

研究テーマ	ナマコ類体壁に含まれる機能性タンパク質の高度利用化に関する研究	
研究期間	平成 23 ～ 24 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】 准教授・水田 尚志
<p>○研究目的</p> <p>水産業上重要なナマコ類として、マナマコ (<i>Apostichopus armata</i>) およびアカナマコ (<i>Apostichopus japonicus</i>) の2種を上げることができる。以前これらは同種として扱われてきたが、近年の集団遺伝学的な検討結果から別種であることが明らかにされている。またこれら2種以外にもキンコやバイカナマコなど食用種が数種存在する。これらの体壁部は組織学的には皮膚に相当し、美味でコリコリとした独特の食感を有するため酢の物などとして生食されることが多い。しかし、生食による消費量は減少傾向にあり、それ以外の主な用途としては加工品（乾燥ナマコ、乾燥粉末）の製造にほぼ限られているため、ナマコ類の新たな利用法の開発を模索すべき段階に来ている。ナマコ類に含まれる機能性成分としてはホロスリン（サポニン的一种）が上げられるが、これは水虫薬の有効成分として利用されている他、界面活性作用を持つため石鹸の成分としても用いられている。しかし、ホロスリン以外に機能性成分を単離して実用化された例はほとんど見当たらない。一方、福井県では、昭和63年から平成9年の10年間にわたってマナマコの放流技術開発事業が行われ、その過程においてマナマコの種苗生産や中間育成などに関わる優れた諸技術の開発を達成している。これら技術を活用することによってマナマコ資源の安定的な生産・供給のみならず資源量の増大も今後十分期待できるだろう。</p> <p>ナマコ類の体壁を構成するタンパク質のうちの70～80%程度はコラーゲンであるが、残りのほとんど(20～30%)は、構造的にフィブロネクチン (FN) に類似した特異なタンパク質 (以下、FN様タンパク質) であることがこれまでの研究により分かっている。FNとは多くの動物に存在する接着性タンパク質のひとつで、細胞および繊維状タンパク質と結合することで細胞の分化や形態維持に重要な役割を果たしている。通常、血漿中に含まれる可溶性FNおよび結合組織中に含まれる不溶性FNの2種類が存在し、前者は動物から精製されて細胞培養基質として産業利用されている。しかしナマコ類体壁に存在するFN様タンパク質は、結合組織中に存在しつつも可溶性を示すため、産業利用の可能性を持つ新しいタンパク質資源となりうる。本研究は、マナマコに代表されるナマコ類のより付加価値の高い利用法の一つとして、それらの体壁に含まれるFN様タンパク質に着目し、化粧品、食品や医薬品の原料として実用化するための基礎的知見を集積することを目的とする。今年度においてはマナマコを試料とし、体壁組織からのFN様タンパク質の抽出・精製法の検討を行うとともに、その部分性状の解明を行う。</p>		

○研究成果

1) 抽出方法の検討 FN 様タンパク質を粗抽出するのに適した pH および塩濃度の条件について検討した。pH については、3、5、7、8 および 9 の 5 条件を設定し、それぞれについて 0、3、6 および 9% の NaCl を含む緩衝液を調製し使用した。なお、粗タンパク質含有量に対する抽出タンパク質量の百分率をタンパク質抽出率 (%) とした。NaCl 非存在下では、pH8 および 9 で 35~40% 程度の抽出率を示したが、pH3 および 5 ではいずれの場合も 15% 未満であった。いずれの pH においても塩濃度の増加に伴う抽出率の上昇傾向が認められ、pH8 の 9% NaCl 存在下の条件において抽出率は最大 (56%) となった。以上の結果から、体壁のタンパク質抽出率は NaCl 濃度の増加に伴って上昇し、さらに中性~弱塩基性 pH 領域で比較的高くなることが分かった。各抽出で得られた可溶性ならびに不溶性画分を電気泳動に供した結果、可溶性画分は分子量約 400K の主要バンド (FN 様タンパク質の主要成分) を示し、他には数本のマイナーバンドが観察されるのみであった。不溶性画分に関しては、pH7, 8, および 9 において約 400K の主要バンドはごくわずしか観察されなかった。従って、これらの条件では塩濃度に関わりなく大部分の FN 様タンパク質が可溶性画分に回収できることが明らかとなった。

2) 生化学的性状 pH7.8 における 3% NaCl 抽出物について陰イオン交換クロマトグラフィーを行ったところ、主要ピークとして部分精製標品を得た。部分精製標品は非還元条件下での電気泳動で 400K の主要バンドを示したが、還元条件下では 400K 成分が消失し、分子量約 200K の新たな成分が出現した。これは FN 様タンパク質の分子内にジスルフィド結合が存在し還元剤によってこれらが開裂した結果、二量体であったものが単量体に変化したためであると考えられる。さらに 400K および 200K 成分はいずれも PAS 反応 (糖成分を検出する反応) で陽性となったため、糖タンパク質であることが確認された。アミノ酸組成において、部分精製タンパク質はアスパラギン酸、グルタミン酸、およびトレオニン (それぞれ 124、112、78 残基/1000 残基) に富むほか、システイン (6 残基/1000 残基) も含有することが分かった。電気泳動、PAS 反応ならびにアミノ酸組成分析における上記の結果は、いずれも脊椎動物 FN の有する性質によく一致している。

3) 機能の検討 マナマコ体壁 FN 様タンパク質の機能性評価の一環として、得られた部分精製標品について抗ヒト FN 抗体に対する交差性を調べるとともに、哺乳類 FN が有するとされている赤血球凝集活性の有無について検討した。しかし、これらの反応性または活性は極めて低いか、または検出できるレベルではなかった。これらの結果から、マナマコの FN 様タンパク質は構造的には FN に類似した特徴を有するものの、機能的には FN とは異なる新規のタンパク質である可能性が示された。

4) 今後の展望 ナマコ類体壁 FN 様タンパク質は体壁総タンパク質の少なくとも 20~30% を占める重要な構成成分であるが、その生理機能のみならず食品機能についても今なお不明な点が多く残されている。23 年度の成果も含め、アカナマコ、マナマコおよびキンコのいずれにおいても互いに性質の類似した FN 様タンパク質の存在が確認された。これは本タンパク質がナマコ類体壁に種を超えて広く分布することを示唆するものである。今後、コラーゲン結合能など FN との機能的な類似点を追跡しつつも、FN が持たない新規な機能の探索にも焦点を当てながら検討を進める。