

博士論文

アデノシン三リン酸による魚類筋原線維タンパク質の変性抑制

鹿児島大学

緒方 由美

2019

略語

本論文では以下の略語を使用した。

ADP : adenosine diphosphate

AMP : adenosine monophosphate

ATP : adenosine triphosphate

ATPase : adenosine triphosphatase

cMb : crude myoglobin

DTT : dithiothreitol

EDTA : ethylenediaminetetraacetic acid

EGTA : ethylene glycol tetraacetic acid

HMM : myosin heavy chain

HPLC : high-performance liquid chromatography

Hx : hypoxanthine

HxR : inosine

IMP : inosinic acid, inosine monophosphate

IS : isosbestic

KOH : potassium hydroxide

Mb : myoglobin

Mf : myofibrillar protein

PCA : perchloric acid

PMSF : phenylmethylsulfonyl flouride

PPi : pyrophosphate

rod : myosin rod

SDS-PAGE : sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis

S-1 : subfragment-1

TMAO : trimethylamine-N-oxide

Tris : tris (hydroxymethyl) aminomethane

目次

英文要旨	I
和文要旨	III
緒言	1

第1章 ATPによる魚類筋原線維タンパク質の冷凍変性抑制

1. 研究目的	6
2. 実験材料	7
3. 実験方法		
(1) 筋原線維の調製	7
(2) ATPおよびEDTA共存下での筋原線維の凍結保存	7
(3) ATP濃度の測定	7
(4) 筋原線維からアクトミオシンの抽出	8
(5) 筋原線維から抽出したアクトミオシンのATPase活性測定	8
(6) タンパク質濃度の測定	9
(7) SDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) による アクトミオシンの分析	9
(8) 筋原線維の冷凍変性速度恒数の算出	9
4. 結果		
(1) ATPase活性を抑制した筋原線維溶液系の構築	10
(2) ATPの筋原線維冷凍変性抑制作用	12
(3) 冷凍変性速度恒数によるATPの変性抑制効果の解析	16
5. 考察	18

第2章 ATPによるマグロミオシンサブフラグメント-1の酸性pHにおける熱変性抑制

1. 研究目的	20
2. 実験材料	21
3. 実験方法	
(1) マグロ筋原線維からミオシン S-1 の調製	22
(2) pH 調整および ATP-Mg 共存下におけるミオシン S-1 の加熱処理	23
(3) 加熱処理ミオシン S-1 の濁度測定および解析	23
(4) 加熱処理ミオシン S-1 の ATPase 活性測定	23
(5) ミオシン S-1 ATPase の変性速度恒数の算出	24
(6) ATP 濃度の測定	24
(7) 統計処理	24
4. 結果	
(1) マグロ筋原線維からミオシン S-1 の調製	25
(2) 各 pH における ATP-Mg 共存下でのミオシン S-1 の加熱による濁度変化	26
(3) 各 pH における ATP-Mg 共存下でのミオシン S-1 ATPase 活性の加熱変性速度	28
(4) ミオシン S-1 の Ca-ATPase 変性速度恒数による ATP の変性抑制効果の解析	32
5. 考察	34

第3章 ATPによるアカシユモクザメミオシンの尿素変性抑制

1. 研究目的	37
---------	----

2. 実験材料	38
3. 実験方法	
(1) ミオシンの調製	38
(2) ミオシン ATPase 活性の測定	39
(3) ミオシンの尿素処理とミオシン Ca-ATPase 活性の測定	39
(4) ATP 共存下におけるミオシンの尿素変性速度恒数の測定	39
(5) ATP 濃度の測定	40
4. 結果	
(1) アカシュモクザメミオシンの生化学的な性状	41
(2) アカシュモクザメミオシン Ca-ATPase の尿素変性	43
(3) ATP によるアカシュモクザメミオシン Ca-ATPase の 尿素変性抑制	44
(4) ATP によるマダイミオシン Ca-ATPase 尿素変性抑制	49
5. 考察	52

第4章 高濃度 ATP 存在下で凍結し解凍したヒラメ肉の性状

1. 研究目的	54
2. 実験材料	55
3. 実験方法	
(1) ヒラメ肉の凍結および解凍方法	55
(2) 魚肉 pH の測定	55
(3) 魚肉中 ATP 関連化合物含量の測定	55
(4) ドリップ量の測定	56
(5) 筋原線維の塩溶解度およびの Ca-ATPase 活性の測定	56
(6) ミオグロビン (Mb) のメト化率測定	57

(7) 統計処理	57
(8) 冷凍解凍刺身の官能評価	58
4. 結果	
(1) 凍結解凍によるヒラメ筋肉の性状変化	59
(2) 凍結時の鮮度と解凍方法がドリップ発生量に及ぼす影響	64
(3) ヒラメ Mb のメト化率測定法の確立	65
(4) 凍結時の鮮度が解凍後の血合肉のメト化率に及ぼす影響	67
(5) 凍結解凍ヒラメ刺身の官能評価	68
5. 考察	70
総括	73
参考文献	80
謝辞	86

LIST OF FIGURES

Fig. 1 KCl concentration dependence of K-EDTA-ATPase activity of myofibrillar protein from Alaska pollack surimi. 11

Fig. 2 Changes in extractability of actomyosin from myofibrillar protein from Alaska Pollack or croaker during being frozen at -20°C with or without added ATP. 13

Fig. 3 Changes in total ATPase activity of extracted actomyosin from myofibrillar protein from Alaska pollack or croaker during being frozen at -20°C with or without added ATP. 13

Fig. 4 Extractability of actomyosin from myofibrillar protein from Alaska pollack or croaker after freezing at various temperature for 1 month with or without added ATP. 15

Fig. 5 SDS-PAGE pattern of extracted actomyosin from myofibrilla protein from Alaska pollack or croaker after freezing at -20°C for 1 month with or without added ATP. 15

Fig. 6 Changes in extractability of actomyosin from myofibrillar protein from Alaska pollack or croaker during frozen at -20°C with 2.25 mM ATP. 15

Fig. 15	The urea inactivation of Ca-ATPase activity of myosin from scalloped hammerhead in the presence of ATP and the changes in ATP concentration in myosin solution during incubation at 0°C.	45
Fig. 16	The urea inactivation of Ca-ATPase activity of myosin from scalloped hammerhead in the presence of ATP and the changes in ATP concentration in myosin solution during incubation at 10 and 20°C.	47
Fig. 17	The inactivation of Ca-ATPase activity of myosin from scalloped hammerhead and red seabream in the presence of urea during incubation at 20°C.	50
Fig. 18	The urea inactivation of Ca-ATPase activity of red seabream myosin in the presence of ATP during incubation at 20°C.	51
Fig. 19	Effect of postmortem time and freeze-thawing conditions on extractability of salt soluble protein from myofibrillar protein.	63
Fig. 20	Effect of postmortem time and freeze-thawing conditions on Mf Ca-ATPase activity.	63
Fig. 21	Effect of thawing conditions on free drip volume.	64
Fig. 22	SDS-PAGE pattern of purified olive flounder myoglobin.	66

Fig. 23 Visible absorbance spectra of deoxyMb, oxyMb and metMb
from cardiac muscle of olive flounder. 66

Fig. 24 Effect of postmortem time and freeze-thawing treatment on
metmyoglobin formation. 67

LIST OF TABLES

Table 1 The apparent first order rate constant (K_D) for decrease of extractability of actomyosin from myofibrillar protein in the presence of ATP during being frozen. 17

Table 2 The apparent first order rate constant (K_D) for early stage inactivation of Ca-ATPase activity of tuna myosin S-1 in the presence of ATP. 33

Table 3 The apparent first order rate constant (K_D) for decrease of Ca-ATPase activity of myosin from scalloped hammerhead in the presence of ATP and urea while being incubated at 0, 10 and 20°C. 48

Table 4 Effect of postmortem condition until freezing and freezing treatment on ATP and concentration of its related material in meat. 59

Table 5 Effect of postmortem conditions until freezing and thawing condition on ATP and concentration of its related material in meat. 60

Table 6 Effect of postmortem conditions until freezing and thawing condition on pH of meat. 61

Table 7 Sensory evaluation of olive flounder sashimi prepared under different conditions of postmortem time and thawing method. 69

ABSTRACT

The value of fisheries products is evaluated by freshness. Fish which are frozen pre-rigor have a better quality on thawing than fish of lower initial freshness. On the other hand, there have been few scientific reports on why muscle protein of fresh fish is more stable during frozen storage than that of less fresh ones. In this study, I focused on the protective effect of adenosine triphosphate (ATP) on fish muscle proteins.

In the 1st chapter, the suppressive function of ATP on freeze denaturation of myofibrillar protein from Alaska Pollack and croaker surimi was investigated. Freeze denaturation of myofibrillar protein was suppressed by the addition of ATP. The suppression effect of ATP on freeze denaturation depended on the ATP concentration, freezing temperature and fish species. In the 2nd chapter, the effect of ATP on the denaturation of myosin in “burnt meat” was investigated. The suppression effect of ATP on acidic-thermal denaturation of tuna myosin subfragment-1 (S-1) by measuring the changes in turbidity of myosin S-1 solution and Ca-ATPase activity. The increase of turbidity of myosin S-1 solution and the inactivation of myosin S-1 Ca-ATPase during acidic-thermal treatment were suppressed strongly with the presence of physiological concentration of ATP. The rapid reduction of ATP during the early postmortem stage may act as a trigger of the acceleration of acidic-thermal denaturation of tuna myosin in burnt meat. In the 3rd chapter, the suppressive effect of ATP on urea denaturation of shark muscle was investigated. Urea is known as a powerful protein denaturant. Elasmobranches, such as sharks, retains large amount of urea in their body, but muscle proteins of sharks are maintained even in the presence of urea *in vivo*. The protection effect of ATP on fish muscle proteins was focused, and the suppressive effect of ATP on urea denaturation of myosin Ca-ATPase from scalloped hammerhead was studied. Myosin was incubated at various temperature in the

presence of both urea and ATP. Both urea and ATP were removed from the incubated myosin by dialysis, and then Ca-ATPase activity of the incubated myosin was assayed. In the case of myosin incubated with both ATP and urea, its Ca-ATPase activity was higher than incubated with urea. This result suggested that ATP suppressed urea denaturation of myosin Ca-ATPase. ATP may act as a safeguard of muscle protein against urea *in vivo*. In the 4th chapter, the procedure for freeze-thawing of olive flounder for consumption of high quality raw fish as sashimi was investigated. Freeze-thawed meat which was frozen containing a high concentration ATP immediately after instantaneous killing and then thawed by slow thawing method showed high quality for sashimi and properties of myofibrillar protein were maintained considerably.

The above results indicate that ATP may protect of fish muscle protein against various denaturation *in vivo* and in fishery food processing. These results will contribute to keeping freshness and producing high quality fisheries products.

