

戻りに関与するプロテアーゼのイトヨリダイ筋肉からの分離精製とその性質について

山本晃司・小出良美* (* 愛知学泉大学)

魚肉練製品は独特の弾力があり、その強弱が品質判定の重要な要因である。加熱によって形成されたゲルの弾力は製造過程の温度に大きく依存し、最終温度(88℃)は同じでも、すり身を緩慢に50～60℃付近の温度で長時間加熱すると、ゲル強度が著しく低下する^{1) 2)}。この現象は戻りと呼ばれ、原因は50～60℃付近に活性を持つ魚肉中のプロテアーゼ³⁾であると言われる。本研究では、近年魚肉練製品によく使用され、志水らによって坐りやすかつ戻りやすい魚に分類された⁴⁾イトヨリダイから戻りに関与すると思われるプロテアーゼを分離精製し、その性質を明らかにすることを目的とした。

実験材料及び実験方法

1. 供試魚

イトヨリダイ(Threadfin-Bream)は平成6年3月に名古屋市熱田区中央卸売市場で南洋産物を購入した。魚体を三枚におろした後、チョッパープレートを通して細断し実験試料とした。

2. プロテアーゼ活性の測定方法

合成基質であるBoc-Leu-Thr-Arg-MCA 500μM/mlの溶液50μlと試料溶液50μlを混合し、60℃で30分間反応させた後、反応停止液(1%SDS/0.1M トリス-塩酸緩衝液(pH9.0))を900μl加えた。分光蛍光光度計((株)日立製作所, F-3000)を用いて励起波長380nm, 発光波長460nmでプロテアーゼがArgとMCAの間の結合を切断して遊離したAMCを定量した。1分間に遊離するAMC量をプロテアーゼ活性の指標とした。

3. プロテアーゼ溶液の抽出

魚肉に対して4倍量の緩衝液(10mM トリス-塩酸緩衝液(pH8.0), 1mM EDTA)を加え、ホモジナイザー((株)エスエムテック, PH9.1)を用いて4℃で3分間均質化し抽出した。抽出液を遠心分離(12,000 rpm, 15分間)後、ろ過し、粗酵素液を得て以下の

クロマトグラフィーの試料とした。

4. 陰イオン交換クロマトグラフィー

粗酵素液を10mM トリス-塩酸緩衝液(pH8.0)で平衡透析し、DEAE-Sepharose CL-6B (Pharmacia)で陰イオン交換クロマトグラフィーを行った。吸着画分を0～0.5M塩化ナトリウムでの直線濃度勾配法で溶出した。溶出液の280nmの吸光度と、プロテアーゼ活性を測定した。プロテアーゼ活性画分を集め、同条件でリクロマトグラフィーを行った。

5. アフィニティークロマトグラフィー

DEAE-Sepharose CL-6Bでリクロマトグラフィーを行ったプロテアーゼ活性画分をポリエチレングリコールで濃縮し、50mM トリス-塩酸緩衝液(pH8.0, 0.5M塩化ナトリウム)で平衡透析後、Benzamidine-Sepharose 6B (Pharmacia)でアフィニティークロマトグラフィーを行った。吸着画分を10mM塩酸(pH2.0, 0.5M塩化ナトリウム)で溶出した。プロテアーゼの失活を防ぐため、溶出液をただちに1M トリス-塩酸緩衝液(pH8.0)で中和した。

6. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)

Laemmliの方法⁵⁾に従い5～20%グラジエントゲル濃度でSDS-PAGEを行った。泳動後、ゲルをコマシーブリリアントブルーで染色した後、脱色液(エタノール:酢酸:水=25:6:65)で脱色した。

7. N末端アミノ酸配列

SDS-PAGEを行ったゲルをPVDF膜(Bio-Rad)に15Vで30分間電気ブロットした後、プロテアーゼのバンドを剃刀で切り出し、ペプチドシーケンサー(Applied Biosystems, model 477A)を用いてエドマン分解法でN末端アミノ酸配列を解析した。

8. プロテアーゼによるイトヨリダイ筋原繊維タンパク質の分解

イトヨリダイを細断後、3%塩化ナトリウム溶液で抽出し、調製したイトヨリダイ筋原繊維タンパク質画分(1mg/ml) 50μlに、精製プロテアーゼ溶液を50μl混合し、60℃で30分間反応させた。

