3. コラーゲン分解に関わる酵素 —遺伝子からのアプローチ*1

西 塔 正 孝*2

女子栄養大

近年、高等脊椎動物におけるコラーゲンの分解は主に MMP (matrix metalloproteinase) と呼ばれる特異的な酵素によることが明らかになり、形態形成、組織の再構築、癌細胞の浸潤などの観点から広く研究されている。¹⁾ MMP はコラーゲンを代表とする細胞外マトリックス成分の分解に関わる一群の亜鉛 (Zn) 要求性プロテアーゼの総称であり、その構造と性質は種々の動物種間で共通性が報告されている。しかしながら、魚類ではコラーゲンの分解に関わる酵素の情報は乏しく、魚類の MMP に関する構造と性質は不明な点が多い。

一方、魚肉のテクスチャーは畜肉のそれに比べて低温貯蔵中に速やかに変化し、魚肉の品質に影響をおよぼすことがある。殊に魚肉の軟化現象はその初期段階においてコラーゲン繊維の崩壊に由来するとされている。²⁾ 魚類筋肉には主要な I 型コラーゲンの他に、微量成分として V 型コラーゲンが存在し、I 型に比べて細い繊維を形成している。これまでに佐藤³⁾ は筋細胞周囲の結合組織を形成するコラーゲン繊維の崩壊が、魚肉の冷蔵初期における急激な軟化の主因と推測している。しかし、どのような機構に起因するのか、その詳細は明らかでない。少なくともコラーゲン繊維の崩壊は V 型コラーゲン分子が分解されることによって生じ、その分解には特異的な酵素が関与していると推定されているため、おそらくコラーゲン分解代謝に関わる酵素 (MMP) とも関連すると考えられる。そこで筆者らは魚類コラーゲンの分解機構を明らかにする一環として、ニジマスを試料に用いて MMP の検索とその性質を調べたので、その成果を紹介する。

1. ニジマス組織の MMP

ニジマスの皮と筋肉の抽出物および血液について、哺乳類のコラーゲンを基質に用いて分解活性をゲルスライス法⁴⁾ で調べた。その結果、ウシ I 型コラーゲンを分解する活性は検出できなかったが、ヒト胎盤由来のペプシン可溶化 V 型コラーゲンに対する分解活性を調べた結果、図 1 に示すように V 型コラーゲン α 鎖の消失が筋

肉の 38~63 kDa 成分と血液の 130 kDa 成分に認められた。次にゼラチンザイモグラフィにより MMP 様酵素の検索を行った結果、その存在が皮、筋肉および血液に確認された。また、ニジマスを 7 日間氷蔵し、各組織の MMP 様酵素の活性を経時的に調べた場合、そのほとんどが残存していた。

2. ニジマス MMP の一次構造

コラーゲンやゼラチンの分解活性を組織抽出物について調べるだけでは、コラーゲン分解に直接関与する酵素の存在と作用を説明することは難しい。またコラーゲンの分解機構に関与する複数の微量な酵素について、それらの性質を調べるのは容易でない。それ故に MMP の性質を明らかにするには、標的を明確にして個々の酵素の性質を十分に検討できるようなアプローチが必要である。そこでニジマスヒレ由来繊維芽細胞の cDNA library から MMPcDNA のクローニングを行い、それらの性質を明らかにすることを試みた。クローニングの結果、得られた cDNA の 1 つは 475 アミノ酸残基のポリペプチドをコードしており、ヒトの MMP-13 に対する相同性が高かった。他の 1 つはシグナルペプチドを含む 655 アミノ酸残基をコードしており、ヒトの MMP-2 に対する相同性が最も高かった。⁵⁾

得られた cDNA から推定アミノ酸配列を解析したところ、高等脊椎動物の MMP 間で特徴的な活性発現制御部位および触媒領域中の亜鉛イオン結合部位は、2 種のニジマス MMP においても完全に保存されていた。しかしながら、プロペプチド領域には高等脊椎動物のそれと若干の違いが認められ、活性化の過程が幾分異なるものと推定された。さらに MMP-2 のヘモペクシン様領域をニジマスと哺乳類で比べると、ニジマスでは糖鎖結合部位に相当する配列を欠き、さらにその他の数残基が欠損するなど、魚類 MMP の性質は高等脊椎動物と異なることが推測された。

3. ニジマス MMP のコラーゲン分解活性

MMPcDNA をタンパク質レベルで解析するために、

*1 Degrading Collagen by Matrix Metalloproteinase.

