

氏名	豊原治彦 とよはらはるひこ
学位の種類	農学博士
学位記番号	農博第408号
学位授与の日付	昭和59年3月23日
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当
研究科・専攻	農学研究科水産学専攻
学位論文題目	STUDIES ON FISH MUSCLE PROTEASES (魚類の筋肉プロテアーゼに関する研究)

論文調査委員 (主査) 教授 池田静徳 教授 門田元 教授 土井悦四郎

論文内容の要旨

本論文は、魚の死後における自己消化と、とくに魚肉タンパク質の分解に関与すると考えられる各種プロテアーゼを魚筋肉から抽出精製し、それらの諸性質を調べた研究結果をまとめたもので、主な内容は次のとおりである。

1. カテプシンDは自己消化に関与する可能性の最も大きいプロテアーゼとして古くからよく研究されてきたが、筋肉から均一な酵素として精製された例はまだほとんどない。そこでコイ筋肉から抽出した粗酵素液を酸処理、硫酸分画、アセトン分画、DEAE-セファデックス A-50 処理、等電点電気泳動及びセファロス6Bゲルろ過により精製し、性質を検討した。その結果、分子量41,000、等電特5.4、至適 pH 3 付近のアスパルティックプロテアーゼであることを認めた。本酵素の筋原線維タンパク質に対する活性は魚肉の pH である6.5付近では全く認められなかった。3 M尿素の存在下でも同様であった。これより本酵素は魚肉の自己消化には関与しないものと推察した。

2. カテプシンAは弱酸性域に至適 pH をもつプロテアーゼであるが、これも筋肉から均一に精製された例はまだない。そこでコイ筋肉からカテプシンDの場合とほぼ同様の方法で精製し、性質を調べた。その結果、分子量36,000、等電点4.6、至適 pH 5.0、活性中心にセリンとシステイン残基を有するカルボキシペプチダーゼであることを認めた。筋原線維タンパク質に対する活性はみられなかったが、カテプシンDによるヘモグロビン水解産物には作用した。これより、本酵素は自己消化過程の後半における遊離アミノ酸の生成に関与する可能性が推察された。

3. そこで、魚肉の自己消化には主としてどのようなプロテアーゼが関与するかを知るために、魚肉ホモジネートを用いて自己消化に及ぼす各種プロテアーゼインヒビターの影響などを調べた。自己消化後の5%トリクロル酢酸可溶画分の遊離アミノ酸及びペプチドを比色定量する方法と、電気泳動パターンを比較する方法とではほぼ同様の結果を得た。その結果から、魚肉の自己消化には pH 6.5 付近でもよく作用しうる中性プロテアーゼが重要な役割を果たしていることがわかった。

4. 最近、陸上動物の筋肉には筋原線維Z帯の崩壊に関与する Ca^{2+} 依存性中性プロテアーゼ（カルパイン）及びその特異的インヒビター（カルパスタチン）が見いだされている。この酵素が魚肉にも存在するとすれば、その作用 pH 域及び上記3.の結果から考えて自己消化に関与する可能性が高い。そこでカルパインが魚肉にも存在するかどうかを調べた結果、活性発現に 5 mM の Ca^{2+} を必要とするカルパイン II, 0.1 mM の Ca^{2+} で活性を発現するカルパイン I, 及びカルパスタチンの存在を認めた。さらに、カルパイン II は分子量10万、至適 pH 7.5, 活性発現に 5 mM Ca^{2+} と 20 mM システインを必要とする中性チオールプロテアーゼであることを明らかにした。またカルパスタチンは分子量30万の熱に安定なタンパク質で、コイ筋肉から抽出したカルパイン II ばかりでなくラット肝臓からのカルパイン II をも阻害した。

5. さらに、コイ筋肉におけるカルパスタチン以外のプロテアーゼインヒビターの存在を検索した結果、トリプシンインヒビター及びパピニンインヒビターが存在することを見いだした。前者は熱に比較的安定でトリプシンとキモトリプシンを阻害した。後者は熱にかなり安定でパピニンのみならずカルパイン II をも阻害した。なお、コイ筋肉には合成基質であるベンゾイルアルギニン2-ナフチルアミド (BANA) を加水分解する中性チオールプロテアーゼも存在することを証明した。

論文審査の結果の要旨

漁獲された魚の貯蔵中における自己消化、とくに魚肉タンパク質の分解はどのような機構で起こるのか、これは魚の鮮度保持に関連する重要な研究課題である。しかし、古くから数多くなされてきた魚肉の自己消化に関する研究の大部分は一定条件下で保蔵した魚肉中に生成する遊離アミノ酸やペプチドの消長を扱ったものであり、酵素レベルでの研究はまだ著しく乏しい。

著者はまず、古くから自己消化との関連が論議されながらなお結論の得られていない酸性プロテアーゼであるカテプシン D 及び A を魚筋肉から初めて均一に精製し、性質を調べた。その結果、前者は自己消化にはほとんど関係しないが、後者は自己消化過程の後半においてペプチドの分解に関与し得る可能性があることを明らかにしている。

次に、魚肉ホモジネートに各種プロテアーゼインヒビターを添加して電気泳動パターンを解析する方法などにより、自己消化には魚肉の pH 6.5 付近でもよく作用し得る中性プロテアーゼが重要な役割を果たすことを認めた。そこで、魚筋肉中の中性プロテアーゼを検索して、 Ca^{2+} 依存性の中性チオールプロテアーゼ（カルパイン）及び Ca^{2+} 非依存性の中性チオールプロテアーゼ (BANA 加水分解酵素) が存在することを見だし、それらの酵素学的諸性質を明らかにしている。

さらに、魚筋肉におけるプロテアーゼインヒビターの検索を行い、カルパインを特異的に阻害するカルパスタチン、トリプシンとキモトリプシンを阻害するトリプシンインヒビター、及びパピニンのほかにカルパインをも阻害するパピニンインヒビターが存在することを見いだしている。これらのプロテアーゼインヒビターが魚筋肉に存在することを認めたのは本報が初めてであり、この知見は自己消化との関係ばかりでなく比較生化学的観点からも評価されてよい。

以上のように、本論文は魚類筋肉のプロテアーゼ及びそのインヒビターについて、新しい知見を加えるとともに、自己消化との関連を考察したもので、水産化学及び水産保蔵学の進歩に寄与するところが大き

い。

よって、本論文は農学博士の学位論文として価値あるものと認める。

なお、昭和59年1月23日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、農学博士の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。