シンポジウム記録 魚介類内在性プロテアーゼ—基礎から水産食品加工への応用まで—

I-3. 魚類筋原線維結合型セリンプロテアーゼ

Min-Jie Cao

集美大学食品与生物工程学院

I-3. Myofibril-bound serine proteinase (MBSP)

in fish muscle

MIN-JIE CAO

College of Food and Biological Engineering, Jimei University, Xiamen 361021, China

筋原線維結合型セリンプロテアーゼ (MBSP: Myofibril-bound Serine Proteinase) は、魚肉練り製品の製造工程中に引き起こされる“火戻り”の原因酵素として発見され、生体内では魚筋肉の代謝系において重要な役割を担うと考えられている。そこで本報告では、MBSP の発見から組換え酵素の応用の可能性までを、最新のタンパク質化学・遺伝子工学技術を用いて検証したので紹介した。

1. 火戻り原因酵素 MBSP の発見¹⁾

魚筋肉より初めて MBSP を単離精製し、遺伝子クローニングによりその全一次構造を明らかにした。コイ筋肉より調製した筋原線維に酸処理を施すことで、本来不溶性の MBSP を可溶化し、Q-Sepharose, Benzamidine Sepharose 6B により高純度に精製した。精製 MBSP の分子量は約 28 kDa で、基質中の Arg および Lys 残基の C 末端側を特異的に切断したことから、トリプシン様セリンプロテアーゼであることが示唆された。遺伝子クローニングの結果、コイ MBSP 遺伝子は 20 残基のシグナルペプチドを含む 242 残基からなる演繹アミノ酸配列がコードされていた。また、活性中心の His⁶⁰, Asp¹⁰⁶, Ser¹⁹⁶ などのトリプシン様酵素に特有な保存領域においては他のトリプシン様酵素と高い相同性を示した。

以上の結果より、魚肉練り製品の火戻り原因酵素の一つである新規のセリンプロテアーゼ MBSP の存在が、魚筋肉において初めて確認された。

2. 組換え MBSP の応用の可能性

MBSP は、前述の通り、特徴的な基質特異性を有し、熱安定性および pH 安定性も高いため、研究用試薬への応用が期待される。しかし、本酵素は魚筋肉中に微量しか存在しないため、MBSP タンパク質を大量かつ安定的に供給する必要がある。そこで、酵母 *Pichia pastoris* を用いた組換え MBSP 大量発現系を構築し、得られた組換え MBSP (rMBSP) と天然 MBSP の酵素学的諸性質を比較した。²⁾ その結果、rMBSP の分子量は約 36 kDa であり、基質中の Lys 残基の C 末端側のみを特異的に切断したことから、天然 MBSP よりも高い基質特異性を有することが明らかとなった。また、rMBSP は筋原線維タンパク質に対する分解能も有し、天然 MBSP と同様に、高い熱安定性および pH 安定性を示した。以上の結果より、組換え MBSP の酵素製剤としての応用の可能性が示された。

なお、コラーゲン分解を担う魚類 MMP-2 の研究用試薬への可能性についても合わせて紹介した。³⁾

文 献

- 1) Osatomi K, Sasai H, Cao MJ, Hara K, Ishihara T. Purification and characterization of myofibril-bound serine proteinase from carp *Cyprinus carpio* ordinary muscle. *Comp. Biochem. Physiol. B* 1997; **116**: 183–190.
- 2) Du CH, Han L, Cai QF, Cao MJ. Secretory expression and characterization of the recombinant myofibril-bound serine proteinase of crucian carp (*Carassius auratus*) in *Pichia pastoris*. *Comp. Biochem. Physiol. B* 2013; **164**: 210–215.
- 3) Wang C, Zhan CL, Cai QF, Du CH, Liu GM, Su WJ, Cao MJ. Expression and characterization of common carp (*Cyprinus carpio*) matrix metalloproteinase-2 and its activity against type I collagen. *J. Biotech.* 2014; **177**: 45–52.