

イワシクジラ骨格筋ミオグロビンの生化学的および熱力学的 性状

誌名	日本水産學會誌
ISSN	00215392
著者	落合, 芳博 渡辺, 良明 内田, 直行 小澤, 秀夫 渡部, 終五
巻/号	76巻4号
掲載ページ	p. 686-694
発行年月	2010年7月

イワシクジラ骨格筋ミオグロビンの生化学的 および熱力学的性状

落合芳博,^{1*} 渡辺良明,² 内田直行,² 小澤秀夫,¹ 渡部終五¹

(2010年2月4日受付, 2010年4月14日受理)

¹東京大学大学院農学生命科学研究科, ²日本大学生物資源学部

Biochemical and thermodynamic characteristics of myoglobin from the skeletal muscle of sei whale *Balaenoptera borealis*

YOSHIHIRO OCHIAI,^{1*} YOSHIAKI WATANABE,² NAOYUKI UCHIDA,²
HIDEO OZAWA¹ AND SHUGO WATABE¹

¹Department of Aquatic Bioscience, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, Bunkyo, Tokyo 113-8657, ²Nihon University College of Bioresources, Fujisawa, Kanagawa 252-8510, Japan

Myoglobin (Mb) was purified from the skeletal muscle of a sei whale *Balaenoptera borealis* through a combination of ammonium sulfate fractionation and a series of column chromatography. The absorption maxima of the oxidized form appeared at 543 and 581 nm, while that of the met form appeared at 638 nm. The autooxidation rate at 25°C and pH 7.0 was calculated to be 0.04 h⁻¹. The thermostability of this Mb at pH 7.0 as observed in the temperature dependency of circular dichroism (CD) showed that the apparent free energy of folding is -12.6 kJ/mol and the apparent melting temperature is 64.1°C. The α -helical content at 5°C and 80°C was 75.4% and 30.9%, respectively. Differential scanning microcalorimetry (DSC) showed that a large structural change took place at 81.8°C. CD measurement and DSC analysis gave considerable differences in the thermal denaturation profiles of this Mb, suggesting that the helices and hydrophobic interaction collapse in different temperature ranges. Finally, structural characteristics of this Mb were discussed based on the modeled tertiary structure.

キーワード：クジラ，構造，自動酸化，ミオグロビン，熱変性

脊椎動物の骨格筋や心筋の赤い色調は，筋肉細胞中に存在するミオグロビン (Mb) というヘムタンパク質に由来する。¹⁾ Mb は分子量約 17,000，球状かつ水溶性のタンパク質で，1 分子当たり 1 つのヘム鉄を結合する。ヘモグロビンにより血液中を輸送されてきた酸素を受け取り，筋肉細胞へ輸送および貯蔵する役割を担う。

Mb は酸素との結合状態により様々な誘導体を派生し，とくにヘム鉄が二価から三価に酸化されて生じるメト Mb (MetMb) は暗褐色を呈する。MetMb は生体内では還元系が働くため還元型 Mb に戻るが，死後の筋肉ではこの還元系が働かず MetMb が蓄積し暗褐色を呈する。マグロ類や鯨類の骨格筋には多量の Mb が含まれているため，¹⁻³⁾ 新鮮なものでは濃厚な赤色を呈するが，貯蔵条件によっては著しく酸化し，褐変する。とくに鯨類は筋肉 (骨格筋) に多量の Mb を含有するた

め，³⁾ 凍結・解凍により著しく変色することがある。

Kendrew *et al.*⁴⁾ は，タンパク質としては初めて X 線結晶解析によりマッコウクジラ *Physeter macrocephalus* の Mb の立体構造を決定した。それによると，本 Mb は N 末端側から順に A から H とよばれる 8 つの α ヘリックス構造をとっている。その後，マッコウクジラ Mb はタンパク質の構造研究の有用なモデルの一つとして，構造と機能との関連性などについて数多くの研究が進められてきている。⁵⁻⁹⁾ このように構造については詳細な研究がなされているにもかかわらず，クジラ類の Mb の生化学的性質についてはマッコウクジラのを除き不明の点が多い。他の鯨類についても，筋肉中に多量に存在する Mb の諸性質を明らかにしておくことは重要であると考えられる。これまでの一連の研究は上述のようにマッコウクジラ Mb を用いて行われてきており，

データの豊富な蓄積があるため研究対象としては望ましいとも考えられるが、マッコウクジラの新鮮な試料は入手が困難であり、また本種の肉の利用価値は高くない。

そこで本研究では、調査捕鯨の対象種であるため、わが国で高鮮度の試料が比較的入手しやすいイワシクジラ *Balaenoptera borealis* を対象として、Mb の自動酸化速度や熱安定性などの性状を明らかにすることを目的とした。本種の Mb については Iwanami *et al.*¹⁰⁾ が既に一次構造を明らかにしており、この点においても適切な実験材料と考えた。

試料および方法

試料 日本近海(太平洋側)で捕獲され、船上で解体、直ちに凍結処理されたイワシクジラ *Balaenoptera borealis* (♀, 体長 12.7 m, 体重 16.3 t) の骨格筋を用いた。解体時の体温は 30.5°C, 凍結前の筋肉 pH は 7.17 と、本試料は高鮮度であると考えられた。試料肉は入手後、実験に使用する直前まで -80°C に保存しておいた。

Mb の精製 氷上で半解凍した筋肉約 20 g を包丁で細かく刻み、2 倍量の氷冷蒸留水を加えて静かに攪拌しながら 30 分間 Mb を抽出した。4°C, 3000 x g, 10 分間の遠心分離後、上清をろ紙 (ADVANTEC, 51A) でろ過した。ろ液を硫酸分画に付し、50~100% 硫酸飽和画分の沈殿を 0.5 mM Tris phosphate (pH 7.0), 0.15 M NaCl で平衡化した Superdex 200 prep grade (GE Healthcare) を用いて流速 0.35 mL/min でゲル濾過クロマトグラフィーを行った。Mb の溶出は 280 nm と 540 nm でモニターし、さらに SDS-PAGE (後述) で Mb が含まれると思われる赤色を呈する画分の純度を調べ、高純度のものを合わせて次のイオン交換クロマトグラフィーに供試した。Mb 画分を 0.5 mM Tris phosphate (pH 7.0) に対して透析後、Mono S 5/50 GL (GE Healthcare) を用いる陽イオン交換クロマトグラフィーに付し、0.5 mM Tris phosphate (pH 7.0) から 7.5 mM Tris phosphate (pH 7.0) の直線的濃度勾配により流速 1 mL/min で溶出した。溶出してきた Mb の検出は上記の方法で行った。

可視部吸収スペクトルの測定 0.1 M リン酸塩緩衝液 (pH 7.0) 中、Mb 濃度 0.0025 mg/mL において、分光光度計 V-630 (日本分光) を用いて 500~650 nm の範囲で測定した。また、同溶液を 25°C に静置した時の吸収スペクトルの変化についても調べた。

