

魚類ミオグロビンの分子状態とメト化抑制に関する研究

井ノ原 康太
2016

目次

英文要旨	I
和文要旨	III
緒言	1
第1章 ミオグロビンのメト化に及ぼす ATP の影響	
緒言	5
材料と方法	
材料	5
ミオグロビン (Mb) の調製	5
ATP 存在下における Mb メト化進行の測定	6
ATP で惹起される Mb 分子の状態変化の測定	7
可視部吸収スペクトル測定	7
Mb 分子の自家蛍光測定	7
Mb と ATP の化学量論的關係の検討	7
circular dichroism(CD)スペクトルによる Mb 分子状態の測定	8
溶液中の Mb 分子サイズ	8
Mb 分子表面電荷の測定	8
結果	
ミナミマグロ Mb の調製	9
Mb のメト化に及ぼす ATP の影響	10
ATP で惹起される Mb 分子の状態変化	15
1) Mb の可視部吸収スペクトルに及ぼす ATP の作用	15
2) Mb の自家蛍光に及ぼす ATP の影響	19
3) Mb と ATP の化学量論的關係	20

4) Mb 分子の circular dichrorism(CD)スペクトルの ATP による変化	24
5) 溶液中の Mb 分子サイズと表面電荷に及ぼす ATP の作用	25
考察	27

第 2 章 魚類筋肉ミオグロビンのメト化率測定方法の検討

緒言	27
材料と方法	
材料	30
精製 Mb の調製	30
deoxyMb, oxyMb, metMb の調製	30
Mb の加熱処理	31
統計処理	31
結果	
各魚種 Mb の性状	31
Mb メト化率測定法	35
本研究で確立した Mb メト化率測定法と尾藤法との関係	40
ゴマサバとマサバのメト化率算出式の関係	47
考察	49

第 3 章 各魚類ミオグロビンの自動酸化速度の比較検討

緒言	50
材料と方法	
材料	51
精製 Mb の調製	51
pH 条件下での Mb 加熱処理	51

結果

各 pH における Mb のメト化速度の比較 51
treated oxyMb と native oxyMb のメト化速度の比較 57
考察 59

第 4 章 筋肉内 ATP による冷凍カンパチ血合肉の褐変抑制

緒言 60

材料と方法

材料 61
カンパチ精製 Mb の調製 61
Mb メト化率測定法 61
魚肉 pH の測定 62
ATP 濃度の測定 62
統計処理 62

結果

筋肉粗抽出液での Mb メト化率測定方法 62
カンパチ血合肉の -20°C 貯蔵における Mb のメト化と ATP 濃度との関係 . . 67
考察 70

第 5 章 総括

総括 71

参考文献 80

謝辞 85

略語リスト

Mb ; myoglobin, ミオグロビン

cMb ; 粗ミオグロビン (crude Mb)

精製 Mb ; cMb をゲルろ過処理して得られた純度の高い Mb

deoxyMb ; デオキシミオグロビン (還元型ミオグロビン)

oxyMb ; オキシミオグロビン (酸素化型ミオグロビン)

metMb ; メトミオグロビン

ATP ; アデノシン三リン酸

メト化率 ; Mb 中の metMb の存在量を百分率で表した値

K_{met} ; メト化速度恒数, 処理時間 1 分間あたりに増加する metMb 変化率メト化速度

IS 点 ; 等吸収点 (isosbestic point) の略。deoxyMb, oxyMb, metMb の各可視部吸収スペクトルの交点

native Mb ; 還元剤や酸化剤での未処理のミオグロビン

treated Mb ; 還元剤や酸化剤で処理をした Mb

h ; hour, 時間の略

min ; minute ; 分の略

LIST OF FIGURES

- Fig. 1** Purification of southern bluefin tuna Mb. p 9
- Fig. 2** Time course of changes in the ratio of metMb formed in cMb with or without ATP. p 10
- Fig. 3** Effect of ATP and pH on the autoxidation rate (K_{met}) of tuna crude Mb at 25°C. p 12
- Fig. 4** Time course of changes in the ratio of metMb formed in purified native Mb with or without ATP. p 14
- Fig. 5** Effect of ATP on the Soret region (380-440 nm) and the visible spectra of Mbs. p 16
- Fig. 6** Effect of ATP concentration on the Soret region spectra of native Mb. p 17
- Fig. 7** Effect of ATP concentration on the absorption at 409 nm in Soret region of native Mb. p 18
- Fig. 8** The changes in fluorescence emission of native Mb as a function of ATP concentration. p 19
- Fig. 9** ATP-induced changes in intensity of maximum fluorescence emission at 330 nm of native Mb. p 20

Fig. 10 The changes in fluorescence emission of native Mb at various concentration as a function of ATP concentration. p 21

Fig. 11 ATP-induced changes in intensity of maximum fluorescence emission at 330 nm of native Mb at various concentration. p 22

Fig. 12 The effect of protein concentration on the affinity between Mb and ATP. . . p 22

Fig. 13 ATP-induced changes in CD spectra of native Mb. p 24

Fig. 14 Size distribution for native Mb with ATP. p 25

Fig. 15 SDS-PAGE pattern of various Mbs. p 32

Fig. 16-A Visible absorbance spectra of deoxyMb, oxyMb and metMb from ordinary muscle of southern bluefin tuna and from dark muscle of other fish specis. p 33

Fig. 16-B Visible absorbance spectra of deoxyMb, oxyMb and metMb from dark muscle. p 34

Fig. 17 Visible absorbance spectra of deoxyMb, oxyMb and metMb from yellowtail dark muscle. p 35

Fig. 18-A Changes in visible absorbance spectra of purified treated oxyMb during heat treatment at 25°C. p 41

Fig. 18-B Changes in visible absorbance spectra of purified treated oxyMb during heat treatment at 25°C. p 42

Fig. 19-A The relationship between data on ratio of metMb calculated by the Bitou method and each scheme of (1) – (6) from the spectra shown in Fig. 18-A. p 44

Fig. 19-B The relationship between data on ratio of metMb calculated by the Bitou method and each scheme of (7) – (12) from the spectra shown in Fig.18-B. p 45

Fig. 20 The relationship between scheme 2 and 3 for spotted mackerel and chub mackerel by using the data of changes in spectra of chub mackerel Mb shown in Fig. 18-A (c). p 48

Fig. 21 The relationship between scheme 5 and 6 for southern bluefin tuna and bluefin tuna by using the data of changes in spectra of southern bluefin tuna Mb shown in Fig. 18-A (e). p 48

Fig. 22 Changes in visible absorbance spectra at various pH conditions of purified bluefin tuna nativeMb (a, b, c, d) and purified red seabream nativeMb (e, f, g, h) during heat treatment at 30°C. p 53

Fig. 23 Changes in the ratio of metMb formed in purified bluefin tuna native Mb and red seabream native Mb at various pH conditionsat 30°C. p 54

Fig. 24 Effect of pH on the autoxidation rate constant value (*K_{met}*) of purified bluefin tuna native Mb and purified red seabream native Mb 30°C. p 55

Fig. 25 Visible absorbance spectra of filtered crude extract, supernatant by ammonium sulfate fractionation with 55% saturation and purified Mb. p 63

Fig. 26 Effect of ammonium sulfate on the visible absorption spectra of oxyMb and metMb. p 65

Fig. 27 Changes in ATP concentration and pH in amberjack muscle during storage in iced water. p 67

Fig. 28 Effect of postmortem time in iced water until freezing on metMb formation during frozen storage at -20°C for four months. p 69

Fig. 29 Visible absorbance spectra of deoxyMb, oxyMb and metMb from dark muscle of amberjack and ordinary muscle of southern bluefin tuna. p 72

LIST OF TABLES

Table 1 The molecular size and zeta potential of tuna Mb with or without ATP . . . p 25

Table 2 Wavelength of A_0 and isosbestic point measured in spectra of deoxyMb, oxyMb and metMb prepared from yellowtail, spotted mackerel, chub mackerel, red seabream, southern bluefin tuna, bluefin tuna, skipjack, amberjack, Japanese jack mackerel, pacific saury, sardine, scalloper hammerhead shark p 37

Table 3 The ratio of absorbance at A_0 and B (100% oxyMb) or C and B (100% metMb) of fish Mbs p 38

Table 4 Autoxidation rate constant (K_{met}) of various fish Mbs at each pH p 56

Table 5 The autoxidation rate (K_{met}) of native oxyMb and treated oxyMb of spotted mackerel, chub mackerel, southern bluefin tuna, red seabream , yellowtail, amberjack, at pH7.5 at 30°C p 58

Table 6 Effect of turbidity of Mb solution and ammonium sulfate (A.S.) fractionation on the measurement of ratio of metMb p 64

Table 7 Effect of ammonium sulfate (A.S.) fractionation on absorbance of supernatants fractionated by A.S. precipitation and centrifugal separation from cMb solution . . . p 64

Table 8 Effect of protein concentration of Mb on the measurement of ratio of metMb

..... p 66

Table 9 The ratio of the absorbance of oxymyoglobin and metmyoglobin at 503 nm

..... p 74

ABSTRACT

Frozen fish products are generally transported and stored at -20°C . This storage conditions, however, causes rapid progression of autoxidation of myoglobin and browning of dark muscle, reducing the commercial value of fish for sashimi. Because the discoloration of tuna meat also proceeds during frozen storage at around -20°C , tuna meat is stored at the ultra-low temperature (-60°C). On the other hand, the discoloration of highly fresh tuna meat could effectively be suppressed even if stored at -20°C . However, the suppressive mechanism of the discoloration is not well understood. In this study, I focused on a function of ATP contained with high concentration in highly fresh meat. The effects of ATP on the autoxidation rate and molecular state of southern bluefin tuna myoglobin were investigated. The autoxidation rate of tuna myoglobin at 25°C was suppressed in the presence of ATP especially in acidic pH range. Mixing ATP with myoglobin induced a spectral perturbation in the Soret region of myoglobin. Quenching of myoglobin fluorescence was also caused by ATP. According to dynamic light-scattering measurements the apparent molecular weights of tuna myoglobin changed from 15.5 kDa to 11.3 kDa with ATP and zeta-potential measurements gave also a negative surface charge without ATP and a positive one with ATP, respectively. The above results indicate that ATP induces changes in the conformational structure of myoglobin. The effects of ATP on myoglobin could thus provide a possible mechanism to regulate the autoxidation of myoglobin.

Then, I had investigated the effect of ATP in muscle on the progression of autoxidation of myoglobin in dark muscle of amberjack during frozen storage at -20°C . In the early stage of this study, I found that the method of Bito for measuring the ratio of generated metmyoglobin in tuna myoglobin was not applicable for amberjack

myoglobin. This suggested that for measuring the ratio of generated metMb, an individual method for each fish myoglobin should be developed. Therefore I tried to develop a method for measuring the ratio of generated metmyoglobin in a myoglobin for each fish. I prepared purified myoglobin from 12 kinds of fish and then prepared deoxymyoglobin, oxymyoglobin and metmyoglobin. The wavelength of isosbestic point among those visible spectra of deoxymyoglobin, oxymyoglobin and metmyoglobin was measured. From these data, I developed a method for measuring of the ratio of generated metmyoglobin in myoglobin for each fish and then measured the discoloration rate constant of each myoglobin.

Then I investigated the effect of ATP in muscle on the progression of myoglobin in dark muscle of cultured amberjack during frozen storage at -20°C . Amberjack fillets quick-frozen at -50°C containing various concentrations of ATP were prepared and then stored at -20°C for four months. The progress of autoxidation of myoglobin was suppressed in the fillets containing high concentrations of ATP.

The above results indicate that fish meat contained ATP of high concentration could be possible to store at -20°C with good quality for sashimi. It is expected that frozen fish products for sashimi with the good quality are produced and distributed globally by using this technical idea.

和文要旨

冷凍水産物の一般的な流通温度は -20°C であるが、凍結保蔵中にミオグロビン (Mb) のメト化が進行し刺身としての商品価値を失うことが課題となっている。マグロでも -20°C で保存すると変色が進むため、 -60°C のような超低温流通がなされている。一方、鮮度が非常に良い場合、 -20°C 保存での変色の進行は遅いことが経験されているが、その科学的機序は明らかにされていない。本研究では高鮮度魚肉中に高濃度で存在する ATP に着目し、Mb の自動酸化速度や Mb の分子状態に及ぼす ATP の影響についてミナミマグロ Mb を試料として検討を行った。その結果、ATP は 25°C における Mb の自動酸化を抑制し、さらに ATP の存在で Mb 分子の状態を表す Soret 帯の吸光スペクトルや自家蛍光、CD スペクトル、動的光散乱法で測定される見かけの分子サイズおよび表面電荷が変化することが明らかとなった。ATP は Mb 分子の形状に影響を及ぼし、それにより Mb の自動酸化が抑制されることを示唆する結果が得られた。

つぎに、各濃度の ATP を含む冷凍魚肉について、凍結保存中の Mb のメト化速度を検討したが、その研究中に魚類 Mb メト化率測定法として一般的に使われてきたマグロ Mb メト化率測定法は本研究で使用したカンパチの Mb メト化率測定に応用できないことが明らかとなったため、改めて、12 種の魚類筋肉 Mb のメト化率測定法を確立した。方法は各魚種の血合肉から Mb を精製し、還元、酸素化、酸化処理により deoxyMb, oxyMb, metMb を調製し、それぞれの可視部吸収スペクトルを測定した。得られたスペクトル特性を利用し Mb メト化率を測定するための測定波長とメト化率算出式を魚種ごとに導出した。本研究では各 pH における各魚種 Mb の自動酸化速度についても比較した。

各種魚類 Mb のメト化率測定法を確立したので、ATP 濃度が異なる冷凍魚肉について、 -20°C 保存中のメト化率経時変化を測定した。養殖カンパチを用い、

活けしめ後の海水氷溶液中での保持時間を調整することで筋肉中の ATP 濃度が異なる魚肉を調製した。この魚肉を -50°C で急速凍結後、 -20°C で4ヶ月間保存しメト化の進行を測定した結果、高濃度 ATP を含有する魚肉でメト化抑制を示した。

本研究で明らかとなった魚肉中の ATP 濃度を管理することで、 -20°C のような一般的な冷凍保存条件下で高品質を維持した流通が可能となることが明らかとなった。今後、本研究で明らかとなった研究成果を高品質冷凍刺身水産物の生産やグローバル流通などで技術応用することにより、水産業が発展することが期待される。

緒言

平成 25 年に和食はユネスコ無形文化遺産に登録された。和食の中心的な食材の刺身や寿司は、日本だけでなく世界の各地で日本食の代表料理として楽しめるようになった。刺身や寿司は魚の生食料理であり、刺身商材としてマグロ類に代表される赤身魚の普通肉やタイ等の白身魚の血合肉の赤い色調は重要な品質要因である。これらの赤身魚の普通肉や白身魚の血合肉には、色素タンパク質のミオグロビン(Mb)が多量に含まれている。Mb は魚類や多くの動物の筋肉中に存在している組織内の酸素貯蔵機能タンパク質であり、さらに、Mb の分子状態が食肉としての色調に強く影響をすることから、Mb タンパク質の構造と機能に関する生化学的な研究や食品としての色調変化に関する研究が行われてきている^{1, 2)}。Mb は生体内組織中で deoxymyoglobin (deoxyMb), oxymyoglobin (oxyMb), metmyoglobin (metMb) の 3 状態で存在している。Mb 分子中のヘムはポリフィリンと鉄原子で構成されていて deoxyMb と oxyMb は Fe^{2+} の状態だが、metMb では Fe^{3+} の 3 価鉄である。これらは生体内において可逆的に変化しており、還元型 Mb である deoxyMb は酸素と結合すると酸素型 Mb の oxyMb となり酸素の貯蔵と組織への供給の作用を担っている。組織内の酸素分圧が低下すると oxyMb は酸素を遊離し、同時にヘム鉄は酸化され metMb となる。metMb は酸素との親和性を持たないため遊離した酸素が再び Mb と結合することはない^{1, 2)}。生体内では metMb は deoxyMb に還元され、Mb は酸素に対する親和性を回復する。各 Mb の色調は deoxyMb が暗赤（紫）色、oxyMb で鮮赤色、metMb では褐色となる。死後の筋肉中では metMb の還元反応が停止するため、死後経過とともに metMb が蓄積し肉色が褐変化する。

水産物の魚では、マグロなどを刺身の柵にした時に Mb が酸素と結合し鮮やかな赤色を呈した後、時間経過とともに metMb が蓄積して褐色化する。このよ

うな色調の変化は鮮度指標として利用されるので、魚類 Mb の生化学的性状とメト化に関する研究は活発に行われてきている³⁻⁶⁾。また、水産物では輸送と貯蔵で冷凍を利用するものが多いが、冷凍保存中に魚肉 Mb のメト化が進行し褐変化することが問題となる。特に、マグロ類では褐変化すると商品価値を失うため、メト化の進行を抑制するために漁獲後の冷凍処理と貯蔵および流通において超低温（ $-50\sim-60^{\circ}\text{C}$ ）が利用されている。そのため冷凍や解凍条件と Mb のメト化に関する研究はマグロ類を中心に行われてきている⁷⁻⁹⁾。ブリ類などの血合肉の凍結保存中のメト化を防止するためには、 -35°C 以下の超低温保存が必要とされる。しかし、超低温保蔵のための装置および冷却コストが高いため、超低温の利用は主にマグロ流通に限られている。冷凍水産物の国内外の流通では、冷凍食品の流通温度である -20°C での流通が一般的であるが、この温度では流通貯蔵時に Mb のメト化が進行する。これはブリやカンパチなどを刺身用冷凍水産物として輸出する際に大きな問題となっている。ブリやカンパチを -20°C のような温度帯で保存すると、1ヶ月以内に褐変化が進行し商品価値を失う。これに対処する方法としては、一酸化炭素（CO）処理により CO-Mb を形成する方法が行われている。CO-Mb は非常に安定なので冷凍解凍後もピンクに近い独特な赤色を維持するが、鮮度が低下しても色調が変化しない特徴を有する。米国では CO 処理は許可されているが、日本、EU、オーストラリア、アジア諸国などでは鮮度誤認の問題があるということで禁止されている。米国以外の国への輸出では、空輸によるチルド輸送となるためコストが高く、輸出は低迷している¹⁰⁾。 -20°C のような凍結保蔵温度における魚類 Mb のメト化抑制に関する有効な方法は開発されていないのが現状であり、このような温度帯でのメト化抑制方法の開発が水産業界から強く望まれている。本研究では、 -20°C のような保存条件下での魚類 Mb のメト化抑制を最終目標とし、魚類 Mb の生化学

的性状やメト化率を指標に研究を進めた。

本研究を進めるにあたって重要な一般情報としては、冷凍マグロ類の凍結時の鮮度と解凍後の魚肉品質について挙げるができる。冷凍マグロはマグロはえ縄漁により漁獲されているものが多い。マグロはえ縄漁では投縄から揚縄までの時間がかかるため、生きた状態で水揚げされる魚体と死んだ魚体があり、生きた状態で水揚げされたものは活きしめ処理後、急速凍結される。高鮮度状態で凍結したマグロの魚肉は、凍結保蔵後の肉質が非常に優れていることが経験されている。さらに、橋本と渡部⁸⁾はマグロ肉の冷凍貯蔵中の肉色と保水性変化に関する研究で、鮮度が良い状態で凍結したマグロは -20°C での保存で褐変が遅れることを報告した。鮮度指標は K 値を使用していたが、鮮度が良い状態で冷凍したマグロを -20°C で保存した時に、なぜ褐変が抑制されるかについては、科学的な検証がなされていない。

本研究では上記の現象に関する科学的な検討を行うことにしたが、生体内エネルギー物質のアデノシン三リン酸 (ATP) に着目した。その理由の一つは、生きた状態で漁獲され活きしめされた魚肉には ATP が多く含まれていることが挙げられる。ATP は生体内エネルギー物質であり、生体内の種々の代謝、合成や運動などにおいて「エネルギーの貨幣」として機能している。理由の2番目は、ATP には筋原線維タンパク質の変性抑制効果を有することが報告されており^{11, 12)}、緒方らは筋原線維タンパク質の冷凍変性抑制効果を報告している。Mb と ATP の相互作用に関する研究報告は見られないが、本研究では ATP が魚肉 Mb のメト化抑制作用を示すかについて Mb 溶液モデル系で検討を行い、さらに、ATP の Mb 分子状態に及ぼす影響についても研究を進めた。Mb 溶液でのモデル試験で ATP によるメト化抑制作用が確認できたことから、各濃度の ATP を含む魚肉を養殖カンパチ(*Seriola dumerili*)で調製し、実際に魚肉を用い

た ATP による冷凍品質保持効果に関する研究を行った。

一方、本研究では魚肉 Mb のメト化率を主な指標として測定したが、Mb のメト化率の簡易測定法として広く利用されている尾藤法¹³⁾は、マグロ Mb 以外には使用できないことが明らかとなった。Mb の研究報告では、マグロ Mb のメト化率測定方法として開発された尾藤法を他魚種の Mb のメト化率測定に応用して報告されたものもあるが、高鮮度状態の魚肉でも Mb のメト化率が高い結果となる報告¹⁴⁻¹⁷⁾が見受けられ、本研究でもマグロ以外の Mb で異常な値となることを確認した。そこで本研究では、各種魚類 Mb のメト化率の簡易測定方法について新たに検討を行い、12 種の魚類筋肉から Mb を精製し、それを用いてメト化率測定方法を確認した。魚類 Mb の自動酸化や構造については多くの研究がなされており^{3, 4, 18-21)}、Mb の自動酸化は魚肉の肉色に大きく関与することが明らかとなっている。しかし、Mb の自動酸化の簡易測定法については、魚種ごとに検討されたものは少ない。12 魚種 Mb の精製とそれぞれの魚種 Mb のメト化率測定方法を確認できたので、本研究では各魚種 Mb の自動酸化速度を Mb メト化率を指標に測定し、比較することができた。

本研究により、高鮮度魚肉を冷凍保存した時に解凍後の品質が良い理由について考察することが可能となり、魚肉中に含まれる ATP によるタンパク質変性抑制効果が Mb 分子にも影響することが明らかになった。また、魚肉の高品質冷凍保存のための技術の確立には、ATP と Mb の相互作用に関する研究を推進することが重要であることも示唆された。これらの研究結果は、高品質冷凍水産物の生産と国内外への流通を可能とする技術として応用されるので、日本の水産業の発展に貢献することが大いに期待される。

第1章 ミオグロビンのメト化に及ぼす ATP の影響

緒言

高鮮度で凍結処理を施されたマグロ肉はその品質が非常に良いことが経験されている⁸⁾。その原因を探る研究として Mb の安定性に関する pH の影響について多数の研究が行われてきている。すなわち、凍結保管時や解凍時における Mb の安定性は pH の影響を受け、特に酸性条件下では著しく低下することが報告されている。橋本と渡部は高鮮度 (K 値 0.8) のマグロでは -20°C 貯蔵での褐色化が遅れることを示したが、高鮮度の場合 ATP が含まれている可能性があるがこの報告には ATP の濃度や効果について記載がなされていない。ATP は生体内エネルギー物質であると同時に筋原線維タンパク質や筋小胞体 Ca-ATPase の安定化作用を有することが報告されている^{11, 12, 22)}。そこで、本研究ではまず、ATP の Mb のメト化に対する影響について測定し、その後、Mb 分子状態に及ぼす ATP の作用について検討を行った。試験にはミナミマグロ Mb を用いた。

材料と方法

材料 Mb の調製には、生きた状態で漁獲されたミナミマグロ *Thunnus maccoyii* の急速凍結品 (-60°C) を使用した。このミナミマグロ普通肉は、実験に供するまで -80°C の冷凍庫で保管した。

方法

ミオグロビン (Mb) の調製 魚類 Mb の調製はマグロ Mb の精製法である落合らの方法^{5, 6)} に準じて行った。すなわち、細切した魚肉に 3 倍量の 0.1 M KCl 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) を添加しホモジナイズし、遠心分離して上清を得た。この上清の 70 - 90% 飽和硫酸銨分を沈殿として集め、これを抽出液と同じ緩衝

液に透析し粗ミオグロビン (cMb) 溶液を得た。この cMb 溶液をフィルター (Minisart RC 15) で処理したろ液を落合らの方法⁵⁾ に準じて 0.1 M KCl 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) で平衡化した Superdex 200 prep grade (GE Healthcare 製) を用いてゲル濾過クロマトグラフィーを行った。Mb の検出は溶出液の 280 nm と 540 nm の吸光値を測定して行った。Mb の純度と分子量は、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (SDS-PAGE) により分析した。SDS-PAGE は Laemmli の方法²³⁾ に従い 17.5 %ポリアクリルアミドゲルを使用して行った。Mb の分子量は分子量マーカー (アトー社製 AE1440) を使用し SDS-PAGE における移動距離から求めた。Mb タンパク質濃度は、ウマミオグロビン (ナカライテスク製) を標準タンパク質としてビウレット法により定量した²⁴⁾。

ATP 存在下における Mb メト化進行の測定 Mb メト化率の 25 °C における変化は、0.1 M KCl, pH(6.0, 6.5, 7.0, 7.5), ATP 濃度 0 mM - 7.5 mM の溶液条件で行った。Mb メト化率の測定はマグロ Mb 測定方法の尾藤法¹³⁾ に準じて行った。即ち、cMb の 540nm と 503nm の吸光値を測定し、吸光値比 Mb メト化率の関係曲線から導出した関係式により metMb 存在比率を求めメト化率を算出した。Mb メト化率の測定は 25 °C 加熱 30 分毎に 540nm, 503nm, の吸光値を測定しメト化率を算出した。メト化速度恒数 (K_{met}) は、25 °C での処理時間 1 分間あたりに増加する metMb 変化率より求めた。 K_{met} の算出は、加熱時間 (分) と Mb メト化率 (%) の増加の関係から、以下の式により算出を行った。

$$K_{met} = \{ \ln(\text{metMbt}) - \ln(\text{metMb}_0) \} / t$$

metMbt: 25 °C t 分間加熱処理後の Mb メト化率,

metMb₀: 25 °C 加熱処理前の Mb メト化率,

t: 加熱処理時間 (分), (K_{met} の単位は min⁻¹)