和文要約

水産物の価値は鮮度によって評価されることが多い。鮮度の良い水産物を凍結した場合、その品質は良い状態で保たれる。このことは水産業従事者の経験に基づいた知見であるが、高鮮度水産物で冷凍耐性が高いことに関する科学的な研究はほとんど行われていない。本研究では、生体内に 5–10 mM の濃度で存在する高エネルギー物質であるアデノシン三リン酸 (adenosine triphosphate ; ATP) のタンパク質安定化作用に着目し、魚類筋肉タンパク質の冷凍変性、熱変性、酸性 pH 変性、尿素変性に対する ATP の変性抑制作用について検討し、ATP のタンパク質安定化作用メカニズムの解明とその研究成果を高品質水産加工品の製造に応用することを目的とした。

第 1 章で魚類筋原線維タンパク質 (Mf) の冷凍変性に対する ATP の保護効果について検討した結果、生理的な ATP 濃度下で Mf の冷凍変性抑制効果を確認することができた。その効果は、ATP 濃度と凍結貯蔵温度に依存し、魚種差を示した。次に、マグロの「ヤケ肉」の発生と ATP のタンパク質安定化作用の関係について検討した。ヤケ肉は致死後の魚肉の酸性化と高体温が発生原因であり、同時に ATP は急速に消失することが報告されている。第 2 章では、酸性 pH 下でのマグロミオシンサブフラグメント-1 (S-1) の熱変性に及ぼす ATP の作用について検討した。その結果、酸性 pH 下のミオシン S-1 の熱変性は、生理的な濃度の ATP で強く抑制された。マグロのヤケ肉発生は、致死後の魚肉の酸性化と高体温に加えて、急速な ATP の消失が引き金になると推察した。第 3 章では、サメミオシンの尿素変性に対する ATP の変性抑制作用について検討した。海産サメ類は、タンパク質変性作用を示す尿素を体内に高濃度で蓄積しているにも関わらず、筋肉は重篤な筋疾患を起こさない。このことについて、私は ATP のタンパク質安定化作用が働いているのではないかと考えた。アカシユモクザメのミオシンを尿素と ATP 存在下で一定温度で保持した後、ミオシン

Ca-ATPase 残存活性を測定した結果、ATP が存在することで尿素によるミオシン Ca-ATPase の失活は抑制されることを見出した。サメ類の生体内において、ATP は尿素によるタンパク質の変性を抑制する作用を有することが示された。第4章では、ATP のタンパク質安定化作用を利用し、刺身の品質を示す高品質冷凍ヒラメの製造条件を検討した。活けしめ直後の高濃度 ATP を含むヒラメ肉と、一晩冷蔵したヒラメ肉を凍結し、解凍後の魚肉の性状を測定した。ATP を高濃度に含んだ状態で凍結し緩慢解凍したヒラメ肉は、他の条件で凍結解凍したヒラメ肉よりも筋原線維タンパク質の塩溶解性と Ca-ATPase 比活性は高く、肉質が良いことを示した。また、官能評価においても高い評価が得られた。

以上の結果から、ATP は魚肉タンパク質の安定化に寄与し、生体内や水産加工過程で起こりうる各種変性を抑制するところが明らかとなった。本研究成果は水産物の鮮度維持と高品質水産加工品の製造に応用されることが期待される。

緒言

日本の水産業を取り巻く情勢は大きく変化しており、水産資源量の低下や燃料価格の高騰、漁業者の高齢化と減少、魚離れなどが問題となっている。日本における食用魚介類の1人当たり年間消費量は、2001年の40.2 kg/人をピークに減少を続けており、2017年には24.4 kg/人まで減少した。¹⁾ さらに、総務省統計局によると、日本の人口は、2018年現在1億2618万人と推計されているが、2050年には1億192万人まで減少し、今後も減少傾向にあると予想されている。²⁾ 人口の減少は、魚介類の年間消費量の減少に拍車をかけ、国内消費を急激に増加させることは困難である。一方、世界に目を向けると、急激な人口増加、中国やインド等の経済発展、先進国での健康志向の高まりと水産物の健康機能効果が評価され、世界の水産物の総需要量は年々増加を続けている。国連食糧農業機関（FAO）「世界漁業・養殖業白書（2018）」によると、1960年代には一人当たり年間10 kgであった魚類消費量はアジアやアフリカを中心に2016年には20.3 kgにまで増加し、今後ますます増加することが予想される。³⁾ しかしながら、この需要の増加を支えるべき世界の水産資源状況はとてもよい状態とはいえず、FAO「世界漁業・養殖魚白書（2010）」は、2008年の世界の海洋水産資源は「適度または低・未利用状態」の割合が減少して15%となる一方で、「満限利用状態」が53%、「過剰利用または枯渇状態」が32%へとそれぞれ増加していると報告している。⁴⁾ 世界の海面漁業生産量はすでに頭打ちとなっており、不足する水産物は養殖業によって補うしかない。しかし、養殖業の増産についても、中長期的にみると、養殖適地の限界や過密飼育の問題、魚粉などの餌の供給の限界などの問題から頭打ちになる可能性がある。限りある資源を有効に活用することは世界の水産業界の課題である。

好漁場に恵まれた日本の水産物は、世界の貴重な食糧資源である。2011年に発生した東日本大震災とそれにとまなう福島第一原子力発電所事故により、世

界からみた日本の水産物のイメージは一次的に低下したものの、日本産水産物の品質は、漁獲物の取扱いの丁寧さや発達したコールドチェーンに支えられた鮮度保持の確かさから、世界で高い評価を得ている。さらに日本食の人気が海外で高まっていることも相まって、日本産水産物に対しては世界各国において根強い需要がある。加えて水産物に対する需要は世界的に増大していることから、今後、日本産水産物の海外市場はさらに拡大する可能性がある。

水産物の価値は鮮度によって決定されることが多い。水産物の鮮度を評価する指標は各種あるが、水産物を生食することを想定した比較的初期の鮮度変化を表す指標として、K 値が広く知られている。生体内高エネルギー物質である ATP は、酵素分解により、 $ATP \rightarrow ADP \rightarrow AMP \rightarrow IMP \rightarrow HxR \rightarrow Hx$ の順に分解され、ATP 関連化合物総量に占めるリン酸を分子内に持たない成分 (HxR, Hx) の割合 (%) が K 値と定義されており⁵⁾、K 値が低いほど鮮度が良いとされている。また、魚の死後変化は一般的に死後硬直、解硬、軟化、腐敗という順に進行し、死後の筋肉の硬直の進行度合いを指標にした硬直指数も鮮度評価の一つとして用いられている。魚の死後、筋肉中の ATP が分解され ATP 濃度が低下すると死後硬直が始まる。このように、死後の ATP 分解は水産物の鮮度変化に大きな影響を及ぼし、鮮度保持の研究を進める上で ATP は重要なファクターとなっている。

ATP は、生きている筋細胞内に約 5–10 mM の濃度で含まれ⁶⁾、生体内高エネルギー物質として生体内の種々の代謝、合成、筋収縮に利用されている。一方、筋肉タンパク質に対する食品化学的な視点で ATP の作用をみると、ミオシンの低塩濃度下における溶解作用⁷⁾ やミオシン ATPase の熱変性抑制⁸⁻¹¹⁾ あるいはミオシンの凝集変性抑制作用¹²⁾ などについて報告がなされている。ATP はミオシン ATPase の基質であるのと同時に、ミオシンタンパク質の熱変性抑制作用を有することが示唆されている。本研究では、これらの食品化学的な ATP

の作用，特に筋肉タンパク質の変性抑制作用について，水産物の水揚げから加工・流通過程で起こりうる様々な変性要因に対する ATP の変性抑制効果について検討した。

第 1 章では，高鮮度水産物の冷凍耐性が高いことについてタンパク質化学的な視点から明らかにすることを目的とし，死後の筋肉中に種々の濃度で存在する ATP による魚肉タンパク質の冷凍変性抑制効果について，魚肉タンパク質モデル系として筋原線維タンパク質を用いて検討した。筋原線維タンパク質のアクチン抽出性と ATPase 活性を指標に測定した結果，ATP による魚類筋原線維タンパク質の冷凍変性抑制作用が確認された。

第 2 章では，マグロ類やブリ類でしばしば確認される「ヤケ肉」と ATP の関係について検討した。マグロやブリは，生産量も輸出量も多く，日本の水産業において重要な魚種である。ヤケが発生すると，身は白色化し水っぽくなり，味はエグ味や酸味を呈するため，刺身などの生食としてだけでなく，加工品としての商品価値も著しく低下する。さらにヤケ肉は，魚体深部で発生しやすく，外観から判断できないことも問題となっている。ヤケは，夏場の高水温や水揚げ時の魚の激動による体温上昇，または嫌氣的代謝で生成される乳酸による pH 低下が主な原因とされている。一方，マグロやブリのヤケ肉では，致死直後に ATP はほとんど消失することが報告されているが，^{13,14)} ATP の消失が酸性 pH 下におけるミオシンの熱変性にどの程度影響するかについては，まだ研究がなされていない。第 2 章では，ミナミマグロミオシン S-1 の酸性条件下における ATP の熱変性抑制作用について検討した。加熱による S-1 の濁度上昇と Ca-ATPase 活性を指標に測定を行った結果，ATP は酸性条件下における S-1 の熱変性を抑制することが明らかになった。

第 3 章では，体内に高濃度の尿素を蓄積するサメ類の筋肉タンパク質に対する ATP の尿素変性抑制効果について検討した。生化学の分野において，尿素は

典型的なタンパク質変性剤であり、海産サメ類は浸透圧調節のために体内に 0.2–0.5 M という高濃度の尿素を蓄積しているにも関わらず、¹⁵⁾ 尿素をほとんど含まない硬骨魚類と変わらぬ生命活動を維持している。この原因について、現在、2 つの仮説が挙げられている。一つは、尿素とともに浸透圧調節のために体内に大量に蓄積されているメチルアミン類が尿素の影響を打ち消していること、¹⁶⁾ もう一つは、サメ類のタンパク質が尿素に対して特殊な耐性を示すことである。¹⁷⁻¹⁹⁾ 第 1 章、第 2 章の結果から、ATP は魚類筋肉タンパク質の冷凍変性や熱変性を抑制する作用を有し、タンパク質の安定化に寄与することが示唆される。そこで、第 3 章では、アカシュモクザメのミオシン Ca-ATPase に対する ATP の尿素変性抑制作用について検討した。対照区に、体内に尿素をほとんど含まないマダイを用いて比較した。ATP 共存下でミオシンを尿素処理し、そのミオシンの Ca-ATPase を測定した結果、アカシュモクザメとマダイのミオシンのどちらも、ATP が存在することでミオシン Ca-ATPase の失活が抑制され、尿素変性が抑制されることが明らかになった。