自動酸化速度の測定 Kitahara¹¹⁾ の方法に準じて行った。すなわち、0.1 M リン酸塩緩衝液 (pH 7.0) 中、Mb 濃度 1 mg/mL とし、少量の Na₂S₂O₄ を加えて還元し、室温にて緩やかに振とうしてオキシ型 (MbO₂) に誘導した。これを 15 mL 容チューブに移し、25°C の水浴中においてゆっくり振とうし、一定時間ごとに取り出

して 578 nm の吸光度を測定し、次式により自動酸化速度を求めた。

$$\text{自動酸化速度 (h}^{-1}\text{)} = \ln \{ [\text{MbO}_2]_t / [\text{MbO}_2]_0 \} / t,$$

ここで、 t は 25°C における保温時間 (h) を表す。

円二色性 (CD) スペクトルの測定 CD スペクトルは Ueki *et al.*¹²⁾ の方法に準じて石英セル (光路長 0.2 mm) を用い、0.1 M KCl, 0.1 mM ジチオスレイトール (DTT), 0.01% NaN₃ を含む 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) 中、タンパク質濃度 1 mg/mL とし、190~240 nm の範囲において円二色性分散計 J-720 (日本分光) を用いて測定した。詳細な温度依存性の解析にあたっては、高温下における Mb の凝集を避け測定ノイズを軽減するために 0.1 M KCl, 0.1 mM DTT, 0.001% NaN₃ を含む 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) 中、タンパク質濃度 0.025 mg/mL に調整した後、石英セル (光路長 1 cm) を用いて CD 測定を行なった。222 nm における楕円率 ($[\theta]_{222}$) を測定し、遷移温度 T_M および ΔH を算定した。¹³⁾ なお、 $[\theta]_{222}$, α ヘリックス含量, 遷移温度 T_M および 20°C の変性における見かけの自由エネルギー変化 ΔG_{app} は以下の式を用いて算出した。 ΔH と T_M については Excel のソルバーを用いて計算した。

1. 分子楕円率 $[\theta]$ ($\text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{decimol}^{-1}$)

$$= \theta / (1000 \times c \times L)$$

ここで、 θ : 楕円率 (mdeg), c : モル残基濃度 ($\text{decimol}/\text{cm}^3$), L : セル長 (cm)

2. α ヘリックス含量 (%) = $100 \times \{ [\theta]_{222} / -36,000 \}$

3. 遷移温度 (°C) $T_M = \Delta H / \Delta S - 273.15$

ここで、 ΔH : エンタルピー変化 (J/mol), ΔS : エントロピー変化 (J/mol·K)

4. 見かけの自由エネルギー変化

$$\Delta G_{\text{app}} (\text{kJ/mol}) = \sum \varepsilon (\Delta H - 293.15 \Delta S)$$

ここで、 ε : 減衰係数

示差走査熱量分析 (DSC) DSC は Ueki *et al.*¹²⁾ の方法に準じて測定した。0.1 M KCl, 1 mM DTT, 0.01% NaN₃ を含む 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) に対し透析した Mb 溶液をタンパク質濃度 1 mg/mL に調整し、5~100°C における Mb の吸熱反応を示差走査型カロリメーター VP-DSC (Micro Cal) を用いて、昇温速度 1°C/min で測定した。遷移温度 T_M および ΔH は同社の専用解析ソフト Origin (Micro Cal) を用いて求めた。

分子モデリング イワシクジラ Mb のアミノ酸配列は Iwanami *et al.*¹⁰⁾ が報告したもの (Swiss-Prot ID: Q0KIY1) を用いた。立体構造の鋳型として Vojtechovsky *et al.*¹⁴⁾ が X 線結晶解析により決定したマッコウクジラ Mb の立体構造 (PDB ID: 1A6G) を用いた。分子モデリングは Kiefer *et al.* ほかの方法¹⁴⁻¹⁶⁾ に準じて行

なった。両 Mb のアミノ酸配列のアラインメントは ClustalW により行い, SWISS-MODEL を用いて構造を最適化した後, GROMOS96 により総エネルギーを最小化した。Swiss Pdb Viewer により立体構造モデルを得て, 分子表面積および体積, 分子内空間表面積および体積, 遠位および近位ヒスチジンからヘム鉄までの距離などの構造情報を求めた。

その他の分析方法 SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) は以下の方法により行った。試料に等量の 2% SDS, 2% 2-メルカプトエタノール, 40% グリセロール, 4 mM EDTA, 0.015% プロモフェノールブルーを含む 20 mM Tris-HCl (pH 6.8) を加え, 95°C で 5 分間加熱後, 0.1% SDS を含む 15% ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行った。泳動後, ゲルを Coomassie Brilliant Blue R-250 で染色した。分子量マーカーには Molecular Weight Marker SDS-7 (Sigma-Aldrich, 分子量 14,000~66,000) を用いた。2 次元電気泳動は, 1 次元目に Dry Gel Strip (pH 3-11, 11 cm, GE Healthcare) を用いた等電点電気泳動, 2 次元目は上記と同様の SDS-PAGE を行った。

タンパク質濃度は, BCA Protein Assay Kit (Thermo) を用い, ウシ血清アルブミンを標準タンパク質として Smith *et al.*¹⁹⁾ の方法に準じ BCA 法により測定した。

結 果

精製に先立ち, 硫酸分画における Mb の挙動を調べた。その結果, 50% 飽和では Mb の半分程度が上清に残ったが, 100% 飽和では Mb を沈殿としてほぼ回収することができた (Fig. 1, レーン 4)。50% から 100% の間では Mb の回収が不完全であった (図省略)。そこで, 50-100% 飽和硫酸分画の沈殿を以下の精製に用いることにした。

この画分をゲル濾過クロマトグラフィーに付し (Fig. 2A), Mb を含む画分 37-41 (Fig. 2B) をさらに陽イオン交換クロマトグラフィーにより分離した (Fig. 2C)。この方法により, 高純度の Mb を得ることができた (Fig. 2D)。ゲルろ過においては, まだ高分子側の複数のタンパク質成分の混在が認められた。しかし, Mb 画分を陽イオン交換クロマトグラフィーに付したところ, 画分番号 25-27 は高純度であることが認められたので, 以降の実験にはこれらの画分を合一したものを用いることにした。精製 Mb を 2 次元電気泳動で分析した結果, 主成分 (図中矢印で示した) の泳動位置は, アミノ酸配列から計算した分子量および等電点 (それぞれ, 17,249 および 8.70) とほぼ一致した (Fig. 3)。そのほか, 分子量はほぼ同等であるが若干酸性側にある成分と等電点が 3~4 の成分, および分子量がやや小さく中性

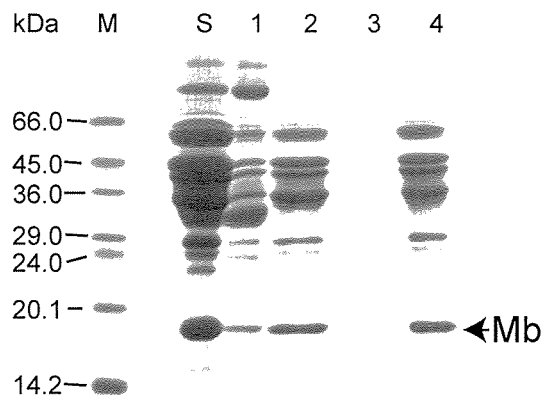


Fig. 1 SDS-PAGE patterns of ammonium sulfate saturation fractions of the water extract from sei whale skeletal muscle. Lane M; molecular weight markers; S: muscle extract; 1; supernatant at 50% saturation; 2; precipitate at 50% saturation; 3; supernatant at 100% saturation; 4; precipitate at 100% saturation. 15% gel. Mb, myoglobin.

