

魚類筋形質タンパク質の熱凝固特性*¹

森岡克司, 志水 寛

(1992年3月5日受付)

Heat-Coagulation Property of Fish Sarcoplasmic Proteins

Katsuji Morioka*² and Yutaka Shimizu*³

To study the mechanism of the gel-strength increasing effect of sarcoplasmic proteins (Sp-P) on fish meat gel, the interaction between each component of Sp-P and actomyosin (AM) occurring during heating was examined. Heat coagulation temperature range was measured for each component by gradually heating the Sp-P extracts ($I=0.05$) from 9 fish species: 40-50°C for 50 K, 43 K, and 23 K; 50-60°C for 94 K, 60 K, 40 K, 30 K, and 25 K; 60-70°C for 65 K, 63 K, 55 K, and 35 K; >70°C for 20 K components. These components, however, remained in the mixed solution ($I=0.7$) of Sp-P and AM at a ratio of 1 to 2 even after heating at 80°C. This was attributable to the fact that the coagulable Sp-P components bound to AM molecules one after another at their coagulation temperatures were suspended in the solution.

魚肉のゲル形成時に筋形質タンパク質 (以下 Sp-P と略す) は、これまで筋原線維タンパク質 (以下 Mf-P と略す) の網状構造形成を阻害すると考えられてきた。¹⁻³⁾しかし、最近著者ら⁴⁾は Sp-P が必ずしも魚肉のゲル形成を阻害せず、むしろ補強すること、その効果は Sp-P を 90°C で予備加熱すると失われることを報告した。しかし、その作用機構については依然として不明である。

志水ら⁵⁾はゲル構造の主構成成分であるアクトミオン (以下 AM と略す) と Sp-P が熱変性の際相互に干渉し合い、中性域ではそれ自身非熱凝固性の AM が 50 から 90°C の温度域で Sp-P と凝集して沈殿することを報告した。この凝集が Sp-P のどの成分に由来するかを調べることは、Sp-P の Mf-P ゲル補強機構を明らかにする上で重要であると考えられる。

そこで本研究ではマサバを含む 9 魚種の Sp-P 溶液の熱凝固特性を調べた後、AM 存在下 ($I=0.7$) での加熱に伴う上清中のマサバ Sp-P の変化を SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (以下 SDS-PAGE と略す) 像を用いて検討し、SDS-PAGE 像上に認められる Sp-P のどの成分が AM と凝集するかを明らかにしようとした。

実験方法

試料魚 前報¹⁾と同様に Sp-P の調製にはマサバ *Sco-*

mber japonicus を、Mf-P の調製にはイトヨリダイ *Nemipterus virgatus* を用いた。また、Sp-P の熱凝固特性についてはマサバ以外にさらに以下の 8 魚種を用いた。マイワシ *Sardinops melanostictus*、キハダ *Thunnus albacares*、マダイ *Pagrus major*、スケトウダラ *Theragra chalcogramma*、ゲンゴロウブナ *Carassius auratus*、コイ *Cyprinus carpio*、ニジマス *Oncorhynchus mykiss*、テラピア *Oreochromis niloticus*。

筋形質タンパク質の調製 試料魚から背部普通筋を採取し、4 mm 目の肉挽き機にかけた後、その挽肉に 5 倍量のリン酸緩衝液 ($I=0.05$, pH 7.0) を加え、泡止めホモジナイザーで 3 分間磨砕し、その懸濁液を 12,000×g で 15 分間遠心分離して得られる上清を綿ろ過して集め Sp-P 溶液とした。

筋原線維の調製 イトヨリダイ背部普通肉に 5 倍量のホウ酸緩衝液 (0.09 M KCl, 5 mm EDTA, 0.039 M Borate buffer, pH 7.0) を加え、泡止めホモジナイザーで 5 分間磨砕して、5 mm 目のステンレスネットに通した後、遠心分離と洗浄を 4 回繰り返して得られる残渣を Mf-P とした。この Mf-P に 8% ショ糖を加えて -20°C で凍結保存しておき、随時解凍して実験に供した。

筋形質タンパク質の熱凝固率の測定 Sp-P 溶液 10 ml を共栓付き試験管に取り、30 から 90°C に設定した恒温

*¹ 魚類筋形質タンパク質の原料学的研究—III.