反応は煮沸して停止し、その試料を10%ゲル濃度でSDS-PAGEして筋原繊維タンパク質の分解性を調べた。

9. プロテアーゼ活性に及ぼす温度の影響

3%塩化ナトリウム存在下で0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0)を用いて、10~80℃の範囲でプロテアーゼ活性を測定した。

10. プロテアーゼ活性に及ぼすpHの影響

3%塩化ナトリウム存在下、60℃、pH5~9の範囲で以下の緩衝液を用いてプロテアーゼ活性を測定した。

pH5.0 : 0.1M酢酸緩衝液

pH6.0, pH7.0 : 0.1Mリン酸緩衝液

pH8.0, pH9.0 : 0.1Mトリスー塩酸緩衝液

11. プロテアーゼ活性に及ぼす塩化ナトリウム濃度の影響

0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0)を用いて60℃0, 1, 2, 3, 5, 7, 10%の塩化ナトリウム濃度でプロテアーゼ活性を測定した。

12. プロテアーゼ活性に及ぼす阻害剤の影響

TPCK, PCMB, DTNB, 2-Mercaptoethanol, PMSF, 大豆トリプシンインヒビター(STI), Pepstatin, Leupeptin, Antipain, Chymostatin, EDTAの各酵素阻害剤とプロテアーゼを20℃で15分間前反応させた後、プロテアーゼ活性を測定した。活性は、阻害剤のない場合を100%とした相対活性で示した。阻害剤の添加濃度はその特異性を考慮して定めた。

13. プロテアーゼの基質特異性

Boc-Leu-Thr-Arg-MCA, Z-Phe-Arg-MCA, Bz-Arg-MCA, Boc-Val-Leu-Lys-MCA, Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA, Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-MCA, Suc-Arg-Pro-Phe-His-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA, Suc-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-MCA (PEPTIDE)の各合成基質を用いてプロテアーゼ活性を測定し、基質特異性を調べた。Boc-Leu-Thr-Arg-MCAに対する活性を100%とした相対活性で示した。

実験結果及び考察

1. イトヨリダイ筋肉からのプロテアーゼの精製

精製のフローシートを図1に示した。イトヨリダイ筋肉より抽出して得られた粗酵素液をDEAE-Sepharose CL-6Bで陰イオン交換クロマトグラフィーを行った。非吸着画分にプロテアーゼ活性が認められなかったため、吸着画分を0~0.5M塩化ナトリウムの直線濃度勾配法で溶出した。0.3M~0.4Mの

濃度で溶出される画分に強いプロテアーゼ活性が認められ、その画分を集め、濃縮後、10mMトリスー塩酸緩衝液(pH8.0)で平衡透析し、DEAE-Sepharose CL-6Bでリクロマトグラフィーを行った。その溶出パターンを図2に示した。0.2M~0.3M塩化ナトリウム濃度で溶出される画分に、大小2つのプロテアーゼ活性のあるピークが認められた。先に溶出される活性の強い画分(斜線部)に注目しその画分を集めた。また、この画分のプロテアーゼ活性がSTIによって阻害されたため、このプロテアーゼがセリンプロテアーゼである可能性が高いと推定された。

そこで、50mMトリスー塩酸緩衝液(pH8.0, 0.5M塩化ナトリウム)で平衡透析し、トリプシンなどのセリンプロテアーゼの精製に使われるBenzamidine Sepharose 6Bでアフィニティークロマトグラフィーを行った。その溶出パターンを図3に示した。10mM塩酸(pH2.0, 0.5M塩化ナトリウム)で溶出される吸着画分のプロテアーゼ活性を測定し、活性が認められた画分(斜線部)を集めた。