付近に位置する成分の混在が微量ながら認められた。いずれもカラムクロマトグラフィー後の SDS-PAGE では存在が確認されなかったため (Fig. 2), 精製後の派生物, あるいは 1 次元目の等電点電気泳動で濃縮されたため可視化された成分である可能性がある。

精製 Mb を MbO₂ としたところ, 543 nm および 581 nm に吸収極大をもつ特有の吸収スペクトルを示した (Fig. 4A)。しかし, 25°C において振とうすると, 時間経過とともにこれらの吸収ピークは次第に低くなり, 代わって MetMb に特徴的な 638 nm の吸収が増加した。578 nm の吸光度の減少分を指標に自動酸化速度を追跡したところ, MbO₂ の残存量は一次反応的に減少した (Fig. 4B)。得られた勾配から, pH 7.0 における本 Mb の自動酸化速度は 0.04 h⁻¹ と算定された。

次に, 本 Mb につき, CD スペクトルの温度依存性を測定した (Fig. 5)。図にはその結果の一部を示した。分子橢円率は温度上昇に伴って減少し, とくに 50°C 以上における減少が顕著であった。222 nm における分子橢円率 $[\theta]_{222}$ は, 5°C および 80°C において, それぞれ -27,142 および -11,110 であり, これらの値から α ヘリックス含量は, それぞれ 75.4% および 30.9% と算定された。

次に, 本 Mb の安定性について熱力学的な解析を試みた。Fig. 6A に示すように, $[\theta]_{222}$ の測定値に対して計算値を忠実に近似することができた。そこで近似値をもとに温度依存的な変化について詳細な解析を行った。まず $[\theta]_{222}$ の温度に対する微分値 $d[\theta]_{222}/dT$ の温度依存性をみたところ, 最も大きな変化を示したのは 65.5

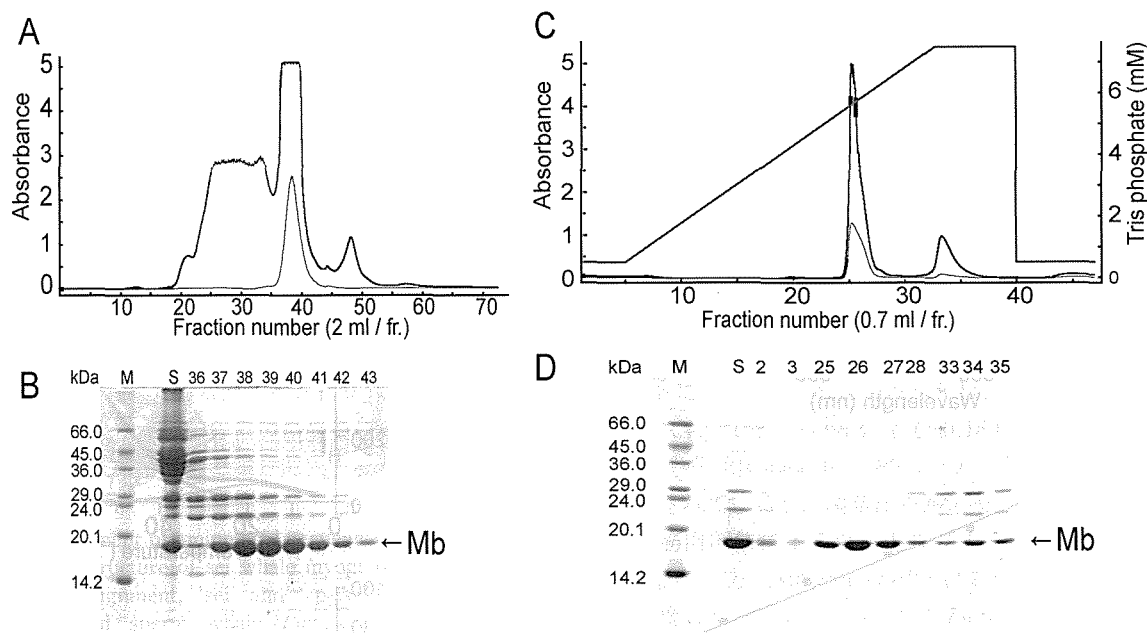


Fig. 2 Purification of sei whale myoglobin. (A) elution pattern of myoglobin from a Superdex 200 gel filtration column equilibrated with 0.5 mM Tris phosphate (pH 7.0). The column was developed with the same buffer at a flow rate of 0.35 mL/min. The eluate was collected in 2 mL portions and monitored by the absorbance at 280 nm (thick line) and 540 nm (thin line). (B) SDS-PAGE patterns of the fractions obtained by gel filtration in A. Lane M: molecular weight markers; S: the applied fraction; The number above each lane corresponds to that of the fraction number in A. The arrow indicates the band of myoglobin. 15% gel. (C) elution pattern of myoglobin from a MonoS 5/50 cation exchange column. Elution of the column was performed at a flow rate of 1 mL/min with 0.5 mM Tris phosphate (pH 7.0) for the initial 5 min, followed by a linear gradient of the same buffer up to 7.5 mM in 32 min. The eluate was collected in 0.7 mL portions and monitored as in A. The flow rate was 1 mL/min. (D) SDS-PAGE patterns of the fractions obtained by ion exchange chromatography in C. The lane numbers correspond to the fraction numbers in C. Refer to the legend in B for lanes M and S, and the arrow. 15% gel. Mb, myoglobin.

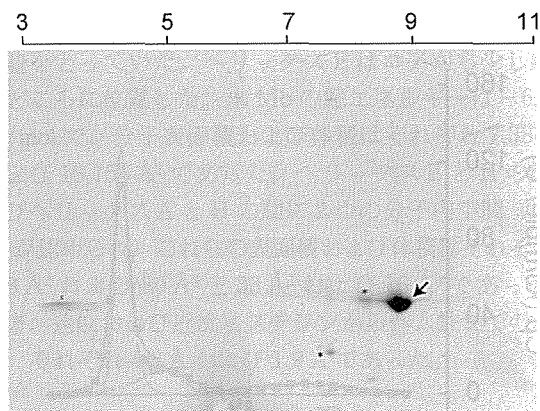


Fig. 3 Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of purified sei whale myoglobin. The arrow indicates the spot of myoglobin. For the first dimension, isoelectric focusing was performed horizontally in the range of pH 3–11. For the second dimension, SDS-PAGE was carried out vertically using 15% gel. The arrow points to the spot of myoglobin. The asterisks indicate the other components.