*² 高知大学農学部水産利用学講座 (Laboratory of Aquatic Product Utilization, Faculty of Agriculture, Kochi University, Monobe-Otsu, Nankoku, Kochi 783, Japan).

*³ 神戸学院女子短期大学 (Kobe-gakuin Women's Junior College, Hayashiyama, Nagata, Kobe 653, Japan).

略語: EDTA, ethylenediamine tetraacetate; SDS, sodium dodecyl sulfate.

Table 1. Heat-coagulability of sarcoplasmic proteins (Sp-P) extracted from white muscle of 9 fish species at temperatures ranging from 30 to 90°C (%)

Heating temp. (°C)	30	40	45	50	55	60	65	70	80	90
Yellowfin tuna	0.4	3.8	5.5	20.8	72.3	87.2	94.8	96.0	96.5	96.7
Pacific mackerel	2.5	3.8	10.1	31.7	52.0	70.4	82.4	95.7	95.7	95.7
Sardine	10.5	19.8	31.1	41.7	82.6	91.1	91.1	92.5	93.6	94.0
Red sea bream	3.2	7.2	13.9	31.4	72.2	85.2	93.2	94.1	95.6	96.2
Walleye pollack	2.7	32.7	39.8	54.1	63.7	71.4	75.3	76.9	80.2	81.3
Carp	0	0	5.3	16.8	38.6	50.3	55.2	66.7	76.4	76.4
Crurian carp	4.0	4.0	9.5	24.5	45.3	55.0	57.6	62.9	66.2	66.6
Rainbow trout	3.7	21.4	37.3	57.4	74.7	89.8	90.8	91.8	93.4	93.4
Tilapia	0	0	2.2	5.9	22.2	28.9	66.4	75.6	78.4	78.4

Extraction was done at $I=0.05$, pH 7.0. Coagulation test of sarcoplasmic extracts was performed by heating the test tubes containing 10 ml of each extract in water baths at fixed temperatures for 15 min. Immediately after heating, the test tubes were cooled in ice water and then centrifuged at $12,000 \times g$ for 15 min. The supernatants thus obtained were used for determination of protein concentration. Protein concentration was determined by the method of Lowry *et al.*⁶⁾ Heat-coagulability was obtained from following formula: $(A-B)/A \times 100$, where A and B are values of the protein concentration before and after heating at each temperature, respectively.

槽中で 15 分間加熱後、氷水中で急冷して反応を停止させた。反応停止後、 $12,000 \times g$ で 15 分間遠心分離して得られる上清中のタンパク質を定量し、加熱前のタンパク質量に対する沈殿に移行したタンパク質量の比を熱凝固率 (%) とした。筋原線維タンパク質共存下での Sp-P の熱凝固特性を調べる場合は以下のように行った。調製したイトヨリダイ Mf-P をリン酸緩衝液 ($I=0.05$, pH 7.0) で 2 回洗浄と遠心分離して得られた残さを 5 倍量の 0.6 M NaCl を含む 10 mM NaH_2PO_4 , 25 mM Na_2HPO_4 (pH 6.8) を用いて 5°C で一晚抽出後、遠心分離して得られた上清を AM 溶液として実験に供した。この AM および Sp-P をタンパク質濃度がそれぞれ 4, 2 mg/ml に、またイオン強度が 0.7, pH が 6.8 になるように希釈、混合したものを 30 から 80°C に設定した恒温槽中で 15 分間加熱後、氷水中で急冷して反応を停止させた。反応停止後、 $12,000 \times g$ で 15 分間遠心分離して得られる上清中のタンパク質を定量し、加熱前の溶液中の全タンパク質量に対する上清中に残存するタンパク質量の比を残存率 (%) とした。