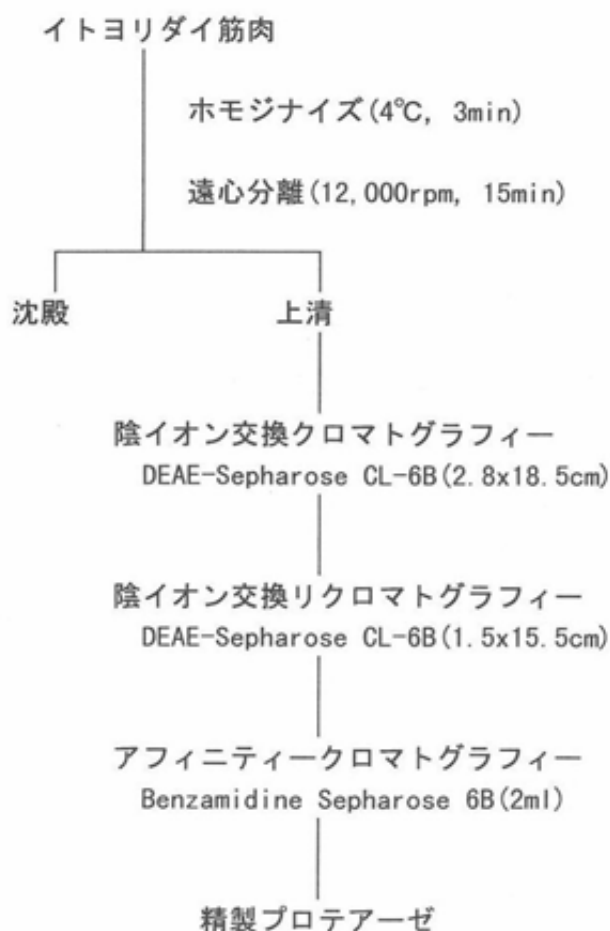


図1 イトヨリダイプロテアーゼの精製方法

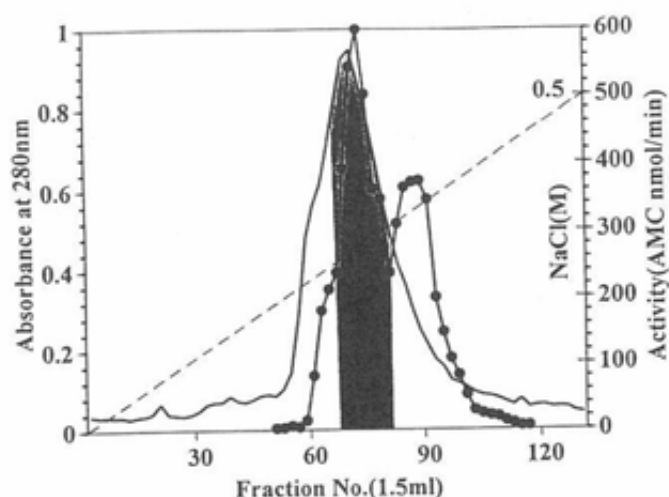


図2 イトヨリダイプロテアーゼの陰イオン交換クロマトグラフィーでの分離
担体: DEAE-Sephadex CL-6B

— Absorbance at 280nm
● Activity AMC(nmol/min)

そこで、50mM トリス-塩酸緩衝液 (pH8.0, 0.5M 塩化ナトリウム) で平衡透析し、トリプシンなどのセリンプロテアーゼの精製に使われる Benzamidine Sepharose 6B でアフィニティークロマトグラフィーを行った。その溶出パターンを図3に示した。10mM 塩酸 (pH2.0, 0.5M 塩化ナトリウム) で溶出される吸着画分のプロテアーゼ活性を測定し、活性が認められた画分 (斜線部) を集めた。

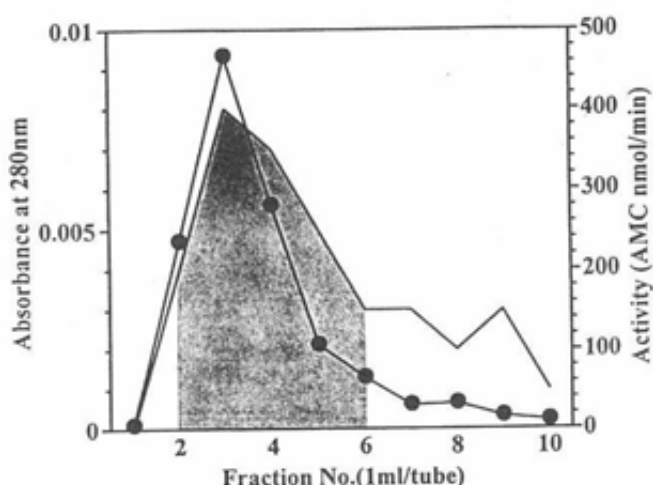


図3 イトヨリダイプロテアーゼのアフィニティークロマトグラフィーでの分離
担体: Benzamidine Sepharose 6B

— Absorbance at 280nm
● Activity (AMC nmol/min)