魚肉のモデル系として筋原線維タンパク質やミオシン、S-1 を用いた試験で、ATP による冷凍変性や熱変性抑制作用が認められたことから、第 4 章では、活けしめ直後の筋肉中に高濃度の ATP を残した魚肉を用い、凍結解凍品に及ぼす ATP の品質保持効果について検討した。試料には活ヒラメを用いた。筋肉中の ATP 濃度の異なるヒラメ肉を凍結解凍し、ヒラメ肉の性状を分析した。筋肉中に ATP を含んだ冷凍魚肉を急速解凍すると解凍硬直を引き起こすため、解凍方法についても検討した。凍結解凍したヒラメ肉は筋原線維タンパク質の塩溶解性と Ca-ATPase 活性を指標にして分析し、これらの生化学的分析に加え、凍結解凍したヒラメ肉の刺身としての官能評価も行った。その結果、活けしめ直後の筋肉中に ATP を高濃度含んだ状態で凍結し、緩慢解凍したヒラメ肉の性状が最も良いことが確認された。

本研究は、ATP の食品科学的な作用として魚類筋肉タンパク質の安定化作用のメカニズムの解明を目的とし、筋原線維タンパク質の冷凍変性、熱変性、酸性 pH 変性、尿素変性に対する ATP の変性抑制作用について検討した。本研究で得られた結果は、水産物の鮮度保持や高品質冷凍品の製造と流通技術の確立に応用されることが期待される。

第1章 ATPによる魚類筋原線維タンパク質の冷凍変性抑制

1. 研究目的

鮮度が非常によい水産物を凍結保存後解凍処理した場合、その品質は良好に保たれることは水産業界で常識となっているが、このことに関するタンパク質科学的な研究報告は少ない。鮮度と凍結解凍品の品質との関係については、解凍後の加工処理方法や調理適性に影響することから今なお重要な研究課題である。本研究では、生体内高エネルギー物質である ATP に着目した。魚肉中の ATP 濃度は、死後の一定期間は生きていた時と同濃度を維持されるが、その後低下し始め、低 ATP 濃度で硬直を起こす。水産物の漁獲から加工処理および凍結保蔵に関わる現状の生産技術においては、即殺直後の高濃度の ATP を保持した状態での凍結処理も可能となってきている。高鮮度状態で凍結した場合、個々の冷凍水産物の筋肉には様々な濃度の ATP が含まれているが、残存するこれら ATP が冷凍水産物の品質にどのような影響を及ぼすかについてはほとんど研究はなされていない。²⁰⁾

本研究では、高鮮度水産物の冷凍耐性が高いことについてタンパク質化学的な視点から明らかにすることを目的とし、死後の筋肉中に種々の濃度で存在する ATP による魚肉タンパク質の冷凍変性抑制効果について魚肉タンパク質モデル系として筋原線維タンパク質を用いて検討した。本研究を進める上で、ATP は筋原線維 ATPase の基質であることから生理的塩濃度に近い溶液条件下では ATP は急速に分解されてしまうことが課題となる。これを解決するために、試験サンプル中の ATP 濃度を一定に保つことを可能とする筋原線維 ATPase 抑制試験系の構築を初めに検討した。

2. 実験材料

筋原線維タンパク質の調製には、均質な魚肉タンパク質試料としてスケトウダラ *Theragra chalcogramma* とグチ *Argyrosomus argentatus* の冷凍すり身 FA 級（日本水産株式会社販売）を使用した。冷凍すり身は、実験に供するまで -30°C の冷凍庫で保管した。

3. 実験方法

(1) 筋原線維の調製

冷凍すり身を半解凍後、氷冷下で 3 倍量の 0.1 M KCl , $20\text{ mM Tris-HCl (pH7.5)}$ 溶液を添加してホモジナイズし、 $5,000\text{rpm}$ で 15 分間遠心分離し沈殿を得た。これに同溶液を加えて沈殿を懸濁攪拌後、同様に遠心分離を行った。この操作を 3 回繰り返して冷凍すり身中に含まれる副原料を除き、得られた沈殿画分を筋原線維タンパク質として使用した。

(2) ATP および EDTA 共存下での筋原線維の凍結保存

凍結保存試験サンプルは、 0.1 M KCl , $20\text{ mM Tris-HCl (pH7.5)}$ 溶液に懸濁した筋原線維タンパク質 ($14\text{--}18\text{mg/mL}$) に終濃度 5 mM の EDTA と最大濃度 7.5 mM までの各濃度の ATP を添加して調製した。これを -15 , -20 , -30 , -78°C で 2 週間から 3 ヶ月間凍結保存した。

(3) ATP 濃度の測定

筋原線維溶液の凍結保存中の ATP 濃度の分析は、凍結解凍処理した筋原線維溶液を遠心分離した上清液について測定した。得られた上清に終濃度 5% PCA を加え除タンパク後、KOH 溶液で中和した溶液中の ATP 濃度を Murata らの方法²¹⁾ に準じて HPLC（ポンプ：LC-10AD, カラム恒温槽：CTO-10A, 検出器：

SCL-10A 島津製作所製，カラム：GS-320 7E Shodex Asahipak 製）で測定した。なお移動相には 0.2 M リン酸緩衝液（pH 2.9）を用い，検出波長は 260 nm とした。

(4) 筋原線維からアクトミオシンの抽出

凍結保存した筋原線維からアクトミオシンの抽出は，以下の方法で行った。氷水中の低温下で解凍した筋原線維溶液に 3 倍量の 0.1 M KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) 溶液を添加し懸濁攪拌後，5,000 rpm で 15 分間遠心分離をして沈殿を得た。この操作を 3 回繰り返す，凍結保存試験系に含まれる ATP と EDTA を除いた後，沈殿に 3 倍量の 0.5 M KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) 溶液，1 mM ATP 溶液を添加して緩やかに攪拌し，氷中で 4 時間保持した。これを 5,000 rpm で 20 分間遠心分離後，得られた上清に 10 倍量の冷蒸留水を加えて希釈沈殿を行い，その後遠心分離にて沈殿を集め，0.5 M KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) 溶液に溶解し同溶液に透析後，遠心分離した上清をアクトミオシン溶液とした。アクトミオシンの抽出率は，凍結処理をしていない筋原線維からの抽出率（スケトウダラ 26%，グチ 40%）に対する相対値として表した。

(5) 筋原線維から抽出したアクトミオシンの ATPase 活性測定

ATPase 活性は以下の反応組成液で 25°C で測定した。

Ca-ATPase 活性：0.05 M KCl あるいは 0.5 M KCl, 5 mM CaCl₂, 25 mM Tris-maleate (pH 7.0), 1 mM ATP, 0.2 mg/mL アクトミオシン。K-EDTA-ATPase 活性：0.5 M KCl, 5 mM EDTA, 25 mM Tris-maleate (pH 7.0), 1 mM ATP, 0.2 mg/mL アクトミオシン。それぞれアクトミオシンを添加して ATPase 反応を開始し，終濃度 5% PCA で反応を停止させ，生成する無機リン酸を Gomori 法で測定した。²²⁾ また，抽出されたアクトミオシン量とそのアクトミオシンの Ca-ATPase 比活性

とを掛け合わせた値を Ca-ATPase 全活性とし, 筋原線維 1 g 当たりの値で示した。

(6) タンパク質濃度の測定

各種タンパク質の濃度の測定は, ビウレット法を用い, 牛血清アルブミンを標準として比色定量した。²³⁾

(7) SDS-ポリアクリルアミド電気泳動(SDS-PAGE)によるアクトミオシンの分析

SDS-PAGE は Laemmli の方法²⁴⁾ に従い, 10%アクリルアミドゲルを使用し
て行った。

(8) 筋原線維の冷凍変性速度恒数の算出

各濃度の ATP を添加し各温度の凍結条件で保存した筋原線維からのアクト
ミオシン抽出率の低下を下記の一次反応式に従って解析し, 冷凍変性速度恒数
(K_D) を算出した。

$$K_D = (\ln C_0 - \ln C_t) / t$$

ここで C_0 および C_t は, 凍結保存前と t 日間凍結保存後のアクトミオシン抽出率
の相対値である。各試験は最低 3 回行い, 平均値と標準偏差を求めて示した。

4. 結果

(1) ATPase 活性を抑制した筋原線維溶液系の構築

0.1M KCl, 20mM Tris-HCl (pH 7.5) 溶液中における筋原線維 Mg-ATPase 活性は非常に高いため、高濃度の筋原線維タンパク質を含む溶液系で ATP を高濃度に維持した状態で変性抑制効果を測定することは難しい。一方、EDTA 存在下で測定するミオシン K-EDTA-ATPase 活性は KCl 濃度依存性を示し、さらに、アクチンを共存させるとその ATPase 活性は抑制されることが報告されている。²⁵⁻²⁷⁾ 本試験では、0.1 M KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) 溶液中に懸濁した筋原線維を使用しているため、終濃度 5 mM EDTA を添加することによる ATPase 活性の抑制を検討した。Fig. 1 に、25°C におけるスケトウダラ筋原線維 K-EDTA-ATPase 活性の KCl 濃度依存性を示した。筋原線維にはアクチンが共存しているため、いずれの KCl 濃度下においても ATPase 活性は低いが、その中でも低濃度側の KCl 溶液中で、さらに活性が低くなることを示した。なお、実際の試験では、氷冷保存した筋原線維懸濁液に EDTA を混合し、その後 ATP を添加してすぐに凍結して凍結保存試験サンプルを調製した。凍結前の氷冷下における凍結保存試験サンプルの筋原線維の ATPase 活性を測定したところ 6.8×10^{-4} $\mu\text{mol Pi}/\text{min}/\text{mg}$ であり、ATP の分解はほとんど無視できる試験条件であることが確認された。なお、結果は示さないが、凍結解凍した筋原線維懸濁液中の ATP 濃度を HPLC にて測定した結果も試験中の ATP 分解は無視できるものであることを示していた。さらに、EDTA の筋原線維懸濁液への添加による凍結変性への影響を確認するために、ATP 無添加におけるスケトウダラとグチの筋原線維懸濁液に終濃度 5 mM EDTA を添加し、-15°C でそれぞれ 6 日間（スケトウダラ）あるいは 15 日間（グチ）凍結保存した場合のアクトミオシン抽出率を EDTA 無添加の場合と比較した。凍結前のアクトミオシン抽出率に対する凍結処理後のアクトミオシン抽出率の値は、スケトウダラでは、EDTA 無添加で

41%, EDTA 添加で 48%であった。グチでは、それぞれ 38%と 48%となった。EDTA 添加により、アクトミオシン抽出率を指標とした筋原線維の冷凍耐性はやや高まる傾向となったが、ATP の効果を測定する系では全てに EDTA を添加した系で行っていることから、ATP の効果を評価する上では影響は少ないと考えられた。以上の結果から、本試験では、5 mM EDTA を含む 0.1 M KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) 溶液に懸濁した筋原線維に各濃度の ATP を添加して凍結保存試験に供した。

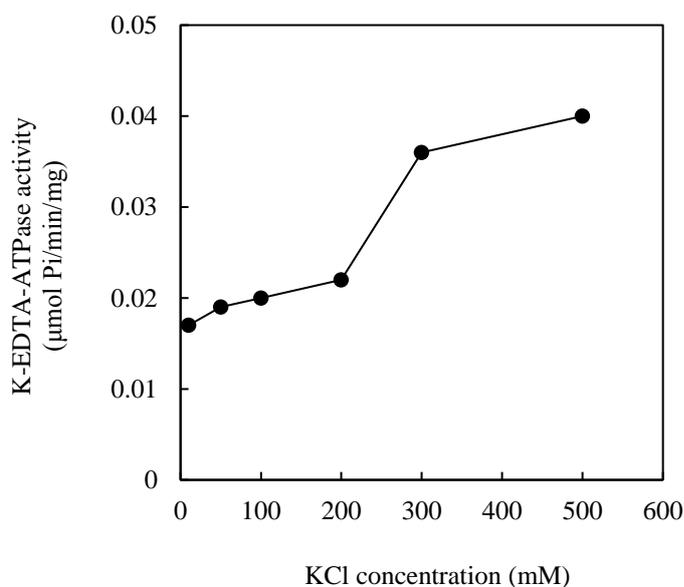


Fig. 1 KCl concentration dependence of K-EDTA-ATPase activity of myofibrillar protein from Alaska pollack surimi. The ATPase assay was carried out at 25°C in a reaction medium containing 5 mM EDTA, 1 mM ATP, 25 mM Tris-maleate (pH 7.0), 0.2 mg/mL myofibrillar protein and various concentrations of KCl.