℃であった (Fig. 6B)。しかし、19℃付近にも小さいながらピークが認められ、見かけ上の変性に関与してい

る本 Mb のドメインは 2 つあるものと考えられた (Fig. 6B)。全エンタルピー変化 ΔH_{total} は -202.4 kJ/mol、ヘリックス全体の半分が変性する見かけの遷移温度 T_{Mapp} は 64.1 ℃、 20 ℃における見かけの自由エネルギー変化 ΔG_{app} は -12.6 kJ/mol と算定された。また、Fig. 6C に示すように、 α ヘリックス含量は温度依存的に減少し、 50 ℃前後までは緩やかに、さらに高温域では急速に減少することが明らかとなった。

本 Mb の熱安定性について DSC を用いた検討も行なった。Fig. 7 に示すように、最大の吸熱ピークは 81.8 ℃にみられたが、解析の結果、 34.8 および 70.2 ℃にも小さな吸熱ピークが認められた。また、 90 ℃を超えると Mb は凝集してしまい、2 度目の測定では明確な吸熱ピークが得られなかった (データ省略)。

最後に、既報のアミノ酸配列¹⁰⁾をもとに、マッコウクジラ Mb の結晶構造を鋳型としてイワシクジラ Mb の立体構造について相同性モデリングを行った。Fig. 8A に示すように、両 Mb のアミノ酸配列は 92.9% の同一率を示し、12 残基にのみ置換がみられた。これらの置換も保存的なものが主体であり、完全に異なるのは 67 番目の残基の置換 (Asn→Val) のみであった。その

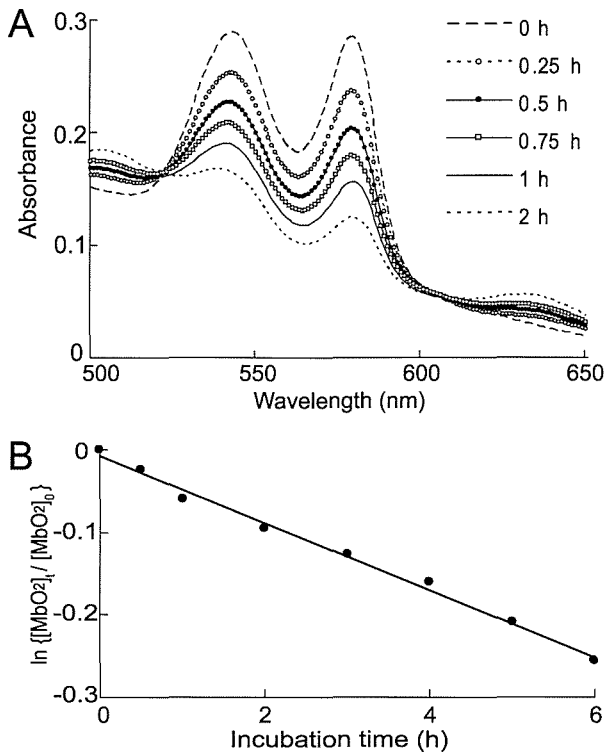


Fig. 4 Autoxidation profiles of sei whale myoglobin. (A) Time course of the changes in visible absorption spectra. The spectra in the range of 500 and 650 nm are shown to focus on the decrease of oxy form and increase of met form. (B) Autooxidation rate in 0.1 M sodium phosphate (pH 7.0) at 25°C. Regression line $Y = -0.0407 X$, correlation coefficient $R^2 = 0.994$.

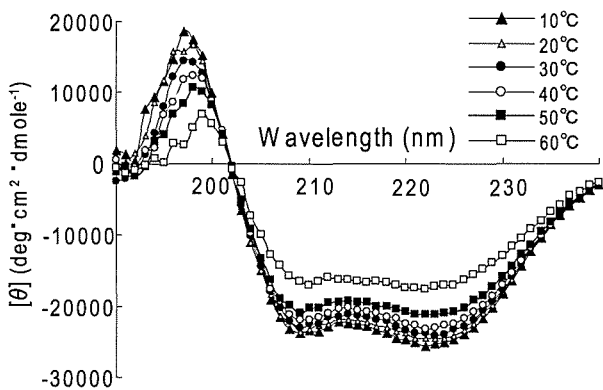


Fig. 5 Effect of temperature on the CD spectra of sei whale myoglobin. Protein concentration was adjusted to 1 mg/mL in 0.1 M KCl, 1 mM DTT, 0.01% NaN₃, and 10 mM sodium phosphate (pH 7.0).

ほか、ヘリックス A, E および H には、ヘリックス構造の安定性に関わると思われる 6 および 130 番目の Ala→Gly および 75 番目の Gly→Ala という置換が認められた。しかし、イワシクジラ Mb の立体構造は Fig. 8B に示すように、マッコウクジラのもの (図示せず) とほぼ

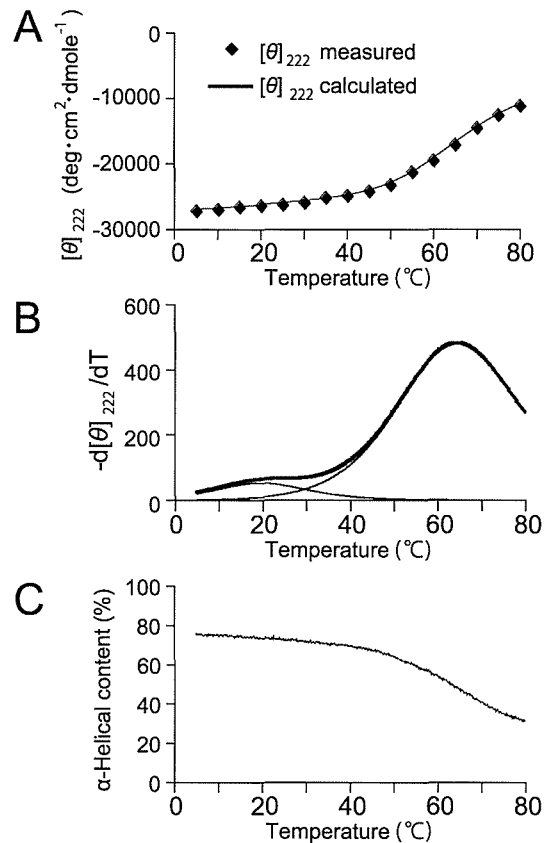


Fig. 6 Analyses of CD spectra of sei whale myoglobin. From the data in Fig. 5, the molar ellipticity (A), differentiation of the molar ellipticity (B), and α -helical content (C) were plotted against temperature. Protein concentration was 0.025 mg/mL.

