

浜田産カレイおよび中海産サルボウガイの“うま味成分”および“機能性成分”の分析を通じた高付加価値化に向けた取り組み —カレイのうま味生物（イノシン酸）を分解する酵素(IMPase)の単離・同一—

生物科学科 准教授

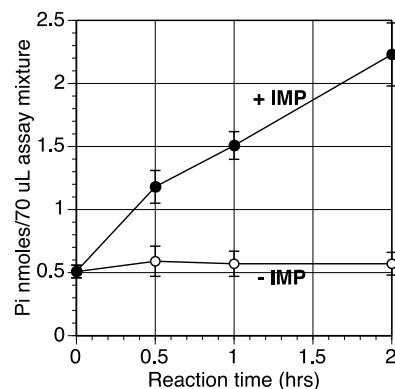
大島 朗伸

目的

島根県の重要な水産資源の一つであるカレイは、その種類によって価格が大きく異なる。うま味成分であるイノシン酸含量をムシガレイとその3倍以上も高価なヤナギムシガレイとで比較すると、水揚げ直後には両者のイノシン酸含量に大きな差は観察されないが、干物にするとヤナギムシガレイはムシガレイの10倍も高濃度のイノシン酸が残存していることが判明した。魚類をはじめとする動物の筋肉にはATPが存在しているが、イノシン酸はこのATPが死後速やかに分解されて生じる産物である。しかし、イノシン酸は時間の経過とともにIMPaseで分解され、不味成分のイノシンへと変換される。このため、各種カレイのIMPaseを精製し、その性質を比較検討することでIMPase活性を抑制する方法を見いだせば、貯蔵及び加工の工程にこの方法を追加・挿入することで、水産加工品のうま味を向上させることが可能になると考えられる。そこで、種々のカレイからのIMPaseの抽出及び精製を試みた。

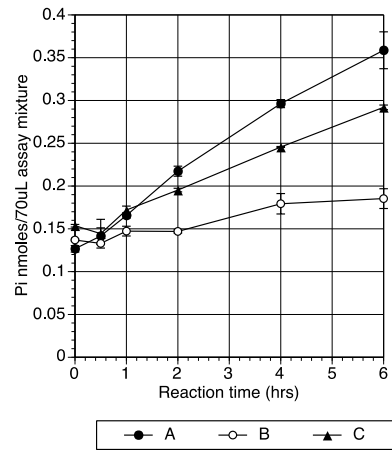
研究成果

粗酵素活性測定法の改良：IMPaseの活性測定には、IMPの酵素分解に伴い放出される無機リン酸の定量を行う方法及び、分解されて減少するIMPの濃度を測定する方法の2種類があるが、主に前者の方法が用いられている。魚類のホモジネート中には、IMPaseの反応生成物である無機リン酸やIMPaseの基質となるイノシン酸が混入しているため、何れの活性測定方法を用いるにしても、そのままではIMPaseの活性を正確に測定することは困難である。先行研究では、魚類のホモジネートを一旦遠心分離して得られる上清を2日間透析し、これらの低分子物質を除去する手法がとられていた¹⁾。しかし、長時間の透析に伴う酵素の失活が懸念されたため、今回は市販のPD-10カラム(GEヘルスケア)を用いたゲル濾過による脱塩を試みた。また、先行研究では無機リン酸の定量にはFiske-subbaowの変法を用い48時間に渡り酵素反応を行わせIMPase活性を測定していた²⁾。このように長時間にわたる反応が必要となる要因は無機リン酸の定量感度が低いためではないかと考え、無機リン酸の定量を、より高い感度を持つマラカイトグリーンを用いる方法に変更した。その結果、ムシガレイの粗酵素標品を試料とした場合、右図の様に基質(IMP)未添加の場合は、酵素反応に伴う無機リン酸の増加は認められず、IMPを添加した場合は、無機リン酸の増加が2時間に渡りほぼ直線的に進行した。この結果から、この程度のIMPase活性があれば、1時間の反応で活性測定が可能であることが明らかとなった。これらの酵素活性測定法の改善により、従前では4日間が必要であった魚類のホモジネート中に含まれるIMPase活性の測定を、ほぼ1/20の5時間程度と飛躍的に短縮する事が出来た。



三種のカレイの粗酵素抽出液中に含まれるIMPase活性の比較：島根県水産技術センターの岡本氏より供与して頂いたムシガレイ、ヤナギムシガレイ、ソウハチガレイの粗酵素抽出液中に含まれるタンパク質

濃度を一定に合わせた後、IMPase活性を測定した。その結果、次ページのグラフに示すように、IMPase活性は高い順に、ムシガレイ(A)、ソウハチガレイ(C)、ヤナギムシガレイ(B)となった。それぞれの酵素の比活性(nmol/h/mg protein)はムシガレイ(10.5)、ソウハチガレイ(7.3)、ヤナギムシガレイ(2.4)となり、ヤナギムシガレイのIMPase活性は他のカレイの1/3~1/4程度の低い値にとどまっていた。他のカレイに比べ低いIMPase活性が、高級魚であるヤナギムシガレイに高濃度のイノシン酸が残存している重要な要因の一つであると考えられた。



カレイのIMPaseの精製：ヤナギムシガレイの粗酵素抽出液中に存在するIMPase活性が他のカレイに比べて低い原因としては、a) IMPaseの活性が他のカレイに比べ低い、b) IMPaseの含有量自体が少ない、c) IMPaseの安定性が低く、すぐに失活してしまう、d) 何らかのIMPaseの阻害物質が存在するなどの可能性が考えられる。いずれの可能性もIMPaseの単離精製によって検討できるため、各カレイからのイノシン酸分解酵素の精製を試みた。IMPaseの局在部位を特定するため、各カレイの粗酵素抽出液を超遠心分離により分画したところ、大半の活性は沈殿の膜分画に結合していることが示唆された。現在、先行研究を参考にしたTriton X-100を用いた可溶性試験の段階では、ムシガレイとソウハチガレイでは160倍、ヤナギムシガレイでは67倍程度にまで精製が進行している。

社会への貢献

今回開発した、魚肉ホモジネート内に含まれるIMPase活性測定方法を用いる事により、漁獲後の鮮魚の保存・処理に伴うIMPase活性の変化を迅速に測定する事が可能となる。本年3月には島根県水産技術センターの岡本氏が来学されるので、本手法のワークショップを開催する予定である。今回開発した手法は、高いイノシン酸含有量を持ち、うま味成分の多い漁業製品の開発に寄与出来ると考えられる。

次年度に向けた検討状況

各種カレイのIMPaseを細胞膜から可溶化した後、現有のConA-Sepharose及び5'-AMP Sepharose 4Bを用いたアフィニティークロマトグラフィーを用いてIMPaseをSDS-PAGEで単一バンドになるまで精製する予定である。IMPaseは、コイから240kDaのタンパク質として精製されてはいるが、最も基礎的な情報であるアミノ酸配列については知る限り報告されていない⁽²⁾。カレイのIMPase精製が完了すれば、MALDI-TOFMSを使用してアミノ酸の配列を決定する予定である。

公表論文

なし

学会発表等

これまでの成果は、平成27年5月に愛媛大学で行われる、中国四国植物学会にて発表予定である。

受賞等

なし

外部資金

島根県水産技術センターからカレイの試料提供を受け、共同研究を行っている。

参考文献

- (1) 大泉 徹 (2010) ソルトサイエンス研究財団 2010年度研究報告書 133-139
- (2) K. Tomioka and K. Endo, (1984) *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **50**(6),1077-1081