(2) ATP の筋原線維冷凍変性抑制作用

スケトウダラあるいはグチの筋原線維懸濁液 (0.1 M KCl, 20 mM Tris-HCl (pH7.5), 5 mM EDTA) に終濃度で最大 7.5 mM の ATP を添加し, それぞれを凍結保存温度-15, -20, -30°C およびスケトウダラについてはさらに-78°C で 2 週間から 3 ヶ月間保存したときのアクトミオシン抽出率と Ca-ATPase 全活性の変化を測定した。試験結果例として, 各濃度の ATP を含むスケトウダラとグチ筋原線維の-20°C での凍結保存によるアクトミオシン抽出率の変化を Fig. 2 に示した。両方の筋原線維も ATP 濃度が高いほどアクトミオシンの抽出性が高く保持され, その抽出率を指標として測定される凍結変性耐性は ATP 濃度依存性を示した。また, スケトウダラに比べてグチの方が, 冷凍耐性が高いことも示された。Fig. 3 には, -20°C での凍結保存におけるスケトウダラとグチの Ca-ATPase 全活性の変化を示した。抽出されたスケトウダラのアクトミオシンの Ca-ATPase 活性は筋原線維の凍結時に ATP を含まない, あるいは ATP 濃度が低い場合はやや低い値を示したので, Ca-ATPase 全活性の変化はアクトミオシン抽出率を指標とした場合 (Fig. 2) よりも速い低下経過を示した。グチの場合は, 抽出したアクトミオシンの ATPase 活性はわずかな低下であったため, Ca-ATPase 全活性の変化とアクトミオシン抽出性の変化は, Ca-ATPase 全活性の低下がやや速くなるもののよく似た低下経過を示した。図には示さないが, 他の凍結保存温度における Ca-ATPase 全活性の変化もアクトミオシン抽出率の変化と同様, あるいはやや速い変化を示した。

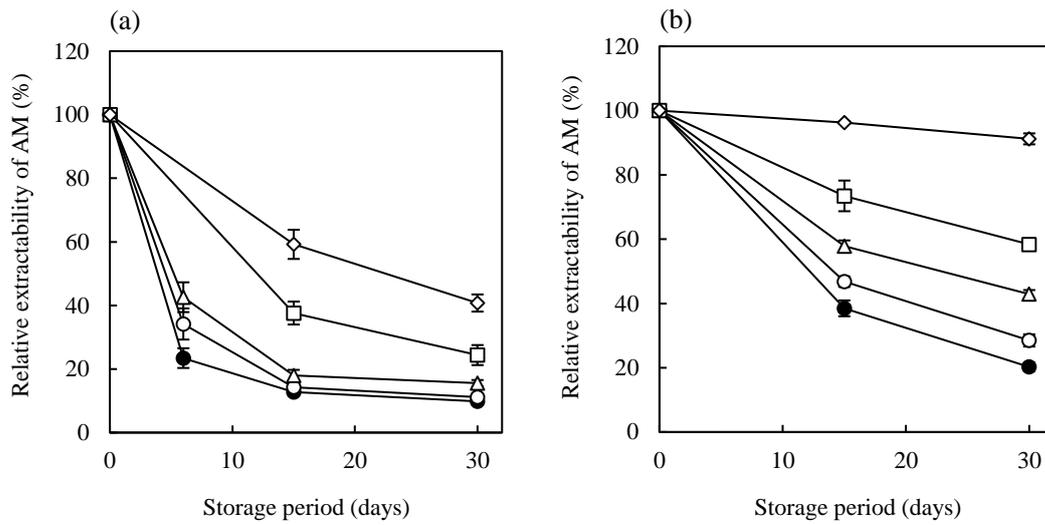


Fig. 2 Changes in extractability of actomyosin from myofibrillar protein from Alaska Pollack or croaker during being frozen at -20°C with or without added ATP. Alaska pollack (a) and croaker (b) myofibrillar protein (ca. 16 mg/mL) were frozen and stored at -20°C in a medium containing 0.1 M KCl, 5 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), and various concentrations of ATP. The final concentration of ATP was 0 (\bullet), 0.75 (\circ), 2.25 (Δ), 3.75 (\square), and 7.50 (\diamond) mM, respectively. Values are mean \pm standard deviation. ($n = 3$)

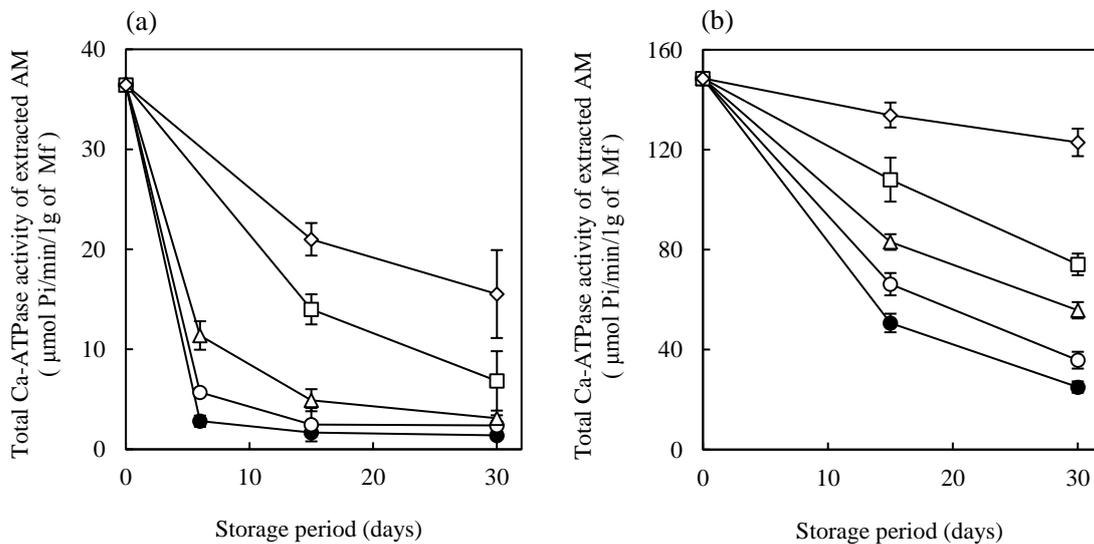


Fig. 3 Changes in total ATPase activity of extracted actomyosin from myofibrillar protein from Alaska pollack or croaker during being frozen at -20°C with or without added ATP. Alaska Pollack (a) and croaker (b) myofibrillar protein (ca. 16 mg/mL) were frozen and stored at -20°C in a medium containing 0.1 M KCl, 5 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), and varied concentrations of ATP. The final concentration of ATP was 0 (\bullet), 0.75 (\circ), 2.25 (Δ), 3.75 (\square), and 7.50 (\diamond) mM, respectively. Ca-ATPase activity of extracted actomyosin was measured. The total ATPase activity was defined as value which ATPase activity multiplied by mass of extracted actomyosin. Values are mean \pm standard deviation. ($n = 3$)

Fig. 4 には、スケトウダラとグチの筋原線維に各濃度の ATP を添加して各凍結温度で 1 ヶ月間凍結保存したときのアクトミオシン抽出率の変化を示した。アクトミオシン抽出率は凍結保存温度が低いほど高く、また、ATP 濃度が高いほど高い抽出率を維持していた。スケトウダラ筋原線維の -78°C における凍結保存では、ATP 濃度約 4 mM 以上でアクトミオシンの抽出率は凍結前に比べて 80%以上保持されていた。また、Fig. 5 には各濃度の ATP を添加し -20°C で凍結保存した筋原線維から抽出されるアクトミオシンの SDS-PAGE 泳動図を示した。凍結保存時の ATP 濃度が異なっても、筋原線維から抽出されたアクトミオシンのタンパク質組成には大きな差は認められなかった。以上の結果から、凍結保存時に ATP が残存すると、筋肉タンパク質の主要成分である筋原線維の冷凍変性が抑制されることが示唆された。Fig. 6 には、スケトウダラとグチの筋原線維それぞれに終濃度 2.25 mM の ATP を添加し、 -20°C にて凍結保存したときのアクトミオシン抽出率の変化を示した。グチの筋原線維はスケトウダラに比べてより安定化し、ATP による凍結変性抑制効果には魚種差があることが確認された。これは、ATP の変性抑制効果と各魚種の筋原線維タンパク質の構造安定特性が合わさった効果が現れたものと推察される。