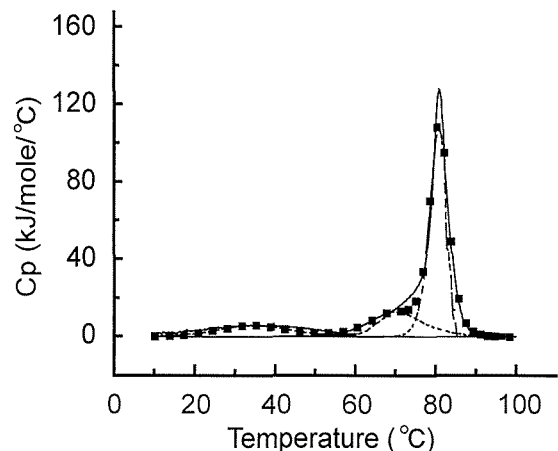


Fig. 7 Differential scanning calorimetry (DSC) of sei whale myoglobin. The observed DSC pattern, the sum of subsequent deconvolution analysis and the subsequent analysis are shown by a thick line, dots, and a thin line, respectively. Myoglobin was dissolved in 0.1 M KCl, 1 mM DTT, 0.01% NaN₃, and 10 mM sodium phosphate (pH 7.0) at a concentration of 1 mg/mL. The raising rate of temperature was set to 1°C/min.

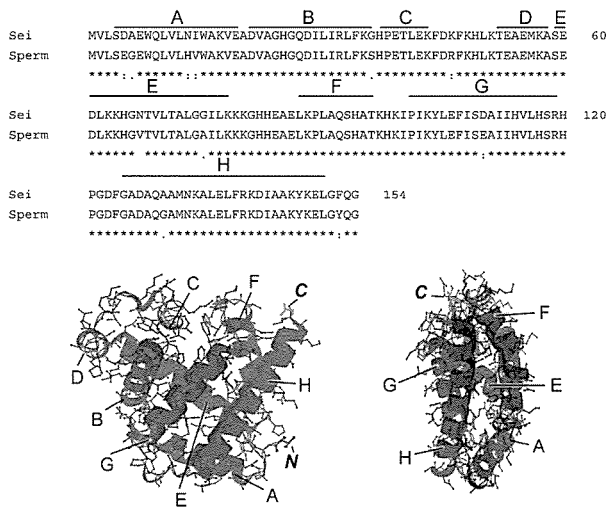


Fig. 8 Alignment of amino acid sequences and modeled tertiary structure of sei whale myoglobin. In the sequence alignment, 'sei' and 'sperm' represent sei whale and sperm whale *Physeter macrocephalus*, respectively. The tertiary structures are from two different angles. The letters A through H represent helices in this order from the N terminus. The N and C termini are indicated by italicized bold letters *N* and *C*, respectively.

同じものが得られた。この図では、立体構造はヘリックス H 側からみたもの、左方向に約 90 度回転したものを示した。Mb の構造のコアをなすとされるヘリックス A, B, G および H は長めのらせん構造を、ヘリックス C, D, および F は非常に短いあるいは不完全ならせん構造をとっていた。ヘリックス E はコアから少し離れたところに位置した。本 Mb の総エネルギーは $-6,416$ kJ/mol で、分子表面積および体積はそれぞれ $7,384 \text{ \AA}^2$ および $18,156 \text{ \AA}^3$ であった。ヘリックス E と H の間およびヘリックス A と H の間に 2 つの分子内空間 (cavity) が認められ、これらの表面積および体積はそれぞれ、 108 \AA^2 および 80 \AA^3 と 33 \AA^2 および 16 \AA^3 であった。一方、遠位および近位ヒスチジンからヘム鉄までの距離は、それぞれ 4.6 \AA および 1.9 \AA であった。

考 察

イワシクジラ Mb は硫安飽和度 100% でほぼ回収された。マグロ類の Mb では 50~80% 飽和程度で回収されており、^{12,20,21} 本 Mb は魚類のものに比べて溶解度が高いものと考えられた。哺乳類の Mb では、わずかなアミノ酸の置換が溶解度や凝集性に影響を及ぼすことが報告されている。⁷⁾ カラムクロマトグラフィーによる精製においては、これまでのマグロ類 Mb の精製例^{12,20-22)} と同様に、ゲルろ過に続く陽イオン交換クロマトグラフィーが有効であった (Fig. 2C)。

イワシクジラ Mb の自動酸化については松浦ら²³⁾により報告がなされている。それによると、クジラ Mb はウマ Mb と同様、マグロ類の Mb に比べてはるかに熱安定性が高い。松浦らの論文では、試料の詳細については言及されておらず、また精製法や自動酸化速度の測定条件が異なることなどから、本研究で得られたものと単純な比較はできない。しかし、例えば 20°C , pH 6.42 および 30°C , pH 6.33 におけるイワシクジラ Mb の自動酸化速度がそれぞれ 0.01 および 0.13 h^{-1} と、本研究で得られた 0.04 h^{-1} とほぼ同等である。マッコウクジラ Mb については 22°C , pH 5.8 および 40°C , pH 7.0 においてそれぞれ 0.08 および 0.18 h^{-1} と報告されている。^{24,25)} 他の哺乳類の Mb についても自動酸化速度が測定されているが、調製法や測定条件を工夫すると動物種や筋肉部位による差はあまり大きくないと報告もある。²⁶⁾ 一方、Madden *et al.*²⁷⁾ は数種魚類 Mb の自動酸化速度について調べ、キハダ *Thunnus albacares* で 0.088 h^{-1} 、南極産ノトセニア科魚類 *Notothenia coriiceps* で 0.44 h^{-1} であったとしている。クジラ Mb は、魚類 Mb の中では比較的安定なマグロ Mb よりも安定であることがわかる。一方、ティラピア Mb では同様の条件下において 0.02 h^{-1} 前後という値が報告されているが、²⁸⁾ 筋肉水抽出液を用いて測定しているために Mb が安定化され、自動酸化速度が小さめに出ていると考えられる。魚類 Mb が哺乳類 Mb と比較して概して不安定であり、自動酸化を受けやすいことについては報告例が多い。^{11,12,29,30)} Chow²¹⁾ はサバ科魚類 Mb の塩酸グアニジンに対する安定性と pH が自動酸化速度へ及ぼす影響を調べ、安定性が低いものほど自動酸化速度が大きいことを明らかにした。残念ながら、Mb の自動酸化速度については測定条件が統一されておらず文献値の比較が難しいのが現状であり、今後の統一が望まれる。

イワシクジラ Mb では 5°C および 80°C における α ヘリックス含量はそれぞれ 75.4% および 30.9% であり、イワシクジラ Mb は 80°C という高温においても α ヘリックス構造を半分程度維持していた。CD による熱安定性の測定では $[\theta]_{222}$ の温度依存性に基づく熱力学的パラメーターの算出により、イワシクジラ Mb の安定性が示された。