その画分について5~20%グラジエントゲル濃度で SDS-PAGE を行い純度の確認をした。その泳動図を図4に示した。泳動図からこの画分は単一のタンパク質に精製され、分子量は49KDaであると推定した。Kinoshitaら^{6) 7)} が報告しているイトヨリダイプロテアーゼの分子量 (77KDa, 500KDa) とは異なり、新規のものであると考えられた。しかし、重合体を形成している可能性もあり、ゲルろ過による分子量の測定を行いその確認をする必要があると考えられた。

+

KDa

200 —
116 —
97 —
66 —
45 —
31 —

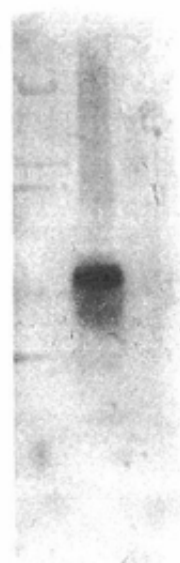


図4 精製イトヨリダイプロテアーゼの SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動図 (5~20%グラジエントゲル)

2. 精製プロテアーゼの性質

精製したプロテアーゼについて、N末端アミノ酸配列、ミオシンの分解性、至適温度、至適 pH、塩化ナトリウム濃度の影響、阻害剤の影響、基質特異性などの性質を調べた。

N末端アミノ酸配列を調べた結果を表1に示した。N末端から13番目のアミノ酸まで配列を読みとることができた。ホモロジー検索を行ったが、特に相同性を有するタンパク質は認められなかった。

表1 イトヨリダイプロテアーゼのN末端アミノ酸配列

Ile-Phe-Gly-Gly-Leu-Lys-Val-Pro-Pro-Ala-Gly-Ile-Pro

イトヨリダイ筋原繊維タンパク質と精製プロテアーゼを60℃で30分間反応させた後、コントロールと共にSDS-PAGEを行った。その泳動図を図5に示した。筋原繊維タンパク質中の主成分であるミオシン重鎖 (Myosin Heavy Chain) が、このプロテアーゼによって特異的に分解されていた。しかし、アクチンはあまり分解されず残存していた。したがってプロテアーゼは魚肉練製品において、ゲルの主成分であるミオシン重鎖を特異的に分解し、ゲル構造を崩壊させる関与に関与している可能性があると考えられた。

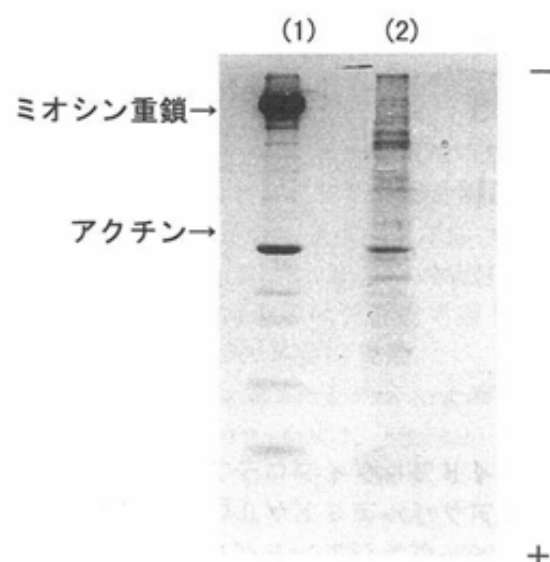


図5 イトヨリダイ筋原繊維タンパク質のイトヨリダイプロテアーゼと反応後のSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動図(7.5%ゲル)
(1)コントロール, (2)+プロテアーゼ

プロテアーゼの活性に及ぼす温度の影響を図6に示した。プロテアーゼ活性はわずかではあるが10℃から認められ、坐りの温度(30~40℃)で強いプロテアーゼ活性が確認され、坐りの工程中にもタンパク質の分解が起ることが推察された。これを避けるためには低温(10℃以下)で長時間坐らせるのが効果的であると考えられた。そして、プロ

テアーゼ活性は戻りが生じる温度付近の50℃で最大となり、70℃以上の温度で失活した。

プロテアーゼ活性に及ぼすpHの影響を図7に示した。プロテアーゼ活性はpH7.0~8.0において特に強く認められた。また、魚肉練製品の製造時のpHもこの付近であり、温度と同様に戻りへの関与を支持する結果となった。

