。軟骨魚類および硬骨魚類の中で海洋に戻った種は、その後数億年という年月をかけて、海洋の様々な環境に適応して棲息してきた。このような長い年月を経て、海産魚類のトリプシンもその環境に即した安定性へと変化してきた。一方、サケ科魚類は淡水魚類として数億年を淡水環境で過ごしてきたが、約300万年前から豊富な餌を求めて海洋に進出したとされる。本研究において、淡水魚類トリプシンは熱帯性海産魚類トリプシンと同等の高い溫度安定性と構造を有することがわかったが、サケ・トリプシンの溫度安定性と、「N-末端」および「Ca²⁺ 結合ループ」の2領域の構造は、高水温下で棲息する魚類に類似するとともに、低温適応型の魚類トリプシンにも類似した機能と構造特性（「自己消化ループ」領域）も有していた。従って、他の淡水魚類のものとは異なり、サケ・トリプシンは海洋の棲息水温に適応している過渡期にあると考えられた。以上のように、本研究で明らかにした魚類トリプシンの多様な構造は、魚類の環境適応の結果としてもたらされた特徴といえる。

学位論文審査の要旨

主査	教授	今野久仁彦
副査	教授	佐伯宏樹
副査	教授	尾島孝男
副査	准教授	岸村栄毅

学位論文題名

魚類トリプシンの構造・機能解析およびその環境適応に関する研究

水圏には 50 万種以上にも及ぶ多種多様な生物が棲息しているが、それらの持つ酵素の構造および機能も棲息環境への適応に伴い多様になったと考えられる。しかしながら、棲息域の異なる水産生物由来酵素の温度特性とその構造の関係については、未だ不明な点が多い。種々ある酵素の中で、トリプシン (EC 3. 4. 21. 4) は最もよく研究されている代表的な消化酵素の 1 つであり、特に、ほ乳動物の膵臓由来のトリプシンは、その構造と酵素化学的機能が明らかにされている。そこで申請者は、魚類由来トリプシンをモデルとして、様々な環境に棲息する魚類のそれらの構造と温度安定性の関係を詳細に検討し、トリプシン分子から見た魚類の進化と環境適応について考察した。

まず、第 1 章では、数種海産魚類のトリプシンの一次構造を決定し、海産魚類トリプシンの温度安定性と構造の関係について考察した。その結果、海産魚類の棲息温度とトリプシンの温度安定性の間に明確な正の相関関係が認められた。次に、様々な温度安定性を有する海産魚類トリプシンの一次構造を比較検討し、「自己消化ループ」、「N-末端」および「Ca²⁺結合ループ」の 3 領域がトリプシンの温度安定性と深く関わることが示唆された。さらに、温帯性海産魚類であるカタクチイワシのトリプシンのアイソザイム I の X 線結晶構造解析により得られた立体構造をほ乳動物トリプシンのものと比較検討し、海産魚類トリプシンの前記 3 つの構造要因が温度安定性に深く関わることを立体構造レベルでも再確認された。

次に、第 2 章では、遡河性魚類であるサケ科魚類トリプシンの温度安定性および構造を調べ、それらトリプシンの温度安定性と構造の関係について考察した。その結果、サケ科魚類は冷水域に棲息するにも関わらず、それらトリプシンの温度安定性は温帯性および熱

帯性海産魚類のそれらに類似するものであった。そして、サケ科魚類トリプシンは、「自己消化ループ」、「N-末端」および「Ca²⁺ 結合ループ」の3領域において、温帯性および熱帯性海産魚類のそれらに類似する温度に安定な構造を有した。この原因は、海産と淡水産の違いによるものではないかと推察された。

そこで、第3章では、様々な水温に棲息する淡水魚類のトリプシンの温度安定性と構造の関係について考察した。その結果、淡水魚類では、棲息水温が異なるにも関わらずそれらトリプシンの温度安定性は熱帯性海産魚類のものと同等の高い温度安定性を示した。そして、淡水魚類トリプシンの「自己消化ループ」、「N-末端」および「Ca²⁺ 結合ループ」の3領域の構造特性は、熱帯性海産魚類のそれらに非常によく類似したものであった。

第1章から第3章までの結果をふまえ、最後に、海産魚類と淡水魚類の棲息温度とトリプシンの温度安定性の関係が異なる理由について考察した。河川は海洋に比べ狭く、水温や水量変化も大きい過酷な環境条件であり、そのような環境に生存しなければならない淡水魚類は温度に対して非常に安定なトリプシンを持つのではないかと考えられた。一方、海産魚類は広い海洋の中で、自らの環境に適した水温の海域で生活することで、トリプシンもその環境に適応させてきたのだと考えられた。また、サケは、本来淡水魚類であるが、約300万年前から豊富な餌を海洋に求めて降海し始めた。しかし、魚類の5億年という長い進化の中でサケが降海し始めた300万年前はごく最近のことと考えられ、そのため、サケ・トリプシンは現在冷水海域の水温に適応している過渡期にあるのだと考えられた。

以上のように、申請者は、水産生物由来の酵素の温度安定性と構造の関係について魚類トリプシンをモデルとして体系的に研究し、水産科学に関する新たな知見を得た。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のあるものと判定した。