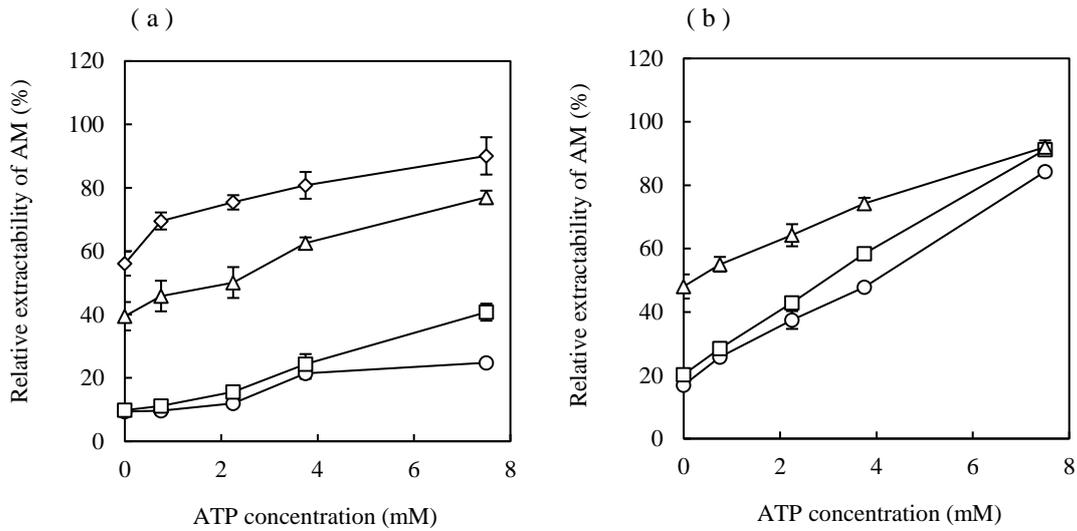


Fig. 4. Extractability of actomyosin from myofibrillar protein from Alaska pollack or croaker after freezing at various temperature for 1 month with or without added ATP. Alaska pollack (a) and croaker (b) myofibrillar protein (ca. 16 mg/ml) were frozen and stored at -15 (○), -20 (□), -30 (△), and -78 (◇) °C for 1 month in a medium containing 0.1 M KCl, 5 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), and varied concentrations of ATP, respectively. Values are mean ± standard deviation. (*n* = 3)

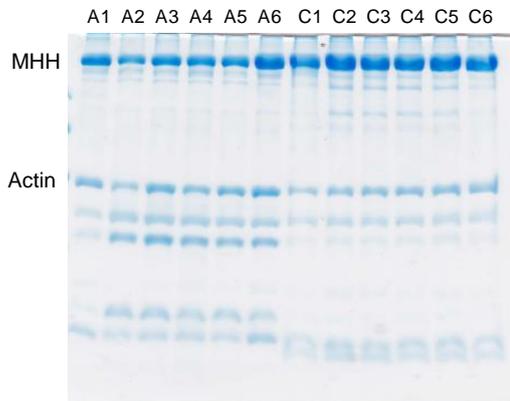


Fig. 5 SDS-PAGE pattern of extracted actomyosin from myofibrilla protein from Alaska pollack or croaker after freezing at -20°C for 1 month with or without added ATP. “A” and “C” mean Alaska Pollack and croaker, respectively. Numerals mean ATP concentrations. 1, Actomyosin from myofibrillar protein before being frozen; 2, 0 mM ATP; 3, 0.750 mM ATP; 4, 2.25 mM ATP; 5, 3.750 mM ATP; 6, 7.50 mM ATP.

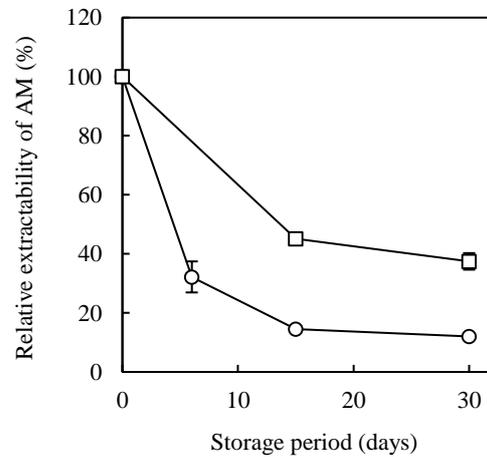


Fig. 6 Changes in extractability of actomyosin from myofibrillar protein from Alaska pollack or croaker during frozen storage at -20°C with 2.25 mM ATP. Alaska Pollack (○) and croaker (□) myofibrillar protein (ca. 16 mg/mL) were frozen and stored at -20°C in a medium containing 0.1 M KCl, 5mM EDTA, 20mM Tris-HCl (pH7.5), and 2.25mM ATP. Values are the mean ± standard deviation. (*n* = 3)

(3) 冷凍変性速度恒数による ATP の変性抑制効果の解析

-15°C から-78°C の各凍結保存温度で各濃度の ATP を存在させて凍結保存したスケトウダラとグチの筋原線維について、凍結保存期間にともなうアクトミオシン抽出率の低下の経時変化を一次反応式で解析したところ、凍結保存初期のアクトミオシン抽出率の速い低下とそれに続く速度の遅い低下の二段階の変化を示した。アクトミオシン抽出率の凍結保存初期に見られる低下速度を冷凍変性速度恒数 (K_D) として求め、結果を Table 1 に示した。ATP を添加していないスケトウダラ筋原線維の-15°C における K_D は $3478.91 \times 10^{-4} \text{ (day}^{-1}\text{)}$ である。これに対して各濃度の ATP を添加した筋原線維の K_D は ATP 濃度に依存して小さくなり、7.50 mM ATP 存在下では $464.87 \times 10^{-4} \text{ (day}^{-1}\text{)}$ となった。これは、7.50 mM ATP 存在下で-15°C における安定性が約 7.5 倍となったことを示している。いずれの凍結保存温度においても添加した ATP 濃度に従って K_D の値は小さくなり、また、凍結保存温度が低いほど ATP による安定化の程度は大きくなることが認められた。さらに、一般的な冷凍水産物の流通保蔵温度に近い-20°C の K_D に注目し、それよりも低温の-30°C の値と比較すると、スケトウダラ筋原線維に 7.50 mM の ATP を存在させた-20°C における K_D $299.64 \times 10^{-4} \text{ (day}^{-1}\text{)}$ は、-30°C の ATP 無添加時の K_D に近い値であった。グチの筋原線維にて行った-15°C から-30°C における凍結保存試験においても ATP による変性抑制効果が認められた。すなわち、凍結保存温度-15, -20, -30°C のいずれの場合も、添加する ATP 濃度が高くなるに従い K_D は小さくなり、ATP による変性抑制効果が認められた。また、ATP を添加していないグチ筋原線維の-30°C における K_D $140.20 \times 10^{-4} \text{ (day}^{-1}\text{)}$ は、凍結保存温度-20°C の ATP 濃度 3.75 mM の K_D $179.50 \times 10^{-4} \text{ (day}^{-1}\text{)}$ と近い値を示した。これらの結果は、ATP が存在するような高鮮度魚肉を-20°C で凍結保存した場合、そのときの ATP の変性抑制効果は、死後硬直以降の ATP がほぼ消失した鮮度である魚肉を-30°C の低温で凍結保存した場合の

魚肉タンパク質の安定化に匹敵することを示している。さらに、スケトウダラとグチの筋原線維の K_D を比較するとグチの方が小さな値を示し、Fig. 6 に認められた凍結保存時の魚肉タンパク質の安定性の魚種差をいずれの条件においても確認することができた。魚肉の冷凍変性の研究においては、魚種毎に特異的な魚肉タンパク質の構造安定性に起因する凍結耐性特性と死後の筋肉内に存在する ATP による保護効果を考慮する必要がある。

Table 1 The apparent first order rate constant (K_D) for decrease of extractability of actomyosin from myofibrillar protein in the presence of ATP during being frozen.

Alaska pollack		$K_D \times 10^4$ (day ⁻¹)			
ATP (mM)	- 15°C	-20°C	- 30°C	- 78°C	
0	3478.91 (± 108.39)	2428.53 (± 185.91)	311.20 (± 30.63)	122.69 (± 3.40)	
0.75	2630.25 (± 74.56)	1300.62 (± 50.34)	153.80 (± 6.48)	122.97 (± 4.36)	
2.25	1288.35 (± 22.63)	1145.99 (± 54.40)	135.88 (± 4.08)	100.72 (± 7.24)	
3.75	790.88 (± 39.23)	472.19 (± 34.48)	94.79 (± 4.99)	78.86 (± 5.02)	
7.50	464.87 (± 9.41)	299.64 (± 17.85)	54.87 (± 1.41)	42.18 (± 4.32)	
Croaker		$K_D \times 10^4$ (day ⁻¹)			
ATP (mM)	- 15°C	- 20°C	- 30°C		
0	969.03 (± 30.38)	532.82 (± 17.57)	140.20 (± 6.94)		
0.75	774.08 (± 17.33)	418.93 (± 17.95)	114.69 (± 4.59)		
2.25	531.03 (± 3.34)	282.26 (± 8.19)	91.03 (± 12.67)		
3.75	406.49 (± 19.70)	179.50 (± 8.31)	61.27 (± 5.95)		
7.50	56.93 (± 2.76)	27.32 (± 0.65)	13.94 (± 2.28)		

Alaska pollack and croaker myofibrillar proteins were frozen and stored at -15, -20, -30 and -78°C in a medium containing 0.1 M KCl, 5 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), and various concentrations of ATP. The measurement method for extractability of actomyosin from myofibrillar protein was the same as in Fig. 2. The first order rate constant (K_D) for decrease of extractability of actomyosin from myofibrillar protein was calculated, using the relation, $K_D = (\ln C_0 - \ln C_t) / t$, where C_0 and C_t are the relative extractability values of actomyosin before and after t days of frozen storage. Values are mean ± standard deviation. ($n = 3$)

5. 考察

本研究において、生体内エネルギー物質である ATP に魚類筋原線維タンパク質の冷凍変性抑制効果があり、しかもそれは濃度依存性を示すことが明らかとなった。ATP については、死後の筋肉内における ATP から IMP, イノシン, ヒポキサンチンに至る各分解生成物の経時変化が研究され鮮度指標 K 値として活用されているが、⁵⁾ ATP そのものの筋肉タンパク質変性抑制作用に関する研究報告は非常に少ない。^{8-12,25)} この原因の一つは、ATP がミオシン ATPase の基質であるため、通常の生理的な条件下では ATP が爆発的な速度で分解されてしまうために、一定の ATP 濃度を維持した試験系を組むことの困難さにあると考えられる。吉岡らは Ca-ATPase の熱変性に及ぼす ATP の変性抑制作用を測定するために、ATP 再生系のホスホエノールピルビン酸とピルビン酸キナーゼを共存させ、1 mM MgCl₂ 共存下で最大 1 mM の ATP 濃度を維持した状態で加熱処理試験を行った。^{9,10)} その結果、Ca-ATPase を指標としたミオシン (0.5 M KCl 溶液中) の ATP による熱変性の抑制効果は、ATP とミオシンがほぼ等モルで発揮されることを報告している。ミオシン ATPase 活性部位の ATP による変性抑制効果は、ミオシン ATPase 活性部位への ATP の結合によることを示唆する結果である。一方、筋肉細胞内のミオシン濃度 (0.2 mM)¹⁰⁾ と ATP 濃度 (5–10 mM) の比は、約 25 から 50 倍でありミオシン量に比べて過剰の ATP が存在している。本研究では、試験系として筋肉タンパク質に近い筋原線維を用い、0.1 M KCl 溶液に EDTA を共存させることにより ATPase を抑制し、サンプル調製から凍結保存中の一連の試験過程で ATP 濃度を本来の生理的な濃度に維持した実験系を導入した。ただし、凍結試験溶液におけるミオシン濃度は約 0.02 mM であり、今回試験を行った ATP 濃度はミオシンに対して過剰に存在する条件である。今回の試験結果は、生理的な ATP 濃度下において、ミオシンに対して過剰ではあるが ATP 濃度に依存して筋原線維タンパク質の凍結変性が抑制されことを

