

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 局 詩 織

イミダゾールジペプチドはヒスチジン関連化合物とも呼ばれ、カルノシン (β -アラニルヒスチジン)、アンセリン (β -アラニル- π -メチルヒスチジン)、バレニン (あるいはオフィジン; β -アラニル- τ -メチルヒスチジン) などが挙げられる。近年、特にカルノシンを中心に、これらのジペプチドのもつヒトに対する機能性が注目されている。これらのジペプチドは脊椎動物筋肉中に広く分布し、嫌氣的運動時のプロトン緩衝物質として機能することが知られている。また、動物の種類によって含有されるジペプチドの種類は大きく異なる。しかしながら、なぜ動物種によって含有されるジペプチドの種類が異なるのかは、未だ解明されていない。

そこで本研究では、これらジペプチドの合成系に着目し、魚類におけるカルノシン-*N*-メチルトランスフェラーゼによるカルノシンのメチル化および β -アラニンと π -メチルヒスチジンの縮合によるアンセリン合成の確認を行なった。その結果、ウナギ筋肉において、後者のイミダゾールジペプチド合成酵素によるアンセリンおよびその他のジペプチドの合成活性を確認した。次いで、ウナギ筋肉から本酵素を単離精製し、精製酵素の N 末端アミノ酸配列を明らかにした。さらに、このジペプチド合成酵素がジペプチドの分解をも触媒する新規酵素であることを明らかにしたものである。

第 1 章では、高速液体クロマトグラフィーによる各イミダゾールジペプチドの分離定量条件を確立した。次いで、コントロールとしてニワトリ雛の胸筋を用い、既に存在が知られているカルノシン-*N*-メチルトランスフェラーゼ活性を確認することで、酵素の抽出および反応条件の検討を行なった。これに基づき、メバチマグロおよびマカジキ普通筋について、アンセリン合成活性の有無を調べた。しかしながら、両魚種ともに、アンセリン合成は認められなかった。また、ミンククジラの筋肉においても、本酵素によるバレニン合成は確認されなかった。

第 2 章では、ウナギ筋肉の硫安 40-75%飽和沈殿画分を調製し、 β -アラニンとヒスチジンを反応させたところ、カルノシンの合成が確認された。なお、この反応は ATP の加水分解を必要としない反応であった。また、同様にアンセリンの合成活性も認めた。アンセリンはウナギ筋肉中に痕跡程度にしか検出されないにもかかわらず、アンセリン合成活性の方がカルノシン合成活性よりも 10 倍程度高かった。さらに、バレニンおよび僅かながらホモカルノシンの合成も認めている。

次いで、多量のアンセリンを含有するメバチマグロおよびマカジキ普通筋の硫安 0-75%飽和沈殿画分を調製し、活性を測定した結果、アンセリン合成を認めた。また、バレニンの多いミンククジラに関しては、バレニンの合成を確認した。

第 3 章では、ウナギ筋肉の硫安 50-75%飽和沈殿画分から、各種クロマトグラフィーを用

いてジペプチド合成酵素の精製を行ない、最終的におよそ 1,130 倍に精製した。精製酵素は分子質量約 275kDa と推定され、約 43kDa のサブユニットからなる 6 ないし 7 量体と推測した。精製酵素も粗酵素と同様にカルノシン、アンセリン、バレニンおよびホモカルノシン合成活性を示し、アンセリン合成活性が最も高かった。また、 Zn^{2+} および Co^{2+} の添加によって、それぞれ 5 倍および 4 倍に活性が増大した。精製酵素のその他の諸性質も明らかにしている。また、精製酵素の N 末端アミノ酸配列の 25 残基を決定し、BLAST 検索の結果、ゼブラフィッシュのハプトグロビン β 鎖の部分配列と高い相同性を示すことを明らかにした。

第 4 章では、ハプトグロビン β 鎖の一次構造がトリプシン様セリンプロテアーゼと類似していることから、本酵素がジペプチド分解活性をもつ可能性が示唆された。そこで、精製酵素をカルノシン、アンセリンあるいはバレニンとともにインキュベートし、これらジペプチドをいずれも加水分解することを明らかにした。ジペプチド合成と同様に、アンセリン分解活性が最も高かった。プロテアーゼ阻害剤の影響から、本酵素がメタロプロテアーゼの一種である可能性が示唆された。

最後に第 5 章では、これらの結果について総括的な考察を行っている。

以上本研究により、ウナギ筋肉より精製したイミダゾールジペプチド合成酵素は、複数のジペプチドを合成し、またジペプチドの合成と分解の両方の反応を行なう新規酵素であることが明らかにされた。これらの成果は今後イミダゾールジペプチドの種特異的分布を解明するための基礎となり、またジペプチドの生理機能の解明のために、カルノシン以外の入手困難なイミダゾールジペプチドを供給するための資となるものと考えられ、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。