

コイ・ミオシンのトランスグルタミナーゼ

架橋部位アミノ酸残基の同定

○ 江蔵麻衣・木村メイコ・埜澤尚範・関 伸夫・尾島孝男（北大院水）

キーワード：トランスグルタミナーゼ・架橋重合・ミオシン重鎖・ゲル形成

【目的】 魚肉の加熱ゲル化において重要な過程である“坐り”効果の本質は、トランスグルタミナーゼ (TGase) によるミオシン分子内及び分子間の架橋形成であるが、その架橋部位や分子反応機構については十分に解明されていない。先に演者らは、TGase による蛍光性アミン MDC のコイ・ミオシンの Gln 残基への取り込み実験などから、ミオシン重鎖 (MHC) の S2 領域に架橋部位が存在することを明らかにした。本研究では、更に詳細に架橋部位の検討を行ない、ミオシン分子中の反応性 Gln 残基を明らかにした。

【方法】 コイ普通筋ミオシン(5 mg/mL)に 0.5M NaCl, 50mM HEPES (pH 7.5), 4mM MDC, 1mM CaCl₂ 存在下、コイ筋肉 TGase を添加し、25℃で 2 時間反応を行なって MDC を取り込ませた。反応停止後、70%ギ酸中で 25℃, 1 時間、BrCN 分解を行ない、これを SDS-PAGE に供し PVDF 膜へ転写した。ついで、MDC が結合した蛍光断片を切り出し自動エドマン法によりアミノ酸配列を解析した。さらに、この断片をリジルエンドペプチダーゼ(AP-I)で消化し、消化物を逆相 HPLC に供して MDC が結合した蛍光ペプチドを単離し、そのアミノ酸配列を分析した。

【結果および考察】 コイ・ミオシンに MDC を取り込ませ BrCN 分解を行なった結果、蛍光は主に 10.5 kDa 断片に検出された。この断片の N 末端アミノ酸配列分析の結果、S2 領域の Asn(436)残基から始まるペプチド断片(NAQRA-)であることが分かった。しかしこれ以外に S1 領域にあるペプチド断片(ENFLV-)が混在していた。そこで、この 10.5 kDa 断片を AP-I で消化し、逆相 HPLC カラム (C18, 4.6 x 150mm) に供した結果、単一の蛍光ピークが検出された。このピークをさらに逆相 HPLC カラム (C18, 2.1 x 150mm) で精製し、アミノ酸配列を解析したところ AEL(Q)RG からなるペプチドであることが明らかになった。この配列は、S2 領域の 517-522 残基の配列と完全に一致していた。このペプチドの 4 残基目の Q はシーケンサー分析でシグナルが検出できなかったことから、MDC が側鎖に結合した Gln 残基であると推定された。以上の結果から TGase によって MDC はミオシン S2 領域の Gln(520)残基に主に取り込まれることが明らかになった。S2 領域は 533 残基よりなるので、S2 領域の C 末端域に取り込まれることが分かった。MDC 存在下では TGase によるミオシンの架橋形成が阻害されることから、この Gln(520)残基が架橋形成に関わっており、この残基の近傍にある Lys 残基との間で分子内架橋形成が起こることが推測された。