示した。この結果は、吉岡らがミオシン ATPase 活性の熱安定性に対する ATP の保護効果は、ミオシン濃度と等モル濃度で発揮されるという結果と異なるものである。この違いについては、本研究では 0.1 M KCl 溶液での筋原線維タンパク質を使用し、冷凍変性に対する ATP の抑制効果をアクトミオシン抽出性を指標に測定したことからミオシン分子の塩溶解性に対する変性抑制効果を測定していること、ATP の変性抑制効果には ATPase 活性部位への結合によるもの以外に冷凍すり身などの冷凍変性防止剤として使用される糖のようなタンパク質変性抑制効果と同様の機序が存在する可能性を示唆すること、あるいは ATP 濃度を維持するために EDTA を添加した系で行っているために ATP とミオシンとの親和性に影響を及ぼした可能性が推察される。

第2章 ATPによるマグロミオシンサブフラグメント-1の酸性pHにおける熱変性抑制

1. 研究目的

マグロ類やブリ類の品質価値を著しく低下させる現象として「ヤケ肉」の発生がある。ヤケ肉は延縄、旋網や一本釣漁業および養殖漁業のいずれでも起こり問題となっている。ヤケ肉が発生すると、マグロ類の赤身肉やブリ類の筋肉が透明感のない白色に変わり、時間が経過するとさらに褐色へと変化する。同時に肉質は水っぽい食感となり商品価値を著しく低下させる。こうしたヤケ肉は解体して初めて分かることから、卸や仲買業者の大きなリスクとなるとともに、信頼を損ねる一因となる。高品質マグロ肉の安定供給のためにヤケ肉発生機構の解明および防止法の開発が重要な課題となっている。ヤケ肉の発生は、魚体の体温上昇および筋肉のpH低下が原因とされている。1978年に小長谷らは、モデル実験でマグロヤケ肉の原因は高体温と低pHの相乗作用であることを提唱し^{28,29)}、その後、多くの研究者によってヤケ肉の研究は続けられ成書³⁰⁾として報告された。

赤身魚は高速で遊泳するため筋収縮で多量のATPを消費するが、生きていながらあいだは酸素供給によって効率的にATPを再生産している。しかし、漁獲時の激動や致死後酸素供給が停止すると、筋肉中は嫌気状態となりグリコーゲンの分解により乳酸が生成され、同時にATP分解にともなうH⁺の生成により筋肉pHの低下が起きる。さらに、漁獲時に激動させることで魚体の体温が上昇し、魚肉タンパク質の変性が促進する。特に、マグロ類などの大型魚では魚体の中心部まで冷却されるまでに時間がかかるため、魚肉タンパク質は高温、低pHに曝露される時間が長くなり、ミオシンやミオグロビンの変性が促進される。³⁰⁻³²⁾

緒言および第1章において、ATPはミオシンあるいは筋原線維タンパク質の

熱変性や冷凍変性を抑制することが示唆されている。さらに、ATP はミオグロビンのメト化の進行を抑制することも報告されている。^{33, 34)} ATP は生物が生きている間は効率的に生合成されており、生理的な活動により消費されても常にほぼ一定の濃度を保持している。また、死後の一定期間は生きていた時と同程度の濃度を維持するが、その後低下し始め、低 ATP 濃度で死後硬直を起し、種々の品質低下を引き起こす。一方、マグロやブリのヤケ肉では、致死直後に ATP のほとんどは消失することが報告されている。^{13, 14)} ATP の消失が酸性 pH 下におけるミオシンの熱変性にどの程度影響を及ぼすかについては、まだ、研究がなされていない。

本研究では、より単純な系で ATP による魚肉筋肉タンパク質の熱安定化作用を測定するためにミオシンの ATPase active site であるミオシン S-1 に対する ATP の熱変性抑制効果について検討した。マグロのヤケ肉は漁獲時の高体温と酸性 pH が原因とされ、その発生には個体差はあるが、体温は 30°C 付近まで上昇し pH は 6 以下になる場合が多い。¹³⁾ そこで、酸性 pH に調整したマグロミオシン S-1 の 30°C における熱変性に対する ATP の作用について検討した。

2. 実験材料

ミオシン S-1 の調製にはミナミマグロ *Thunnus maccoyii* の高鮮度冷凍赤身肉を使用した。約 200 g に柵取りされた冷凍品を新洋水産有限会社より 3 kg 購入し、実験に供するまで -80°C の冷凍庫で保管した。この冷凍品は急速解凍をすると解凍硬直を起すことを確認したので、魚肉中に高濃度の ATP を含有した高鮮度冷凍品であると推定し使用した。

3. 実験方法

(1) マグロ筋原線維からミオシン S-1 の調製

ミオシン S-1 の調製は、今野らの方法³⁵⁾ に準じて筋原線維から調製したが、 α -キモトリプシン消化の条件については検討を行った。すなわち、氷水中で約 3 時間保持して半解凍した高鮮度ミナミマグロを細切後、氷冷下で 3 倍量の 0.1 M KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) 溶液を添加してホモジナイズし、5,000 rpm 15 分間遠心分離し沈殿を得た。これに同溶液を加えて沈殿を懸濁攪拌後、同様に遠心分離をした。この操作を 3 回繰り返して水溶性画分を除き、得られた沈殿画分を筋原線維とした。筋原線維は α -キモトリプシン消化のために 0.05 M KCl, 20 mM Tris-maleate (pH 7.0) に懸濁した。筋原線維から S-1 の調製は、1 mM EDTA および 0.1 mM DTT 共存下で筋原線維を α -キモトリプシンで 20°C にて 30 分間消化し、ミオシン分子を S-1 と rod の接続部位で選択的に切断した。キモトリプシン消化は終濃度 0.3 mM PMSF を添加して停止し、10,000 rpm で 20 分間遠心分離を行い沈殿に S-1 を含む画分を集めた。得られた沈殿に終濃度 10 mM PPI (Na) -Mg を含む 0.05 M KCl, 20 mM Tris-maleate (pH 7.0) 溶液を加えてよく攪拌し、10,000 rpm で 30 分間遠心分離し、アクチンから解離した S-1 を上清に回収した。得られた上清の 40–50%飽和硫酸画分を 10,000 rpm で 20 分間遠心分離し S-1 を沈殿に集め、0.1 M KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) 溶液に透析して硫酸を除き 10,000 rpm で 20 分間遠心分離し上清画分を S-1 として使用した。

筋原線維からミオシン S-1 の調製過程におけるタンパク質組成は、第 1 章と同様に Laemmli の方法²⁴⁾ の従い 10% アクリルアミドゲルを用いて SDS-PAGE により分析した。

(2) pH 調整および ATP-Mg 共存下におけるミオシン S-1 の加熱処理

ミオシン S-1 の pH の調整は、pH 5.5–7.0 の場合は 0.1 M KCl, 20 mM Tris-maleate を、pH 7.5 の場合は 0.1 M KCl, 20 mM Tris-HCl の溶液に溶解して行った。各 pH に調整したミオシン S-1 (タンパク質濃度 1 mg/mL) に終濃度 1 mM MgCl₂ および最大 7.5 mM の ATP を添加して 30°C に保持し、経時的に取り出し氷冷して加熱を止めた後、ミオシン S-1 の濁度を測定した。その後、0.1 M KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) 溶液に透析し MgCl₂ と ATP, ATP 分解物を除去した S-1 を加熱処理 S-1 とした。

(3) 加熱処理ミオシン S-1 の濁度測定および解析

ミオシン S-1 の熱変性の経時変化を S-1 の加熱処理時の濁度を指標にして測定した。S-1 の濁度は 350 nm での吸光値を測定した。濁度の経時変化については、濁度が最大となったときの吸光度の値の 1/2 に達するまでの時間 (sec) を $\tau_{1/2}$ として濁度増加速度を解析した。

(4) 加熱処理ミオシン S-1 の ATPase 活性測定

加熱処理した S-1 の Ca-ATPase 活性は以下の反応液組成で 25°C で測定した。0.5 M KCl, 5 mM CaCl₂, 25 mM Tris-maleate (pH 7.0), 1 mM ATP, 0.05–0.10 mg/mL S-1。ミオシン S-1 の各 pH における加熱処理時の ATP 分解速度を比較するために、Mg-ATPase 活性を以下の反応液組成で 30°C で測定した。0.1 M KCl, 1 mM MgCl₂, 20 mM Tris-maleate (pH 5.5–7.0) または 20 mM Tris-HCl (pH 7.5–9.0), 1 mM ATP, 0.2 mg/mL S-1。第 1 章と同様に遊離した無機リン酸を Gomori 法²²⁾ で測定した。タンパク質濃度は第 1 章と同様にビウレット法²³⁾ によって比色定量した。

(5) ミオシン S-1 ATPase の変性速度恒数の算出

各 pH および ATP 共存下で加熱処理したミオシン S-1 の Ca-ATPase 活性の失活の経時変化を下記の一次反応式に従って解析し、変性速度恒数 (K_D) を算出した。

$$K_D = (\ln C_0 - \ln C_t) / t$$

ここで、 C_0 および C_t は加熱前と t 時間加熱後の活性の相対値である。

(6) ATP 濃度の測定

0.5 mM ATP 存在下で 30°C で保持したときのミオシン S-1 溶液 (0.1 M KCl, 1 mM MgCl₂, 20 mM Tris-maleate (pH 6.0), 1 mg/mL S-1) 中の ATP 濃度を測定した。すなわち、ATP 存在下、30°C でそれぞれ一定時間保持したミオシン S-1 溶液に終濃度 5% の PCA を添加し除タンパク後、KOH 溶液で中和した溶液を 5,000 rpm で 5 分間遠心分離し、得られた上清を 0.45 μm メンブレンフィルター処理した濾液を分析試料とした。ATP 濃度の分析は、第 1 章と同様に島津製作所製 HPLC システムを用い、Murata らの方法に従って行った。²¹⁾

(7) 統計処理

測定は 3 検体で行い、得られた実験結果はエクセル統計 (株式会社社会情報サービス社製) を用い、多群間の有意差を Tukey 法で解析した ($p < 0.05$)。

4. 結果

(1) マグロ筋原線維からミオシン S-1 の調製

筋原線維の α -キモトリプシン消化条件を SDS-PAGE により検討した結果、1/500 (w/w) の α -キモトリプシンを用いて 20°C で 30 分間消化することでミオシンはほとんど消失し、S-1 とロッドに切断されることを確認した (Fig. 7a)。上記条件で筋原線維タンパク質をキモトリプシン消化した後、今野らの方法に準じてミオシン S-1 を調製した。最終的に得られたミオシン S-1 は、アクチンを含まず、純度の高いものであった (Fig. 7b)。また、出発材料として使用した冷凍ミナマグロの柵が異なっても、得られたミオシン S-1 の Ca-ATPase 比活性は約 0.5–0.6 $\mu\text{mol Pi}/\text{min}/\text{mg}$ と安定して高い値を示した。