ATP で惹起される Mb 分子の状態変化の測定

可視部吸収スペクトル測定 精製 Mb を用いて各濃度の ATP 存在下で Mb の可視部吸収スペクトルを測定した。可視部吸収スペクトルは native Mb, deoxyMb, oxyMb, metMb について測定した。なお, deoxyMb, oxyMb, metMb は以下の方法で調製した。deoxyMb は精製 Mb 溶液 (0.1 M KCl 20 mM Tris-HCl (pH 7.5)) にヒドロ亜硫酸ナトリウムを適量添加して調製した²⁵⁾。oxyMb は deoxyMb 溶液をスターラーで攪拌して調製した。metMb は泉本らの方法²⁶⁾に準じて, 精製 Mb 溶液にフェリシアン化カリウムを 3 μ M 添加して調製した。可視部吸収スペクトルの測定条件は 0.1 M KCl, pH 6.0, 7.5, ATP 濃度 0 mM, 7.5 mM, Mb タンパク濃度は 0.21 mg/ml, 0.15 mg/ml の条件で行った。また, ATP が Mb の Soret 帯に及ぼす影響について native Mb 用いて, 0.1 M KCl 20m M Tris buffer(pH 6.0, 7.5), 25°C, ATP 濃度 0-6 mM, Mb タンパク質濃度 0.25 mg/ml, 測定波長 300~600 nm, にて島津 UV-1800 で測定した。

Mb 分子の自家蛍光測定 蛍光光度計による Mb 自家蛍光の測定は, 精製 Mb を使用して行った。実験条件は, 0.1 M KCl 10 mM phosphate buffer (pH 6.0 又は 7.5), ATP 濃度 0-2mM, Mb タンパク質濃度は 0.05 mg/ml, 0.07 mg/ml の条件で行った。蛍光測定条件は励起波長 (Excitation ; 285 nm), 測定波長 (Emission ; 300-500 nm)で測定を行った。また, Mb に限らず蛍光強度は温度の影響を受けるため, セル室内の温度は 15°C の恒温条件で日本分光 JFP-8200 で測定を行った。

Mb と ATP の化学量論的關係の検討 Mb 分子自家蛍光は ATP によりクエンチングすることを応用して Mb と ATP の化学量論的關係の検討を行った。測定条件は Mb の自家蛍光測定と同様に行い実験条件は 0.1 M KCl 10 mM phosphate buffer (pH 7.5), ATP 濃度 0-2 mM, Mb タンパク質濃度は, 0.0065, 0.0033, 0.065, 1.0 mM で 15 °C で行った。

Circular dichroism (CD) スペクトルによる Mb 分子状態の測定 CD スペクトルの測定も蛍光強度測定と同様に精製 Mb を使用して行った。CD 測定には 1 mm 幅のセルを使用し, 窒素気流下および 10 °C で測定した。測定条件は, 0.1 M KCl 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), ATP 濃度 0 mM 又は 1 mM, Mb タンパク質濃度 0.7 mg/ml, 測定波長 200~700 nm, 日本分光 J-820Q4 にて行った。

溶液中の Mb 分子サイズの測定 Mb の溶液中での分子サイズの測定を精製 Mb を用いて行った。測定条件は, 15 °C, 0.1 M KCl 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), ATP 濃度 0 mM 又は 5 mM, Mb タンパク質濃度 1.65 mg/ml にて行った。測定機器は Zetasizer nano ZS (Malvern, United Kingdom) にて測定した。本装置は溶液中のタンパク質サイズを動的散乱法で測定する。散乱光の強度変動率は分子サイズにより影響される特性を測定原理に用いている²⁷⁾。

Mb 分子表面電荷の測定 Mb 分子表面と溶液間に生じるゼータ電位測定は Zetasizer nano ZS (Malvern, United Kingdom) と 4.5 mm ゼータディップセルを使用し, 電界強度下を移動する分子による光散乱強度を測定する電気泳動的散乱法で測定した²⁸⁾。測定条件は Mb 分子サイズの測定と同様に行った。

結果

ミナミマグロ精製 Mb Fig. 1 にミナミマグロ Mb のゲルろ過による調製と SDS-PAGE パターンを示した。cMb を 70-90%飽和硫酸分画に付しゲルろ過した結果、フラクション 43-45 番に Mb を得ることが出来た。SDS-PAGE 分析の結果、得られた Mb は高純度で分子量 15300 であることを示した。この分子量はクロマグロとマルソウダにより得られた結果と一致している^{29, 30)}。精製 Mb はフラクション 43-45 をプールして実験に供した。また、70-90 %飽和硫酸分画後に透析して得られた Mb 溶液を cMb として利用した。

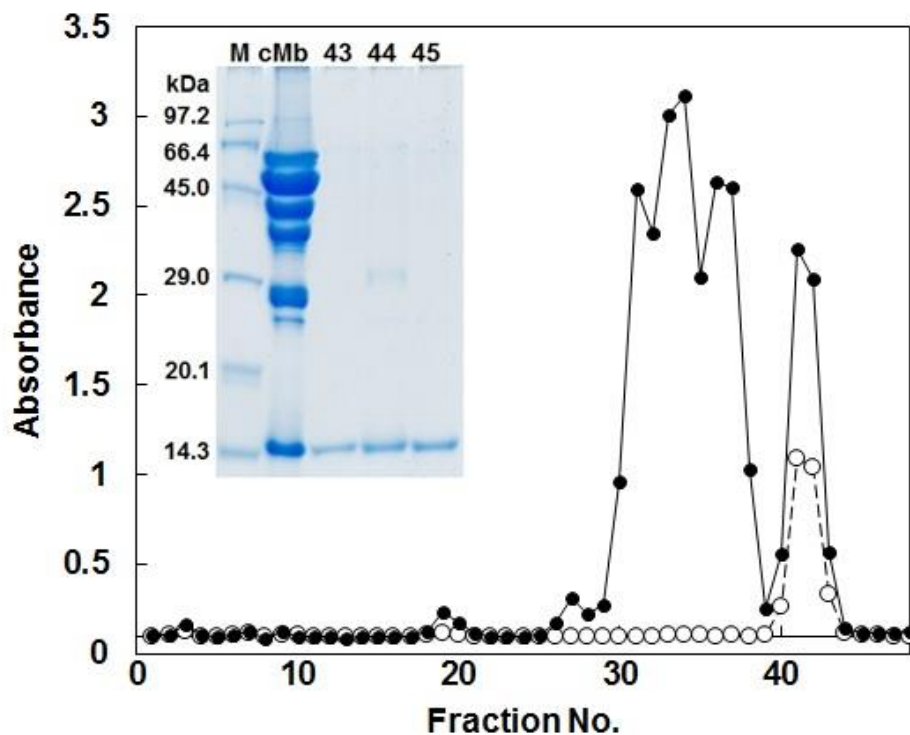


Fig. 1 Purification of southern bluefin tuna Mb. Elution pattern of Mb from a HiLoad 16/60 Superdex 200 gel filtration column equilibrated with 0.1 M KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5). The eluate was monitored by the absorbance at 280 nm (*filled circle*) and 540 nm (*open circle*). The inset shows SDS-PAGE patterns of the fractions obtained by gel filtration. M molecular weight markers, cMb: crude Mb (the applied sample). The number above each lane corresponds to that of the fraction number.

Mb のメト化に及ぼす ATP の影響 cMb の pH を各 pH (pH 6.0-7.5) に調整した後、各濃度の ATP 存在下で、25°C で加熱を行い、メト化の進行を測定した。

Fig. 2 (a, b) に pH 7.5 および pH 7.0 でのメト化の経時変化の結果を示した。

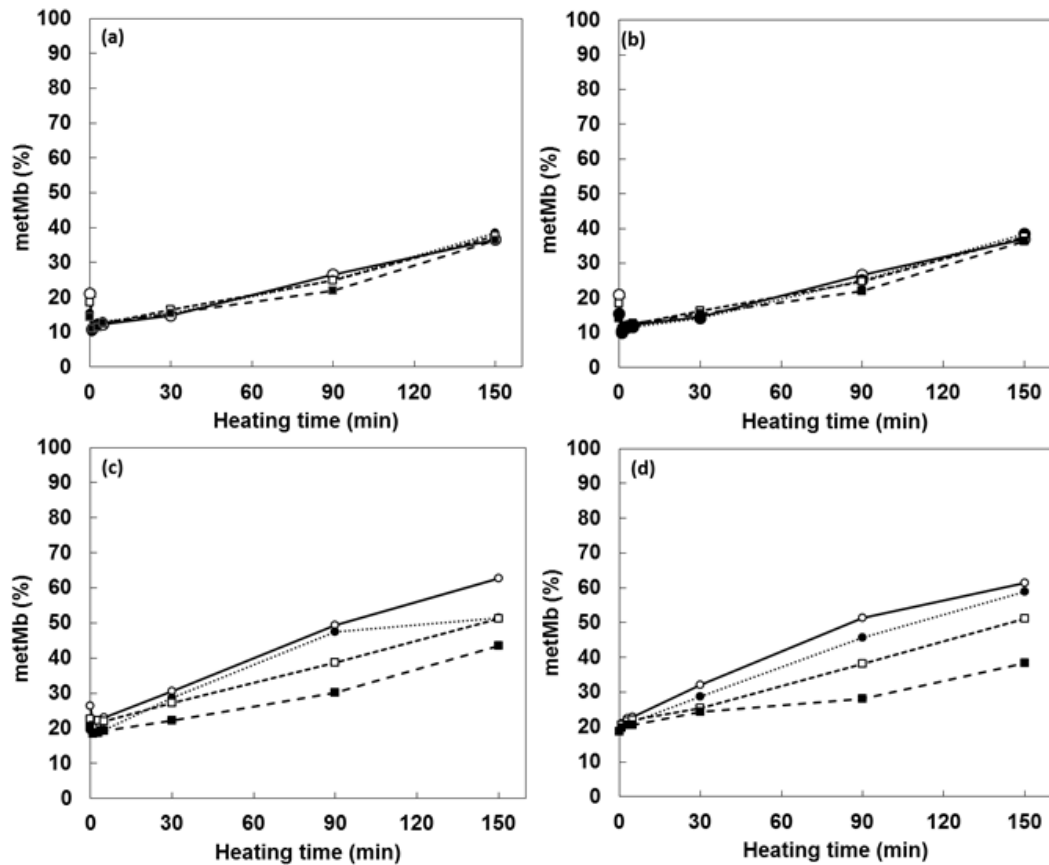


Fig.2 Time course of changes in the ratio of metMb formed in crude Mb with or without ATP. The discoloration of cMb was measured at 25°C in 0.1 M KCl at the pH over the range 6.0 – 7.5 with or without ATP of various concentrations. (a) pH 7.5 (20 mM Tris-HCl), (b) pH 7.0 (20 mM Tris-maleate), (c) pH 6.5 (20 mM Tris-maleate), (d) pH 6.0 (20 mM Tris-maleate). ATP concentration was (○) 0 mM, (●) 1 mM, (□) 3 mM and (■) 7.5 mM. The Mb concentration in crude Mb solution was 1.07 mg/ml estimated by using molar extinction coefficient (8230) at 540 nm of purified oxyMb of southern bluefin tuna. Time course of changes in the ratio of met Mb formed in crude Mb with or without ATP. The discoloration of cMb was measured at 25°C in 0.1M KCl at the pH over the range of 6.0~7.5 with or without added ATP of various concentration.(a) pH 7.5, (b)pH 7.0, (c)pH 6.5, (d)pH 6.0

pH 7.5 および pH 7.0 では, ATP の添加の有無にかかわらずメト化の進行は遅い結果が得られた。なお, 有意差は認められないが ATP 濃度が高くなると, pH 7.5, pH 7.0 の中性から弱アルカリ性条件でもメト化の進行を抑制する傾向が認められた。Fig. 2 (c, d) に pH 6.5 および pH 6.0 でのメト化経時変化の結果を示した。酸性 pH 条件下では Mb のメト化の進行は非常に速いが, ATP の存在によりメト化の進行は ATP 濃度依存的に抑制されることが明らかとなった。

Fig. 2 (a - d)に示した cMb のメト化経時変化の結果から K_{met} を求め, 各 pH における ATP 濃度とメト化速度との関係を Fig. 3 に示した。ATP が存在しない場合の K_{met} は, pH 6.0 で $1.53 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$, pH 6.5 で $1.45 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$, pH 7.0 で $1.01 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$, pH 7.5 で $1.0 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ であり強い pH 依存性を示した。酸性 (pH6.0, pH6.5) と中性-微アルカリ (pH7.0, pH7.5) で K_{met} は大きく異なる結果が得られ, 酸性条件下での K_{met} は非常に大きいことが明らかになった。

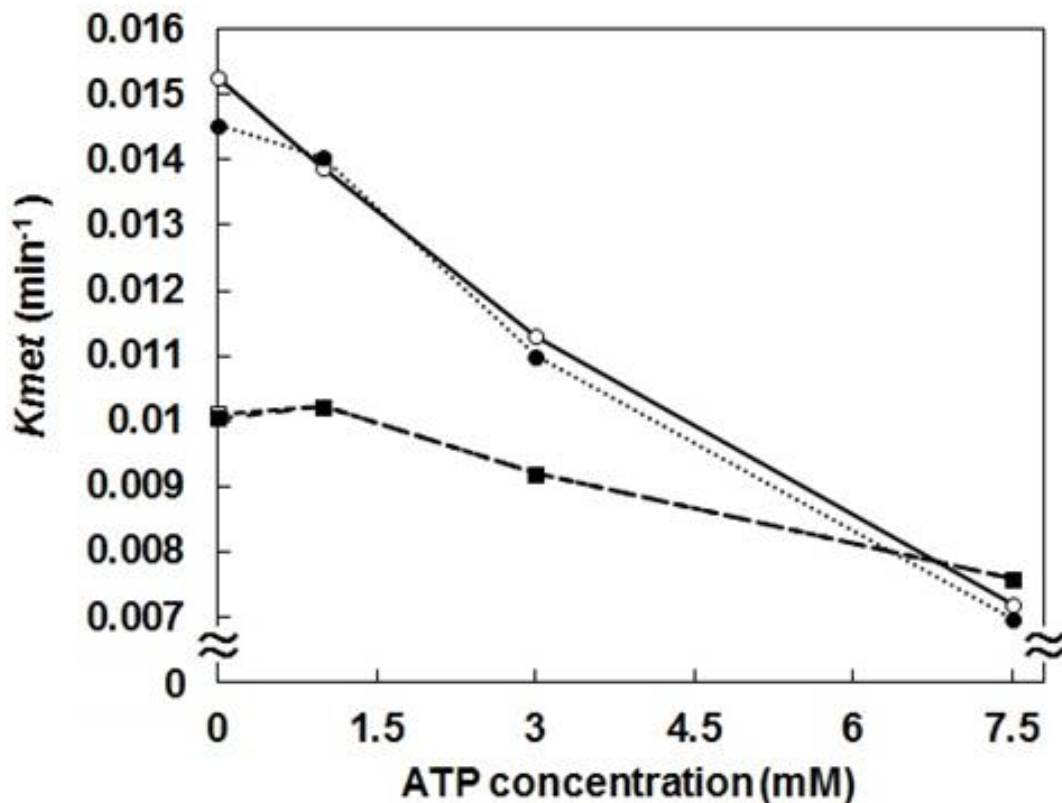


Fig.3 Effect of ATP and pH on the autoxidation rate (K_{met}) of tuna crude Mb at 25°C. The pH was (○) 6.0, (●) 6.5, (□) 7.0 and (■) 7.5, respectively. K_{met} was calculated by a first-order reaction analysis from the data of Fig. 2 Effect of ATP and pH on the autoxidation rate of tuna crude Mb at 25°C. The pH of Mb was 6.0(●), 6.5(○), 7.0(□), and 7.5(■), respectively.

一方、ATPが存在する場合、メト化速度 K_{met} に対する影響は、酸性 pH 下でより顕著に認められた。pH 7.0, pH 7.5 では、ATP を終濃度 7.5mM まで添加した場合の K_{met} はいずれも $0.76 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ と ATP を添加していない場合の K_{met} (pH 7.0 : $1.01 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$, pH 7.5 : $1.0 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$) よりも僅かに安定化する結果となった。pH 6.0 と pH 6.5 では ATP が存在すると K_{met} は ATP の濃度に依存して低下し、ATP 濃度 3 mM での K_{met} は pH 6.0 で $1.13 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$, pH 6.5 で $1.10 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ となり、ATP 濃度 7.5mM では、pH 6.0 で $0.72 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$, pH 6.5 で $0.70 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ となった。pH 6.0, pH 6.5 における ATP 濃度 7.5mM

での K_{met} は、pH 7.0, 7.5 における K_{met} とほぼ同じ値を示した。生理的な濃度の ATP が存在すると酸性下における Mb のメト化の進行は抑制され、中性・弱アルカリ性下と同程度の Mb の安定性を示すことが明らかとなった。

Fig. 4 に、精製 Mb を用いて pH 6.0, pH 6.5 および pH 7.0, 7.5mM ATP 存在下における 25°C での Mb メト化率の変化を測定した結果を示した。pH 6.0 (Fig. 4a) では ATP の有無により加熱 30 分, 60 分でのメト化率増加に有意差が認められた。pH 6.5 (Fig. 4b) では加熱 90 分と 150 分で同様にメト化率増加に有意差を認めた。一方 pH 7.0 (Fig. 4c) ではメト化率の増大は ATP の有無に影響を受けず同じ値を示した。精製 Mb においても cMb の試験と同様に酸性 pH 下における自動酸化速度は, ATP によって抑制されるということが明らかとなった。

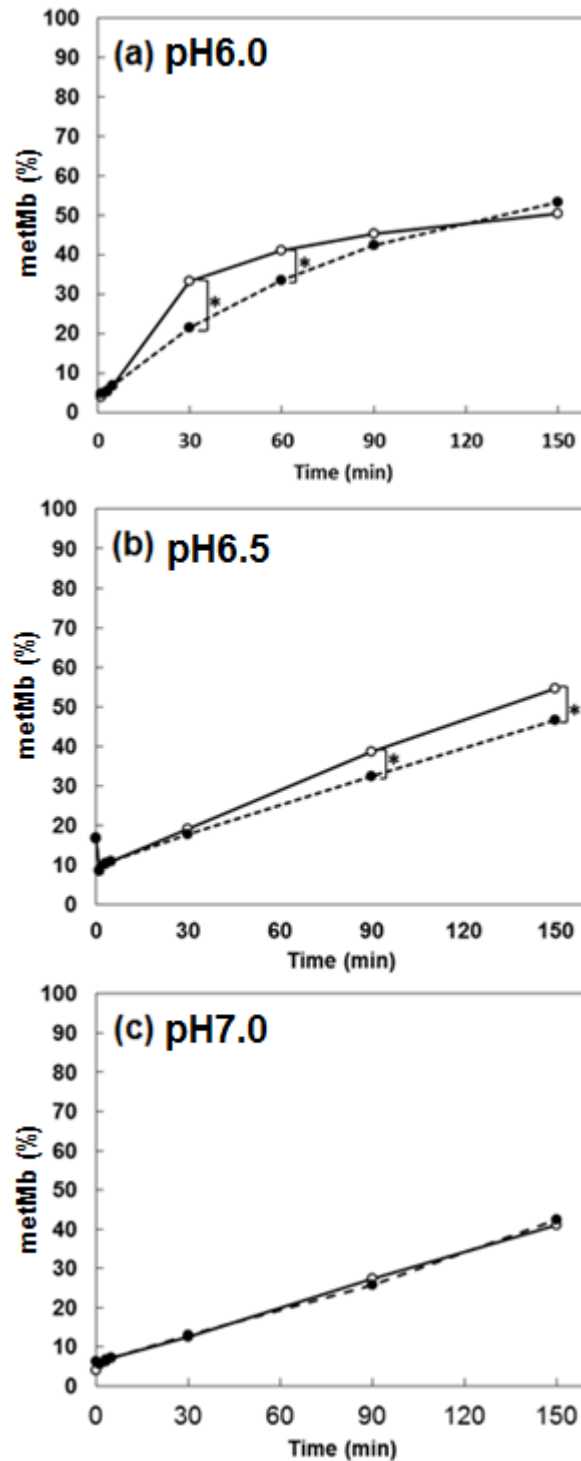


Fig.4 Time course of changes in the ratio of metMb formed in purified native Mb with or without ATP. The discoloration of purified Mb (0.4 mg/ml) was measured at 25°C in 0.1 M KCl, 20 mM Tris-maleate at the pH over the range of 6.0 to 7.0 with or without 7.5 mM ATP. The ATP concentration was 0 (○) and 7.5 mM (●). (a) pH 6.0, (b) pH 6.5, (c) pH 7.0. Asterisk indicates a significant difference ($p < 0.05$, t -test, $n=3$)

ATP で惹起される Mb 分子の状態変化の測定

1) Mb の可視部吸収スペクトルに及ぼす ATP の作用 各種 Mb の可視部吸収スペクトル変化を Fig. 5 (a-d)に示した。Mb の可視部吸収スペクトルは 400~450 nm(Soret 帯)と 530~600nm(Q 帯)に特徴的なスペクトルを示した。Soret 帯の最大吸収波長は各 Mb 状態で異なり, native Mb, oxyMb, metMb でそれぞれ, 409 nm, 414 nm, 407 nm であり, deoxyMb(432 nm)に比べて吸収波長のブルーシフトが認められた。一方, 各 Mb で (pH 6.0, pH 7.5) の 500-600 nm の可視部吸収スペクトルは ATP の添加により変化を示さなかった。各 Mb (pH 6.0, pH 7.5)に ATP を添加した場合にはいずれの Mb も Soret 帯の吸光値が減少した。一方, Fig. 6 に pH 6.5, pH 7.5 において, native Mb に各濃度の ATP を添加した場合の可視部吸収スペクトルの変化を示した。Fig. 7 には, Fig. 6 で得られた ATP による Soret 帯の吸光値の変化を, 最大吸収波長の 409 nm で測定した結果を示した。

ATP の濃度に依存して Soret 帯の吸光値は減少したが, pH 6.5 のほうが pH 7.5 より ATP に対して敏感に反応することが明らかとなった。

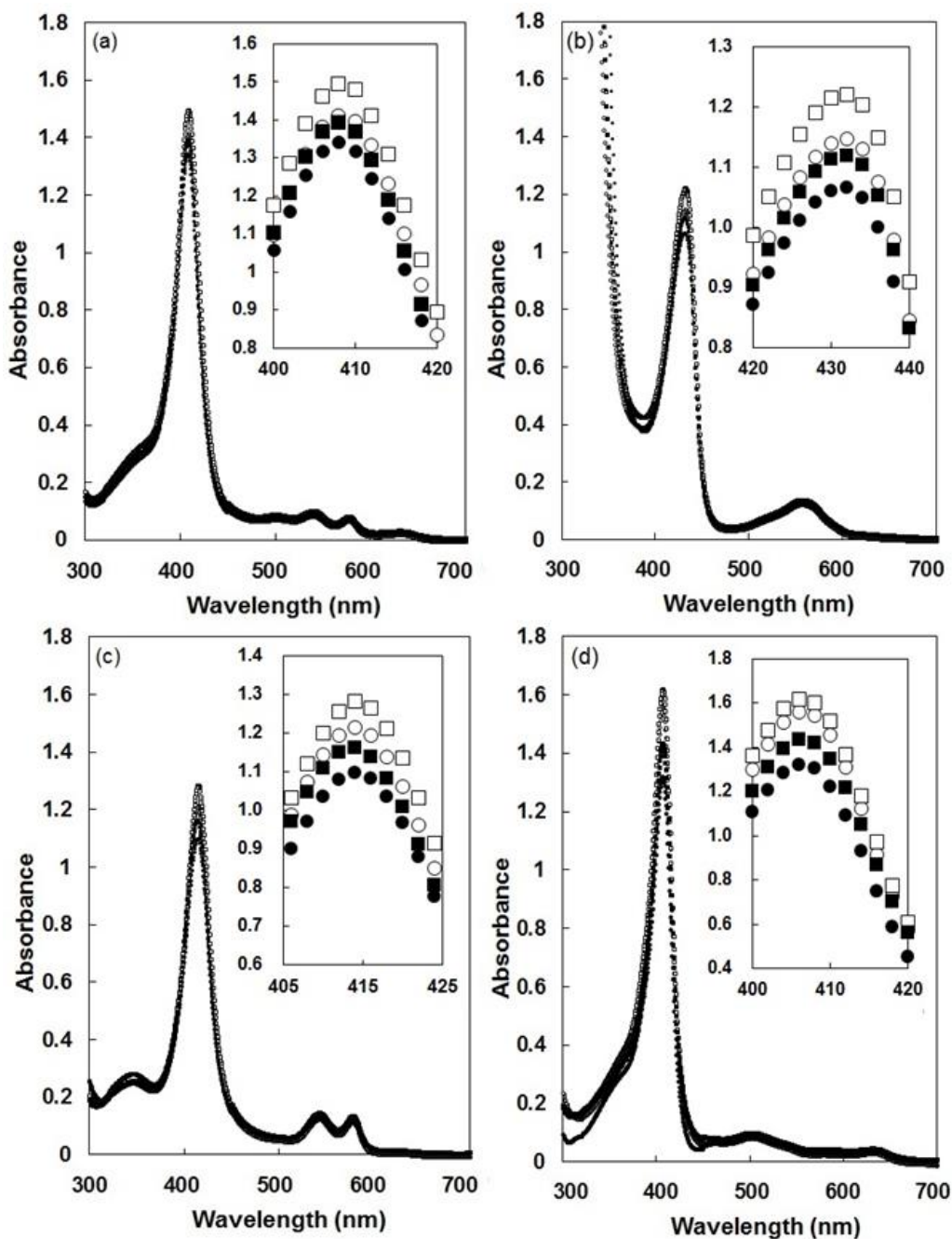


Fig.5 Effect of ATP on the Soret region (380-440 nm) and the visible spectra of Mbs. The spectra of native Mb, deoxyMb, MbO₂ and metMb were measured at 25°C in 0.1 M KCl at pH 6.0 and 7.5 with or without 7.5 mM ATP. The protein concentration was 0.21 mg/ml (pH 6.0) and 0.15 mg/ml (pH 7.5), respectively. Inserted figure shows the enlarged view of spectrum in the soret bands. (a) native Mb, (b) deoxyMb, (c) MbO₂, (d) metMb. (○) 0 mM ATP, pH 6.0, (●) 7.5 mM ATP, pH 6.0, (□) 0 mM ATP, pH 7.5, (■) 7.5 mM ATP, pH 7.5