分析方法 タンパク質の定量は、牛血清アルブミンを標準タンパク質として Lowry *et al.* の方法⁶⁾ に従って行った。また、上清の一部は電気泳動分析に供した。電気泳動は、Laemmli⁷⁾ の方法に従い 0.1% SDS を含む 10% ポリアクリルアミドゲルで行った。泳動後のゲルは、Coomassie Brilliant Blue R-250 でタンパク質バンドを染色し、10% 酢酸で脱色した。脱色後、各バンドの染色強度を高津 CS-9000 デンシトメーターを用い、波長 555 nm で測定し、相対含量を求めた。

実験結果および考察

筋原タンパク質の熱凝固特性 Sp-P 溶液 ($I=0.05$, pH 7.0) を各温度で加熱したとき、上清中に残存するタ

ンパク質を定量し、加熱前のタンパク質量に対する沈殿に移行したタンパク質量の比を求め、Table 1 に示した。30°C で加熱したときの Sp-P の凝固率は、マイワシを除いて 5% 以下であった。40°C 加熱においては、マイワシ、ニジマス、スケトウダラの凝固率はそれぞれ約 20, 21, 33% で 10% を越えたが、他の 6 魚種は依然 10% 以下であった。45°C を越えるとすべての魚種で顕著な凝固率の上昇がみられた。65°C でマダイ、マイワシ、ニジマス、キハダでは凝固はほぼ終了しており、また残りの 5 魚種も 80°C で終了した。90°C における Sp-P の凝固率は、キハダ 96.7%、マサバ 95.7%、マイワシ 94.0%、マダイ 96.2%、スケトウダラ 81.3%、テラピア 78.4%、ニジマス 93.4%、コイ 76.4%、ゲンゴロウブナ 66.6% であった。

以上の結果より、Sp-P の熱凝固パターンおよび熱凝固率は魚種によって異なっていた。志水、西岡⁸⁾ は 8 魚種の Sp-P の熱凝固率を調べており、赤身の魚 > 中間魚種 > 白身の魚、淡水魚の順、すなわち生態的に運動量の多い魚種ほど熱凝固率が高くなる傾向を認めている。今回の我々の結果も同様の傾向を示した。しかし、白身の魚であるマダイと淡水魚であるニジマスの熱凝固率がそれぞれ 96.2, 93.4% と高くなっており、上記以外に熱凝固率を支配する要因が存在すると考えられる。

次に各温度で加熱したときの上清中に残存するタンパク質を SDS-PAGE によって調べ、マサバ Sp-P 構成各成分の熱凝固温度帯を求めた (Fig. 1)。なお、SDS-PAGE 図上の各タンパク質バンドは便宜上、見掛けの分子量 (Da) をもって呼ぶことにした。

50 K, 43 K および 23 K 成分は 45°C から凝固しはじめ、50°C で上清中から消失していた。一方、55 K および 35 K 成分は比較的熱に安定で、60°C から凝固しはじめ 70°C で終了している。また、主成分の一つである

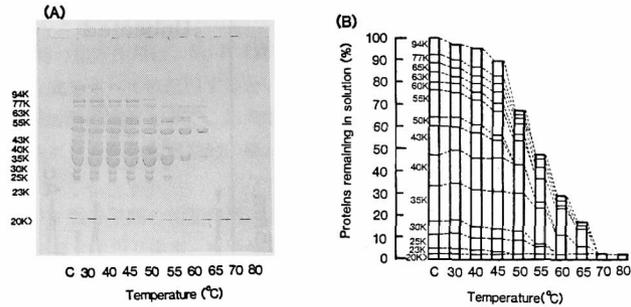


Fig. 1. SDS-polyacrylamide gel electrophoretic patterns (A) and band composition (B) of Pacific mackerel Sp-P remaining in the supernatant after heating at temperatures ranging from 30 to 80°C.

The procedure of the coagulation test was the same as described in Table 1.