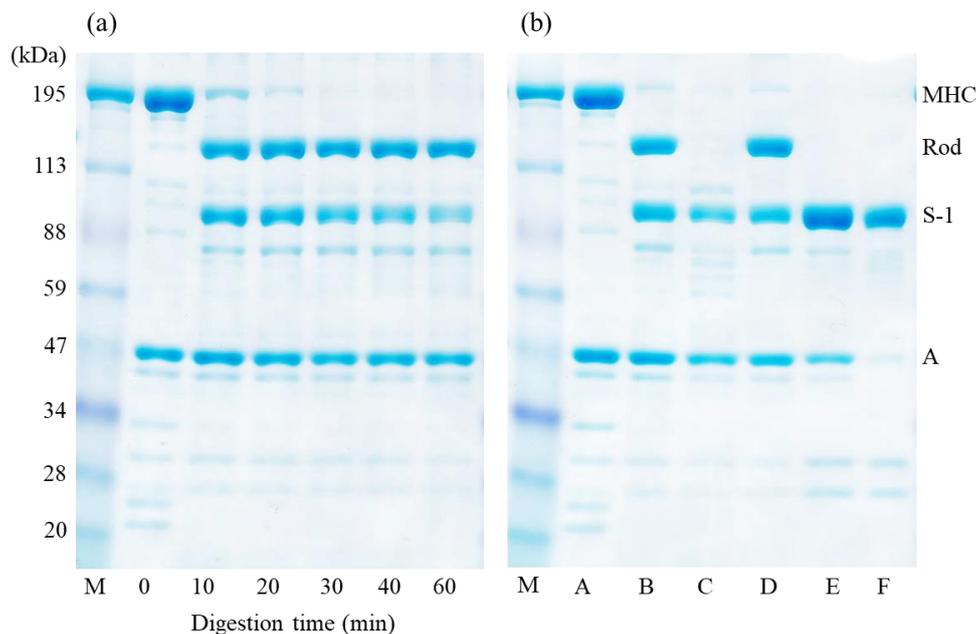


Fig. 7 SDS-PAGE pattern of the α -chymotrypsin digest of tuna myofibrils and preparation of myosin S-1 from tuna myofibrils. (a): Tuna myofibrils were digested in a medium of 0.05 M KCl, 20 mM Tris-maleate (pH 7.0), 1 mM EDTA and 0.1 mM DTT by using 1/500 (w/w) of chymotrypsin at 20°C. (b): (A); tuna myofibril, (B); α -chymotrypsin digest of myofibrils (digestive condition: 1/500 (w/w), 20°C, 30 min), (C); soluble fractions of the digest, (D); insoluble fractions of the digest, (E); crude S-1 released from the digest, (F); purified S-1 by $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ fractionation and (M); molecular weight markers. MHC, Rod, S-1, A mean myosin heavy chain, myosin rod, subfragment-1 and actin, respectively.

(2) 各 pH における ATP-Mg 共存下でのミオシン S-1 の加熱による濁度変化

溶液の pH を 5.5–7.5 に調整したミオシン S-1 に 1 mM MgCl₂ および最大 7.50 mM の ATP を添加し、30°C で加熱したときのミオシン S-1 溶液の濁度変化を 350 nm の吸光値を指標として測定した。pH 6.0 と pH 7.0 の結果を Fig. 8 (a, b) に示す。ATP を添加しないで加熱した場合に比べて、ATP-Mg²⁺ 存在下で加熱した場合では濁度の上昇が緩やかになる傾向を示した。また、酸性の pH 6.0 よりも中性の pH 7.0 のほうが濁度の上昇は遅い傾向を示した。図には示さないが、他の pH におけるミオシン S-1 の濁度変化も Fig. 8 の結果と同様に ATP 濃度依存性を示し、pH が低くなるほど濁度の上昇が速く、中性 pH で濁度の上昇は緩やかとなった。さらにそれぞれの濁度変化について、濁度が最大となったときの吸光度の値の 1/2 に達するまでの時間を $\tau_{1/2}$ (sec) とし、その逆数を濁度増加速度 (sec⁻¹) として解析した結果を Fig. 9 に示す。ATP 無添加の場合、濁度の上昇速度は pH 5.5 ; $33.33 \times 10^{-2} \text{ sec}^{-1}$, pH 6.0 ; $22.22 \times 10^{-2} \text{ sec}^{-1}$, pH 6.5 ; $20.00 \times 10^{-2} \text{ sec}^{-1}$, pH 7.0 ; $12.50 \times 10^{-2} \text{ sec}^{-1}$, pH 7.5 ; $5.80 \times 10^{-2} \text{ sec}^{-1}$ と pH に依存し、pH が酸性で速く、中性から微アルカリになるほど遅なる傾向を示した。0.5 mM および 1.0 mM ATP を添加した場合、pH 5.5 の濁度増加速度はそれぞれ $28.57 \times 10^{-2} \text{ sec}^{-1}$ と $25.00 \times 10^{-2} \text{ sec}^{-1}$ を示し ATP 無添加に近い値を示したが、pH 6.0 以上では $8.33 \times 10^{-2} \text{ sec}^{-1}$ から $2.30 \times 10^{-2} \text{ sec}^{-1}$ と強い濁度増加抑制効果が認められた。また、生体内の ATP 濃度に近い 7.5 mM ATP を添加した場合には、いずれの pH においても加熱による濁度の上昇が $10.00 \times 10^{-2} \text{ sec}^{-1}$ から $2.08 \times 10^{-2} \text{ sec}^{-1}$ と非常に遅く、特に、pH 5.5 で ATP による熱変性抑制効果は顕著であった。以上の結果から、ミオシン S-1 の加熱による濁度変化は pH に影響されるのと同時に ATP 濃度依存性を示し、特に、酸性 pH 下において ATP によりミオシン S-1 の熱変性が顕著に抑制されることが明らかとなった。

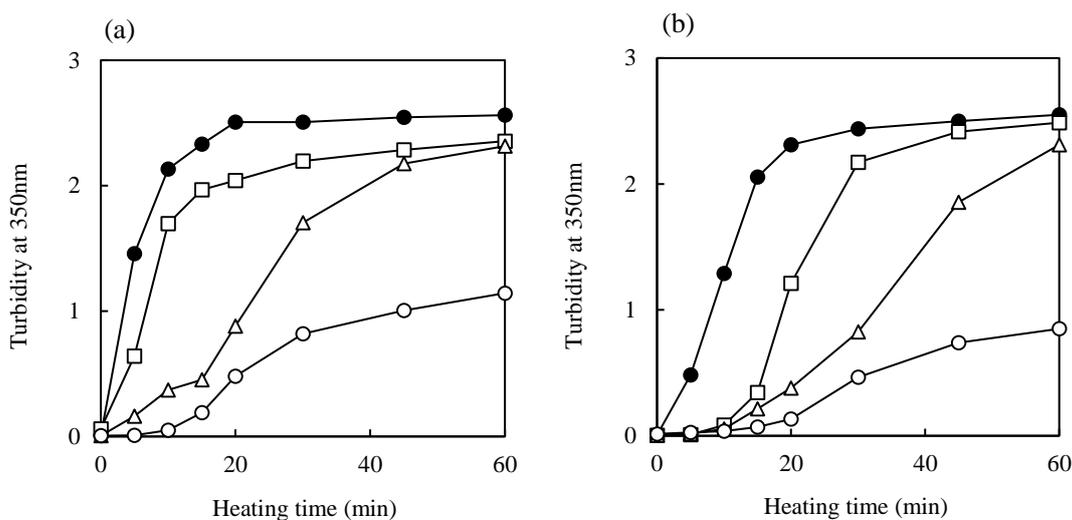


Fig. 8 Changes in the turbidity of tuna myosin S-1 by heat treatment at 30°C with or without ATP. S-1 (protein concentration 1 mg/ml) was treated at 30°C in a medium containing 0.1 M KCl, 1 mM MgCl₂, 20 mM Tris-maleate (pH 6.0, 7.0), and various concentrations of ATP. The final concentration of ATP added was 0 (●), 0.5 (□), 1 (Δ), 7.5 (○) mM, respectively. The heat treatment was stopped by cooling in iced water and then the turbidity of myosin S-1 solution was measured at an absorbance of 350 nm. (a) ; pH 6.0, (b) ; pH 7.0

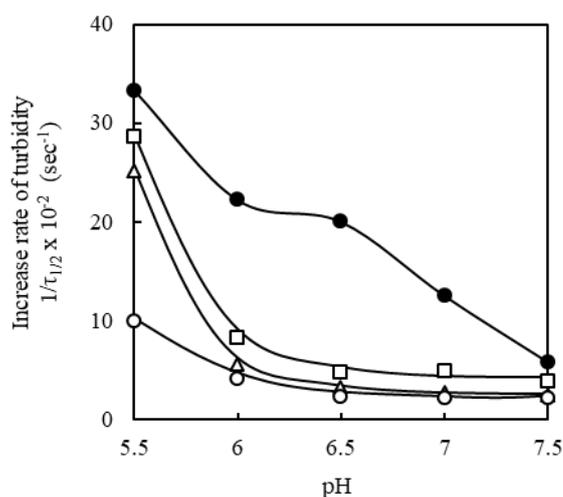


Fig. 9 pH dependence of the rate of turbidity formation of tuna myosin S-1 by heat treatment at 30°C with or without added ATP. S-1 (protein concentration 1 mg/ml) was treated at 30°C in a medium containing 0.1 M KCl, 1 mM MgCl₂, 20 mM Tris-maleate (pH 5.5-7.0) or 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), and various concentrations of ATP. The final concentration of ATP added was 0 (●), 0.5 (□), 1.0 (Δ) and 7.5 (○) mM, respectively. The heat treatment was stopped by cooling in iced water and then the turbidity of myosin S-1 solution was measured at an absorbance of 350 nm.