DSC 測定は 2 回連続で行なったが、2 回目の測定で吸熱ピークは得られなかった (図省略)。吸熱ピークが得られた 1 回目の測定結果を解析した (Fig. 7)。イワシクジラ Mb はピーク数が 3 で解析結果と測定結果が一致したことから、見かけの変性に関与しているドメインが 3 つあることが考えられた。CD 測定により得られた T_M 値 20.1°C および 65.5°C はそれぞれ、DSC 測定により得られた T_M 値 34.8°C および 70.2°C に相当すると考えられ、CD 測定による T_M 値より高温側に DSC 測

定による T_M 値があることから, 本 Mb の熱変性においては, α ヘリックスが半分程度崩壊した後に全体の立体構造が壊れたことが示唆された。ヘリックス以外の要素として, Mb 分子のコアを形成するのに必要なセグメント間の疎水的相互作用が考えられる。また, DSC 測定において, 85~100°C の範囲ではノイズが確認されたため, これらの範囲のデータを除外して解析した。ノイズの原因は, 高温域で不可逆的な構造変化が進み, Mb どうしが凝集を起こしたと考えられる。前述の CD 測定に関しては 80°C を上限にしたため, データの熱力学的解析には問題がなかったと考えられる。

DSC 測定において ΔH が最も大きい T_M は 80.8°C であり, この値は Ueki *et al.*¹²⁾ が報告しているクロマグロ Mb の値 78.6°C より高く, Pinker *et al.*³¹⁾ が報告しているマッコウジラ Mb の値 82.2°C よりも低かった。前者は本研究とほぼ同一条件で得られた値であるのに対し, 後者は 100 mM KCl, 0.5 mM KCN を含む 20 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 9.6) 中で測定を行なっている。マッコウジラ Mb でやや高い値が得られたが, Mb の構造はアルカリ側で安定化されることが原因と考えられる。¹¹⁾

マッコウジラ Mb およびイワシジラ Mb のアミノ酸残基数はいずれも 154 であり, アミノ酸配列の同一率は 92.9% と高かった。両 Mb のアミノ酸配列を比較すると, 明確に異なるのは 67 番目の Asn→Val という置換のみで, 残りは保存的な置換であった。しかし, Ala→Gly および Gly→Ala という置換が 3 箇所あり, これらはヘリックス A, E および H に存在した。Gly は Ala に比べてヘリックス構造の形成に不利に作用すると考えられる。³²⁾ この点につき, Regis *et al.*⁷⁾ はウマ Mb とマッコウジラ Mb の安定性の違いについて検討し, 後者の方が安定であり, 自由エネルギーの差は 2.1 kcal/mol と見積もっている。さらに, 両 Mb で異なる 2 つの置換 (ウマ Mb では Gly であるがマッコウジラ Mb では Ala) をマッコウジラ Mb において Gly に置換した組換え Mb では 1 kcal/mol 分, 不安定になったとしている。マグロ類の Mb についても, アミノ酸の置換と熱安定性の関連性が報告されている。^{33,34)} イワシジラとマッコウジラの Mb にみられる 3 箇所の Ala→Gly あるいは Gly→Ala の置換は, 実質的には両 Mb で差し引き 1 つの置換であるので, 安定性に及ぼす影響は小さいことが予想される。関連して Liong *et al.*³⁵⁾ は, マッコウジラ Mb の 104 残基目の Leu を Phe に置換するとヘミンの離脱率が増加したと報告している。

分子モデリングにおいて, イワシジラ Mb ではマッコウジラのものに酷似した立体構造が得られた。ヘリックス A, E, G および H は長めのヘリックス構造をとり, Mb 分子の安定化に寄与していることが示唆され

た。ヘリックス C や D ははっきりとした構造をとらなないと考えられた。魚類 Mb ではヘリックス D が欠失していることが知られており,³⁶⁾ 不安定性の原因の一つと考えられる。Mb の折れたたみにおける Molten globule 状態において, 5 ミリ秒以内には水素結合が形成され安定な二次構造がヘリックス A, G および H 全体とヘリックス B の一部にできること, ヘリックス B の残部とヘリックス C, E および CD ループの形成にはさらに時間を要することが明らかにされている。³⁵⁾

マッコウジラ Mb の構造特性については他にも詳しい研究例がある。例えば, Tilton *et al.*³⁸⁾ は, Mb に Xe が結合する分子内空間を見出したが, これは酸素分子などのリガンドの通路であるとした。Johnson *et al.*³⁹⁾ は, 酸素結合に関わる遠位ヒスチジン残基が Mb 分子の外側に向かって動き, 振動することを発見した。この動きは “His gate”, “swinging door” などとよばれ, Mb 分子外からの物質の出入り口と考えられるが, Scott *et al.*⁴⁰⁾ は, この出入り口から酸素分子などが通る経路を推定した。Cohen *et al.*⁴¹⁾ は His gate 以外にも, 別の小さな入り口があることを示した。ヘムが挿入されているヘムポケットは疎水性に富むため “Waterproofing the heme pocket” とよばれるが, ヘムポケットに位置するアミノ酸残基の置換によりヘム鉄が外環境と接しやすくなり, ヘミンの離脱率が大幅に増加することが示されている。³⁵⁾ このように立体構造と内部空間, 酸素の移動経路, ヘム環境の安定性は密接に関係していると考えられる。これらの詳細な構造関連の知見は, Mb の自動酸化とその制御法の確立において資するところが大きいと考えられる。

以上, 本研究により, イワシジラ筋肉からの Mb の精製法が確立され, 自動酸化や熱変性などのプロフィールが明らかにされた。魚類筋肉の低温貯蔵中における変色パターンや Mb の変化については比較的多くの報告があるものの,^{1,42-45)} 鯨類筋肉に関する情報は非常に乏しい。クジラ Mb の自動酸化や熱変性における種特異性, 冷凍変性における構造変化等については今後の検討課題としたい。

謝 辞

本研究で用いた試料は調査捕鯨により捕獲されたもの一部で, 入手にあたり共同船舶株式会社 舟橋 均氏 および荻原光仁氏にお世話になった。ここに記して謝意を表する。

文 献

- 1) 落合芳博. 魚類ミオグロビンの構造安定性—褐変抑制の観点から。「水産物の色素—嗜好性と機能性」(平田孝, 菅原達也編) 恒星社厚生閣. 東京. 2008; 19-31.