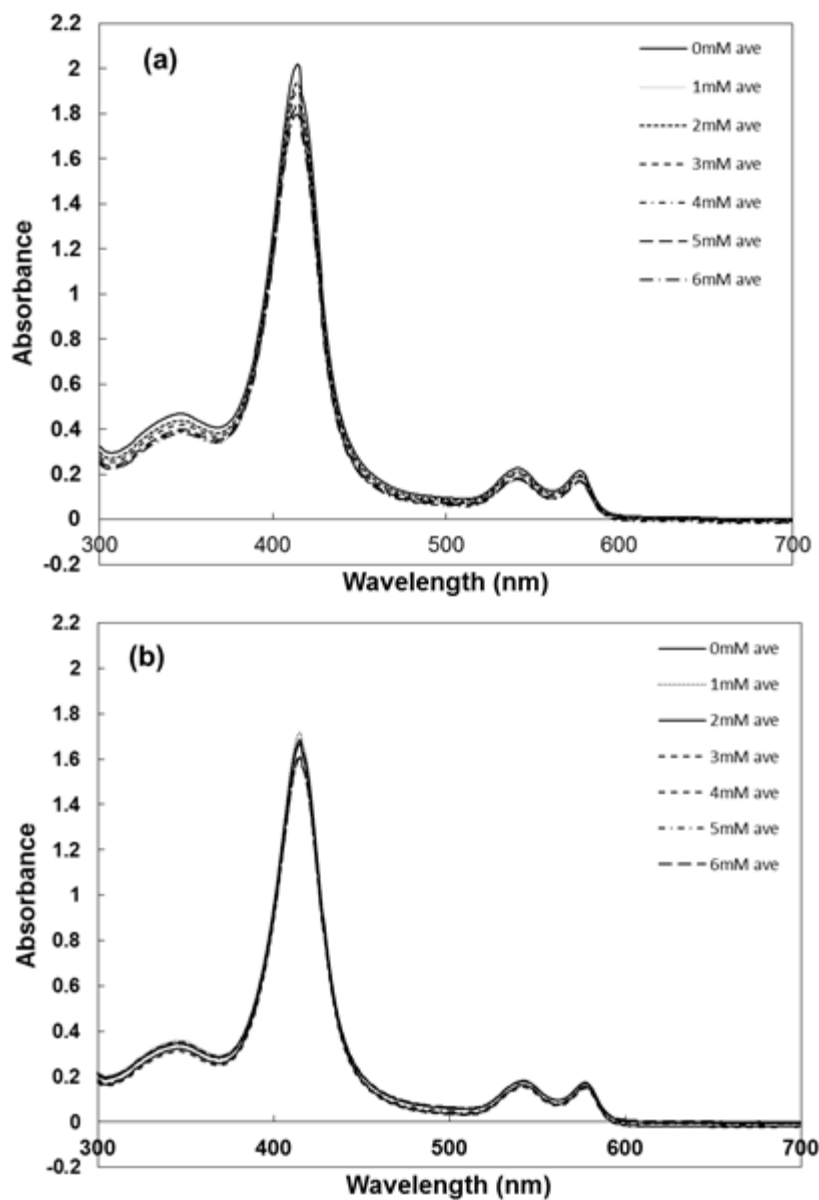


Fig. 6 Effect of ATP concentration on the Soret region spectra of native Mb. The spectra of native Mb was measured at 5°C in 0.1 M KCl at pH 6.5 (a) and 7.5 (b) as a function of ATP concentration from 0 to 6 mM. The protein concentration was 0.25 mg/ml

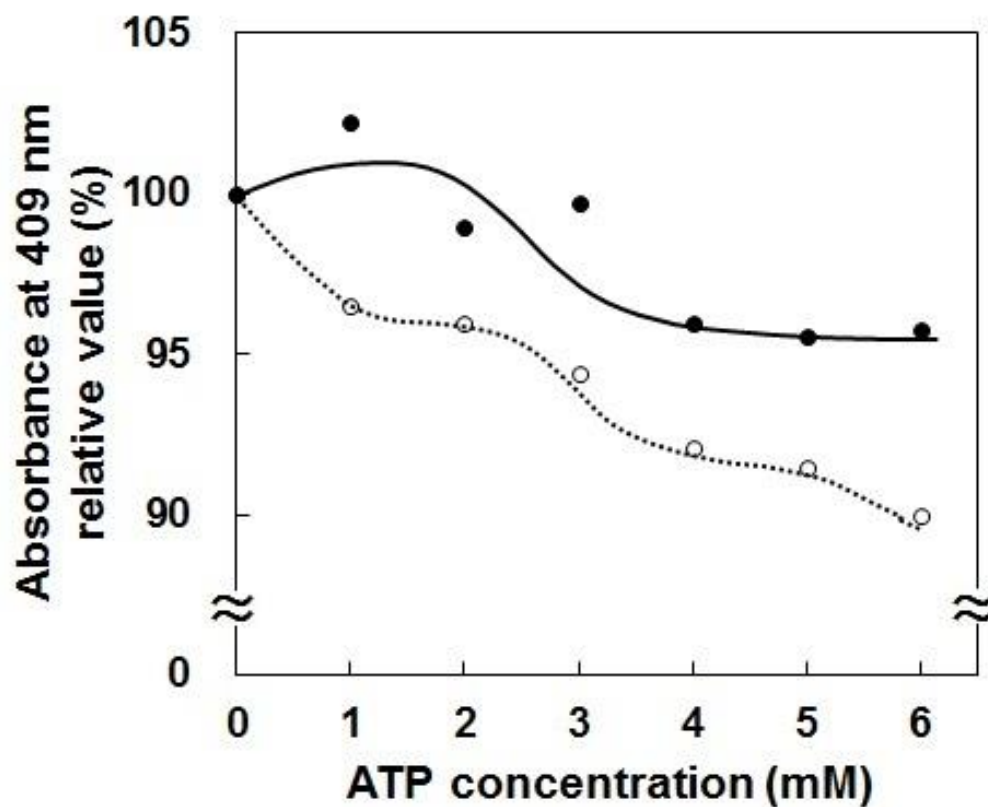


Fig.7 Effect of ATP concentration on the absorption at 409 nm in Soret region of native Mb. The decrease ratio in the absorption at 409 nm as a function of the ATP concentration was calculated from the data in the same measurement as Fig. 6. (○) pH 6.5, (●) pH 7.5

2) Mb の自家蛍光に及ぼす ATP の影響 マグロ Mb の自家蛍光に及ぼす ATP の影響を pH 6.0 と pH 7.5 において測定した結果を Fig. 8 (a, b) に示した。

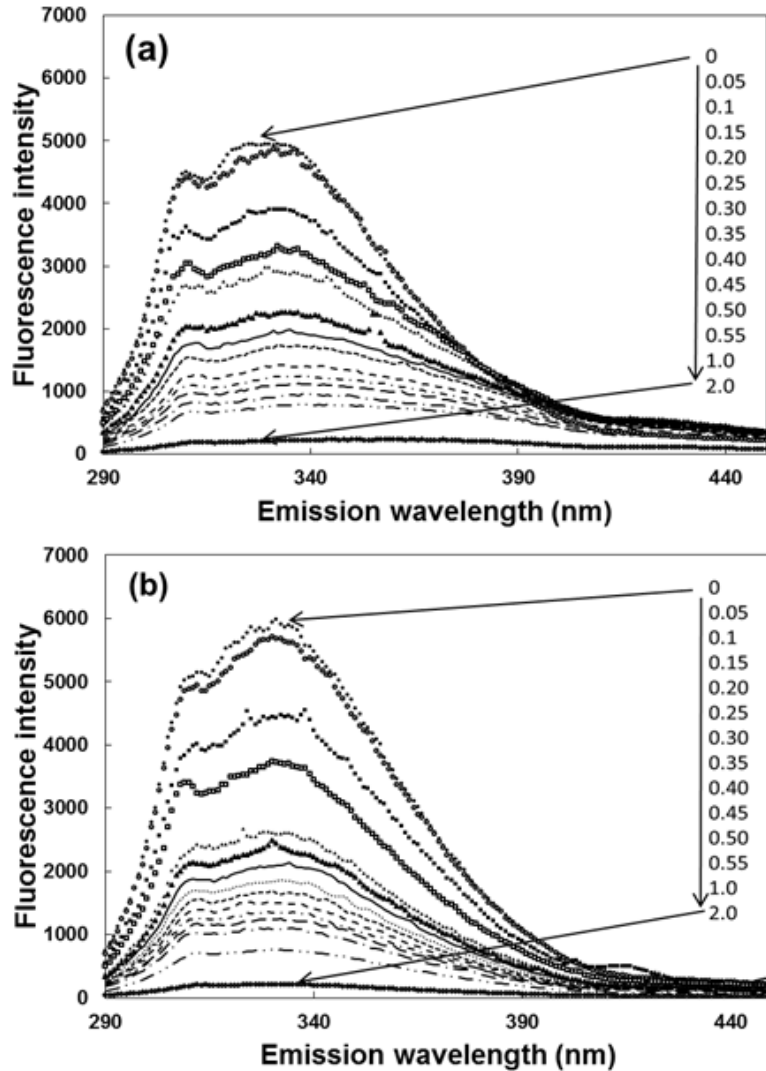


Fig. 8 The changes in fluorescence emission of native Mb as a function of ATP concentration. The fluorescence emission of native Mb in 0.1 M KCl 10 mM phosphate buffer (pH 6.0, 7.5) was measured over the range 300 to 500 nm with excitation at 285 nm as a function of ATP concentration from 0 to 2 mM at 10°C. The protein concentration was 0.05 mg/ml (pH 6.0) and 0.07 mg/ml (pH 7.5). (a) pH 6.0, (b) pH 7.5

ミナミマグロ Mb は励起波長 285 nm で測定波長 330 nm に最大蛍光波長を示す蛍光パターンを示した。ATP の添加により蛍光の減少、クエンチングを示した。330 nm における蛍光強度を求め ATP 濃度と蛍光強度の関係を Fig. 9 に示した。

クエンチングは pH 6.0 および 7.5 でも ATP 濃度が約 0.5 mM で飽和することが認められた。

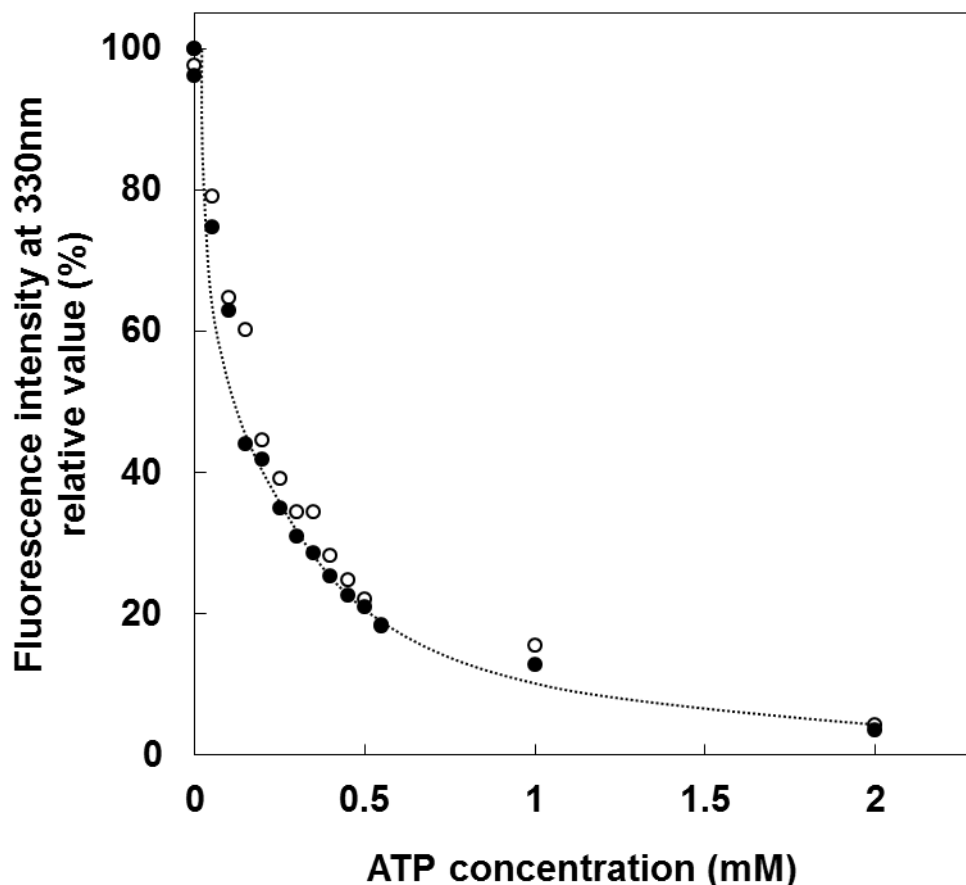


Fig. 9 ATP-induced changes in intensity of maximum fluorescence emission at 330 nm of native Mb. From the results of Fig. 8, the ratio of ATP-induced decrease in intensity of maximum fluorescence emission at 330 nm was calculated. (○) pH 6.0, (●) pH 7.5

3) Mb と ATP の化学量論的關係の検討 Mb の自家蛍光が ATP によりクエンチングすることから、この現象を利用して Mb 分子の状態変化と ATP との關係について検討を行った。各濃度の Mb に対して ATP を 2 mM まで添加した場合の Mb 自家蛍光のクエンチングを測定した結果を Fig. 10 (a, b) に示した。Fig. 10 (a) は Mb の濃度 0.0065 mM, Fig. 10 (b) は 0.033 mM である。いずれも ATP 濃度

0-2 mM に依存して Mb 自家蛍光はクエンチングした。

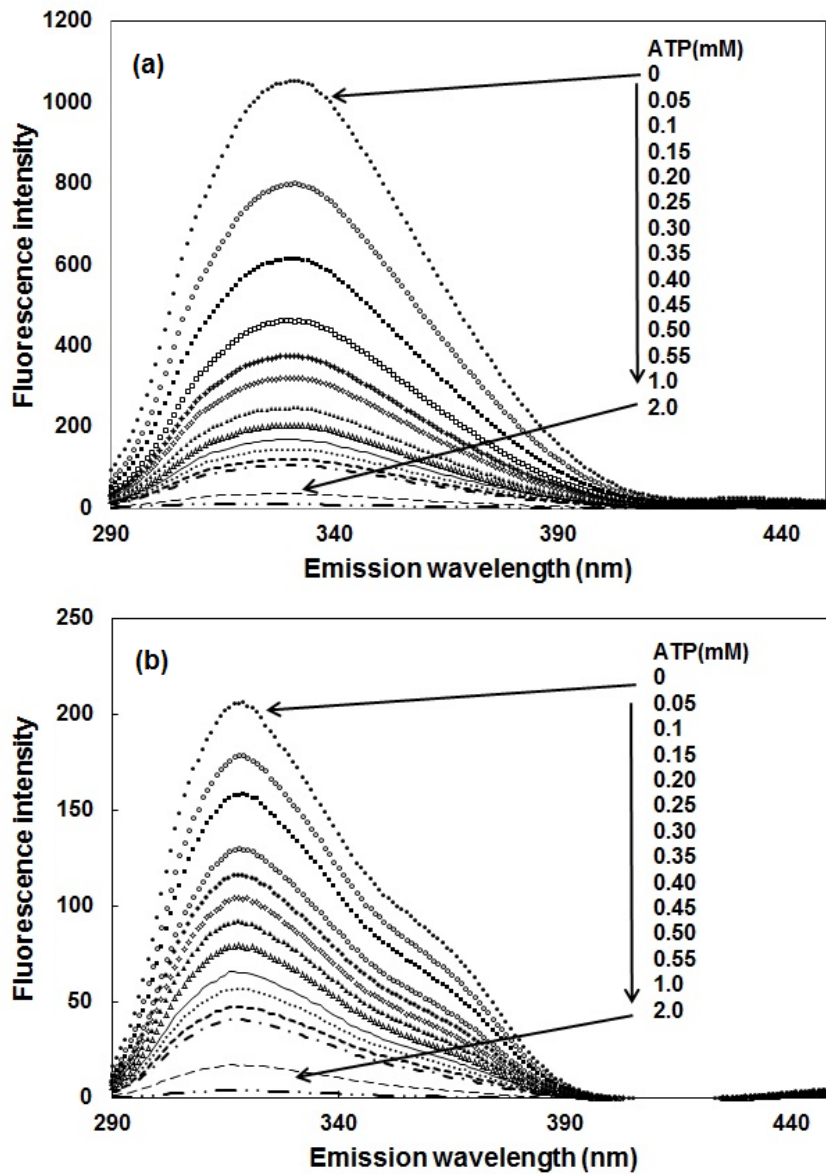


Fig.10 The changes in fluorescence emission of native Mb at various concentration as a function of ATP concentration. The fluorescence emission of native Mb in 0.1 M KCl 10 mM phosphate buffer (pH7.5) was measured over the range 300 to 500 nm with excitation at 285 nm as a function of ATP concentration from 0 to 2 mM at 10°C. The protein concentration was (a) 0.0065 mM, (b) 0.033 mM.

Fig. 11 には Mb 濃度 0.0065 mM, 0.033 mM, 0.065 mM, 0.10 mM における Mb 自家蛍光強度と ATP 濃度との関係を示した。この結果から各 Mb 濃度における Mb 蛍光クエンチングが飽和する ATP の濃度を求め、結果を Fig. 12(a, b)に示した。

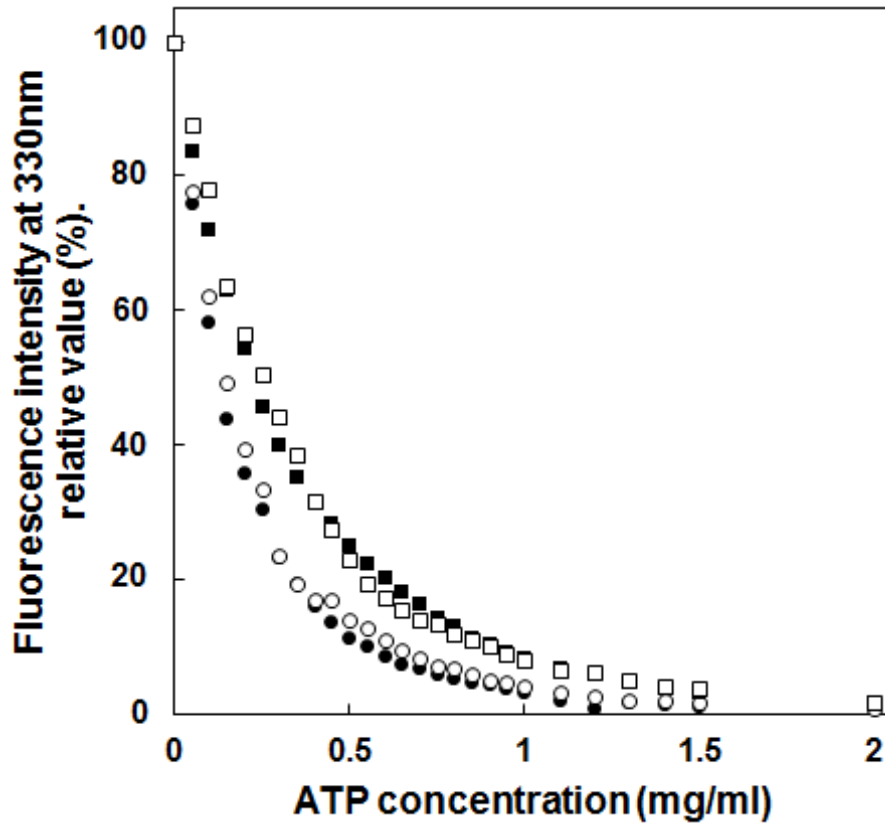


Fig. 11 ATP-induced changes in intensity of maximum fluorescence emission at 330 nm of native Mb at various concentration. From the results of Fig.10, the ratio of ATP-induced decrease in intensity of maximum fluorescence emission at 330 nm was calculated. (●) 0.0065 mM, (○) 0.033 mM, (■) 0.065 mM, (□) 0.1 mM, respectively.

Mb 濃度と Mb 自家蛍光が飽和する ATP 濃度との関係は Mb 濃度 0.0065 mM において ATP は 0.25 mM, Mb 濃度 0.033 mM で ATP は 0.34 mM, Mb 濃度 0.065 mM で ATP は 0.4 mM, Mb 濃度 0.10 mM で ATP は 0.45 mM となった。すなわち, Mb 濃度に対して Mb 自家蛍光のクエンチングが飽和する ATP 濃度は, Fig. 12-a の様に対応する傾向を示した。

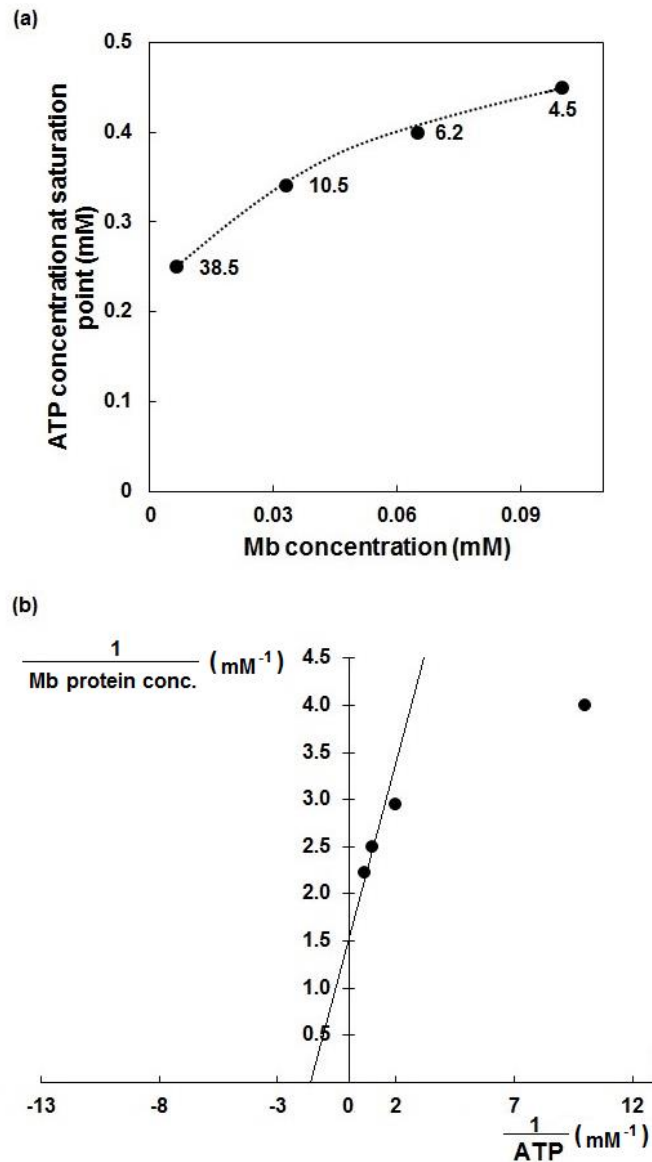


Fig.12 (a) The effect of protein concentration on the affinity between Mb and ATP. The data were calculated from the result of Fig. 11. The inserted number shows mole ratio of Mb to saturated ATP concentration. (b) Double reciprocal plot of Mb protein concentration and saturated ATP concentration from Fig. 12- (a).

また、Mb 各濃度における Mb 自家蛍光のクエンチングが飽和する ATP 濃度のモル比は、Mb 濃度 0.0065 mM で 38.5、Mb 濃度 0.033 mM で 10.5、Mb 濃度 0.065 mM で 6.2、Mb 濃度 0.10 mM で 4.5 となった。(Fig. 12-a) 次に、Fig. 12-a より得られた値についてダブルレシプロカルプロットを応用して Mb と ATP との関係

について求めた。(Fig. 12-b) その結果, k_m 値は 0.62 mM と確認された。

以上の結果から, Mb と ATP のアフィニティは非常に低いと認められた。さらに生体内では ATP が 8-10 mM の濃度で存在しているため生体内の Mb は自家蛍光がクエンチングした分子状態であることが示唆された

4) Mb 分子の Circular dichroism(CD)スペクトルの ATP による変化 Fig. 13 に Mb の CD スペクトルに及ぼす ATP の影響について測定した結果を示した。ATP には短波長側で CD 吸収が認められるため 220–250 nm の測定はできない結果となった。ATP を添加した測定系では, 250 nm より長波長側での測定ができ, ATP 溶液の CD 値を差し引いた値を求め ATP 存在下における Mb の CD スペクトルとして示した。ATP 添加により 260 nm 付近の CD スペクトルに差が認められた。以上の結果は, ATP は Mb 分子状態に影響を及ぼすことを示している。

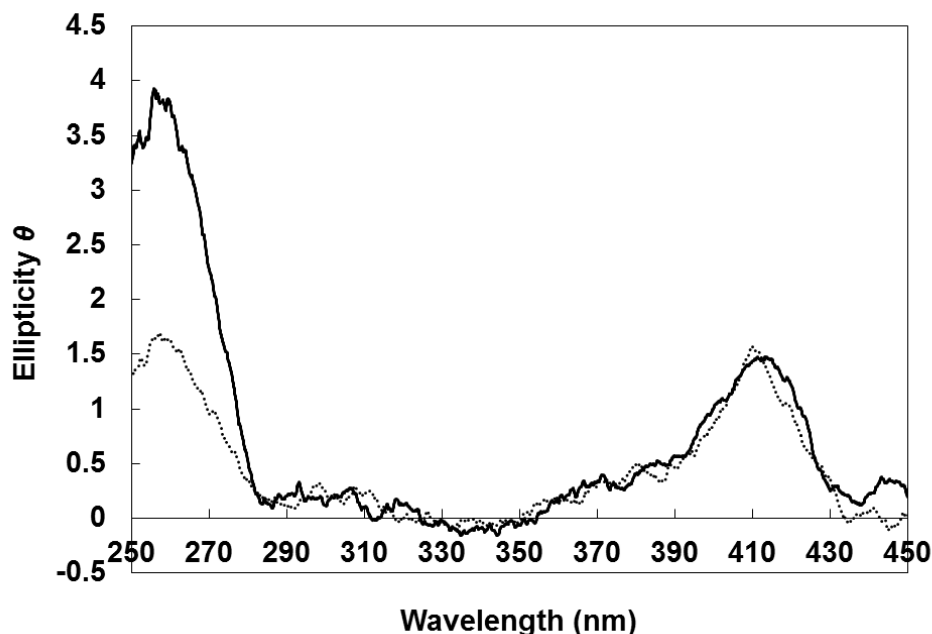


Fig.13 ATP-induced changes in CD spectra of native Mb. The CD spectra with or without 1 mM ATP was measured. 0 mM ATP; (otted line) 1mM ATP; (hick line)

5) 溶液中の Mb 分子サイズと表面電荷に及ぼす ATP の作用 Mb の分子サイズと表面電荷を 5 mM ATP 存在下, 0.1 M KCl 20 mM Tris HCl (pH 7.5) 溶液中で測定した結果を示した。(Fig. 14, Table 1)

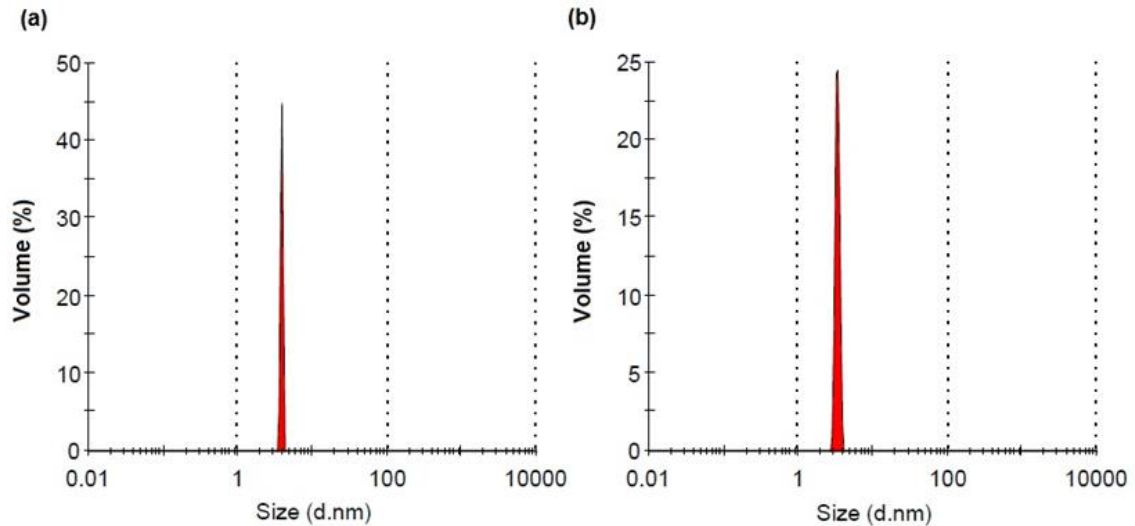


Fig. 14 Size distribution for native Mb with ATP. The molecular size distribution of native Mb by volume in 0.1 M KCl 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) was measured by the dynamic light scattering with or without 5 mM ATP at 15°C. The protein concentration was 1.65 mg/ml. (a) 0 mM ATP, (b) 5 mM ATP

Table 1 The molecular size and zeta potential of tuna Mb with or without ATP

ATP concentration (mM)	Molecular weight (kDa)	Zeta potential (mV) as a globular protein
0	15.5	-4.50
5	11.3	1.32

The measuring conditions were the same as Fig. 14.