40 K 成分は 60°C で凝固が終了している。20 K 以下の低分子タンパク質は 90°C 加熱後なお上清中に残存しており、熱非凝固性タンパク質であると考えられる。

以上の結果より Sp-P の各成分の熱凝固温度の違いが明らかになった。また Sp-P の各成分の熱凝固温度は、すべての魚種に共通の傾向がみられた。つまり 50 K, 43 K および 23 K 成分は、すべての魚種で最も早く凝固が終了する。また 35 K 成分はかなり熱に安定であり、低分子タンパク質はすべての魚種で非凝固性であった。Sp-P 各成分の凝固温度帯は以下のようであった。(1) 40~50°C: 50 K, 43 K および 23 K 成分, (2) 50~60°C: 94 K, 60 K, 40 K, 30 K および 25 K 成分, (3) 60~70°C: 65 K, 63 K, 55 K および 35 K 成分, (4) 70°C<: 低分子タンパク質 (20 K_≧)。

アクトミオシン共存下での筋形質タンパク質の熱凝固特性 志水ら⁵⁾はマアジの AM と Sp-P が熱変性の際に干渉し合うことを報告した。この点について Sp-P のどの成分が AM と相互作用するかを詳しく検討するために AM 共存下での Sp-P の熱凝固特性を SDS-PAGE 像により検討した。AM 溶液 (4 mg/ml), Sp-P 溶液 (2 mg/ml) および AM とあらかじめ 80°C で加熱変性させた Sp-P の混合溶液 (AM 濃度 4 mg/ml, Sp-P 濃度 2 mg/ml) の各加熱温度での上清中のタンパク質の残存率を Fig. 2 に示した。なおこの場合、全ての溶液のイオン強度を 0.7, pH を 6.8 に調節した。

AM 溶液 (a) は 40°C 付近から一部に凝集沈殿が認められた。しかし、50°C 以上の温度域ではそれ以上の凝集は認められず、50 から 80°C での上清中のタンパク質の残存率は約 80% であった。Sp-P 溶液 (b) の場合、40°C から凝固が始まり、50°C で約半分の Sp-P が凝固沈殿し、70°C ではほぼ凝固が完了した。80°C での Sp-P の残存率は約 5% であった。このように AM は大部分

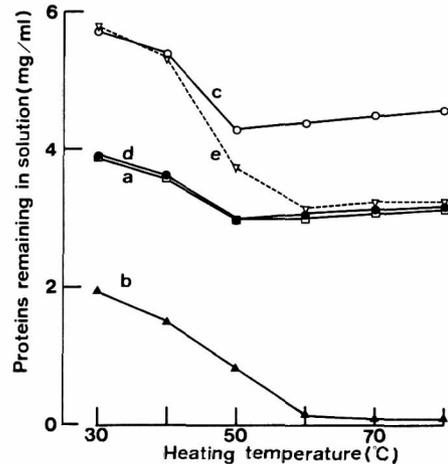


Fig. 2. Solubility curves of actomyosin (AM) solution from threadfin bream muscle, Sp-P solution from Pacific mackerel muscle, and their mixture after heating at temperatures ranging from 30 to 80°C. Ionic strength and pH of the solution were adjusted to 0.7 and 6.8, respectively.

a (□), AM solution (4 mg/ml); (b) (▲), Sp-P solution (2 mg/ml); c (○), mixed solution of AM and Sp-P (4 and 2 mg/ml of each protein); d (●), mixed solution of AM and pre-heated (80°C, 15 min) Sp-P; and e (△), solubility curve estimated from (a) and (b).