- 2) Polasek LK, Davis RW. Heterogeneity of myoglobin distribution in the locomotory muscles of five cetacean species. *J. Exp. Biol.* 2001; **204**: 209-215.
- 3) Noren SR, Williams TM. Body size and skeletal muscle myoglobin of cetaceans: adaptations for maximizing dive duration. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 2000; **126**: 181-191.
- 4) Kendrew JC, Dickerson RE, Strandberg BE, Hart RG, Davies DR, Phillips DC, Shore VC. Structure of myoglobin: A three-dimensional Fourier synthesis at 2 Å resolution. *Nature* 1960; **185**: 422-427.
- 5) Dametto M, Cárdenas AE. Computer simulations of the refolding of sperm whale apomyoglobin from high-temperature denaturated state. *J. Phys. Chem. B.* 2008; **112**: 9501-9506.
- 6) Bossa C, Amadei A, Daidone I, Anselmi M, Vallone B, Brunori M, Di Nola A. Molecular dynamics simulation of sperm whale myoglobin: effects of mutations and trapped CO on the structure and dynamics of cavities. *Biophys. J.* 2005; **89**: 465-474.
- 7) Regis WC, Fattori J, Santoro MM, Jamin M, Ramos CH. On the difference in stability between horse and sperm whale myoglobins. *Arch. Biochem. Biophys.* 2005; **436**: 168-177.
- 8) Draghi F, Miele AE, Travaglini-Allocatelli C, Vallone B, Brunori M, Gibson QH, Olson JS. Controlling ligand binding in myoglobin by mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 2002; **277**: 7509-7519.
- 9) Sato H, Hayashi T, Ando T, Hisaeda Y, Ueno T, Watanabe Y. Hybridization of modified-heme reconstitution and distal histidine mutation to functionalize sperm whale myoglobin. *J. Am. Chem. Soc.* 2004; **126**: 436-437.
- 10) Iwanami K, Mita H, Yamamoto Y, Fujise Y, Yamada T, Suzuki T. cDNA-derived amino acid sequences of myoglobins from nine species of whales and dolphins. *Comp. Biochem. Physiol.* 2006; **145**: 249-256.
- 11) Kitahara Y, Matsuoka A, Kobayashi N, Shikama K. Autoxidation of myoglobin from bigeye tuna fish (*Thunnus obesus*). *Biochim. Biophys. Acta* 1990; **1038**: 23-28.
- 12) Ueki N, Ochiai Y. Primary structure and thermostability of bigeye tuna myoglobin in relation to those of other scombridae fish. *Fish. Sci.* 2004; **70**: 875-884.
- 13) Greenfield JN, Hitchcock-DeGregori ES. The stability of tropomyosin, a two-stranded coiled-coil protein, is primarily a function of the hydrophobicity of residues at the helix-helix interface. *Biochemistry* 1995; **34**: 16797-16805.
- 14) Vojtechovsky J, Chu K, Berendzen J, Sweet MR, Schlichting I. Crystal structures of myoglobin-ligand complexes at near-atomic resolution. *Biophys. J.* 1999; **77**: 2153-2174.
- 15) Kiefer F, Arnold K, Kunzli M, Bordoli L, Schwede T. The SWISS-MODEL repository and associated resources. *Nucleic Acids Res.* 2009; **37**: D387-392.
- 16) Lurman JG, Koschnick N, Pörtner H, Lucassen M. Molecular characterisation and expression of Atlantic cod (*Gadus morhua*) myoglobin from two populations held at two different acclimation temperatures. *Comp. Biochem. Physiol.* 2007; **148**: 681-689.
- 17) Ruscio ZJ, Kumar D, Shukla M, Prisant GM, Murali TM, Onufriev VA. Atomic level computational identification of ligand migration pathways between solvent and binding site in myoglobin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2008; **105**: 9204-9209.
- 18) van Gunsteren WF, Billeter SR, Eising A, Hunenberger PH, Kruger P, Mark AE., Scott WRP, Tironi IG. Biomolecular Simulations: The GROMOS96 Manual and User Guide. 1996; *VdF Hochschulverlag ETHZ*.
- 19) Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Frovenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 1985; **19**: 76-85.
- 20) Ueki N, Chow CJ, Ochiai Y. Characterization of bullet tuna myoglobin with reference to the thermostability-structure relationship. *J. Agric. Food Chem.* 2005; **53**: 4968-4975.
- 21) Chow CJ. Relationship between the stability and autoxidation of myoglobin. *J. Agric. Food Chem.* 1991; **39**: 22-26.
- 22) Chow CJ, Ochiai Y, Watabe S, Hashimoto K. Effects of freezing and thawing on the autoxidation of bluefin tuna myoglobin. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1985; **51**: 2073-2078.
- 23) 松浦文雄, 橋本周久, 黄川田 慎, 山口克己. 魚類ミオグロビンの自酸化速度について. *日水誌* 1962; **28**: 210-216.
- 24) Brown WD, Mebine LB. Autoxidation of oxymyoglobins. *J. Biol. Chem.* 1969; **244**: 6696-6701.
- 25) Livingston DJ, Watts DA, Brown WD. Myoglobin interspecies structural differences. Effects on autoxidation and oxygenation. *Arch. Biochem. Biophys.* 1986; **249**: 106-115.
- 26) Gutzke D, Trout G. Temperature and pH dependence of the autoxidation rate of bovine, ovine, porcine, and corvine oxymyoglobin isolated from three different muscles - *longissimus dorsi*, *gluteus medius*, and *biceps femoris*. *J. Agric. Food Chem.* 2002; **50**: 2673-2678.
- 27) Madden PW, Babcock MJ, Vayda ME, Cashion RE. Structural and kinetic characterization of myoglobins from eurythermal and stenothermal fish species. *Comp. Biochem. Physiol.* 2004; **137B**: 341-350.
- 28) Chow CJ, Yang JI, Lee PF, Ochiai Y. Structural and autoxidation profiles of myoglobins from three species and one hybrid of tilapia (Cichlidae, Perciformes). *Comp. Biochem. Physiol.* 2009; **155B**: 274-281.
- 29) 山口勝己, 武田 登, 小川克公, 橋本周久. マサバおよびマイワシのミオグロビンの性状. *日水誌* 1979; **45**: 1335-1339.
- 30) Chanthai S, Ogawa M, Tamiya T, Tsuchiya T. Studies on thermal denaturation of fish myoglobins using differential scanning calorimetry, circular dichroism, and tryptophan fluorescence. *Fish. Sci.* 1996; **62**: 927-932.
- 31) Pinker JR, Lin L, Rose DG, Kallenbach RN. Effects of alanine substitutions in α -helices of sperm whale myoglobin on protein stability. *Protein Sci.* 1993; **2**: 1099-1110.
- 32) Luo Y, Baldwin RL. How Ala→Gly mutations in different helices affect the stability of the apomyoglobin molten globule. *Biochemistry* 2001; **40**: 5283-5289.
- 33) Ueki N, Ochiai Y. Effect of amino acid replacements on the structural stability of fish myoglobin. *J. Biochem.* 2006; **140**: 649-656.
- 34) Ochiai Y, Ueki N, Watabe S. Effects of point mutations on the structural stabilities of tuna myoglobins. *Comp. Biochem. Physiol.* 2009; **153B**: 223-228.
- 35) Liang CE, Dou Y, Scott EE, Olson SJ, Phillips Jr. NG. Waterproofing the heme pocket role of proximal amino acid side chains in preventing hemin loss from myoglobin. *J. Biol. Chem.* 2001; **276**: 9093-9100.