Mb 分子サイズは Zeta sizer nano ZS による動的光散乱法で測定した。結果を Fig. 14 に示したが、分子量分布図は ATP の非存在, 存在でそれぞれシャープなシングルピークが得られ, ATP 非存在下で 15.5 kDa, 5 mM ATP で 11.3 kDa という結果が得られた。0 mM ATP での結果は Fig. 1 に示した SDS-PAGE パターンから求

めた 15.3 kDa と近似した結果が得られた。以上の結果は、ATP が存在すると見かけの Mb 分子量は 15.5kDa から 11.3 kDa に変化することを示唆している。また、0 mM ATP でのゼータ電位は-4.50 の負の電荷であったが、5 mM ATP 存在下では 1.32 で正の電荷となり、Mb 分子の表面電荷は ATP の存在により変化することが認められた。(Table 1)

考察

本研究によって、Mbの吸光スペクトルや自家蛍光およびメト化進行に対してATPが強く影響を及ぼすということが明らかにされた。このようなATPの作用が明らかにされたのは、本研究の成果が初めてである。Mbの自動酸化速度はpH低下によって増加することについては多数の報告があるものの、全てATP非存在下で測定された結果である⁷⁻⁹⁾。本研究でもミナミマグロMbを用いてATP非存在下で同様の結果を得ているが、さらに、酸性pH下においてATPが存在すると、マグロMbの自動酸化速度はATP濃度に対応して顕著に抑制されることを明らかにすることができた。

さらに、ATPにより、MbのSoret帯スペクトルの変化、Mb自家蛍光のクエンチング、分子サイズと表面電荷の変化が認められたことから、ATPはミナミマグロMbの分子状態の変化を惹起していることを証明することができた。Mbの光学的な変化はMb分子のゆらぎ状態の変化を反映しているが、ヘム構造がその影響に関与しているかについては推論することは難しい。Mb溶液にATPを混合すると、MbのSoret帯のスペクトル変化が惹起された。MbにATPを添加したことが、ATP非存在下で認められる鋭いSoret帯のスペクトルとはやや異なるスペクトル変化を誘引した。deoxyMb, oxyMb, metMbを使用した分光光学的研究もまた、ATPがグロビンの状態変化を起こしていることを示した。

ATPによりMb自家蛍光も変化した。ATPの有無によるMbのCDスペクトル測定の結果はMb分子状態が変化することを示した。溶液中のMb分子サイズは、ATPが存在すると15.5 kDaから11.3 kDaへと見かけの分子サイズが縮むように変化することを示し、この結果はMbの表面電荷が負から正へ変化することと同調した。これらの発見は、ATPはMbを小さく硬い分子構造状態に変化させ、その結果、リガンドのヘムポケットへの通路を狭い状態へ変化させるので、ATP

の存在下で Mb の自動酸化速度が低下するということを推察させる。細胞内で ATP はミリモル濃度で存在しているので、ATP は Mb 分子状態の機能的な調整に影響する生理的な役割を担っていることを示していると考ええる。

第2章 魚類筋肉ミオグロビンのメト化率測定法の検討

緒言

Mb は deoxy, oxy, met 型で存在しその可視部吸収スペクトルは各型で変化する。Mb のメト化率測定については、マグロ肉メト化率測定法の尾藤法¹³⁾や CO-Mb を調製し求める佐野らの方法^{30,31)}および畜肉 Mb のメト化率測定法³²⁾が報告され応用されている。これらの方法はいずれも、Mb メト化率の算出に際して多くの波長での測定を必要とし操作も煩雑なものが多い。

マグロ Mb 用に確立された簡易測定法の尾藤法は方法が簡単のため、マグロ以外の魚種 Mb のメト化率測定にも応用されている。しかし尾藤法を他魚種に応用した場合、活けしめ直後から高い値を示すことが報告されている¹⁴⁻¹⁷⁾。佐野らはマグロ Mb のメト化率測定方法を報告した論文で、魚種ごとに Mb メト化率測定法を検討する必要性を指摘している³¹⁾。本研究でもカンパチ Mb のメト化率測定に尾藤法を応用したところ、活きしめ直後の筋肉から調製した Mb でもメト化率 20 %程度を示す結果を得たことから、改めて魚類 Mb のメト化率測定法について検討が必要と考えた。

そこで本章では、各種魚類 Mb メト化率測定法について検討を行い簡易測定法を確立した。硬骨魚類と軟骨魚類に関して検討を行い使用した魚種は硬骨魚類ではサバ科 5 種 (ゴマサバ *Scomber australasicus*, マサバ *Scomber japonicus*, ミナミマグロ *Thunnus maccoyi*, カツオ *Katsuwonus pelamis*, クロマグロ *Tunnus thynnus*), アジ科 3 種 (ブリ *Seriola quinqueradiata*, カンパチ *Seriola dumerili*, マアジ *Trachurus japonicus*), マダイ科 1 種 (マダイ *Chrysophrys major*), サンマ科 1 種 (サンマ *Cololabis saira*), ニシン科 1 種 (マイワシ *Sardinops melanostictus*) であり、軟骨魚類はアカシユモクザメ *Sphyrna lewini* について検討を行った。

材料と方法

材料 ブリ (平均体重 4.34 kg), ゴマサバ (平均体重 0.42 kg), マサバ (平均体重 0.55 kg), マダイ (平均体重 2.0 kg), カツオ (平均体重 2.0 kg), カンパチ (平均体重 3.05 kg), マイワシ (平均体重 0.12 kg), サンマ (平均体重 0.17 kg), マアジ (平均体重 0.15 kg) は死後硬直前のものを養殖場あるいは市場にて購入した。クロマグロは一本釣り漁法により漁獲され生きしめされた後市場で解体された生鮮品, アカシユモクザメは延縄で漁獲され市場に搬入後解体された生鮮品よりそれぞれ血合肉を材料として Mb を調製した。ミナミマグロは, 延縄漁法で生きた状態で漁獲され船上で急速凍結(-60°C)した冷凍品から, 冷凍状態で柵取りしたものを購入した。これは実験に供するまで-80°C の冷凍庫で保管した。このサンプルは急速解凍すると解凍硬直を示した。ミナミマグロ Mb は普通肉から調製した。

方法

精製 Mb の調製 第 1 章の Mb 調製法に従い落合ら^{5,6)}の方法に準じた方法で精製 Mb を調製した。また, SDS-PAGE も第 1 章の実験方法と同様に行った。

deoxyMb, oxyMb, metMb の調製 Mb のメト化率測定法を確立するために, deoxyMb, oxyMb, metMb を調製し可視部吸収スペクトルの測定を行った。deoxyMb は精製 Mb 溶液 (0.1 M KCl 20 mM Tris-HCl (pH 7.5)) にヒドロ亜硫酸ナトリウムを 1 % 添加して調製した²⁵⁾。oxyMb は deoxyMb 溶液をスターラーで攪拌して調製したが, deoxyMb から oxyMb 調製時のオキシ化についてはそれぞれの Mb の可視部吸収スペクトルの特徴から 540 nm における吸光値を指標とし, この吸光値が deoxyMb の 556 nm における吸光値を越えた段階で oxyMb が生成

したと判断した。metMb は泉本らの方法²⁶⁾に準じて、精製 Mb 溶液にフェリシアン化カリウムを 3 μ M 添加して調製した。可視部吸収スペクトルの測定は Mb のタンパク質濃度 0.1 - 1.0 mg/ml (0.1 M KCl 20 mM Tris-HCl (pH 7.5)), 測定波長 500 - 700 nm, 25°C で Shimadzu UV-1800 を用いて行った。

Mb の加熱処理 各魚種から調製した oxyMb (treated oxyMb) を加熱処理し可視部吸収スペクトル変化を測定した。oxyMb は精製 Mb (0.1 M KCl 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.5 mg/ml)から前記の方法で調製し、25°C で 1 h 加熱処理を行った。加熱処理 2 min ごとに可視部吸収スペクトルの測定を行った。

統計処理 各状態の Mb のスペクトルを様々なタンパク質濃度で測定した後、各スペクトルが交差する測定波長を決定するために Student's *t*-test による有意差検定を行った。

結果

各魚種 Mb の性状 Fig. 15-a,b に各種魚類 Mb の SDS-PAGE 像を示した。各魚種ともに単一バンドとして検出された。これらの SDS-PAGE により求めた各魚種 Mb の分子量は、マイワシ (14,600), ゴマサバ (14,800), マサバ (14,800), カツオ (14,600), ミナミマグロ (15,300), クロマグロ (15,200), ブリ (15,000), カンパチ (15,000), マアジ (14600), マダイ (15,200), サンマ (15,000), アカシユモクザメ (15,200) であり、魚種により多少の違いはあるが約 15,000 を示した。

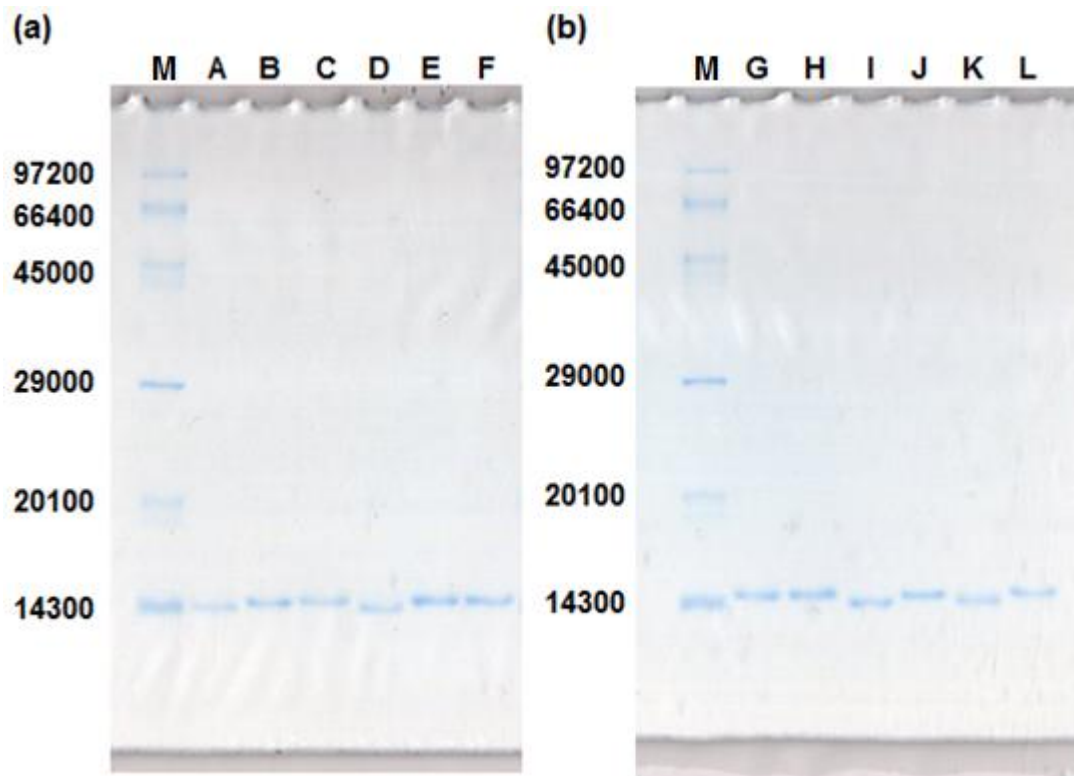


Fig. 15 SDS-PAGE pattern of various Mbs. A: sardine Mb, B: spotted mackerel Mb, C: chub mackerel Mb, D: skipjack Mb, E: southern bluefin tuna Mb, F: bluefin tuna Mb, G: yellowtail Mb, H: amberjack Mb, I: Japanese jack mackerel Mb, J: red seabream Mb, K: pacific saury Mb, L: scallop hammerhead Mb, M: molecular weight markers.

Fig. 16-A, B に各魚種の deoxyMb, oxyMb および metMb の可視部吸収スペクトルを示した。各魚種の Mb は典型的な 3 状態 (deoxy-, oxy-, met-型) の可視部吸収スペクトルを示した。これら 3 状態の Mb 可視部吸収スペクトルはいずれの魚種でも等吸収点 (isosbestic point, IS 点と略) を有した。IS 点の波長と deoxyMb, oxyMb の吸光値が交差する波長(A_0)を Table 2 に示した。各魚種 Mb の IS 点の波長は 523 - 527 nm であり, Mb のメト化率 0% の指標として採用した deoxyMb と oxyMb が交差する波長(A_0)は 547 - 550 nm を示した。

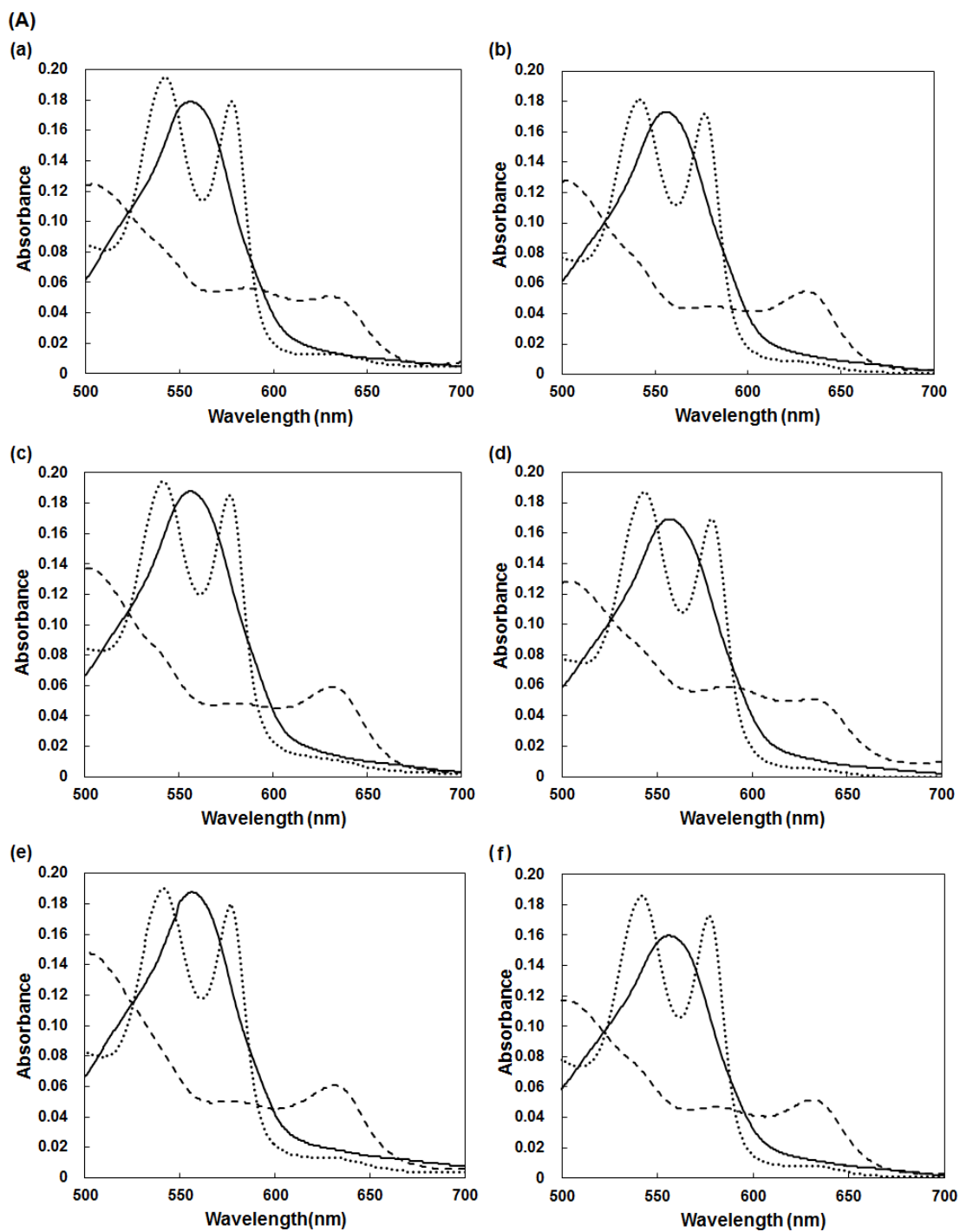


Fig. 16-A Visible absorbance spectra of deoxyMb, oxyMb and metMb from ordinary muscle of southern bluefin tuna and from dark muscle of other fish species. (a) yellowtail, (b) spotted mackerel, (c) chub mackerel, (d) red seabream, (e) southern bluefin tuna, (f) bluefin tuna, The visible absorbance spectra of deoxyMb (—), oxyMb (...) and metMb (---) were measured. Protein concentration of Mb was measured as 0.25 mg/ml in 0.1 M KCl 20 mM Tris-HCl (pH 7.5).

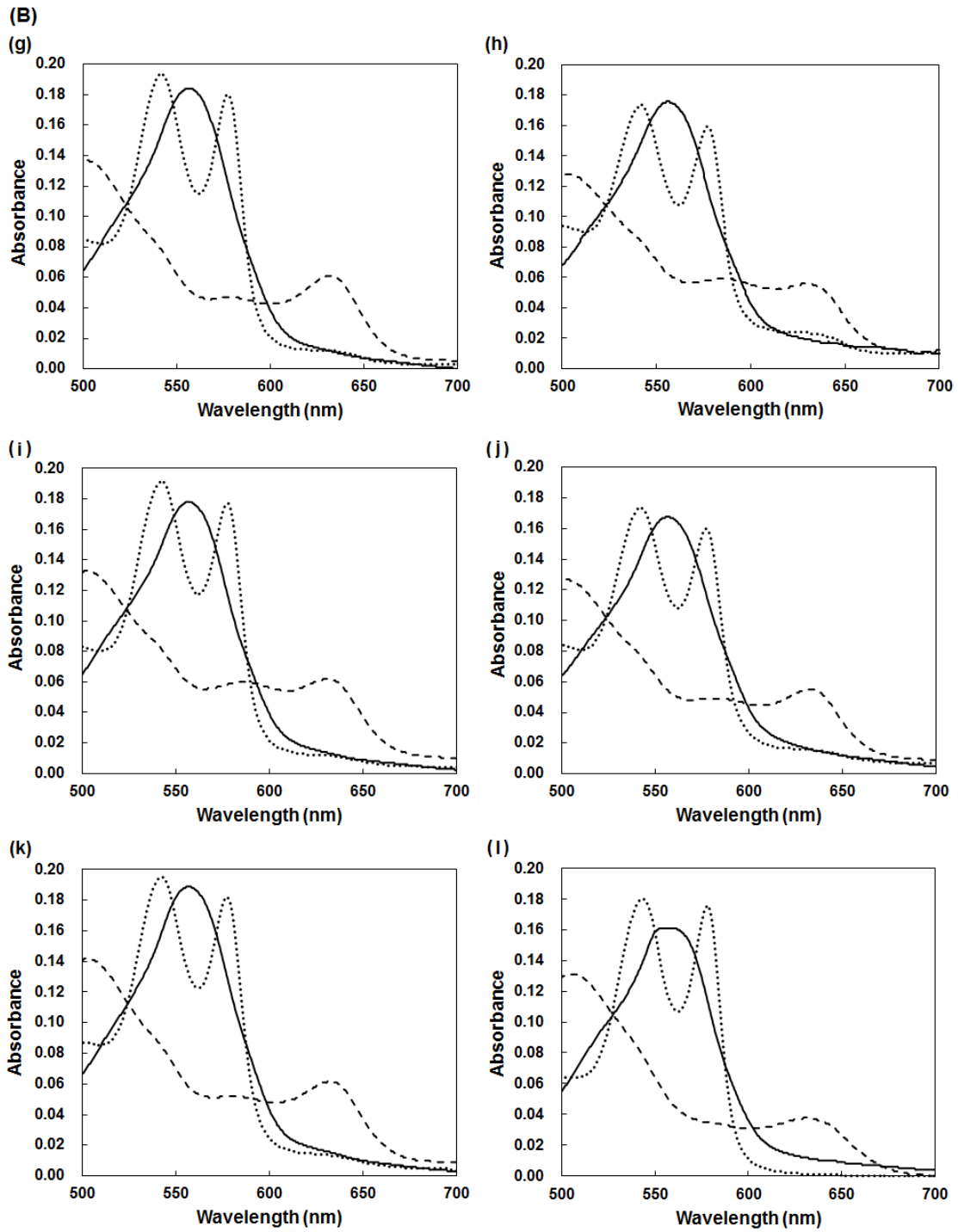


Fig. 16-B Visible absorbance spectra of deoxyMb, oxyMb and metMb from dark muscle. (g) skipjack, (h) amberjack, (i) Japanese jack mackerel, (j) pacific saury, (k) sardine, (l) scalloper hammerhead shark. The visible absorbance spectra of deoxyMb (—), oxyMb (...) and metMb (---) were measured. Protein concentration of Mb was measured as 0.25 mg/ml in 0.1 M KCl 20 mM Tris-HCl (pH 7.5).

Mb メト化率測定法の検討 各魚種 Mb メト化率算出式の検討は、deoxyMb, oxyMb, metMb の可視部吸収スペクトルを測定し、3 状態の Mb が混在しても同一の吸光値を示す IS 点を基準値として利用しメト化率算出式を導出した。各魚種の deoxyMb, oxyMb が交差する波長は 3 点を示したが、3 波長のうち Mb メト化率 0% の指標となる吸光値は 540 nm 付近の値を選択した。(Fig. 17) これらのスペクトル特性を応用し、Mb メト化率算出式を導出した。以下に本研究で検討を行ったブリ Mb を例として説明する。ブリの deoxyMb, oxyMb, metMb の可視部吸収スペクトルを測定した結果を Fig. 17 に改めて示した。

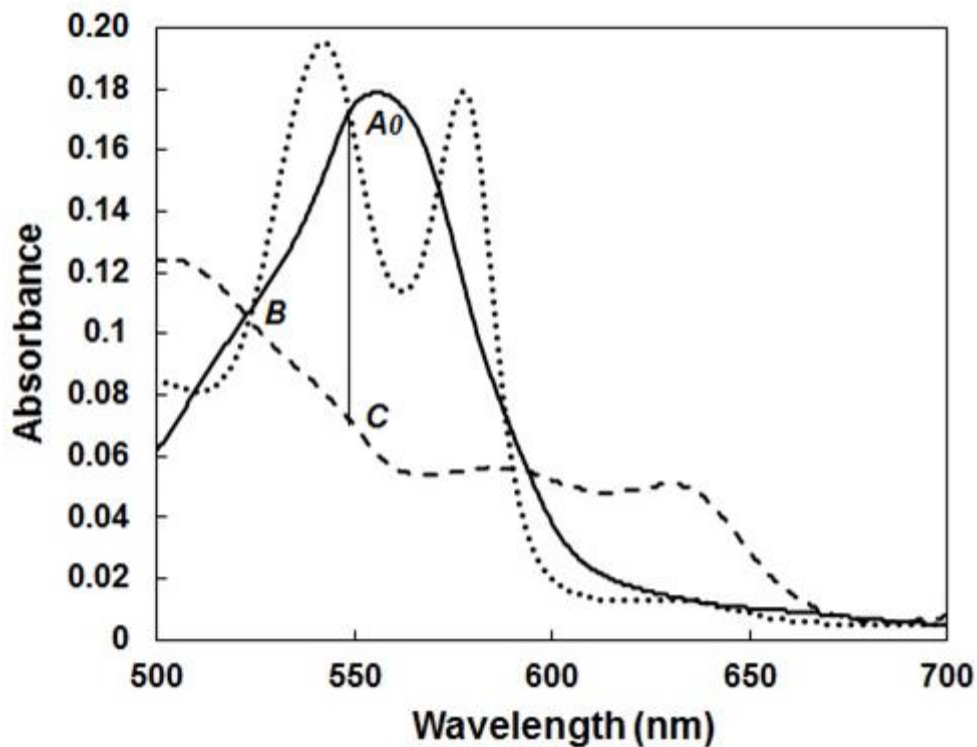


Fig. 17 Visible absorbance spectra of deoxyMb, oxyMb and metMb from yellowtail dark muscle. A_0 is the absorbance of oxyMb at the wavelength of crossing of oxyMb and deoxyMb spectra. B is the absorbance at the wavelength of the isosbestic point. C is the absorbance of metMb at the wavelength of crossing of oxyMb and deoxyMb spectra

IS 点の波長は 524 nm を示し、deoxyMb と oxyMb のスペクトルは 548, 572, 588

nm の 3 波長で交差した。赤色の強さは 540 nm 付近の吸光値が反映されるため、548 nm の吸光値を採用した。この 548 nm における吸光値を A_0 とした。吸光値 A_0 は deoxyMb と oxyMb が同じ値を示す波長での吸光値なので、deoxyMb と oxyMb が混在しているメト化率 0 % の状態を示す値である。IS 点の吸光値 (B) と A_0 の吸光値比 (A_0/B) をメト化率 0% の値とした。一方、メト化率 100 % の吸光値比は、metMb の 548 nm における吸光値 (C) と IS 点である 524 nm の吸光値 (B) を用いて求めた (C/B) 値とした。ブリ Mb のメト化率 0 % の A_0/B 値は 1.65 ± 0.05 (平均値 \pm 標準偏差, $n = 39$) を、メト化率 100 % の C/B 値は 0.65 ± 0.02 ($n = 39$) を示した。以上の結果よりブリ Mb のメト化率算出式 (1) を得た。

$$\text{metMb} (\%) = -99.70 (A/B) + 164.96 \quad (1)$$

なお、 A 及び B は Mb 溶液の $A(548 \text{ nm})$, $B(524 \text{ nm})$ における吸光値である。

また、他の魚種に関しても Fig. 16-A, B の結果より、各魚種 Mb の deoxyMb と oxyMb のスペクトルが交差する波長 (A_0) および IS 点の波長 (Table 2) における吸光値を求め A_0/B 値, C/B 値を算出した結果を Table 3 に示し、Table 2 および 3 の結果より各魚種 Mb のメト化率算出式を求め以下に示した。

Table 2 Wavelength of A_0 and isosbestic point measured in spectra of deoxyMb, oxyMb and metMb prepared from yellowtail, spotted mackerel, chub mackerel, red seabream, southern bluefin tuna, bluefin tuna, skipjack, amberjack, Japanese jack mackerel, pacific saury, sardine, scalloper hammerhead shark.