が上清に残り、一方 Sp-P は大部分が凝固沈殿した。

AM-Sp-P 混合溶液 (c) の場合、AM 単独溶液と非常に良く似た凝固パターンを示した。すなわち、40°C 付近から一部に凝集沈殿が認められたが、50°C 以上の温度域ではそれ以上の凝集はほとんど認められず、80°C での残存率は約 77% であった。この場合、AM と Sp-P

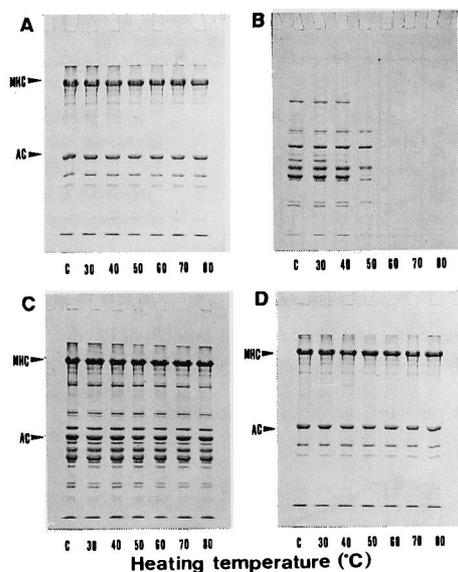


Fig. 3. SDS-polyacrylamide gel electrophoretic patterns of AM solution from threadfin breem muscle, Sp-P solution from Pacific mackerel muscle, and their mixture remaining in the supernatant after heating at temperatures ranging from 30 to 80°C.

(A), AM solution; (B), Sp-P solution; (C), mixed solution of AM and Sp-P; and (D), mixed solution of AM and pre-heated (80°C, 15 min) Sp-P.

Abbreviations are as follows: MHC, myosin heavy chain; AC, actin.

の間に全く相互作用が存在しないと仮定すると AM 溶液と Sp-P 溶液の凝固曲線から、その混合溶液の凝固曲線は (e) のようになると考えられる。しかし、Fig. 2 に示したように実際の混合溶液の残存率は、(e) よりもかなり高くなった。このことから AM と Sp-P の間に加熱により何らかの相互作用が生じて、予想より多量のタンパク質が上清中に残存したと考えられる。一方 80°C であらかじめ加熱変性させた Sp-P と AM の混合溶液 (d) の場合、30°C での残存率がすでに約 60% と低く、40 から 50°C にかけて残存率は若干減少するが、その後はほぼ一定となり、80°C での残存率は約 50% であった。この値は (e) の値とほぼ一致することから、加熱変性させた Sp-P と AM の間には相互作用がないと推察された。

志水ら⁹⁾は AM と Sp-P が熱変性の際相互に干渉し合い、中性域ではそれ自身非熱凝固性の AM が 50 から 90°C の温度域で Sp-P と凝集して沈殿すると報告した。この加熱に伴う混合溶液中の AM の挙動の相違は、

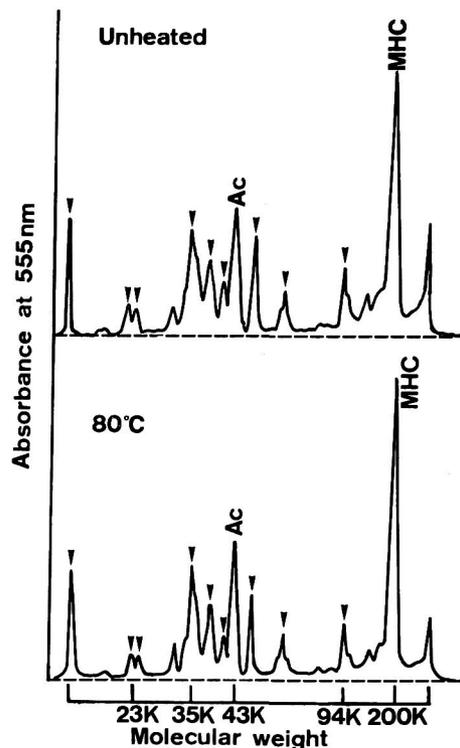


Fig. 4. Densitograms of SDS-polyacrylamide gel electrophoretic pattern of the mixed solution of threadfin breem AM and Pacific mackerel Sp-P remaining in the supernatant before and after heating at 80°C.

Arrows indicate components of Sp-P. Abbreviations are as follows: MHC, myosin heavy chain; AC, actin.