*2 Masataka Saito (Food Science, Kagawa Nutrition University, Komagome, Toshima, Tokyo 170-8481, Japan).

図1 ゲルスライス法により分画したニジマス組織抽出物のペプシン可溶性ヒトV型コラーゲンに対する分解活性

図2 ペプシン可溶性ヒトV型コラーゲンに対するMMPの分解活性

1: コントロール, 2: 組換えニジマス MMP-2, 3: ヒト MMP-9, 4: ヒト MMP-2

大腸菌による組換え酵素の発現を試みた。得られた組換え MMP-13 はゼラチンおよびニジマス I 型コラーゲンを特異的に分解し、一方、組換え MMP-2 はゼラチンおよび V 型コラーゲンを分解することが判明した。図 2 に示すように、テロペプチドが除去されているヒト胎盤由来のペプシン可溶性 V 型コラーゲンに作用させると、3 種の各 $\alpha(V)$ 鎖は低分子化して 3 本の分解断片を生成した。しかし、これらの分解物はヒトの MMP-2 や -9 による分解物と比較して泳動度が幾分相違し、量比も異なることから、ニジマスとヒトの MMP には基質特異性に若干の違いが認められた。佐藤³⁾はコラーゲン繊維の崩壊が V 型コラーゲンの非らせん構造領域または架橋結合の切断によると推定している。そこで、ニジマスのインタクトな酸可溶性 V 型コラーゲンを基質に用い、低温下で分解活性の検討を行った結果、ペプシン可溶性ヒト V 型コラーゲンに対する分解パターンとは異なり、非らせん構造領域を含む末端領域を切断している可能性が示された。

ところで安藤²⁾は回遊魚の血抜きによって魚肉の軟化を抑制する効果のあることを明らかにし、血液中にコラーゲン繊維の崩壊を引き起こす原因物質が存在するであろうと推測している。組換え MMP-2 に対するポリクローナル抗体を作製し、ニジマスの血液をイムノブロット分析した結果、67 kDa の活性型 MMP-2 が検出された。この成分はゼラチンゼイモグラフィーにおける 67 kDa の活性成分に相当し、ニジマスを氷蔵して調べた場合、この活性は 7 日目においても変わらずに残存していた。

以上のことから、これらの MMP はいずれもコラーゲン代謝の一端を担うことは明白であり、特にニジマス筋肉 V 型コラーゲンを分解する MMP-2 は、魚肉の軟化現象にも関与する酵素の一つである可能性が示唆された。今後、魚類コラーゲンの分解機構に関わる他の MMP やセリンプロテアーゼ等の検索が必要であり、さらに魚肉中において、それら酵素と基質あるいは内因性インヒビターとの相互作用を調べることで魚肉の軟化現象を解明する一つの戦略であろう。

文 献

- 1) I. Massova, L. P. Kotra, R. Fridman, and S. Mobashery: Matrix metalloproteinases: structures, evolution, and diversification. *FASEB J.*, **12**, 1075-1095 (1998).
- 2) 安藤正史: 魚肉の軟化機構, 魚介類の細胞外マトリックス (木村 茂編), 恒星社厚生閣, 1997, pp. 73-82.
- 3) 佐藤健司: 魚肉の冷蔵と V 型コラーゲン, 魚介類の細胞外マトリックス (木村 茂編), 恒星社厚生閣, 1997, pp. 83-90.
- 4) R. T. Aimes and J. P. Quigley: Matrix metalloproteinase-2 is an interstitial collagenase. *J. Biol. Chem.*, **270**, 5872-5876 (1995).
- 5) M. Saito, N. Kunisaki, N. Urano, and S. Kimura: Characterization of cDNA clone encoding the matrix metalloproteinase 2 from rainbow trout fibroblast. *Fisheries Sci.*, **66**, 334-342 (2000).