

4. コラーゲン分解に関わる酵素 —活性からのアプローチ*1

久保田 賢*2

高知大学農学部

死後冷蔵中に速やかな軟化を示す魚肉におけるコラーゲン分解は、酵素的作用により生じると考えられている。¹⁾ コラーゲンやプロテオグリカンなどの細胞外マトリックス成分は MMP (matrix metalloproteinase) 群に属する複数の酵素により協調的に分解されることが知られており、²⁾ 魚肉の軟化もこの酵素群により引き起こされる可能性が考えられるが、魚類器官中における MMP に関する知見は非常に乏しい。既知の多くの MMP はコラーゲンの変性物であるゼラチンの分解活性を指標にして検出されていることから、著者らは、魚類器官中のコラーゲン分解酵素活性をゼラチンザイモグラフィ法を用いて検索した。

1. 魚類およびラット器官における活性の比較

哺乳類ではコラーゲン代謝が遅いことから、正常器官中のゼラチン分解活性の検出は一般に困難であると考えられてきた。²⁾ 一方、魚類コラーゲンは哺乳類のそれと比較して酸などで可溶化されやすいことから、著者らは魚類コラーゲンが哺乳類のものと比較してコラーゲン代謝が速く、架橋の成熟が妨げられているのではないかと考えた。そこで、数種魚類および哺乳類としてラットを用いて、その器官抽出液中のゼラチン分解活性の比較を試みた。^{3,4)} その結果を表 1 に示す。ブリ、³⁾ マダイ、キンギョ、⁴⁾ において、それぞれ 80 kDa, 85 kDa および 135 kDa のセリン型の活性が用いた 8-10 種類全ての器官において検出された。さらに、魚種により分子量は異なるものの 55-80 kDa に複数のメタロ型の活性もほとんどの器官において検出された。それに加えて、鰓や消化器官などで 80 kDa 以下と 100 kDa 以上にセリン型の活性が、皮、鰓、消化器官などで 100 kDa 以上にメタロ型の活性が複数検出された。分子量や酵素の型から推測すると各組織に共通に検出されたセリン型の活性はプラスミン由来、複数のメタロ型の活性はゼラチナーゼやストロメリシンなどの MMP 由来であると推測される。

一方、ラットにおいては、用いた 10 種の器官のうち活性が検出できたのは、皮、筋肉、腎臓、空腸の 4 器官のみであった。⁴⁾ これらの結果から、魚類器官中にはラットのそれと比較してゼラチン分解酵素が多様であること、そしてその一部が全ての器官で共通したコラーゲン分解機構に関与する可能性のあることが示唆された。ここで特筆すべきことは、ラットの活性は魚類の場合と比較して 2.5 倍量添加してはじめて検出されたことである。これは、魚類器官の各酵素はラットのものと比較して活性が高いことを示している。ラットの一部の器官で複数のゼラチン分解活性が検出されたことから、哺乳類においても従来考えられていたよりコラーゲン代謝が速いと考えられるが、魚類器官においてはそれよりもさらに急速で複雑なコラーゲン代謝が生じていると考えられる。

2. 産卵期のアユ筋肉に誘導される活性

アユは産卵を迎える秋になると、生殖腺の発達とともに筋肉中のタンパク質や脂質含量が劇的に減少する。この時期の筋肉は成長期のものと比較してコラーゲン構造が崩壊し、肉質が柔らかくなることが観察されている。この時期に誘導されるコラーゲン分解に関わる酵素を検索する目的で、成長期および産卵期アユ筋肉抽出液のゼラチン分解活性を比較した。その結果、産卵期アユの一部の個体で 25 kDa, 62 kDa および 68 kDa のゼラチン分解活性の誘導が観察された。⁵⁾ そこでこれらの活性の分画を試みたところ、DEAE セルロース吸着画分において複数のセリン型の活性が検出された。⁴⁾ しかしながらこの活性は成長期のものにおいても同様に観察されたことから、恒常的なコラーゲン分解に関わっていると考えられる。一方、DEAE セルロース非吸着画分をさらに CM セルロースで分画したところ、吸着画分において産卵期特異的な 80 kDa の活性が検出された。この活性は leupeptin および 1, 10-phenanthroline で阻害さ

*1 Gelatinolytic Enzymes Involved in Collagen Breakdown.

*2 Satoshi Kubota (Faculty of Agriculture, Kochi University, Nankoku 783-8502, Japan).

*3 久保田賢, 豊原治彦, 坂口守彦: 魚類およびラットにおけるゼラチン分解活性の組織間分布: 平成 9 年度日本水産学会春季大会講演要旨集, pp. 232.

*4 木下政人, 矢部泰二郎, 久保田賢, 横山芳博, 豊原治彦, 坂口守彦: アユ筋肉コラーゲン代謝に関する研究 I—ゼラチン分解活性の性状—, 平成 9 年度日本水産学会秋季大会講演要旨集, pp. 131.

