

研究テーマ	マガキの食品機能性向上に関する研究 - 組織中のアミノ酸蓄積メカニズムの解析-
研究期間	平成 21～22年度
主たる研究者	【学部・学科】 海洋生物資源学部・海洋生物資源学科 【職・氏名】 助教・細井 公富
○研究目的	
<p>本研究の目的は、重要な水産資源種であるマガキにおいて、アミノ酸蓄積に関わる酵素の遺伝子同定と機能解析およびその塩分適応における生理的役割の解析を通じて、マガキのアミノ酸蓄積のメカニズムを明らかにすることである。本研究で得られる知見は、単にマガキの塩分適応機構の解明という海洋生物に関する学術的意義にとどまらず、マガキの食品機能性がどのようにして具備されるのかを明らかにするという食品化学的な意義も有する。したがって、得られた知見を利用することで、マガキが有する生理機能を利用した食品機能性の増強技術の開発への展開が可能である。</p> <p>本研究では、マガキが蓄積するアミノ酸のうち、特にアラニンについて、その生合成・代謝を担う酵素であるアラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)について、その遺伝子クローニングと発現・機能解析を試み、マガキ体内のアラニン蓄積における役割を明らかにする。アラニンは、高塩分暴露時に最も迅速に蓄積量が増加するアミノ酸であるとともに、食品機能性についても呈味機能(旨味)・生理調節機能(肝機能の補助)を備えており、マガキ体内のアラニン蓄積量の増加は、マガキの食品としての品質向上につながると考えられる。</p>	
○研究成果	
<p>初年度は、アラニン代謝酵素であるマガキALTの2種類のアイソザイム(cgiALT1, 2)のcDNAクローニングを行い、その構造と、組織発現様式を明らかにした(昨年度研究成果報告参照)。本年度は、アラニン蓄積量の増加が予想される高塩分暴露(60%海水から100%海水)を行い、アラニン蓄積量の変化とそれに伴うcgiALTの遺伝子発現量の変化を定量的に解析した。その結果、組織中のアラニン蓄積量は高塩分暴露20時間以内に約2<math>\mu</math>mol/g湿重から約14<math>\mu</math>mol/g湿重へとおおよそ7倍もの急激な増加が確認された(図1)。同時に行ったcgiALT1, 2遺伝子発現量の定量的結果、cgiALT1の発現量にはほとんど有意な変化がない一方で、cgiALT2の遺伝子発現量は有意に減少した(図2)。これらの結果から、ALT2によるアラニン代謝の抑制によって、高塩分暴露にともなうアラニン蓄積量の増加が引き起こされる可能性が示唆された。</p> <p>次に、同様にアラニン蓄積が起こる貧酸素ストレスに伴うcgiALT1, 2の発現量の変化を測定した。その結果、やはりcgiALT1の発現量変化は認められなかった。また、cgiALT2遺伝子の発現量は増加し、高塩分暴露とは反対の挙動を示した(図3)。</p> <p>以上の結果から、マガキのアラニン蓄積には、2種類のアイソザイムのうち、cgiALT2がより重要な役割を担うことが示唆された。また、本酵素は、各種環境ストレスに応じてアラニンの生合成と代謝分解のいずれの方向の反応を触媒しうる可能性が示唆された。</p> <p>(次項に続く)</p>	

さらにマガキ ALT の生理的役割を明らかにするために、大腸菌による組換え cgiALT の作製を行った。その結果、高い酵素活性を有した組換え cgiALT1,2 の発現と、精製に成功した (図 4)。これらを用いて cgiALT の触媒する反応の基質であるアラニンおよびピルビン酸に対する  $K_m$  値を測定したところ、それぞれの基質に対する  $K_m$  値は、アイソザイム間ほぼ同様であった。この結果は、2 種のアイソザイムのそれぞれが、生体内でアラニンの生合成および代謝分解のどちらかの反応を担っているのではなく、どちらの酵素も両反応を可逆的に行っていることを機能面から示唆するものであり、上述した遺伝子発現量の結果を支持するものであると考えられる。

本研究によって、マガキのアラニン蓄積機構における ALT アイソザイムの生理的役割の一端を明らかにすることができた。これらの知見は、マガキの環境適応機構等の生理学的観点において意義深いものであると考えている。その一方で、本研究で得られた知見に基づいたアラニン含量の増強技術への展開のためには、さらに多くのアラニン生合成に関する知見が必要である。しかしながら、本研究の過程で、塩分の低い 60% 海水に順化させたマガキを 100% 海水に 20 時間暴露することで、アラニン含量が 7 倍に増加する現象を見いだした (図 1)。この知見は、塩分濃度を調節することで、アラニン含量の効率的な増加が可能であることを示唆している。現在、マガキむき身の出荷には、塩分 1.5-2% の塩水が使用されているが、この濃度ではマガキ組織中のアラニンは、かなり減少していると考えられる。今後は、マガキのアラニン蓄積機構のさらなる解明と同時に、種々の塩分条件によるアラニン等の機能性成分の濃度変化の検証する取り組みを行いたい。

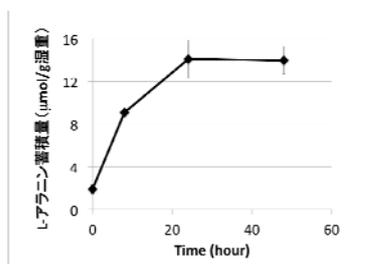


図 1 高塩分暴露によるマガキ組織中のアラニン蓄積量の変化

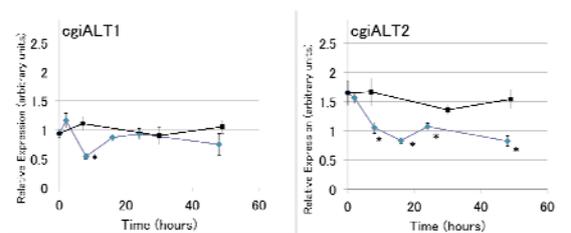


図 2 高塩分暴露によるマガキ外套膜の cgiALT1 および 2 の遺伝子発現量の変化。青線は高塩 (60% から 100%) 暴露区、黒線は対照区の遺伝子発現量を示す。

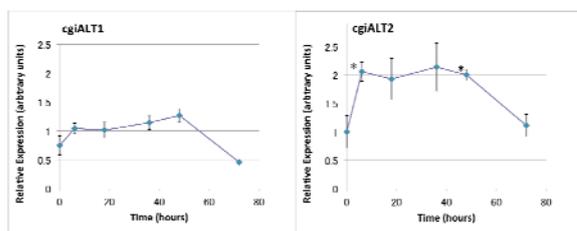


図 3 硝酸素暴露によるマガキ外套膜の cgiALT1 および 2 の遺伝子発現量の変化。

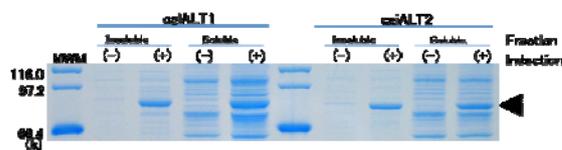


図 4 大腸菌による組換え cgiALT1,2 の発現。矢頭は、発現した組換え ALT1,2 のバンドを示す。