	Wavelength of A_0 (nm)	Wavelength of I.S. (nm)
yellowtail	548	524
spotted mackerel	547	524
chub mackerel	547	523
red seabream	549	525
southern bluefin tuna	549	524
bluefin tuna	549	523
skipjack	547	524
amberjack	547	527
Japanese jack mackerel	547	524
pacific saury	548	524
sardine	548	524
scalloper hammerhead shark	550	527

A_0 means the wavelength at crossing of spectra of oxyMb and deoxyMb in β peak of oxyMb. I.S., isosbestic point, means the wavelength at crossing of spectra of oxyMb, deoxyMb and metMb.

Table 3 The ratio of absorbance at A_0 and B (100 % oxyMb) or C and B (100 % metMb) of fish Mbs

		Wavelength of A_0 (nm)	Wavelength of I.S. (nm)
yellowtail	(n=39)	1.65 ± 0.05	0.65 ± 0.02
spotted mackerel	(n=19)	1.65 ± 0.03	0.63 ± 0.02
chub mackerel	(n=17)	1.66 ± 0.03	0.65 ± 0.02
red seabream	(n=23)	1.66 ± 0.03	0.66 ± 0.05
southern bluefin tuna	(n=11)	1.69 ± 0.01	0.65 ± 0.02
bluefin tuna	(n=21)	1.65 ± 0.02	0.58 ± 0.03
skipjack	(n=19)	1.65 ± 0.01	0.64 ± 0.02
amberjack	(n=15)	1.45 ± 0.01	0.60 ± 0.02
Japanese jack mackerel	(n=12)	1.66 ± 0.05	0.67 ± 0.06
pacific saury	(n=18)	1.62 ± 0.07	0.61 ± 0.02
sardine	(n=13)	1.60 ± 0.03	0.66 ± 0.006
scallop	(n=10)	1.50 ± 0.02	0.60 ± 0.02
hammerhead shark	(n=10)	1.50 ± 0.02	0.60 ± 0.02

A_0 is the absorbance of oxyMb at the wavelength of crossing of oxyMb and deoxyMb spectra as in Table 2. B is the absorbance at the wavelength of the isosbestic point. The ratio of A_0 / B means 100 % of oxyMb. C is the absorbance of metMb at the wavelength of crossing of oxyMb and deoxyMb spectra as in Table 2. The ratio of C / B means 100 % of metMb. Number shows average value and standard deviation.

ゴマサバ

$$\text{metMb} (\%) = -98.53 (A / B) + 162.83 \quad (2)$$

なお、 A 及び B は Mb 溶液の $A(547 \text{ nm})$, $B(524 \text{ nm})$ における吸光値である。

マサバ

$$\text{metMb} (\%) = -98.79 (A / B) + 164.87 \quad (3)$$

なお、 A 及び B は Mb 溶液の $A(547 \text{ nm})$, $B(523 \text{ nm})$ における吸光値である。

マダイ

$$\text{metMb} (\%) = -100.09 (A / B) + 166.85 \quad (4)$$

なお、 A 及び B は Mb 溶液の $A(549 \text{ nm})$, $B(525 \text{ nm})$ における吸光値である。

ミナミマグロ

$$\text{metMb} (\%) = -96.23 (A / B) + 162.79 \quad (5)$$

なお、 A 及び B は Mb 溶液の $A(549 \text{ nm})$, $B(524 \text{ nm})$ における吸光値である。

クロマグロ

$$\text{metMb} (\%) = -93.83 (A / B) + 154.78 \quad (6)$$

なお、 A 及び B は Mb 溶液の $549(\text{nm})$, $523(\text{nm})$ における吸光値である。

カツオ

$$\text{metMb} (\%) = -99.03 (A / B) + 164.13 \quad (7)$$

なお、 A 及び B は Mb 溶液の $547(\text{ nm})$, $524(\text{nm})$ における吸光値である。

カンパチ

$$\text{metMb} (\%) = -134.84 (A / B) + 195.03 \quad (8)$$

なお、 A 及び B は Mb 溶液の $547(\text{ nm})$, $527(\text{ nm})$ における吸光値である。

マアジ

$$\text{metMb} (\%) = -101.66 (A / B) + 168.39 \quad (9)$$

なお、 A 及び B は Mb 溶液の $547(\text{ nm})$, $524(\text{ nm})$ における吸光値である。

サンマ

$$\text{metMb} (\%) = -98.44 (A / B) + 159.69 \quad (10)$$

なお、*A* 及び *B* は Mb 溶液の 548(nm), 524(nm)における吸光値である。

マイワシ

$$\text{metMb} (\%) = -104.67 (A / B) + 167.83 \quad (11)$$

なお、*A* 及び *B* は Mb 溶液の 548(nm), 524(nm)における吸光値である。

アカシユモクザメ

$$\text{metMb} (\%) = -122.20 (A / B) + 167.74 \quad (12)$$

なお、*A* 及び *B* は Mb 溶液の 550(nm), 527(nm)における吸光値である。

本研究で確立した Mb メト化率測定法と尾藤法との関係 本研究で新たに確立した Mb メト化率測定法で得られる Mb メト化率の値と尾藤法を応用して算出した値との関係について検討を行った。各魚種より調製した精製 Mb の濃度を 0.5 mg/ml に調製し、これにヒドロ亜硫酸ナトリウムを添加して deoxyMb とした後、スターラー攪拌により treated oxyMb を調製した。この treated oxyMb を 25°C で加熱処理した時の可視部吸収スペクトル経時変化を測定した結果を Fig.18-A, B に示した。加熱時間に対応して oxyMb の β ピークと α ピークが減少し metMb の生成が進行した。また、metMb 精製における各スペクトルは Fig.16 の可視部吸収スペクトルで示した IS 点で重なることを示した。また、後述するがここに示した精製 Mb を還元剤や酸化剤で処理して調製した deoxyMb, oxyMb および metMb の可視部吸収スペクトルから求められた IS 点の波長は、native oxyMb の加熱処理で生成した metMb と oxyMb の混合液においても同様に IS 点の波長として確認できた。

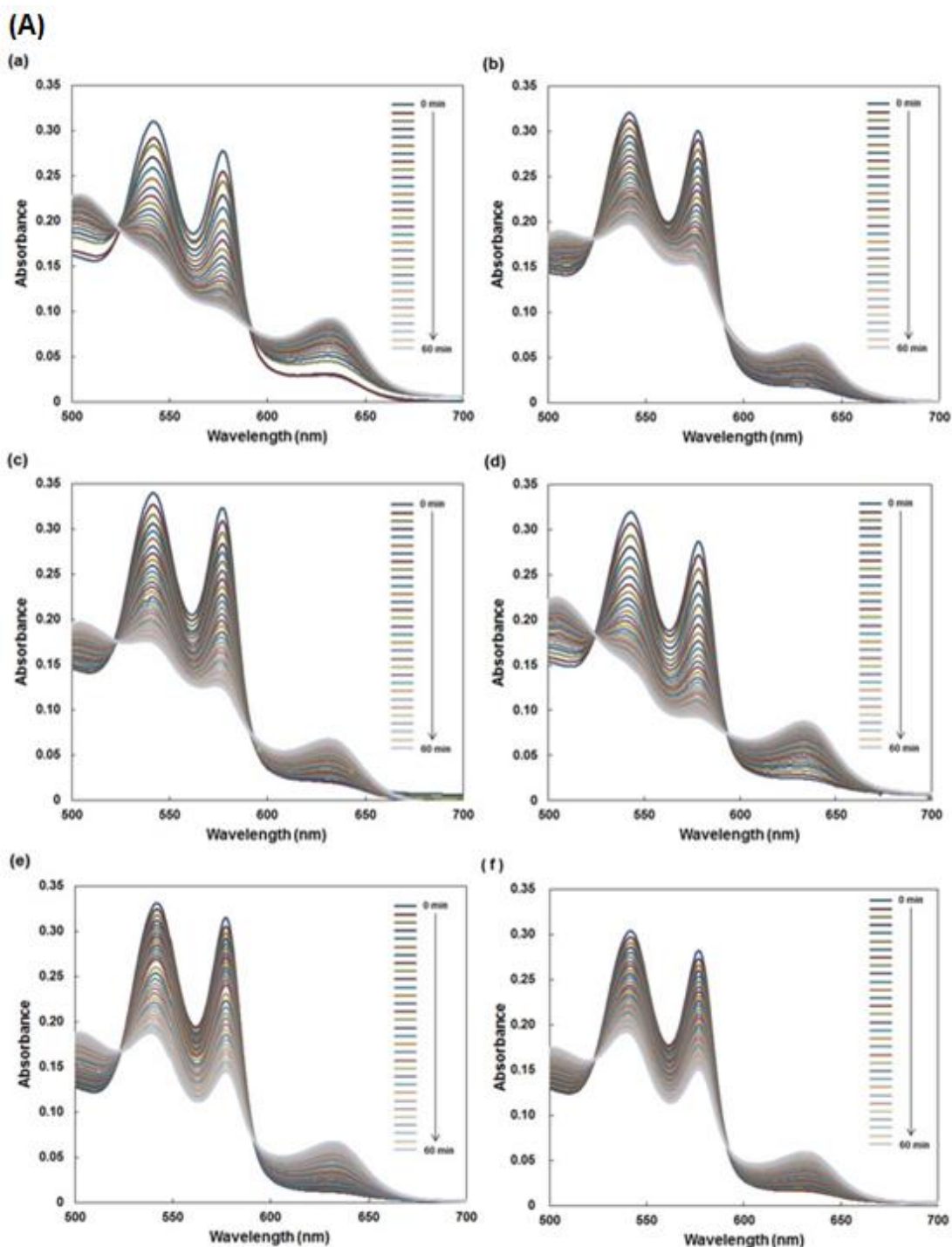


Fig. 18-A Changes in visible absorbance spectra of purified treated oxyMb during heat treatment at 25°C. (a) yellowtail, (b) spotted mackerel, (c) chub mackerel, (d) red seabream, (e) southern bluefin tuna, (f) bluefin tuna. The purified treated oxyMb (0.5 mg/ml) from each fish was treated at 25°C in 0.1 M KCl 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) solution. Measurement of the spectra was carried out every 2 minutes for 1 h. Color lines show incubation time at 25°C.

(B)

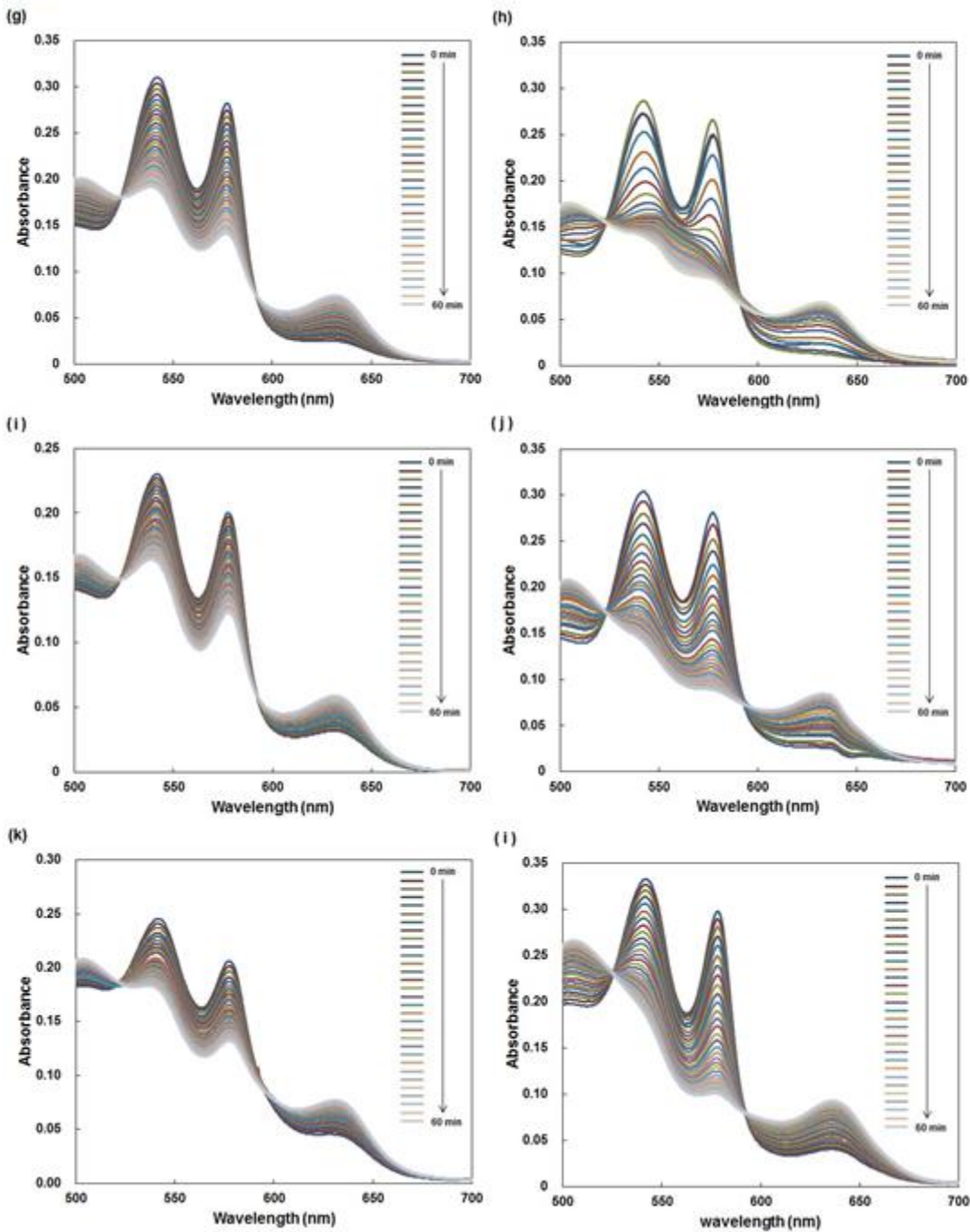


Fig. 18-B Changes in visible absorbance spectra of purified treated oxyMb during heat treatment at 25°C. (g) skipjack, (h) amberjack, (i) Japanese jack mackerel, (j) pacific saury, (k) sardine, (l) scalper hammerhead shark. The purified treated oxyMb (0.5 mg/ml) from each fish was treated at 25°C in 0.1 M KCl 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) solution. Measurement of the spectra was carried out every 2 minutes for 1 h. Color lines show incubation time at 25°C.

Fig. 18-A, B のデータから，本研究により確立した各魚種 Mb のメト化率算出式でメト化率を求めた結果と，尾藤法を応用して得られた結果を Fig. 19-A, B に示した。

ミナミマグロ以外の魚種では，尾藤法を応用して求めた値はメト化率が低い範囲で 15 ~ 25 % ほど高い値を示す結果となった。一方，マグロ類 Mb の場合は，本方法の (5, 6) 式で求めたメト化率と尾藤法で得られるメト化率の値は，尾藤法で 3 ~ 7 % ほど高いもののほぼ同じ値を示す結果となった。

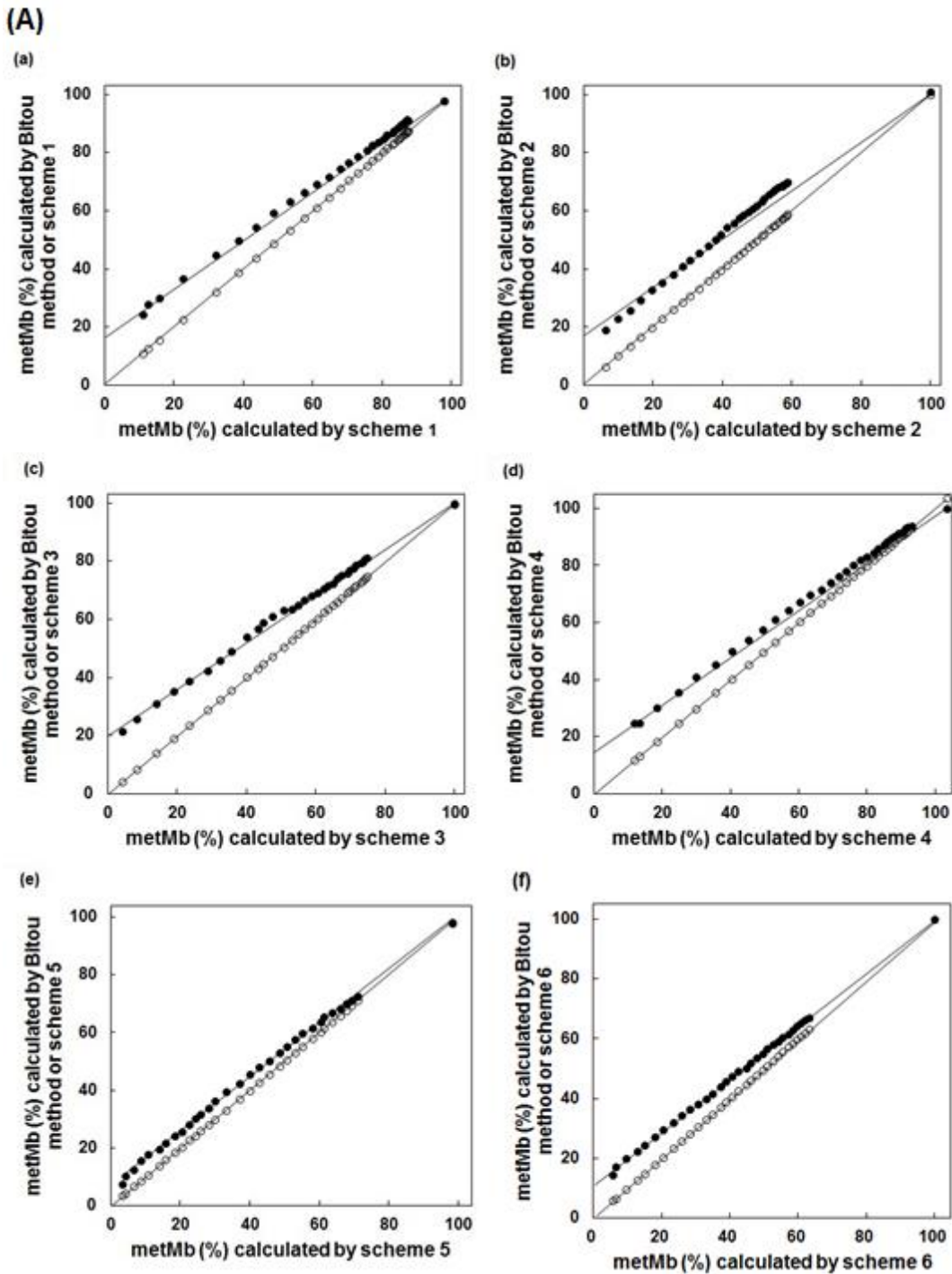


Fig. 19-A The relationship between data on ratio of metMb calculated by the Bitou method and each scheme of (1) – (6) from the spectra shown in Fig. 18-A. (○) : data of ratio of metMb calculated by each scheme of (1) –(6), (●) : data of ratio of metMb calculated by the Bitou method. Scheme (1) : scheme for yellowtail Mb, scheme (2) : scheme for spotted mackerel Mb, Scheme (3) : scheme for chub mackerel Mb, scheme (4) : scheme for red seabream Mb, scheme (5) : scheme for southern blue tuna Mb, (6) .

(B)

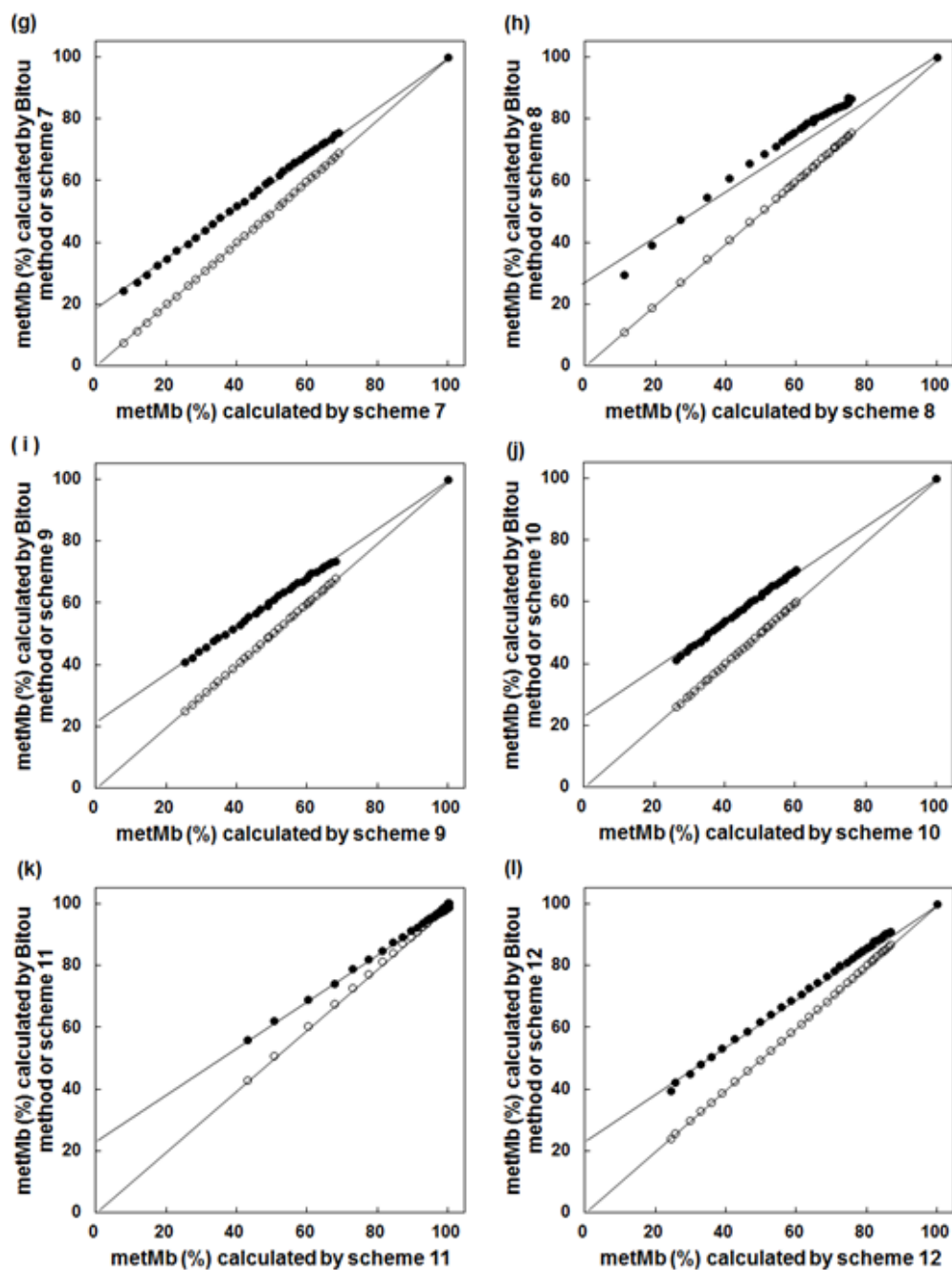


Fig. 19-B The relationship between data on ratio of metMb calculated by the Bitou method and each scheme of (7) – (12) from the spectra shown in Fig. 18-B. (○) : data of ratio of metMb calculated by each scheme of (7) –(12) (●) : data of ratio of metMb calculated by Bitou method. Scheme (7) : scheme for skipjack Mb, Scheme (8) : scheme for amberjack Mb, scheme (9) : scheme for Japanese jack mackerel Mb, scheme (10) : scheme for pacific saury Mb, (11) : scheme for sardine Mb, scheme (12) : scheme for scalloper hammerhead shark Mb.