- 36) Birnbaum IG, Evans VS, Przybylska M, Rose RD. 1.70 Å resolution structure of myoglobin from yellowfin tuna. An example of a myoglobin lacking the D helix. *Acta Cryst.* 1994; **D50**: 283–289.
- 37) Jennings PS, Wright PE. Formation of a molten globule intermediate early in the kinetic folding pathway of apomyoglobin. *Science* 1993; **262**: 892–896.
- 38) Tilton Jr FR, Kuntz Jr DI, Petsko AG. Cavities in proteins: structure of a metmyoglobin xenon complex solved to 1.9 Å. *Biochemistry* 1984; **23**: 2849–2857.
- 39) Johnson KA, Olson JS, Phillips Jr GN. Structure of myoglobin-ethyl isocyanide histidine as a swinging door for ligand entry. *J. Mol. Biol.* 1989; **207**: 459–463.
- 40) Scott EE, Gibson HQ, Olson SJ. Mapping the pathways for O₂ entry into and exit from myoglobin. *J. Biol. Chem.* 2001; **276**: 5177–5188.
- 41) Cohen J, Arkhipov A, Braun R, Schulten K. Imaging the migration pathways for O₂, CO, NO, and Xe inside myoglobin. *Biophys. J.* 2006; **91**: 1844–1857.
- 42) Chow CJ, Ochiai Y, Watabe S, Hashimoto K. Reduced stability and accelerated autoxidation of tuna myoglobin in association with freezing and thawing. *J. Agric. Food Chem.* 1989; **37**: 1391–1395.
- 43) Chow CJ, Wu JC, Lee PF, Ochiai Y. Effects of acid and alkaline pretreatment on the discoloration rates of dark muscle and myoglobin extract of skinned tilapia fillet during iced storage. *Fish. Sci.* 2009; **75**: 1481–1488.
- 44) 落合芳博. マグロ類筋肉の低温貯蔵中におけるミオグロビンの挙動とその制御法. 冷凍, 2009; **84**: 947–952.
- 45) 落合芳博. ヤケ肉における変色機構「生鮮マグロ類の高品質管理—漁獲から流通まで」今野久仁彦, 落合芳博, 福田 裕編, 恒星社厚生閣. 東京. 2010; 68–80.

定した。

日水誌, 76(4), 658-669 (2010)

琵琶湖産アユにおける河川への遡上開始日と遡上尾数の予測

酒井明久 (滋賀水試)

琵琶湖に流入する安曇川におけるアユの遡上開始日および遡上尾数の変動と遡上期直前のアユの資源尾数と平均体長, プランクトン量, 湖水温および遡上期降水量との関係を調べた。重回帰分析により, 遡上開始日の変動には資源尾数, 平均体長, プランクトン量および湖水温が, 遡上尾数の変動には資源尾数, 平均体長, プランクトン量および降水量がそれぞれ影響していることが判明した。説明変数から遡上期降水量を除いても有意な重回帰式が導かれ, これらの関係式からアユの河川への遡上開始日と遡上尾数を予測できると考えられた。

日水誌, 76(4), 670-677 (2010)

ユズ果汁添加飼料を給与したブリにおける血合筋の褐変抑制と筋肉中からのユズ香氣成分の検出

深田陽久, 橋口智美, 柏木丈弘, 妹尾歩美,

高桑史明, 森岡克司, 沢村正義, 益本俊郎 (高知大農)

養殖ブリの高付加価値化を目的として下記の試験を行った。試験1ではユズ果汁をブリ飼料に添加することによって血合筋の褐変を抑制できるか検討した。飼料1kgにユズ果汁を段階的に添加し, ブリ幼魚に40日間給与した。ユズ果汁の添加によって, 成長を損なう事無く, 血合筋の褐変が抑制されていた。試験2としてユズ果汁を添加した飼料を30日間与えたブリの筋肉中からユズ香氣成分の検出と同定を行い, 香りの成分が果汁を添加した飼料より移行し, 蓄積されたことを明らかにした。

日水誌, 76(4), 678-685 (2010)

イワシクジラ骨格筋ミオグロビンの生化学的および熱力学的性状

落合芳博 (東大院農),

渡辺良明, 内田直行 (日大生物資源),

小澤秀夫, 渡部終五 (東大院農)

イワシクジラ骨格筋から, 硫酸分画とカラムクロマトグラフィーによりミオグロビン (Mb) を精製し, 諸性状を調べた。25°C, pH 7.0における自動酸化速度は 0.04 h^{-1} であった。pH 7.0における円二色性の温度依存性から本 Mb の折りたたみにおける見かけの自由エネルギーは -12.6 kJ/mol , 転移温度は 64.1°C と算定された。示差走査熱量分析により 81.8°C で大きな構造変化が起こることが示唆された。本 Mb の構造特性について相同性モデリングによる検討も併せて行った。

日水誌, 76(4), 686-694 (2010)

クロマグロで発生したヤケ肉における肉質の変化および水溶性タンパク質の変性

落合芳博 (東大院農)

ヤケ肉は変色 (白化) や保水性の低下などを伴う異常肉で, マグロ類等で天然, 養殖を問わず, 夏季に発生が集中する。ヤケ肉の発生機構を明らかにするために, 天然および養殖クロマグロの正常個体とヤケが発生した個体につき, 普通筋および血合筋における肉質 (メト化率, 色調など) の相違および水溶性タンパク質成分の変化を調べた。その結果, ヤケ肉では成分の重合や分解が生じ, クレアチンキナーゼなど複数成分の消失が認められた。溶解度や熱分析の結果から, ミオグロビンの変性度合は小さく, 変色には大きく関与しないと考えられた。

日水誌, 76(4), 695-704 (2010)

リアルタイム PCR を用いた実験感染アユにおける *Flavobacterium psychrophilum* の排菌量の推定 (短報)

大原健一, 景山哲史, 桑田知宣 (岐阜県河川環境研),
海野徹也, 古澤修一 (廣大生物園科)

アユの冷水病菌の排菌量についてリアルタイム PCR (R-PCR) を用いて推定した。 $2.1 \times 10^4 \text{ CFU/fish}$ の冷水病菌を接種したアユを個体別に飼育した。試験開始の翌日から小型水槽に取り上げ, 10分間静置した後, そこから 50 mL の水を採取した。採取した水から DNA を抽出し, R-PCR を行った。4日後以降はすべての個体から排菌が確認され, 11日後にすべての個体が死亡した。推定された排菌量は死亡の 2~4 日前から徐々に増加した。また, 死亡日以前よりも死亡後に有意に増加し, 死亡後は高い水準で維持された。

日水誌, 76(4), 705-707 (2010)