表1 魚類およびラット器官中のゼラチン分解活性

| | ブリ ³⁾ | マダイ ^{*3)} | キンギョ ^{*3)} | ラット ⁴⁾ |
|------|--|---|---|--|
| セリン型 | 80 kDa (全組織) <80 kDa (幽門垂, 腸) >100 kDa (鰓, 幽門垂, 腸) | 85 kDa (全組織) <80 kDa (腸) >100 kDa (皮, 鱗, 鰓) | 130 kDa (全組織) <80 kDa (腸) >150 kDa (皮, 鰓, 腎臓, 腸) | 135 kDa (皮, 筋肉, 空腸) 75, 175 kDa (皮) <80 kDa (空腸) |
| メタロ型 | 55, 60, 80 kDa (幽門垂以外) >100 kDa (皮, 脾臓, 幽門垂, 腸) | 55, 60, 62, 72, 80 kDa (全組織) | 55, 60, 62, 72, 80 kDa (全組織) >100 kDa (皮, 鱗, 鰓, 腎臓, 腸, 尾鰭) | 57, 62, 66 kDa (皮) 130-180 kDa (腎臓) |

れ、E-64の影響を受けなかったことから、同じサイズに泳動されたセリンプロテアーゼおよびメタロプロテアーゼ由来であることが推測された。さらにゼラチンアフィニティークロマトグラフィーで分画したところ、非吸着画分に80 kDaのセリン型の活性が、吸着画分に68 kDaのメタロ型の活性がそれぞれ検出された。⁶⁾ 分子量、酵素の型およびゼラチンへの吸着性から80 kDaの活性はプラスミン由来、68 kDaの活性はゼラチナーゼ由来であると推測された。68 kDaのメタロ型の活性はアフィニティークロマトグラフィー中に80 kDaのものの低分子化により出現したのか、潜在型のものが活性化したのかについては不明であるが、これらの酵素が何らかの形で産卵期に特異的なコラーゲン分解に関わっていると考えられる。

3. 冷蔵中の魚肉における活性

冷蔵中の魚肉の軟化を引き起こすコラーゲン分解の原因酵素を検索する目的で、冷蔵中の魚肉から経時的に採肉してゼラチン分解活性の検出を行った。その結果を表2に示す。筋肉抽出液には多量の筋形質タンパク質が混入するためにゼラチン分解活性の検出が比較的困難であるにもかかわらず、即殺肉において全ての魚種でセリン型の活性が、マアジ以外の3魚種でメタロ型の活性が弱いながらも検出された。9時間後にはほとんどの活性がさらに弱くなり、18時間後では一部の活性を除いてほとんど検出することができなくなった。これらの結果から、魚肉中のゼラチン分解活性は一般に即殺時において最も強く、経時的に減少していくことが明らかになった。意外なことに、冷蔵中に顕著な軟化を生じないトラフグにおいても複数の活性が検出され、18時間冷蔵後にもその活性の一部が残存していた。このことは、魚種による魚肉の軟化の違いは、単にコラーゲン分解酵素活性の強弱のみならず、筋肉中のコラーゲン繊維の形態や分解酵素の特異的なインヒビターによる制御などの複合的な要因により生じるものと考えられる。

魚類器官中のプラスミン様酵素やMMP由来のゼラチン分解活性が比較的強いことや、顕著な軟化を示す産卵期のアユ筋肉においてプラスミン様酵素やゼラチナー

表2 冷蔵中の魚肉におけるゼラチン分解活性の経時変化

| | | 0 h | 9 h | 18 h |
|------|------------------|-----|-----|------|
| マアジ | 62-80 kDa(セリン型) | ○ | △ | × |
| シマアジ | 110 kDa(セリン型) | ○ | ○ | × |
| | 200 kDa(メタロ型) | ○ | ○ | × |
| ヒラメ | 58, 62 kDa(メタロ型) | ○ | △ | × |
| | 94 kDa(セリン型) | ○ | △ | △ |
| トラフグ | 68-72 kDa(セリン型) | ○ | △ | × |
| | 200 kDa(メタロ型) | ○ | △ | △ |

○: 活性あり, △: 弱い活性あり, ×: 活性なし

ゼの活性誘導が観察されたことから、死後の魚肉においてもこれらの酵素がコラーゲン分解を引き起こしている可能性がある。ただ、MMPが受けるプラスミンや他のMMPによる活性化や特異的な阻害剤による厳密な制御が、死後冷蔵中の魚肉においてどの程度維持されているかについては現在のところ全く不明である。この点を解明するために、死後の筋肉におけるMMPやその活性化酵素活性およびその特異的な阻害剤について現在検討を行っている。

文 献

- 1) 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.
- 2) J. F. Woessner, Jr.: Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J.*, **5**, 2145-2154 (1991).
- 3) S. Kubota, H. Toyohara, and M. Sakaguchi: Occurrence of gelatinolytic activities in yellowtail tissues. *Fisheries Sci.*, **64**, 439-442, (1998).
- 4) S. Kubota, Y. Yokoyama, H. Toyohara, and M. Sakaguchi: Novel gelatinolytic activities in rat organs. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **47**, 579-585 (1999).
- 5) S. Kubota, ayu mu M. Kinoshita, H. Toyohara, and M. Sakaguchi: Gelatinolytic activities in scle in the spawning stage. *Fisheries Sci.*, **64**, 1001-1002 (1998).
- 6) S. Kubota, M. Kinoshita, Y. Yokoyama, H. Toyohara, and M. Sakaguchi: Induction of gelatinolytic activities in ayu muscle of spawning stage. *Fisheries Sci.*, **66**, 574-578 (2000).