Fig. 19A, B より, 尾藤法を応用して求めた値と今回確立した各種魚類 Mb メト化率算出式で得られるメト化率がほぼ直線関係を示すことから, 尾藤法を応用して求めた値から正確なメト化率に換算することが可能であることが明らかとなった。各魚種 Mb のメト化率を算出するために尾藤法を応用して求めた値から本研究で確立した方法で正確に求められるメト化率への換算式を魚種ごとに求めることが可能なので以下に示した。

ブリ

$$metMb(\%) = (A - 17.10) \div 0.85 \quad (13)$$

ゴマサバ

$$metMb(\%) = (A - 14.73) \div 0.96 \quad (14)$$

マサバ

$$metMb(\%) = (A - 18.78) \div 0.83 \quad (15)$$

マダイ

$$metMb(\%) = (A - 14.86) \div 0.86 \quad (16)$$

ミナミマグロ

$$metMb(\%) = (A - 7.00) \div 0.94 \quad (17)$$

クロマグロ

$$metMb(\%) = (A - 10.99) \div 0.89 \quad (18)$$

カツオ

$$metMb(\%) = (A - 18.30) \div 0.83 \quad (19)$$

カンパチ

$$metMb(\%) = (A - 22.00) \div 0.79 \quad (20)$$

マアジ

$$metMb(\%) = (A - 21.33) \div 0.78 \quad (21)$$

サンマ

$$\text{metMb}(\%) = (A - 21.09) / 0.81 \quad (22)$$

マイワシ

$$\text{metMb}(\%) = (A - 23.97) / 0.75 \quad (23)$$

アカシユモクザメ

$$\text{metMb}(\%) = (A - 21.84) / 0.80 \quad (24)$$

なお、 A は尾藤法で求めた値である。換算式は Mb メト化率算出式と同様に各魚種間で異なる式を示す結果となった。ミナミマグロの換算式 (17) は、他の魚種の場合に比べて尾藤法で求められる値との差が小さいことを示した。

ゴマサバとマサバのメト化率算出式の関係 両魚種 Mb の IS 点は 524 nm と 523 nm とわずかな差を示したが、両魚種の Mb メト化率算出式の(2)と(3)は非常に近い算出式である。ゴマサバ Mb メト化率算出式 (2)でマサバ Mb メト化率を算出した場合の両値の関係を Fig. 20 に示した。ゴマサバ Mb のメト化算出式を応用して得られた値はマサバ Mb メト化率算出式で得られる値とほぼ同じ値を示したので、マサバ Mb メト化率算出式とゴマサバ Mb メト化率算出式は同じ式として扱えることが明らかとなった。

また同様にミナミマグロとクロマグロで検討した結果を Fig. 21 に示した。クロマグロ Mb メト化率算出式を応用して得られた値はミナミマグロ Mb メト化率算出式で得られる値とほぼ同じ値を示したため、クロマグロ Mb メト化率算出式とミナミマグロ Mb メト化率算出式は同じ式として扱えることが明らかとなった。

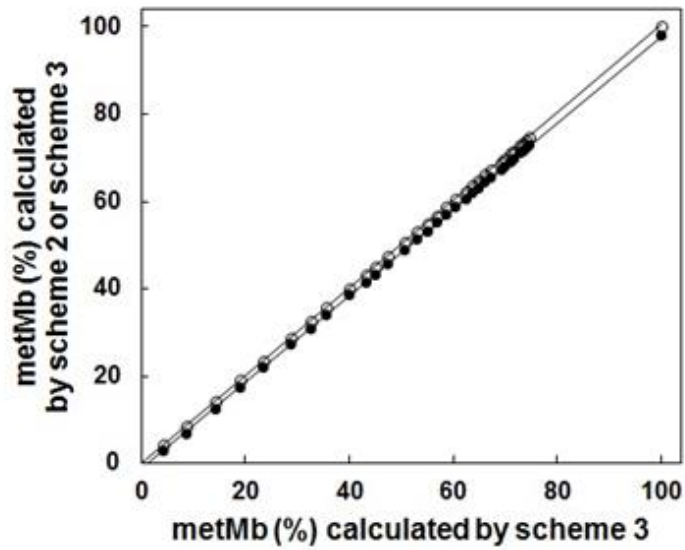


Fig. 20 The relationship between scheme 2 and 3 for spotted mackerel and chub mackerel by using the data of changes in spectra of chub mackerel Mb shown in Fig. 18-c. (○) : data of ratio of metMb calculated by scheme 3 for chub mackerel Mb from Fig. 18-c, (●) : data of ratio of metMb calculated by scheme 2 for spotted mackerel Mb from Fig.18-c.

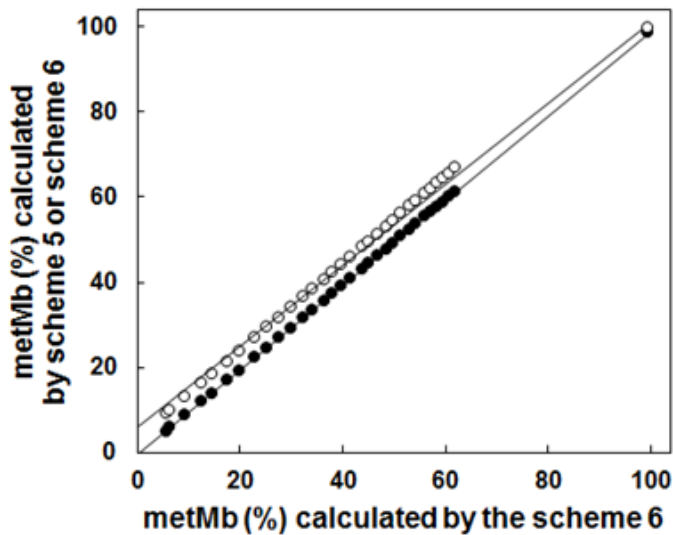


Fig. 21 The relationship between scheme 5 and 6 for southern bluefin tuna and bluefin tuna by using the data of changes in spectra of southern bluefin tuna Mb shown in Fig. 18-e. (○) : data of ratio of metMb calculated by scheme 5 for southern bluefin tuna Mb from Fig. 18-e, (●) : data of ratio of metMb calculated by scheme 6 for bluefin tuna Mb from Fig.18-e.

考察

各魚種の Mb から調製した oxyMb, deoxyMb, metMb の可視部吸収スペクトルはいずれも IS 点を有し, この IS 点における吸収値を基準値としてメト化率測定式 (式 1 - 12) を導くことができた。各魚種 treated oxyMb の加熱処理を行い, 尾藤法で算出される Mb メト化率と比較した結果, 調製直後において尾藤法で得られる値が約 15 - 25 % 高いことを Mb 溶液が清澄であるにもかかわらず確認された。(Fig. 19-A, B)

また, 尾藤法と本研究で確立した Mb メト化率算出法の関係では, 算出される Mb メト化率の両値はすべての魚種でほぼ直線関係を示したことから, 尾藤法を応用して算出した値から正確なメト化率を求める換算式も得られた。

本研究で, 魚種ごとに Mb メト化率測定法の確立が必要であることが明らかとなった。マグロ Mb のメト化率測定方法を最初に確立した佐野らは^{30, 31)} 魚種が異なると測定に使用するカルボニル Mb の α 極大の現れる波長およびこの波長におけるカルボニル Mb と metMb の吸光係数が異なることを予測し, 魚種毎にメト化率測定法を検討しなくてはならないことを指摘している。本研究で, 新たに 12 魚種 Mb のメト化率測定方法を確立することができた。

第3章 魚類ミオグロビンの自動酸化速度の比較検討

緒言

魚肉の血合肉や赤身魚の普通肉の色調は刺身等の重要な品質指標である。魚類 Mb の研究は、各 pH における安定性や自動酸化速度などについて多くの報告がなされている。中でも、Mb は鮮度低下や貯蔵温度などで褐色を呈する metMb を生じて褐変し商品価値の損失につながる事から、畜肉や魚肉の色調保持方法について研究が行われている。

Mb の安定性に関しては、1 章で ATP が魚類 Mb のメト化を抑制することをミナミマグロ Mb を用いた実験で明らかにした。

現在 Mb の構造とその DNA 塩基配列の解読は多くの魚種で進んでおり、Mb 構造の安定性とアミノ酸配列との関係について報告がなされている^{28,29)}。植木らはメバチマグロ Mb のアミノ酸配列の解読を行い、同じサバ科魚類のクロマグロ、キハダ、ビンナガ、カツオ Mb の熱安定性を比較した結果、わずか数か所のアミノ酸配列の相違が熱安定性に寄与していることを明らかにしている。

魚類 Mb の安定性を測定する方法は、示差走査熱量分析や円偏光二色性分析が主に用いられている。DSC を使用し、クロマグロ Mb の熱安定性を検討した結果、pH6.5 で最も高くなることが報告されている^{7,33)}。

Mb のメト化率測定方法については 2 章に 12 魚類 Mb について新たにその測定方法を確立し報告した。そこで本研究では、12 魚類 Mb の安定性を検討するために、各魚種の精製 Mb について各 pH における Mb メト化速度を測定し比較した。

材料と方法

材料 第2章と同じ魚種の血合肉又は普通肉より精製 Mb の抽出を行った

方法

精製 Mb の調製 各種魚類 Mb の調製は、第2章に準じて行った。なお、常法で調製した Mb を native Mb とした。還元処理をして deoxyMb とした後、酸素化して得られる oxyMb は treated oxyMb と表記した。

各 pH 条件下での Mb 加熱処理 メト化速度は、pH 6.0, pH 6.5, pH 7.0, pH 7.5, Mb タンパク質濃度 0.5 mg/ml の条件で2時間加熱処理を行った。前章では、treated oxyMb の加熱処理を 25°C で行ったが、本章では精製直後に得られた Mb (native oxyMb) を対象に実験を行ったところ安定であったため、反応を促進するために加熱処理温度を 30°C とした。可視部吸収スペクトルの測定は加熱処理 2 分ごとに行った。pH 7.5 のサンプルは 0.1 M KCl 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) で平衡化されたゲル濾過により得られた Mb をそのまま使用した。また、Mb 溶液の各 pH の調整は 0.1 M KCl 10 mM phosphate (pH 6.0, 6.5, 7.0) 緩衝液の透析処理で行った。透析方法は、Mb を透析チューブに移し 100 倍量の緩衝液に浸漬して 30 分間行った。なお透析外液の交換は 2 回行った。この方法で透析外液の pH とほぼ同じ pH となることを確かめた。また実験開始時に pH 7.5 の Mb と pH 6.0 の Mb のメト化率の差が 10% 以下となることを確認し実験に供した。

結果

各 pH における Mb のメト化速度の比較 各種魚類 Mb の 30°C におけるメト化速度は、処理時間ごとに各 pH における可視部吸収スペクトルを測定し、Mb メ

ト化率を算出して求めた。Fig. 22 に各 pH におけるクロマグロ native Mb とマダイ native Mb を 30°C 加熱処理したときの可視部吸収スペクトルの変化を例として示した。

クロマグロ Mb メト化率の算出は

$$\text{式(6), } \text{metMb (\%)} = -93.83 (A / B) + 154.78$$

(A 及び B は Mb 溶液の 549(nm), 523(nm)における吸光値)

マダイ Mb メト化率の算出は

$$\text{式(4), } \text{metMb (\%)} = -100.09 (A / B) + 166.85$$

(A 及び B は Mb 溶液の A(549 nm), B(525 nm)における吸光値)

で行った。

Fig. 22 より, pH 6.0 の条件では加熱時間に対応してクロマグロ Mb とマダイ Mb で oxyMb の 540 nm 付近に吸収極大を持つ β ピークと, 580 nm 付近に吸収極大を持つ α ピークが減少し, metMb が生成した。一方, pH 7.5 では, 加熱処理 2 時間後でも β , α ピークが殆ど変化しないことが明らかとなった。

クロマグロ Mb は pH 7.0, pH 7.5, マダイ Mb の pH 7.5 では Mb のメト化は加熱処理 2 時間でもほとんど進行しないが, pH 6.0, 6.5, 7.0 におけるクロマグロ Mb はマダイ Mb よりも各 pH におけるメト化の進行が遅い結果が認められた。これら Fig. 22 から各 pH における, Mb メト化率の変化を求め, 加熱時間との関係を Fig. 23 に示した。ここよりメト化速度 K_{met} を求め, Fig. 24 に示した。

クロマグロ Mb とマダイ Mb の各 pH における Mb メト化速度 K_{met} は, クロマグロ Mb で pH6.0; 0.013 min⁻¹, pH6.5; 0.014 min⁻¹, pH7.0; 0.011 min⁻¹, pH7.5; 0.010 min⁻¹, マダイ Mb は pH6.0; 0.050 min⁻¹, pH6.5; 0.038 min⁻¹, pH7.0; 0.017 min⁻¹, pH7.5; 0.010 min⁻¹であった。クロマグロ Mb とマダイ Mb メト化速度は pH 6.0, pH6.5 で大きな差を示したが, pH 7.5 ではほぼ同じ値であった。

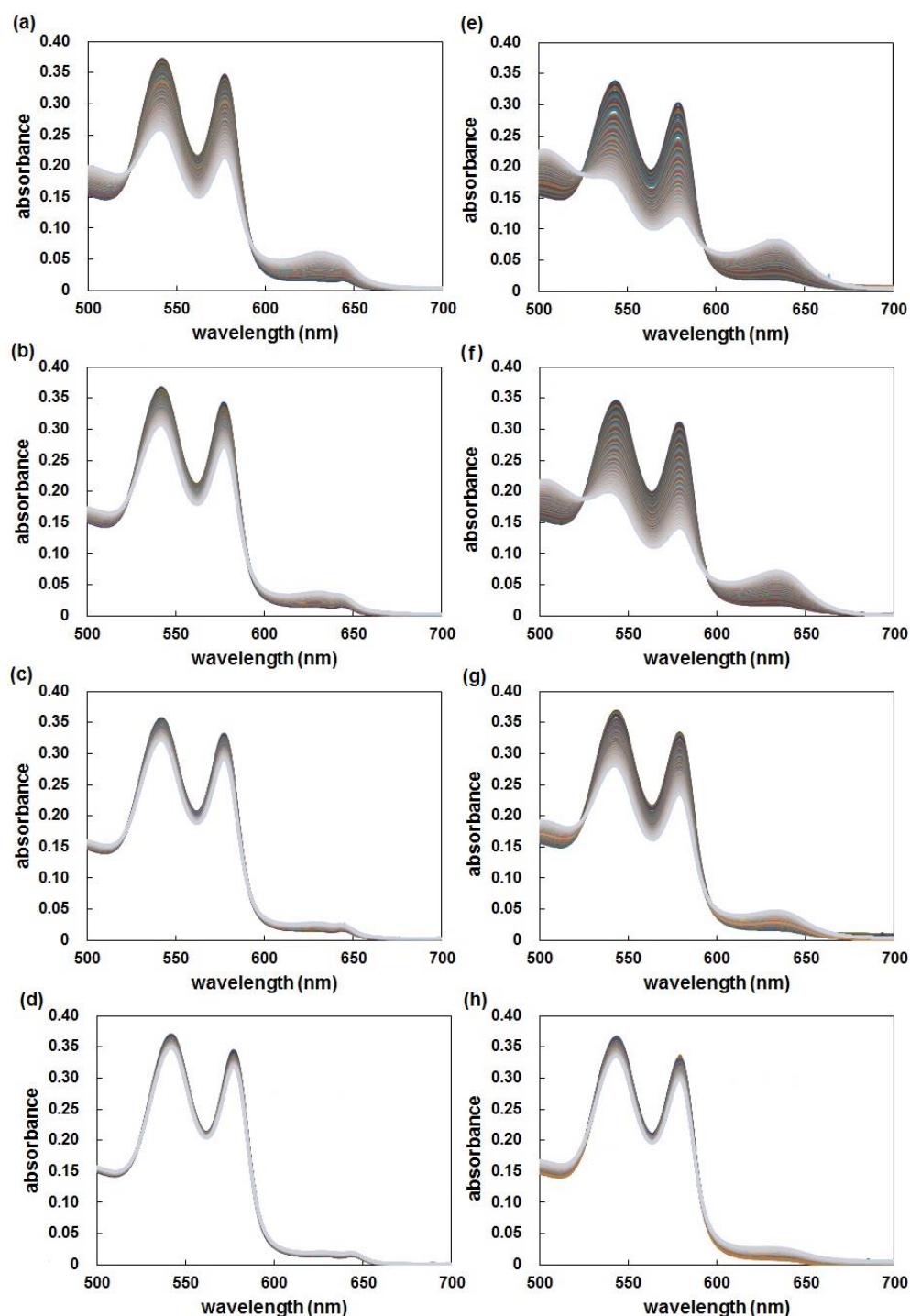


Fig. 22 Changes in visible absorbance spectra at various pH conditions of purified bluefin tuna native Mb (a, b, c, d) and purified red sea bream native Mb (e, f, g, h) during heat treatment at 30°C. (a, e) pH 6.0, (b, f) pH 6.5, (c, g) pH 7.0, (d, h) pH 7.5. The purified oxyMb (0.5 mg/ml) was treated at 30°C in 0.1M KCl 10mM phosphate at pH over a range of 6.0 to 7.0 and 0.1M KCl 20mM Tris HCl (pH7.5) solutions. Measurement of the spectra was carried out every 2 minutes for 2 hours.

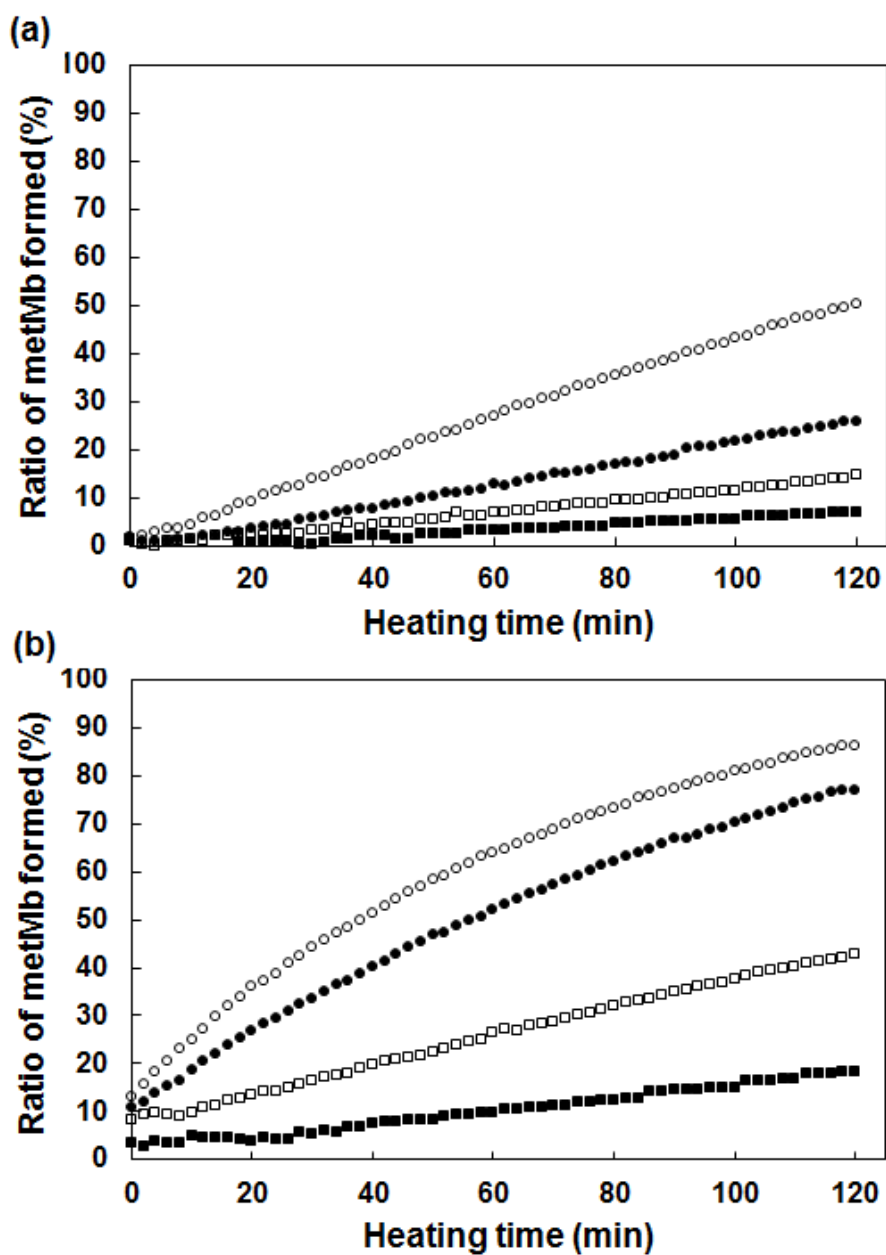


Fig. 23 Changes in the ratio of metMb formed in purified bluefin tuna native Mb and red sea bream native Mb at various pH conditions at 30°C. (a); bluefin tuna, (b); red sea bream. The discoloration of Mb was measured at 30°C in 0.1M KCl at the pH over the range of 6.0~7.5. (■) pH 7.5, (□) pH 7.0, (●) pH 6.5, (○) pH 6.0

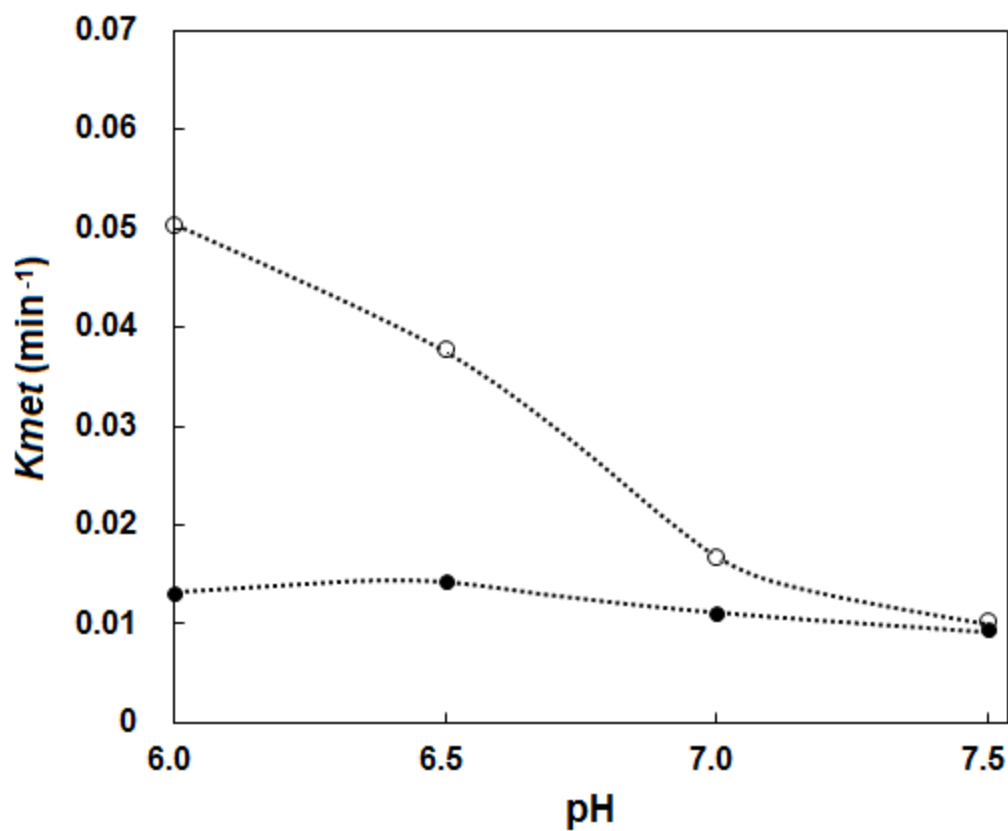


Fig. 24 Effect of pH on the autoxidation rate constant value (K_{met}) of purified bluefin tuna native Mb and purified red sea bream native Mb 30°C. K_{met} was calculated by a first-order reaction analysis from the data of Fig. 23. (○) red sea bream, (●) bluefin tuna

同様の試験を Mb を調製した 12 魚種について行い、各 pH におけるメト化速度 K_{met} を求めた結果を Table 4 に示した。pH 7.0, pH 7.5 のメト化速度 K_{met} は、各魚種はいずれも小さく、pH 6.0 のメト化速度 K_{met} は大きい結果となった。一方ミナミマグロやクロマグロ Mb では pH 6.0-7.5 における K_{met} の差が小さい結果が得られた。

また、近縁種同士で比較を行うとマサバ Mb とゴマサバ Mb のメト化速度 K_{met} は各 pH でほとんど同じ値を示し、ミナミマグロ Mb とクロマグロ Mb でも同じ傾向が認められた。

Table 4 Autoxidation rate constant (K_{met}) of various fish Mbs at each pH.

	pH6.0	pH6.5	pH7.0	pH7.5
yellowtail	0.040	0.015	0.007	0.004
spotted mackerel	0.053	0.017	0.015	0.009
chub mackerel	0.042	0.014	0.014	0.011
red seabream	0.050	0.038	0.017	0.010
southern bluefin tuna	0.015	0.011	0.008	0.007
bluefin tuna	0.013	0.014	0.011	0.010
skipjack	0.041	0.008	0.006	0.002
amberjack	0.024	0.013	0.009	0.009
Japanese jack mackerel	0.025	0.015	0.009	0.005
pacific saury	0.056	0.017	0.007	0.004
sardine	0.066	0.018	0.014	0.009
scallop hammerhead shark	0.042	0.012	0.007	0.004

These numbers shows K_{met} (min^{-1}) calculated by ratio of metMb formed.

pH 6.0における Mb のメト化速度 K_{met} は魚種により差があり K_{met} の大きい魚種から、マイワシ>サンマ>ゴマサバ>マダイ>アカシユモクザメ=マサバ>カツオ>ブリ>マアジ>カンパチ>ミナミマグロ>クロマグロであった。一方、pH 6.5になると多くの魚種の K_{met} は 0.01 min^{-1} 台となるがマダイ Mb のみが 0.038 min^{-1} という高い値を示した。マダイ Mb のメト化速度は pH の変化に対して敏感であることが示唆された。

treated oxyMb と native oxyMb のメト化速度の比較 2章で新たに確立した Mb メト化率測定方法と尾藤法との関係を求めるに当たり、treated oxyMb を 25°C で加熱処理した時の可視部吸収スペクトルの経時変化を測定した。この時の Mb の pH は pH 7.5 の条件であったが 25°C という条件にもかかわらず、oxyMb の 540 nm 付近に吸収極大を持つ β ピークと、580 nm 付近に吸収極大を持つ α ピークが減少し、加熱時間に対応して metMb が生成した。pH 7.5 で特に Mb のメト化速度が遅かった 6 魚種（ゴマサバ、マサバ、ミナミマグロ、マダイ、ブリ、カンパチ）について、 30°C における treated oxyMb のメト化速度を算出し、pH 7.5 の native oxyMb のメト化速度と比較した結果を Table 5 - a, b に示した。

Table 5 The autoxidation rate (K_{met}) of native oxyMb and treated oxyMb of spotted mackerel, chub mackerel, southern bluefin tuna, red seabream, yellowtail, amberjack, at pH7.5 at 30°C

(a)

	spotted mackerel	chub mackerel	southern bluefin tuna
native oxyMb	0.009	0.011	0.007
treated oxyMb	0.275	0.094	0.066

(b)

	Red seabream	Yellowtail	Amberjack
native oxyMb	0.014	0.004	0.010
treated oxyMb	0.099	0.165	0.244

native oxyMb とヒドロ亜硫酸ナトリウム添加により得られた treated oxyMb とのメト化速度 K_{met} の値は、8-40 倍程度の差があることが明らかとなった。以上の結果から還元剤処理により調製した treated oxyMb の分子状態は native Mb と大きく異なり、メト化が進行しやすい状態となっていることが示唆された。

考察

本研究では 12 魚種の Mb メト化速度を pH 6.0–7.5 条件下で測定した。その結果 pH 6.0 においてメト化速度 K_{met} は、大きな値となり酸性 pH 下処理により Mb 分子がメト化しやすい分子状態に変化したことを示した。魚種により、酸性 pH 下におけるメト化速度 K_{met} に差が認められ、Mb の酸変性に対する感受性が異なることが明らかとなった。

Mb 分子で酸変性がし易い魚種としては、ブリ、ゴマサバ、マサバ、マダイ、カツオ、サンマ、マイワシであり、これに対して変性しにくい魚種としてはクロマグロ、ミナミマグロ、カンパチ、マアジであった。Mb の酸変性感受性が異なる結果が明らかになったことは興味深い結果である。