プロテアーゼ活性に及ぼす塩化ナトリウムの影響を図8に示した。塩化ナトリウム濃度が高いほどプロテアーゼ活性が低下する傾向にあった。塩化ナトリウム濃度10%では塩化ナトリウム非存在下のプロテアーゼ活性の約50%であった。水産練製品は3%程度の食塩濃度で製造されており、この濃度では高いプロテアーゼ活性が認められた。

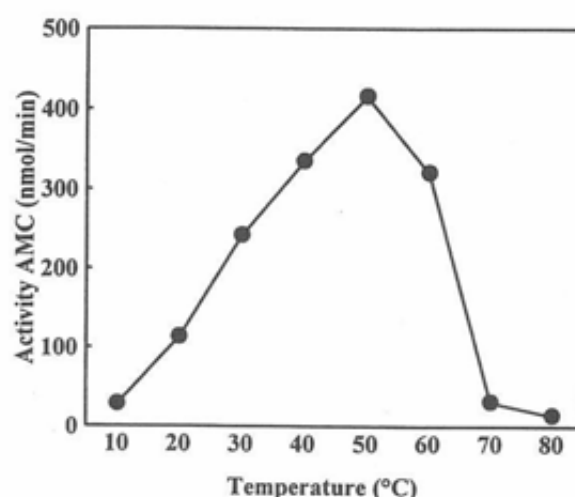


図6 イトヨリダイプロテアーゼ活性への温度の影響

プロテアーゼ活性に及ぼす阻害剤の影響を表2に示した。トリプシンタイプのセリンプロテアーゼ阻害剤である STI, PMSF, Leupeptin, Antipainによってプロテアーゼ活性が強く阻害された。ペプシン阻害剤であるPepstatin, キモトリプシン阻害剤であるTPCKによっては全く活性は阻害されなかった。しかし、同じキモトリプシン阻害剤であるChymostatinによっては約75%活性が阻害された。この点については、原因不明であり、今後の検討

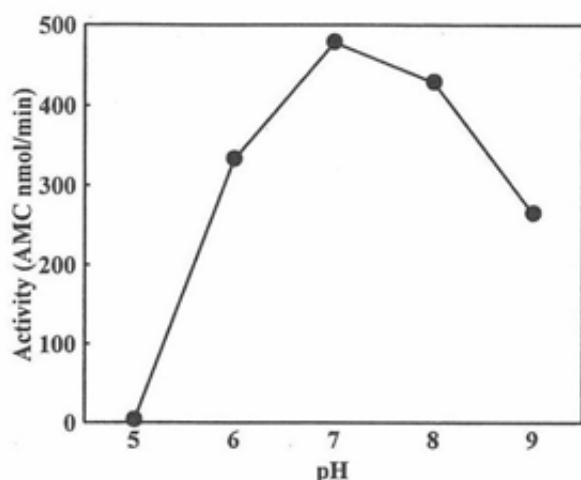


図7 イトヨリダイプロテアーゼ活性へのpHの影響

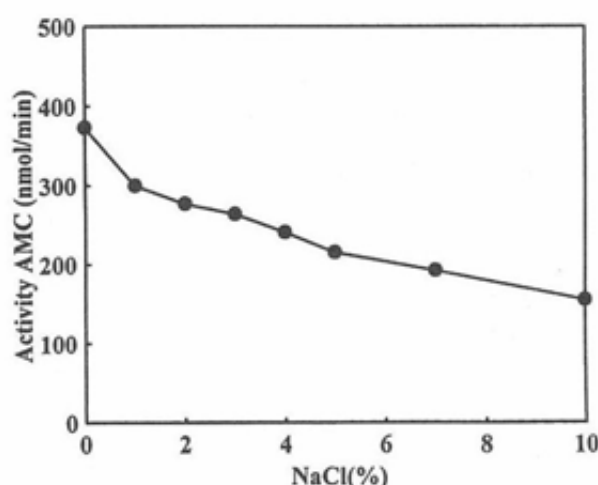


図8 イトヨリダイプロテアーゼ活性への塩化ナトリウム濃度の影響

課題である。また、SH基ブロック試薬であるPCMB、DTNBによっては約50%活性が阻害され、メタルプロテアーゼの阻害剤であるEDTAと還元剤である2-Mercaptoethanolによってはほとんど活性が阻害されなかった。