AM-Sp-P 混合溶液の組成の差に起因すると推察される。すなわち志水らの場合、両者の比が AM/Sp-P=1/2.5 と Sp-P の相対比が高いため、AM が熱凝固性の Sp-P の影響を強く受けて凝集沈殿したのに対して、著者らの場合は AM/Sp-P=2/1 と Sp-P の相対比が低いため、Sp-P が AM に凝集したが、沈殿するには到らなかったと考えられる。

さらに詳しく検討するためこの場合の各上清中のタンパク質組成を SDS-PAGE を用いて検討した。結果を Fig. 3 に示した。AM 溶液は加熱温度が上昇してもその組成には、未加熱とほとんど差が認められなかった。一方、Sp-P 溶液は加熱に伴って各成分が凝固沈殿し、70°C 加熱上清においては SDS-PAGE 像上に低分子成分以外認められなかった。これは残存率の結果と一致していた。

AM-Sp-P 混合溶液の場合、AM 溶液の場合と同様に

加熱温度が上昇しても未加熱のものと比較して SDS-PAGE 像上の組成にほとんど変化は認められなかった。つまり、AM と Sp-P の間の相互作用は、Sp-P の特定の成分ではなく、熱凝固性成分すべてに起因するということである。このことは未加熱の溶液と 80°C 加熱溶液の SDS-PAGE のデントグラムからも定量的に確かめられた (Fig. 4)。

一般に加熱に伴うタンパク質分子間の相互作用には、S-S 結合などの共有結合や疎水性相互作用、水素結合、塩結合などの非共有結合が関与すると考えられている。このうち、S-S 結合については今回 SH 基保護剤である *N*-エチルマレイミドやジチオスレイトールの添加によっても Sp-P の AM への凝集は影響されなかったこと (結果は示さず) から S-S 結合の形成はこの凝集反応に必須ではないものと推察した。

一方、卵白、大豆タンパク質のような熱不可逆性のゲルの場合、そのゲル化には疎水性相互作用が密接に関与していると考えられている。⁸⁾ Sp-P も熱不可逆性のゲルを形成すること、⁹⁾ また、あらかじめ加熱すると AM に対する凝集能を失うことから考えて、加熱に伴う Sp-P の AM への凝集には疎水性相互作用が大きく関与することが示唆されるが、詳細については不明であり、今後の課題である。

今回 Sp-P の AM への凝集には、Sp-P の熱凝固性全成分が係わっていることが明らかとなった。現在、Sp-P

の筋原線維タンパク質ゲル補強効果に SDS-PAGE 像上に認められるどの成分が最も寄与しているかを検討中である。

本研究の一部は文部省科学研究費補助金 (課題番号 62304023) の援助によって行われた。付記して感謝の意を表する。

文 献

- 岡田 稔: かまぼこの足に対する水晒しの影響。日本誌, 30, 255-261 (1964).
- 西岡不二男, 志水 寛: pH 移動法による魚肉廃液からのタンパク回収。日本誌, 49, 795-800 (1983).
- 橋本昭彦, 加藤 登, 野崎 恒, 新井健一: サバ筋肉のゲル形成能低下要因。日本誌, 51, 425-432 (1985).
- 森岡克司, 志水 寛: 魚肉のゲル形成に対する筋形質タンパク質の寄与。日本誌, 56, 929-933 (1990).
- 志水 寛, 西岡不二男: マアジ・アクトミオシンと筋形質たん白の熱凝固の際の相互作用。日本誌, 48, 231-234 (1974).
- O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 191, 265-275 (1951).
- U. K. Laemmli: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature*, 227, 680-685 (1970).
- E. Niwa, T. T. Wang, S. Kanoh, and T. Nakayama: Strengthening effect of the various natural high polymers on the elasticity of the kamaboko. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 54, 841-844 (1988).
- 森岡克司, 志水 寛: 魚類筋形質タンパク質のゲル形成特性。日本誌, 58, 767-772 (1992).