一方、還元剤処理で調製した treated oxyMb のメト化は、native Mb に比べて非常に早くメト化することが明らかとなった。これは還元剤処理により Mb 分子のグロビン画分の状態が大きく変化していることを示すものであり、Mb 研究ではこの様な還元剤、酸化処理を行う場合、その影響について注意を払う必要があることを示している。

第4章 筋肉内 ATP による冷凍カンパチ血合肉の褐変抑制

緒言

1章において、ATPはMbの加熱変性メト化抑制作用を示すことを確認した。ATPは生体内物質であり、魚類筋肉には8–10mM存在する。魚の活きしめ方法や保存温度等により、死後のATP濃度の経時変化は影響を受ける。血合肉や赤身魚の普通肉は色素タンパク質のMbを多量に含むため、鮮度低下や-20°Cのような冷凍食品流通温度での貯蔵流通中にmetMbが生成蓄積し、肉色が褐色に変化するため刺身としての商品価値を失う。魚肉血合肉や赤身魚普通肉の冷凍貯蔵中のMbのメト化抑制法としては、-35°C以下の超低温保蔵が有効でありマグロの冷凍貯蔵流通に応用されているが、³⁴⁾他の魚種では超低温流通はコストが高く利用されていない。本研究で対象とした養殖カンパチやブリを海外へ冷凍品として輸出する際には-20°Cで流通しているため、血合肉の褐変が問題となる。-20°Cにおける魚類血合肉の褐変はMbのメト化を原因としているが、これを抑制する技術の開発は水産業界から強く要望されているものの有効な方法は開発されていない。なお、血合肉の褐変を抑制するために一酸化炭素処理をしたブリ類の冷凍品が米国など限られた国へ輸出されているが、一酸化炭素処理で生成するCO-Mbは独特なピンク色を呈し、さらに鮮度が低下しても色の変化が起きにくいことから消費者が鮮度誤認を起こすことが指摘され、日本やEUなどでは許可されていない方法である³⁵⁾。水産物を高品質な状態でグローバルに流通させるためには、-20°C流通で一酸化炭素処理によらない褐変抑制方法の開発が必要である。

第1章において、生体内エネルギー物質のATPがマグロMbの熱処理におけるメト化を抑制することを明らかにした。本章ではATPの機能に着目し、魚肉中に含まれるATPが-20°C貯蔵における血合肉のメト化進行に及ぼす影響につ

いて明らかにすることを目的に養殖カンパチを用いて試験を行った。すなわち、養殖カンパチを水揚げする場合、活けしめ後、海水氷溶液中で冷却と放血処理を行うが、この時間を調整することにより ATP 濃度が異なる魚肉フィレを調製した。得られたフィレを -50°C で急速凍結し、その後 -20°C で4ヶ月間貯蔵を行い、筋肉内 ATP 濃度と Mb のメト化進行との関係について分析を行った。血合肉の褐変の程度は Mb のメト化率を指標にして測定した。

また、メト化率測定は血合肉から調製した cMb 溶液を用いるが、cMb 溶液の濁度はスペクトル測定に影響を及ぼすので、cMb 溶液の清澄化法についても検討し、カンパチ Mb メト化率測定法を確立した。

材料と方法

材料 鹿児島県桜島沖で養殖されたカンパチ 15 尾 (平均体重 3.14 kg) を活けしめして試料とした。延髄刺殺により活けしめ後、脱血と冷却処理のために海水氷溶液中で 1, 2, 3, 5, 7 時間保持した後、各時間に 3 尾からフィレを調製し、それを幅約 5 cm に切断したものをエアブラスト (-50°C) にて凍結した。これらを真空包装後、 -20°C で 0, 1, 2, 3, 4 ヶ月貯蔵したものを試験サンプルとした。 -20°C 貯蔵期間の影響は同一個体毎に識別して、個々の変化を追跡した。

方法

カンパチ精製 Mb の調製 カンパチ Mb の調製は前章と同様の方法でカンパチ血合肉より行った。

Mb メト化率測定法 Mb メト化率の測定は、Mb の抽出調製時間を短縮するた

めに cMb 溶液で分析した。cMb 溶液の調製は以下の方法で行った。冷凍カンパチ血合肉を半解凍状態まで解凍し、これに 5 倍量の氷冷した 0.1 M KCl 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) 溶液を加えてホモジナイズし、その後遠心分離を行い cMb を調製した。尾藤法では水抽出液をフィルター処理しサンプル調製を行っているが、カンパチ cMb 溶液では後述するように溶液の濁度が問題となった。そこで本研究では Mb 溶液の硫酸分画処理による清澄化を検討し、それを応用して調製した cMb 溶液によるメト化率測定を確立した。カンパチ Mb のメト化率は 2 章で得られた式(8), $metMb (\%) = -134.84 (A/B) + 195.03$ を使用した。

なお、 A 及び B は Mb 溶液の 548 (nm), 524 (nm) における吸光値である。

魚肉 pH の測定 pH の測定は、冷凍状態で細切した魚肉に 5 倍量の氷冷した 20 mM モノヨード酢酸ナトリウム溶液を添加しホモジナイズ後、pH メーターで測定した。

ATP 濃度の測定 魚肉に含まれる ATP 濃度の分析は槌本らの方法³⁶⁾ に準じて行った。ATP 濃度の測定は高速液体カラムクロマトグラフィー自動分析システム(島津製作所製)を用い、GS-320 7E Shodex-Asahipac カラムを使用して行った。測定条件は、分析溶離液として 200 mM リン酸バッファー (pH 2.9) を使用し、検出波長 260 nm で測定した。

統計処理 各試験の測定は 3 検体以上で行い、データの有為差は Student's t -test で解析した。

結果

筋肉粗抽出液での Mb メト化率測定方法の検討 筋肉 Mb のメト化率測定では、

一般的に筋肉から抽出された溶液をフィルター処理して分析に供されている。魚肉のホモジナイズを遠心分離処理して得られる上清には濁りがあり、分光分析に供することができない。カンパチ血合肉から抽出した cMb 抽出液は油脂を含み濁りがあるため 0.45 μ フィルターでの処理ができなかった。本研究で溶液の清澄化法として硫酸分画法の応用を検討した。濁りを除去するために、ろ紙 (No3) 処理, 硫酸分画処理およびゲルろ過処理を行ない, 濁りの低減効果と可視部吸収スペクトル分析で得られるメト化率について比較した結果を Fig. 25 および Table 6 に示した。

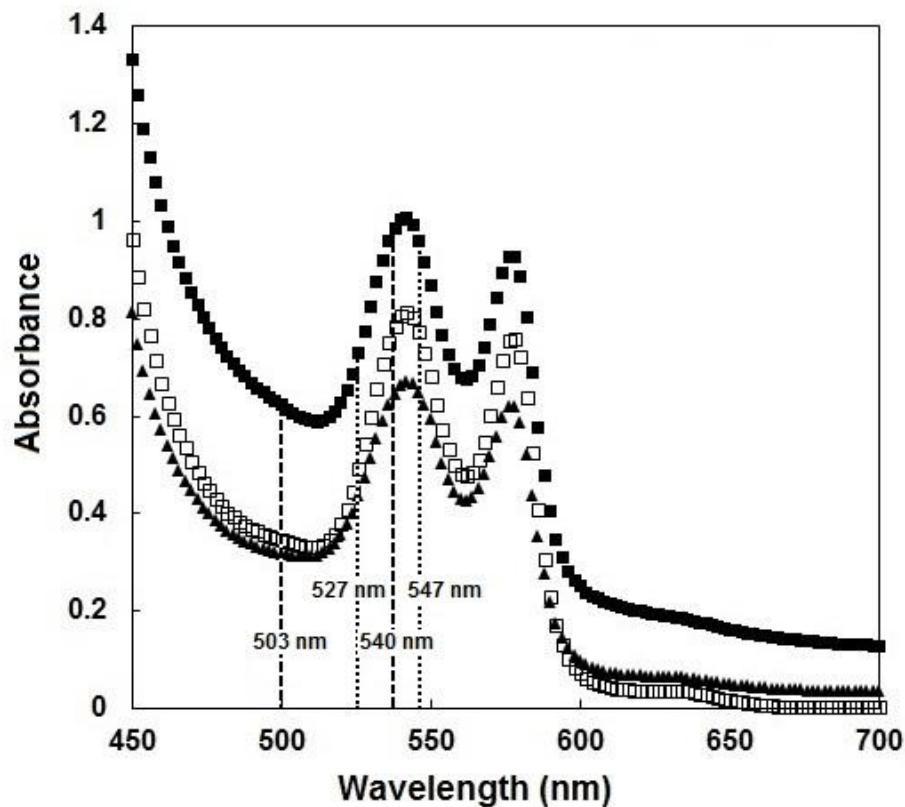


Fig. 25 Visible absorbance spectra of filtered crude extract, supernatant by ammonium sulfate fractionation with 55% saturation and purified Mb. (■): crude extract filtered by paper filter No. 3, (▲): supernatant obtained by ammonium sulfate fractionation with 55% saturation, (□): purified Mb

Table 6 Effect of turbidity of Mb solution and ammonium sulfate (A.S.) fractionation on the measurement of ratio of metMb

	crude Mb filtered by paper filter (No. 3)	Supernatant of crude Mb fractionated with 55% A.S.	Purified Mb
metMb (%)	26.3	1.9	1.9

The ratio of metMb was calculated from the data of Fig.25.

ろ紙によるろ過処理では濁りは低減せず、濁度があると見かけの吸光値が高くなりメト化率は26.3%と高い値として計算された。55%飽和硫酸処理の遠心分離上清溶液は清澄化し、可視部吸収スペクトルは濁度の影響が低減したことを示した。このメト化率は1.9%であり、さらにゲルろ過処理をして精製 Mb として求めたメト化率と同値を示した。以上の結果から筋肉抽出液の55%飽和硫酸処理の遠心分離上清をメト化率測定溶液として使用した。精製 Mb の調製では Mb 粗抽出液から夾雑タンパク質を除き、さらに次工程でゲルろ過法による精製を行うために Mb 濃縮を飽和硫酸濃度70-90%で行うが、1回目の硫酸分画処理後の遠心分離上清は清澄化することを経験していた。そこで硫酸分画1回処理において遠心分離上清が清澄化する飽和硫酸濃度を検討したところ、45~55%で清澄な溶液が得られメト化率が一定の値を示すことを確認した。(Table7)

Table 7 Effect of ammonium sulfate (A.S.) fractionation on absorbance of supernatants fractionated by A.S. precipitation and centrifugal separation from cMb solution

	Supernatant of saturated A.S. fractionation			
	40% A.S.	45% A.S.	50% A.S.	55% A.S.
547 nm	0.209	0.195	0.186	0.178
527 nm	0.148	0.134	0.127	0.121
metMb(%)	4.61	1.92	1.93	1.94

Supernatants were separated from cMb solution by A.S. fractionation with 40, 45, 50 and 55% saturated A.S., respectively. The ratio of metMb was calculated by scheme 8.

また、精製した Mb から調製した Mb および精製 Mb から調製した metMb の可視部吸収スペクトルは 55 %飽和硫酸溶液中と硫酸を含まない溶液中で差がなく、精製 Mb のメト化率は硫酸無しで 10.4 %，硫酸存在で 11.5 %を示したので、55%飽和硫酸存在は Mb の可視部吸収スペクトルの測定とメト化率の算出に影響は無いと判断した。(Fig. 26) 以上の結果からカンパチ血合肉 Mb のメト化率測定は、ろ紙 (No. 3) でろ過した cMb 抽出液を 55 %飽和硫酸で分画し、遠心分離して離して得られる清澄上清液の 527 nm と 547 nm における吸光値を測定する方法として確立した。

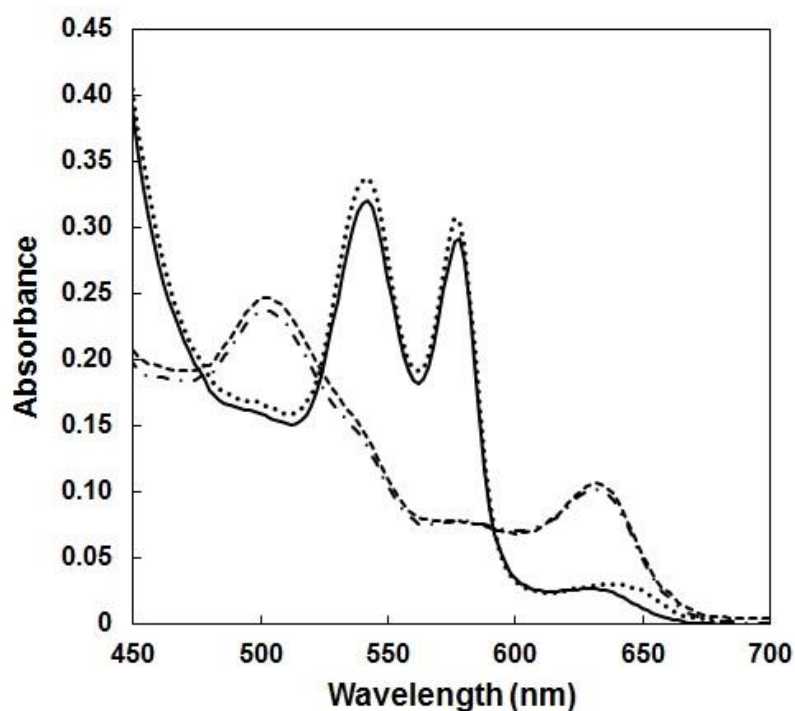


Fig. 26 Effect of ammonium sulfate on the visible absorption spectra of oxyMb and metMb. The visible absorption spectra of purified oxyMb and metMb of amberjack were measured with or without 55% ammonium sulfate (A.S.). oxyMb: without A.S.(—), with A.S. (...), metMb: without A.S. (-·-), with A.S. (---)

さらに、Mb 濃度とメト化率との関係について、精製 Mb を用いて測定した結果を Table 8 に示した。本研究で確立したカンパチ Mb メト化率測定法では、Mb 濃度 0.05 から 1.0 mg/ml (547 nm の吸光値では 0.034 から 0.753) において、ほぼ同じメト化率を示した。従い、筋肉抽出液の 55%飽和硫安処理上清の 547 nm の吸光値が 0.035 以上 0.75 以下の範囲でメト化率を算出することとした。

Table 8 Effect of protein concentration of Mb on the measurement of ratio of metMb

	0.01mg/ml	0.05mg/ml	0.1mg/ml	0.25mg/ml	0.5mg/ml	1.0mg/ml
metMb(%)	0.74	1.95	1.97	1.97	1.93	1.92
absorbance at 547 nm	0.008	0.034	0.067	0.103	0.253	0.753

The ratio of metMb in native purified Mb of amberjack was measured at various concentration of protein and calculated by scheme 8. The absorbance at 547 nm of native Mb at various concentration of protein was measured.

カンパチ血合肉の-20℃貯蔵における Mb のメト化と ATP 濃度との関係 カンパチを-20℃で貯蔵した際に血合肉のメト化の進行に及ぼす ATP の影響を測定するために、養殖カンパチ 15 尾を使用し、活けしめ後、海水氷溶液中で各時間浸漬したサンプルを作製した。各サンプル魚肉の ATP 濃度と pH を Fig. 27 に示した。活けしめ後 1, 2 時間のサンプルの ATP 濃度は 3 $\mu\text{mol/g}$ と高濃度で残存しているが、3 時間頃から減少が始まり、5, 7 時間のサンプルでは 1 $\mu\text{mol/g}$ 前後となった。活けしめ後の経過時間毎の魚肉 pH は 6.8-6.6 を示し、海水氷溶液中での放血冷却の経過時間とともに低下傾向を示したが 0.2 程度の範囲内であった。

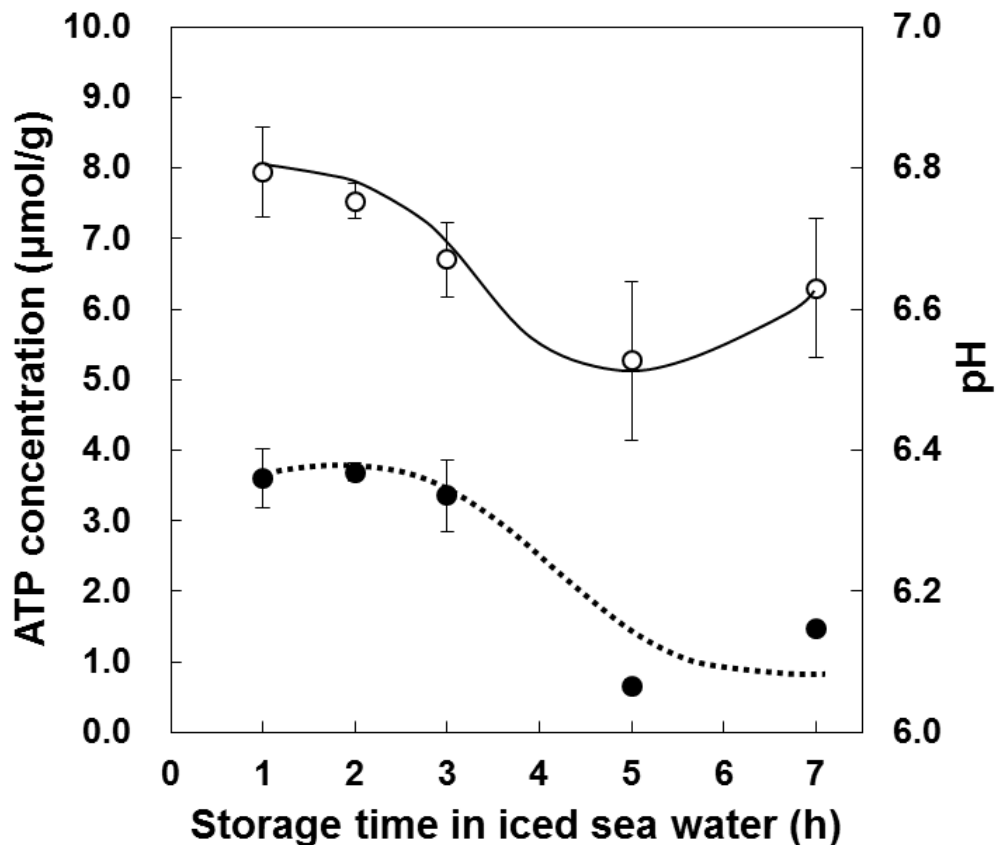


Fig. 27 Changes in ATP concentration and pH in amberjack muscle during storage in iced water. (●) : ATP concentration, (○) : pH

各サンプルフィレを -50°C のエア-ブラストで急速凍結後、真空包装し -20°C で4ヶ月間貯蔵したときの血合肉 Mb のメト化率の経時変化を Fig. 28 に示した。 -20°C 貯蔵期間毎に、活けしめ後の海水氷溶液保持時間が 1 時間の血合肉 Mb メト化率を基準として、海水氷溶液保持時間が異なる各サンプルのメト化率との有意差を検定した。 -20°C 貯蔵開始時（温度調整をするために -20°C 貯蔵 1 日目に測定）では、平均メト化率に 22 % から 33 % とややばらつきはあるが各サンプル間で有意差は認められなかった。 -20°C 貯蔵期間と共に各サンプルともメト化率は上昇するが、活けしめ後の海水氷溶液中での保持時間が短く ATP 濃度が高いサンプルでメト化の進行は遅いことを示した。 -20°C 貯蔵 30 日のメト化率では、活けしめ後海水氷溶液浸漬 1 時間のサンプル（メト化率 37.6 %）に対して 7 時間のサンプルのみがメト化率 57.3 % で有意差 ($p < 0.01$) を示した。貯蔵 60 日では活けしめ後 1 時間のサンプル（メト化率 45.1 %）に対して 3, 5, 7 時間のサンプルのメト化率は、それぞれ 53.5 %, 61.6 %, 64.3 % で有意差 ($p < 0.05$) を示した。貯蔵 90 日では活けしめ後 1 時間のサンプル（メト化率 48.8 %）に対して 2, 3, 5, 7 時間のサンプルにおいて有意差 ($p < 0.01$) を示した。貯蔵 120 日では、活けしめ後 1 時間のサンプル（メト化率 51.9 %）に対して有意差 ($p < 0.01$) を示したのは、3, 5, 7 時間のサンプルであり、活けしめ後 7 時間ではメト化率が 70 % に達した。以上の結果は、凍結前の魚肉の鮮度状態（ATP 濃度の高低）が凍結保蔵中の血合肉のメト化進行に影響することを示唆している。

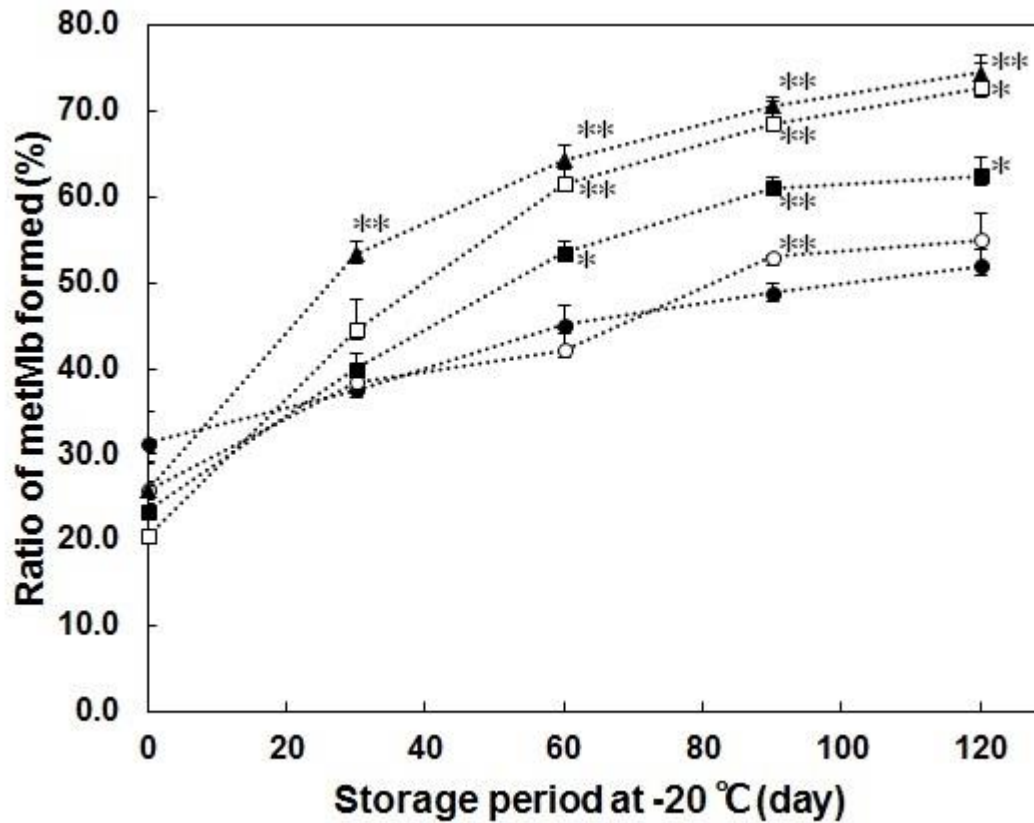


Fig. 28 Effect of postmortem time in iced water until freezing on metMb formation during frozen storage at -20°C for four months. Postmortem time: (●) 1h, (○) 2h, (■) 3h, (□) 5h, (▲) 7h. Each fillet sample was frozen at -50°C by air blast, packed in plastic bag and then stored at -20°C. The first day of measurement of metMb formation was the day stored at -20°C for 1 d. **: ($p < 0.01$) Significant difference with respect to the 1h sample. *: ($p < 0.05$) significant difference with respect to the 1h sample.