基質特異性を調べた結果を表3に示した。用いた合成基質の中でBoc-Val-Leu-Lys-MCAは、プロテアーゼの活性検出に用いたBoc-Leu-Thr-Arg-MCAに比べて約1.5倍AMCが遊離し、基質がよく分解されていた。また、Z-Phe-Arg-MCA、Bz-Arg-MCAで若干ではあるがAMCが遊離し、分解が認められた。その他の合成基質は全く分解されなかった。よって、このタンパク質は塩基性アミノ酸のC末端側を特異的に切断する性質があると推定された。阻害剤及び合成基質を用いた試験よりこのプロテアーゼはトリプシンタイプのセリンプロテアーゼに分類された。

このプロテアーゼ活性による戻りを水産練製品製造において防止するには、緩慢な加熱を行わないことは勿論のこととして、副原料として、このプロテアーゼ活性を阻害するトリプシンインヒビターの含まれている大豆タンパク質や卵白の使用が効果的であると考えられた。

今後、実際に水産練製品を用いた系での確認試験を行う必要があると思われる。

要約

近年、魚肉練製品の原材料として、よく使用さ

表2 イトヨリダイプロテアーゼへの酵素阻害剤の影響

Inhibitor		Relative activity (%)
2-Mercaptoethanol	2mM	97
EDTA	1mM	85
DTNB	1mM	62
PCMB	1mM	31
TPCK	1mM	100
PMSF	1mM	17
Chymostatin	0.1mM	23
Pepstatin	0.1mM	100
Antipain	0.1mM	3
Leupeptin	0.1mM	1
STI	5μM	3

表3 イトヨリダイプロテアーゼの基質特異性

Substrate	Relative activity (%)
Boc-Leu-Thr-Arg-MCA	100
Z-Phe-Arg-MCA	9
Bz-Arg-MCA	1
Boc-Val-Leu-Lys-MCA	151
Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA	0
Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-MCA	0
Suc-Arg-Pro-Phe-His-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA	0
Suc-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-MCA	0

れているイトヨリダイから戻りに関与すると考えられるプロテアーゼをDEAE-Sepharose CL-6Bを用いたの陰イオン交換クロマトグラフィー、同担体を用いたリクロマトグラフィー、Benzamidine-Sepharose 6Bを用いたアフィニティークロマトグラフィーで精製した。

プロテアーゼの性質を調べた結果、分子量は49 kDa、至適温度は 50°C、至適pHは7.0であり、筋原繊維タンパク質の中では、主成分であるミオシン重鎖を特異的に分解した。また、塩化ナトリウム濃度の増加により酵素活性は低下する傾向にあった。このプロテアーゼは、STI、PMSF、Leupeptin、Antipainなどのトリプシンタイプのセリンプロテアーゼインヒビターによって酵素活性が阻害され、トリプシン同様に塩基性アミノ酸のC末端側を特異的に切断した。よってこのプロテアーゼは、トリプシンタイプのセリンプロテアーゼに分類された。

略語

AMC	7Amino-4Methyl-Coumarin
DEAE	Diethylaminoethyl
DTNB	5-5'-Dithiobis(2-Nitro-benzoic Acid)
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid
PCMB	<i>p</i> -Chloromercuribenzoic Acid
PMSF	Phenyl Methane Sulfonyl Fluoride
PVDF	Polyvinylidene Difluoride
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
TPCK	<i>p</i> -Tosyl-Phe-Chloromethyl Ketone

文献

- 1) 清水亘:京大食研報告, 第23号, 1 (1960)
- 2) 志水寛, 吉本晴樹, 清水亘:日水誌, 28, 610 (1962)
- 3) 牧之段保夫, 山本正男, 清水亘:日水誌, 29, 776(1963)
- 4) 志水寛, 町田律, 竹並誠一:日水誌, 47, 95 (1981)
- 5) U.K.Laemmli: Nature, 227, 680(1970)
- 6) M.Kinoshita, H. Toyohara and Y. Shimizu: J. Biochem, 107, 587(1990)
- 7) M. Kinoshita, H. Toyohara, Y. Shimizu and M. Sakaguchi: 日水誌, 58, 715(1992)