考察

4章では、ブリ類の冷凍流通で技術課題となっている -20°C など通常の冷凍食品や冷凍水産物の流通貯蔵温度における血合肉の褐変に対する筋肉内 ATP の抑制作用を明らかにすることを目的とした。研究には養殖カンパチを用いたが、魚種ごとに Mb のメト化率測定法の検討が必要であることを確認したので、2章で確立したカンパチ Mb メト化率測定法を使用した。

本研究で対象としたカンパチ冷凍品の輸出流通では、冷凍コンテナの温度は -20°C であることを検証している。この温度での流通貯蔵では1から2ヶ月程度で血合肉の褐変が進行することが経験されている。これは、Fig. 28の筋肉内 ATP 濃度が低い状態でのカンパチを冷凍貯蔵した場合に1ヶ月で Mb のメト化率が50%を超えた結果に対応している。

一方、Fig. 28の結果から、筋肉内 ATP 濃度が高い状態で冷凍貯蔵すると Mb のメト化率の上昇速度は遅くなることが示された。図には示さないが -20°C 貯蔵におけるメト化率上昇速度と筋肉内 ATP 濃度との関係を解析したところ、強い相関($r = -0.715$)を示すことを認めた。また、1章においてマグロ Mb の 25°C 熱処理におけるメト化は生理的な濃度の ATP により抑制されることを報告した。Fig. 28の結果は、 -20°C のような温度帯での貯蔵中に進行する Mb のメト化は、筋肉内 ATP により抑制されることを示唆している。魚肉鮮度と冷凍貯蔵温度およびメト化の進行に関しては、橋本らにより興味深い報告⁸⁾がなされている。すなわち、K 値 0.8 以下の高鮮度状態で冷凍したマグロ肉は -20°C 冷凍貯蔵でもメト化の進行は遅く、 -40°C 貯蔵と同等の保蔵効果が期待されることを報告している。報告された鮮度の指標が K 値であり ATP 濃度に関する記載はないものの、我々が本研究で得た結果に対応する内容であると推察している。

第5章 総括

本研究では、冷凍水産物の一般的な流通温度の -20°C における凍結保蔵中に、魚肉 Mb のメト化が進行し商品価値を失うという課題の解決に資する技術開発につながる研究に取り組んだ。すなわち、凍結前の魚肉鮮度がメト化進行に影響することを科学的に明らかにするために、生体内エネルギー物質の ATP に着目して研究を進めた。一方、本研究では Mb のメト化率を重要な品質指標として測定したが、研究の過程において水産物の Mb 研究で広く使われてきた尾藤法は、マグロ Mb 以外の魚種の Mb のメト化率測定に応用できないことが明らかとなった。そのため、本研究では新たに 12 種の魚類 Mb のメト化率測定法について検討しなおして簡易測定法を確立し、その測定法を応用して研究を進めた。

まず始めに、マグロ Mb のメト化率測定法として開発された尾藤法が他の魚種 Mb のメト化率測定に応用できない原因について以下に考察する。

魚類 Mb のメト化率測定方法としては、マグロ Mb を対象とした尾藤法¹³⁾、カルボニル Mb と metMb を調製して求める佐野らの方法^{30, 31)}、および畜肉 Mb のメト化率測定法³²⁾を利用した方法などが報告されている。尾藤法に比べて他の方法は煩雑なため、水産物 Mb の一般的な品質分析法としての応用例は少ない。そのため、尾藤法はマグロ Mb を対象として確立されたメト化率の簡易測定法であるが、マグロ以外の魚種の Mb のメト化率測定にも応用されてきた¹⁴⁻¹⁷⁾。本研究ではカンパチ Mb のメト化率の測定に尾藤法を応用したところ、活きしめ直後の高鮮度状態やカラムクロマトで精製した直後の状態の良い Mb でもメト化率が 20 %以上の高い値を示すことを認めた。尾藤法では筋肉水抽出液で分光分析をするために、メト化率が高い場合、溶液の濁りが原因ではないかと指摘されたりしている³⁷⁾。本研究では濁りのない精製 Mb でマグロ Mb とカンパチ Mb の deoxyMb, oxyMb, metMb のスペクトル特性を比較検討し、Fig.29

に示した。

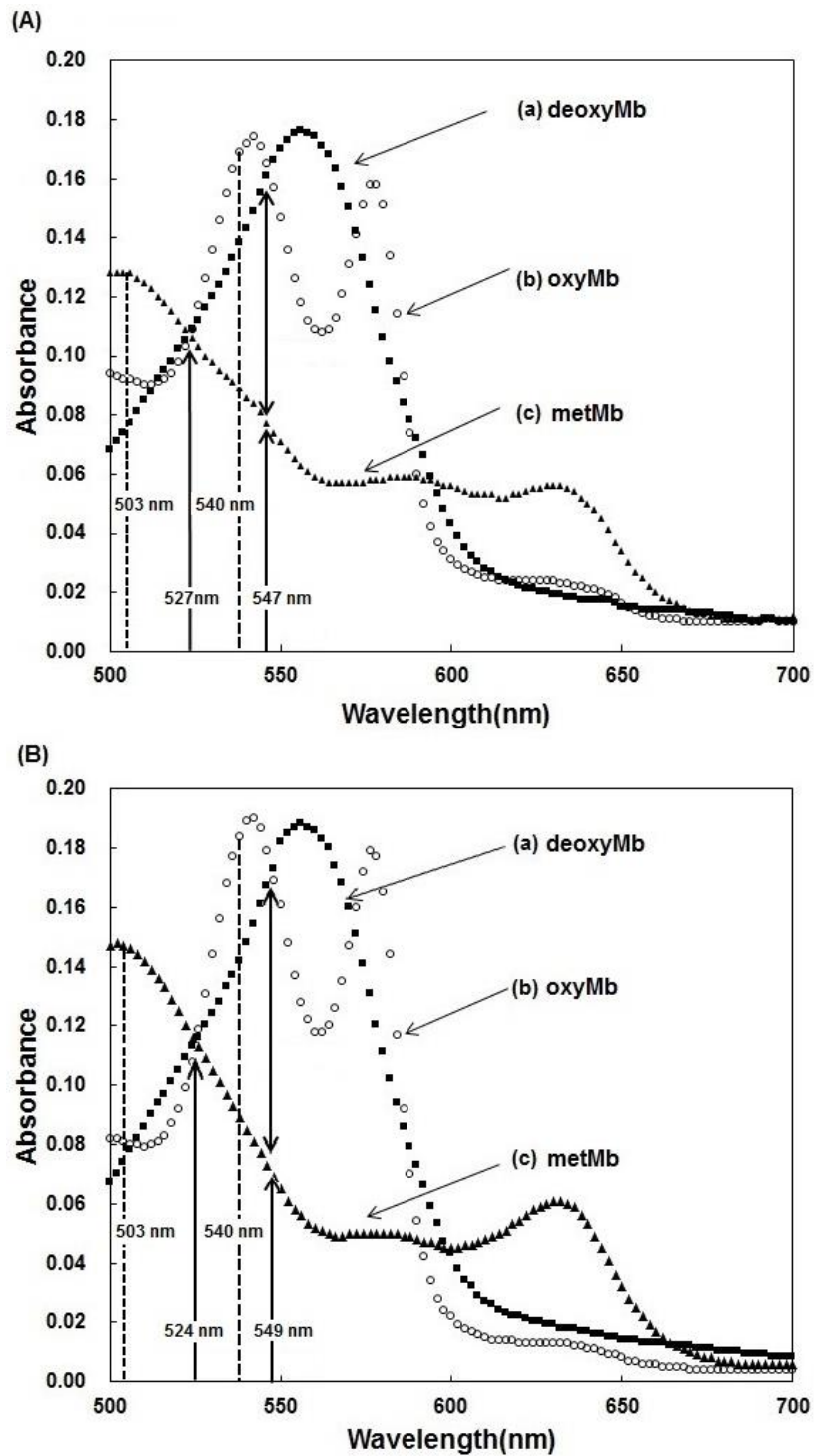


Fig. 29 Visible absorbance spectra of deoxyMb, oxyMb and metMb from dark muscle of amberjack and ordinary muscle of southern bluefin tuna. (A) amberjack, (B) southern bluefin tuna, (a) : deoxyMb, (b) : oxyMb, (c) : metMb, Protein concentration of Mb was measured as 0.25 mg/ml in 0.1 M KCl 20 mM Tris-HCl (pH 7.5)

尾藤法については、第1章の測定方法の項で方法を示したが、測定波長として503 nmと540 nmを使用している。どちらも metMb と oxyMb の吸光値の違いを利用し、両方の波長における値は metMb と oxyMb の存在比を表すものとして扱い、それぞれ2変数となるため、503 nm と 540 nm における吸光値比と標準曲線からメト化率をもとめる方法となっている。503 nm の吸光値は主に metMb の存在量を示す値となるが、この波長における metMb と oxyMb の吸光値の差が重要である。

カンパチでは、精製した Mb 溶液を用いてメト化率を測定しているため溶液は清澄であり濁りの影響は無いと判断されるが、Table 8 に示したカンパチ精製 Mb のメト化率 (1.9%) を尾藤法で計算すると 14.9% となった。また、Fig. 29 には (A)カンパチ Mb と(B)ミナミマグロ Mb の3状態の Mb の可視部吸収スペクトルを示したが、503 nm におけるミナミマグロとカンパチそれぞれの oxyMb と metMb の吸光値との関係を吸光値比 (oxyMb/metMb) で比較すると、ミナミマグロで 0.59 ± 0.06 ($n = 11$), カンパチで 0.66 ± 0.05 ($n = 11$) と大きく異なる結果が得られた。尾藤法で採用されている測定波長の 503 nm (metMb の吸収極大波長として定義されている) における metMb と oxyMb の吸光値比がマグロ Mb と大きく異なるためであることが明らかとなった。他魚種と比較するためにブリ、ゴマサバ、マサバ、マダイの Mb の可視部吸収スペクトル測定結果 (Fig. 16-A) から 503 nm における oxyMb と metMb の吸光値比 (oxyMb/metMb) を求め Table 9 に示した。ミナミマグロ Mb の吸光値比は 0.59 と他魚種の吸光値比と大きく異なる結果となった。すなわち、マグロ以外の各魚種 Mb の 503 nm における oxyMb の吸光値がマグロ Mb に比べて metMb の吸光値に近い値を示しているため、尾藤法を応用して計算すると metMb がほとんど生成していない場合でもメト化率が高く算出される結果となることが明らかとなった。

Table 9 The ratio of the absorbance of oxymyoglobin and metmyoglobin at 503 nm

yellowtail (<i>n</i> = 39)	spotted mackerel (<i>n</i> = 19)	chub mackerel (<i>n</i> = 17)	red seabream (<i>n</i> = 23)	southern bluefin tuna (<i>n</i> = 11)
0.64 ± 0.08	0.62 ± 0.02	0.64 ± 0.03	0.64 ± 0.04	0.59 ± 0.06

Number shows average value and standard deviation.

本研究では各魚種の metMb と oxyMb の 503 nm における関係がそれぞれ異なる結果が得られたが、これは佐野らが Mb のメト化率測定法を確立した論文で魚種毎にメト化率測定方法を検討することが必要と指摘したことに対応した結果であると考えられる³¹⁾。ヘム構造は同一なのに oxyMb, deoxyMb, metMb の可視部吸収スペクトルやこれらスペクトルの関係が魚種により異なる結果が得られることを説明するためには、ヘム構造とタンパク質との関係について検討が必要である。魚肉のヘムはヘム *b* であり、Mb のタンパク質とは非共有結合により結合している³⁸⁾。また、ヘムはその大きさから、相対的にヘムに比べて巨大な Mb 分子に埋まっている状態にある。しかも、Mb タンパク質は一酸化炭素や酸素などと結合するときに分子形状を変えることが報告されている³⁹⁾。Mb メト化率測定法が魚種ごとに異なる理由を明らかにするためには、魚種ごとの Mb タンパク質の構造特性とヘムとの関係についてさらに研究が必要である。

本研究では第2章で示したように Mb のメト化率測定方法について、新たに12魚種についてメト化率測定式を導出することができた。このメト化率算出式の導出は、Fig. 16-A, B に示したように、各魚種の精製 Mb を得、これを酸化剤および還元剤で処理して調製した deoxyMb, oxyMb, metMb の可視部吸収スペクトルを測定することにより行うことができた。この手法において、いずれの魚種 Mb のスペクトルでも deoxyMb, oxyMb, metMb の各スペクトルが一点で交わる isosbestic point を確認することができたので、メト化率算出式の導出は非常に簡便となった。このような手法で行うことができた理由として、deoxyMb,

oxyMb, metMb の調製に使用した Mb は精製した Mb であったためであると推察している。従来行われていた Mb のメト化率算出に関わる式を導出するための実験では, cMb が使用された。cMb 溶液中には Fig. 1 に示したように夾雑タンパク質が多量に含まれている。そのため deoxyMb, oxyMb, metMb を調製するために酸化剤あるいは還元剤処理を行うと, Mb 以外のタンパク質にも影響して溶液の濁度上昇が起るため Mb のスペクトルを正確に測定することができなかつたと推察した。本研究では, 落合の方法を応用することにより精製 Mb を短時間で調製することが可能となり, その結果精製 Mb を用いた deoxyMb, oxyMb, metMb のスペクトル測定ができた。このような各種魚類の精製 Mb を用いた deoxyMb, oxyMb, metMb のスペクトル測定とこれを利用したメト化率算出式の導出は, 本研究で初めて行われた。

12 魚種の Mb のメト化率算出式が得られたので, Mb の自動酸化速度をメト化率の上昇速度を指標にして測定した。(Table 4) その結果, 魚種によって 30°C における Mb のメト化速度の pH 依存性が異なることが明らかになった。pH 6.0 におけるメト化率上昇速度は, イワシ, サンマ, サバ, マダイ, カツオで非常に速いのに対して, ミナミマグロ, クロマグロでは遅いという結果となり, 前者の Mb は酸性 pH への感受性が高く, pH 6.0 で容易にメト化が進行するような状態変化を起こすことが示唆された。この結果は Mb の魚種特性を表している。なお, この研究を行う際に, Mb の還元剤処理で得られた deoxyMb に酸素通気をして調製した oxyMb を用いた場合, native Mb に比べてメト化率上昇が非常に速くなることが確認された。(Table 5-a, b) この結果は, Mb を還元剤や酸化剤で処理すると, Mb 分子はメト化が進行し易い状態に変化することを示唆している。Mb 研究では, 特に, 魚類の Mb では分子が非常に不安定であるため, Mb の調製過程や保存中に metMb になってしまうことがある。このような場合,

還元剤処理を行って deoxyMb を調製して研究を行うことがあるが、ここで得られる Mb の分子状態は、native Mb のものとは大きく異なっていることを認識して研究をする必要があることを示唆している。以上では魚類 Mb のメト化率測定法に関する研究結果について考察した。本研究で、各種魚類 Mb のメト化率測定について問題なく測定をすることが可能となった。

次に、Mb 分子に対する ATP の作用について考察する。本研究では、先ず溶液中の Mb に対するモデル試験で、Mb の熱変性におけるメト化を ATP は抑制することが確認された。さらに、養殖カンパチを用いた筋肉内 ATP 濃度の異なる冷凍フィレを調製して行った -20°C 貯蔵試験で、ATP 濃度が高いフィレでメト化の進行が抑制されることも確認された。この試験結果は、鮮度が良い魚肉を冷凍保存した場合は、魚肉品質が良く保たれ、凍結保存中のメト化進行も遅くなる理由の一つは、ATP により Mb のメト化が抑制されることを示唆するものである。ATP による筋肉タンパク質の変性抑制については、緒方らは筋原線維タンパク質の冷凍変性抑制について、Yuan らは筋小胞体 Ca-ATPase の冷凍変性抑制作用を報告している^{11, 22)}。筋原線維タンパク質のミオシンは ATPase 作用を有し、筋小胞体タンパク質も Ca-ATPase であり、いずれも ATP を基質としているので、これらのタンパク質に対して ATP が高い親和性を有し変性抑制作用を示すことは推察することができる。一方、Mb と ATP の相互作用に関する研究報告を調査したが認めることは出来なかった。本研究では、Mb の可視部吸収スペクトル、CD スペクトル、自家蛍光、動的散乱法で測定される溶液中の分子サイズおよび表面電荷を指標に、ATP との相互作用について検討を行った。

(Fig. 14, Table 1) その結果、いずれの測定指標においても ATP が存在した場合としない場合で、Mb の分子状態が異なることが示された。Mb の自家蛍光は、ほぼ 0.6 mM の ATP でクエンチングしたが、Mb 分子表面におけるトリプ

トファンを指標としてタンパク質の状態・形状が変わったことを示唆する結果である。また、動的光散乱法で求めた溶液中の見かけの分子サイズは、ATP 非存在下で 15.5 kDa, ATP 存在下で 11.3 kDa と大きく異なる結果となった。以上の結果から ATP が存在すると Mb 分子の状態が変化し、全体的に縮んだ構造となることが推察された。

Mb の自動酸化に Mb の分子状態や安定性が影響することに関しては、数多くの研究がなされている。例えば、Chow は、各種魚類 Mb のグアニジン塩酸処理に対する安定性と自動酸化速度に対する影響について研究を行い、Mb の安定性が低いものは自動酸化速度が速いという結果を報告した¹⁹⁾。Sugawara ら⁴⁰⁾ および Shikama¹⁾ は、ヘム鉄 (II 価), 尿素で変性した Mb, 未変性 Mb を用いて Mb 分子中の Fe(O₂) の安定性や自動酸化速度に対するグロビン画分の役割を測定した。その結果は、水溶液中の遊離ヘム鉄 (II 価) の室温での自動酸化速度は数秒以内に進行すること、一方、タンパク質マトリックスがあると保護されて、自動酸化速度は時間および日のオーダーの自動酸化速度になることを示した。Shikama¹⁾ は、Mb のグロビン画分は水分子 (共役イオンの OH⁻ や H⁺ を含む) が Fe(O₂) 中心に容易に接近することを防ぐ作用があることを示した。彼らは、グロビン画分がアンフォールディングすると溶媒水分子または OH⁻ イオンの Fe(O₂) 中心への攻撃をより容易にし、その結果、求核置換メカニズムにより第二鉄メトの速い形成を起こすことを提唱した。Brantley ら³⁷⁾ はヘムポケットの負電荷化は自動酸化速度を劇的に増大するが、正電荷化は自動酸化を阻害することをマッコウクジラ Mb と変異株 Mb を用いた研究で示した。Takano⁴¹⁾ と Phillips⁴¹⁾ は構造とタンパク質動態の研究により、グロビン画分を通りヘムポケットへ通じるリガンド (酸素や一酸化炭素など) 移動のための個別のチャンネルは Mb には認められないことを報告した。リガンドの移動は、一時的に通

路を開くグロビン構造の収縮に左右される。Ruscio らは³⁸⁾ 溶媒と Mb 結合部位間のリガンドの移動経路に関する原子レベルでのコンピューター同定研究により、Mb の中でリガンドが移動するための 2 本の動的な通路が存在し、それらはタンパク質マトリックスの柔軟な領域に位置していることを報告している。局所的な Mb タンパク質の構造のゆらぎは、Mb 分子内部の CO 移動通路の主要な物理的要因であることも報告されている³⁸⁾。

以上に示した研究報告は、いずれも Mb のメト化を引き起こす水分子等の移動や Mb 分子内における酸素や CO リガンドの移動にグロビタンパク質画分の状態が影響することを示唆している。本研究では、生体内エネルギー物質の ATP が Mb のグロビタンパク質の状態に影響を及ぼすことを示す結果が得られ、しかもそれは Mb 分子を収縮する効果が推察されるものである。Shikama らの研究報告では緩んだ Mb タンパク質では自動酸化速度が速くなると報告されており、ATP の Mb への効果は、逆にメト化を抑制するものになることを示唆するものである。本研究で明らかとなった ATP による Mb のメト化抑制、および、高濃度の ATP が存在する魚肉の -20°C における冷凍保存中のメト化進行の抑制に関するメカニズムは、ATP による Mb 分子グロビタンパク質画分の構造状態変化によることが示された。

また、これらの研究成果は、ATP の生体内機能に関する研究として、タンパク質変性抑制作用および Mb との相互作用を研究する新しい研究領域を拓くことが期待される。

本研究で得られた成果は、水産業界で解決されていない技術課題である -20°C のような比較的温度の高い冷凍貯蔵時に発生する Mb のメト化を抑制する技術開発に資するものと考えている。筋肉内に元々含まれている ATP を活用する技術であり特別な添加物を必要としないが、魚肉の凍結時に高濃度の ATP が残る

活けしめ法や致死後の ATP 分解を抑制する温度管理等，水揚げ時から一貫した高度な鮮度管理技術の確立が必要である。

参考文献

- 1) Shikama K. The molecular mechanism of autoxidation for myoglobin and hemoglobin: A venerable puzzle. *Chem. Rev.* 1998; **98**: 1357-1373.
- 2) 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.
- 3) Matsuura F, Hashimoto K, Kikawada S, Yamaguchi K. Studies on the autoxidation velocity of fish myoglobin. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1962; **28**:210-216
- 4) Suzuki N, Hashimoto K, Matsuura F. Studies on the color of skipjack meat. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1973; **39**:35-41 3)
- 5) 落合芳博, 渡辺良明, 内田直行, 小澤秀夫, 渡辺終五. 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. 日本水産学会誌 2010; **76**: 686-694
- 6) 落合芳博. 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. 日本水産学会誌 2010; **76**: 695-704
- 7) Chow C, 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
- 8) 橋本周久, 渡部終五. マグロ肉の凍結貯蔵中における肉色および保水性の変化. 日本水産学会誌 1983; **49**: 203-206
- 9) 尾藤方通, 本間進. 冷凍マグロ肉の肉色保持に関する研究 - IV. 色変の著しい凍結貯蔵温度. 日本水産学会誌 1967; **33**: 33-40

- 10) 第2節 第1部 第II章我が国の水産物の輸出入の動向. 水産白書, 平成 25 年版: 水産物の消費・需給をめぐる動き. 水産庁, 2013, p106-109.
http://www.jfa.maff.go.jp/e/annual_report/2014/pdf/26suisan1-2-2.pdf, (参照 2015-12-1).
- 11) Yoshioka T, Konno K, Seki N. Stabilization of squid myosin subfragment-1 and myofibrils by ATP-related compounds. *Fish. Sci.* 2002;**68**:222-226
- 12) 緒方由美, 進藤譲, 木村郁夫. ATP による魚類筋原線維タンパク質の冷凍変性抑制. 日本水産学会誌 2012; **78**: 461-467
- 13) 尾藤方通. 冷凍マグロ肉の肉色保持に関する研究-1. 冷凍貯蔵中の変色と抽出液の吸光曲線との関係. 日本水産学会誌 1964; **30**: 847-857.
- 14) Tsukamasa Y, Kato K, Bimol CR, Ishibashi Y, Kobayashi T, Itoh T, Ando M. Novel method for improving the antioxidative properties of fish meat by direct injection of sodium L-ascorbate into the blood vessels of live fish. *Fish. Sci.* 2013; **79**: 349-355.
- 15) 石原則幸, 荒木利芳, 井上美佐, 西村昭史, 朱 政治, レカ・ラジュ・ジュネジャ, 森下達雄. 緑茶ポリフェノール給与飼育によるブリ筋肉氷蔵中の酸化防止効果. 日本食品科学工学会誌 2000; **47**: 767-772.
- 16) Arai H, Tani W, Okamoto A, Fukunaga K, Hamada Y, Tachibana K. Suppression of color degradation of yellowtail dark muscle during storage by simultaneous dietary supplementation of vitamins C and E. *Fish. Sci.* 2009; **75**: 499-505.
- 17) 大山憲一, 棚野元秀, 植田 豊, 竹森弘征, 多田武夫. 養殖ブリの血合筋の褐変抑制に及ぼすオリーブ葉粉末添加飼料の投与効果. 水産増殖 2010; **58**: 279-287.

- 18) Chow C, Yang J, Lee P, 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
- 19) Chow C. Relationship between the stability and autoxidation of myoglobin. *J Agric Food Chem* 1991; **39**:22-26
- 20) Brantley RE, Smerdon SJ, Wilkinson AJ, Singleton EW, Olson JS. Mechanism of autooxidation of myoglobin. *J. Biol. Chem.* 1993; **268**:6995-7010
- 21) Shikama K. A controversy on the mechanism of autoxidation of oxymyoglobin and oxyhaemoglobin: oxidation, dissociation, or displacement? *Biochem. J.* 1984; **223**:279-280
- 22) Yuan C, Takeda Y, Nishida W, Kimura I. Suppressive effect of ATP on the denaturation of sarcoplasmic reticulum (Ca²⁺) – ATPase from southern bluefin tuna *Thunnus maccoyii* and its biochemical properties. *Fish. Sci.* DOI 10.1007/s12562-015-0940-1.
- 23) Laemmli UK. Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; **27**: 955-960
- 24) Gornall A.G, Bardwill C.J, David M.M. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.* 1949; **177**: 751-766
- 25) 三浦弘之, 泉本勝利, 塩見雅志. ミオグロビンの自動酸化速度の測定法について. 帯広畜産大学学術研究報告 1979; **11**: 389-401
- 26) 泉本勝利, 山口恭史, 三浦弘之. 食肉のメトミオグロビン形成とメトミオグロビン還元活性に及ぼす脱酸素と炭酸ガスの影響. 帯広畜産大学学術研究報告 1985; **14**: 219-225

- 27) Lundqvist M, Striglor J, Elia G, Lynch I, Cedervall T, Dawson K. Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; **105**:14265-14270
- 28) Uskokovic V, Castiglinone Z, Cubas P, Zhu L, Li W, Habelitz S. Zeta-potential and particle size analysis of human amelogenin. *J Dent Res* 2010; **89**:149-153
- 29) Ochiai Y, Watanabe Y, Ozawa H, Ikegami S, Uchida N, Watabe S. Thermal denaturation profiles of tuna myoglobin. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2010; **74**:1673-1679
- 30) 佐野吉彦, 橋本周久. 冷凍貯蔵中に於ける魚肉の変色に関する研究- I .混合溶液中の Fe^{II}型及び Fe^{III}型ミオグロビンの同時定量法について. 日本水産学会誌 1958; **24**: 519-523
- 31) 佐野吉彦, 橋本周久, 松浦文雄. 冷凍貯蔵中における魚肉の変色に関する研究- II . 魚肉中の Fe^{II}型及び Fe^{III}型ミオグロビンの同時定量法. 日本水産学会誌 1959; **25**: 285-289.
- 32) Krzywicki K. The determination of hem pigments in meat. *Meat. Sci.* 1982; **7**: 29-36.
- 33) Ueki N, Ochiai Y. Effect of amino acid replacements on the structural stability of fish myoglobin. *J. Biochem.* 2006; **140**: 649-656
- 34) 岡崎恵美子. ミオグロビンのメト化. 「新版 食品冷凍技術」(新版 食品冷凍技術編集委員会編) 社団法人日本冷凍空調学会, 東京. 2009; 87-89
- 35) ブリへの一酸化炭素の使用について. (平成9年9月19日) 衛乳第263号 衛化第124号. 厚生省生活衛生局乳肉衛生課長, 食品化学課長, 東京. 1997.34)

- 36) 槌本六良, 三島敏雄, 宇津木照洋, 北島俊一, 矢田殖朗, 保田正人. 動揺の激しい船内での ATP 関連化合物の分離定量法-逆相分配カラムによる高速液体カラムクロマトグラフィー法. 日本水産学会誌 1985; **51**: 1363-1369
- 37) 江平重男, 内山均, 角田聖齊. マグロの品質判定における簡易メト化率測定法の吟味. 日本水産学会誌 1984; **50**: 269-274
- 38) 高橋重一, 増田 建. 5. 色素の分析 b.ヘムの分析. 低温科学 2009; **67**: 327-337.
- 39) Ruscio JZ, Kumar D, Shukla M, Prisant MG, Murali TM, Onufriev AV. Atomic level computational identification of ligand migration pathways between solvent and binding site in myoglobin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2008; **105**:9204-9209
- 40) Sugawara Y, Matsuoka A, Kaino A, Shikama K. Role of globin moiety in the autoxidation reaction of oxymyoglobin: effect of 8M Urea. *Biophys. J.* 1995; **69**: 583-592
- 41) Takano T. Structure of myoglobin refined at 2.0 Å resolution: I. Crystallographic refinement of metmyoglobin from sperm whale. *J Mol Biol* 1977; **110**: 537-568
- 42) Phillips SV. Structure and refinement of oxymyoglobin at 1.6Å resolution. *J. Mol. Biol.* 1980; 142: 531-554

謝辞

本研究を遂行するにあたり、多くの御指導と支援を賜りました主指導教官である木村郁夫教授に深く感謝しております。学位論文を執筆するにあたり、時に厳しく、時に励ましていただいたことや、論文を書く際に研究者としてあるべき倫理規範を教えていただいたことは、今後、私が研究者として進む際に非常に大きな糧となります。また、学士、修士、博士課程の研究生活で木村先生とは長きを共にしましたが、研究を行う中で、私が諦め、くじけそうになったときに立ち直れたのも、研究のやりがいと面白さを常に私に示してくださり支えてくださったおかげです。

副査である鹿児島大学農学部 安部淳一教授、鹿児島大学水産学部 上西由翁教授には、適切なお指示とお助言を頂き深く感謝申し上げます。博士課程の3年間でこのような学位論文を執筆することが出来たのも、数々の貴重なお助言のおかげです。

また、学位論文の査読、審査をしてくださった、木村郁夫教授、上西由翁教授、安部淳一教授、侯 徳興教授、塩崎一弘准教授には、細部にわたりお指導とお助言を頂いたことに、深く感謝いたしております。

学会で多くの貴重な助言を下された東北大学 落合芳博教授にも感謝申し上げます。

最後に、本研究を遂行するにあたり協力してくださった皆様と、我が道を進む私を理解し支えてくれた両親に感謝致します。