(3) 各 pH における ATP-Mg 共存下でのミオシン S-1 ATPase 活性の加熱変性速度

溶液の pH を 5.5–7.5 に調整したミオシン S-1 に 1 mM MgCl₂ および各濃度の ATP を添加し、30°C で加熱処理したときのミオシン S-1 の Ca-ATPase 活性の経時変化を測定し、一次反応式に従い解析した結果を Fig. 10 (a–e) に示す。ATP 未添加のミオシン S-1 は、いずれの pH においても加熱により一次反応式に従って失活したが、変性速度は pH 依存性を示し、pH 5.5 の失活速度 ($838.04 \times 10^{-5} \text{ sec}^{-1}$) は pH 7.5 ($87.25 \times 10^{-5} \text{ sec}^{-1}$) の約 10 倍であった。一方、0.5 および 1.0 mM の ATP を添加したミオシン S-1 では、加熱初期の変性速度は遅く、その後、急速に失活する 2 段階の変性様式を示した。0.5 mM ATP 添加における 2 段目の失活開始時間は、pH 5.5 で加熱 5 分後、pH 6.0 で加熱 10 分後、pH 6.5 で加熱 15 分後、pH 7.0 と pH 7.5 で加熱 20 分後となり、pH に依存して 2 段目の失活開始時間が遅れる結果となった。また、1 mM ATP 添加における失活開始時間は、pH 5.5 で加熱 15 分後、pH 6.0 で加熱 20 分後、pH 6.5 で加熱 25 分後、pH 7.0 で加熱 40 分後、pH 7.5 で加熱 45 分後であり、pH 5.5–6.5 までは 0.5 mM ATP 添加のミオシン S-1 と同様に pH に依存して 5 分ずつ失活開始時間が遅れる結果となった。また、生体内の ATP 濃度に近い 7.5 mM ATP を添加すると、いずれの pH においても加熱 60 分後まで活性の急速な低下は起こらなかった。以上の結果は、加熱時にミオシン S-1 溶液に添加する ATP の濃度を増加することに伴い、Ca-ATPase 活性の急速な失活が始まるまでに要する時間が長くなり、また、失活速度も僅かながら小さくなる傾向を示した。Ca-ATPase 活性が急速に低下する原因は添加した ATP が分解されるためと推察される。そこで、pH 6.0 で 0.5 mM ATP を添加し

たミオシン S-1 溶液を 30°C にて加熱処理した後，5% PCA にて除タンパクし，溶液の pH を KOH 溶液で中和して ATP 濃度を HPLC で測定したところ，加熱 5 分後では 0.23 mM，10 分後では 0.15 mM の ATP が残っていたが，加熱 15 分では ATP はほとんど分解し 0.03 mM であった。Ca-ATPase 活性の低下結果と対応させてみると，加熱処理中に ATP 濃度が低下する時間と Ca-ATPase 活性が急速な低下を始める時間はほぼ一致していた。

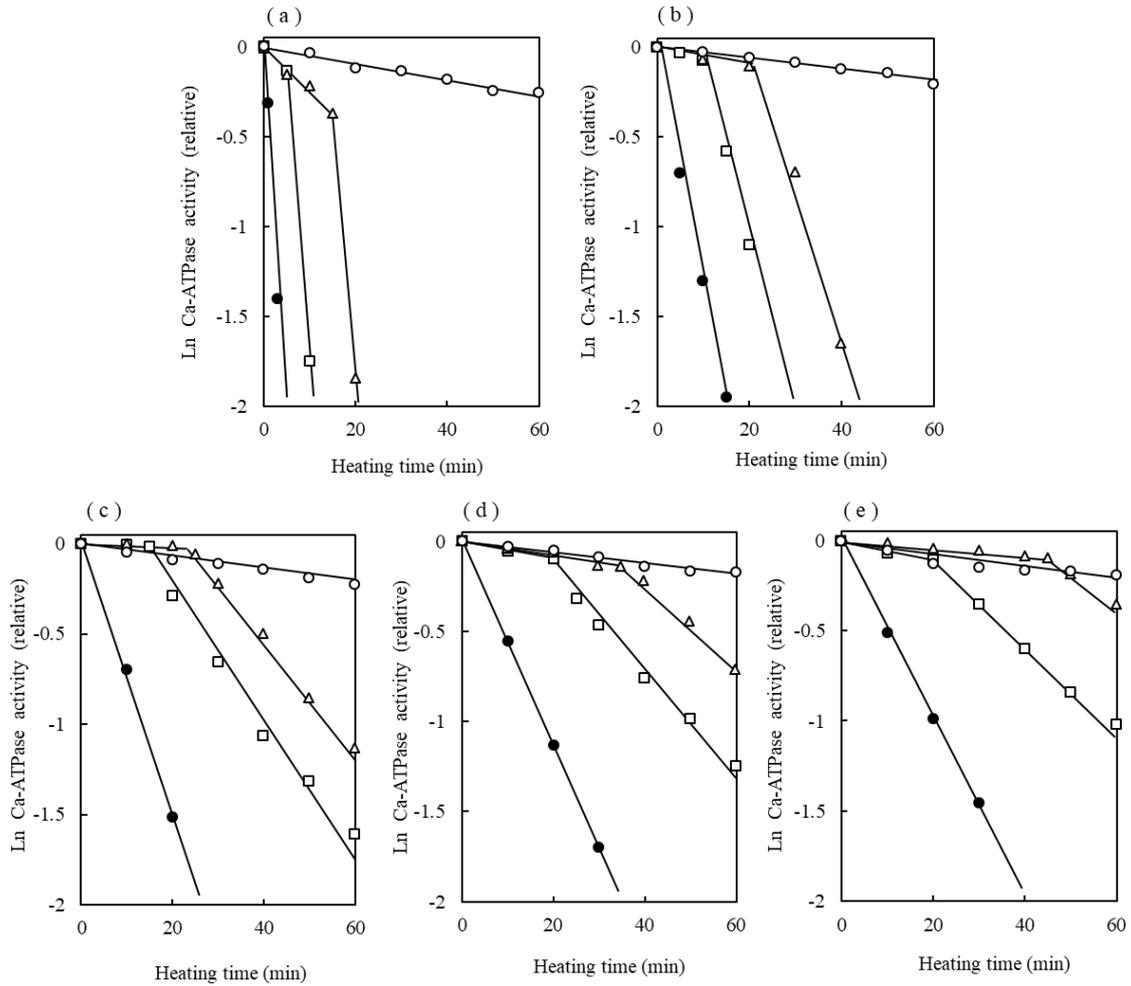


Fig. 10 Thermal inactivation of Ca-ATPase activity of tuna myosin S-1 in the presence of various concentrations of ATP at pH 5.5-7.5. Tuna myosin S-1 (1 mg/ml) was treated at 30°C in a medium containing 0.1 M KCl, 1 mM MgCl₂, various concentrations of ATP and (a): 20 mM Tris-maleate (pH 5.5), (b): 20 mM Tris-maleate (pH 6.0), (c): 20 mM Tris-maleate (pH 6.5), (d): 20 mM Tris-maleate (pH 7.0), (e): 20 mM Tris-HCl (pH 7.5). The final concentration of ATP added was 0 (●), 0.5 (□), 1 (△), and 7.5 (○) mM, respectively. Treatment was stopped by cooling in iced water and then dialyzed against 0.1 M KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) to remove ATP and its related materials and Mg²⁺. Ca-ATPase activity of tuna myosin S-1 was assayed at 25°C in reaction medium containing 0.5 M KCl, 5 mM CaCl₂, 25 mM Tris-maleate (pH 7.0), 1 mM ATP, and 0.05–0.1 mg/mL myosin S-1.

Fig. 11 にマグロミオシン S-1 の 30°C における Mg-ATPase 活性を示す。Mg-ATPase 活性は酸性 pH で高く，中性 pH で低い活性を示した。各 pH における Mg-ATPase 活性の違いが 30°C 加熱処理時に添加した ATP の濃度低下速度に影響し，変性様式が 1 次反応式で折れ曲がる時間に差が認められる原因であることが示された。以上の結果から，マグロミオシン S-1 の Ca-ATPase 活性の加熱による失活は，添加した ATP により抑制され，抑制する時間は ATP 濃度に依存することが明らかとなった。

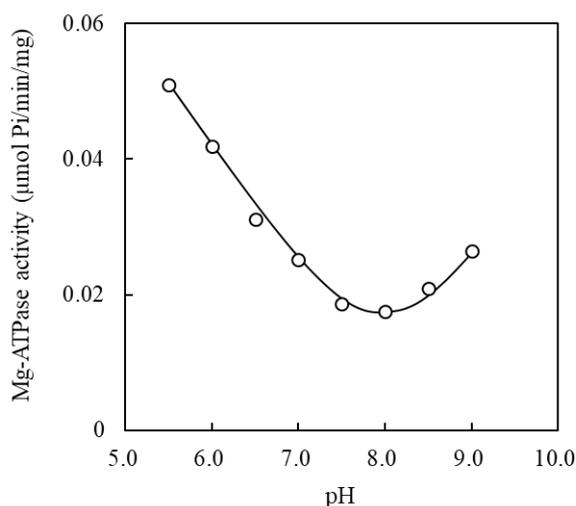


Fig. 11 pH dependence of Mg-ATPase activity of tuna myosin S-1. The ATPase assay was carried out at 30°C in a medium containing 0.1M KCl, 1mM MgCl₂, 20 mM Tris-maleate (pH 5.5-7.0) or 20 mM Tris-HCl (pH 7.5-9.0) and 0.1 mg/ml myosin S-1.

(4) ミオシン S-1 の Ca-ATPase 変性速度恒数による ATP の変性抑制効果の解析

各濃度の ATP を存在させて 30°C で加熱処理したマグロミオシン S-1 について、加熱時間にもなう Ca-ATPase 活性の低下の経時変化を一次反応式で解析したところ、Fig. 10 に示したように加熱初期の Ca-ATPase 活性の低下が遅い変性とそれに続く速い低下の 2 段階の変化様式を示した。後期の速い変性は ATP の濃度低下に伴うものである。これらの結果から、Ca-ATPase 活性の加熱初期の低下速度を ATP が存在し変性抑制を示しているときの変性速度恒数 (K_D) として求め、結果を Table 2 に示す。ATP を添加していないミオシン S-1 の pH 5.5 における K_D は $838.04 \times 10^{-5} \text{ sec}^{-1}$ であり、他のいずれの pH, ATP 添加における K_D 値に対して有意差を示した ($p < 0.05$)。pH 5.5 において、各濃度の ATP を添加した場合の K_D は小さくなり、0.5 mM ATP の添加で K_D は $49.63 \times 10^{-5} \text{ sec}^{-1}$ であった。これは、0.5 mM ATP 存在下で pH 5.5 および 30°C における熱安定性が約 17 倍になったことを示している。いずれの pH においても ATP を添加することで K_D は小さくなり、ATP による変性抑制効果は ATP 濃度 0.5–7.5 mM 間で有意差は見られなく、pH に関わりなくその安定性は約 12–17 倍になることが示された。ATP が 0.5 mM 存在することにより酸性 pH 下でのミオシン S-1 の 30°C における熱変性は抑制され、酸性 pH 下であっても ATP が存在すれば、あたかも pH が中性域における熱変性に匹敵する熱変性速度となることが示唆された。

Table 2 The apparent first order rate constant (K_D) for early stage inactivation of Ca-ATPase activity of tuna myosin S-1 in the presence of ATP.

ATP (mM)	$K_D \times 10^5 (\text{sec}^{-1})$				
	pH 5.5	pH 6.0	pH 6.5	pH 7.0	pH 7.5
0	838.04 (± 115.79) ^a	196.01 (± 17.57) ^{bcd}	143.11 (± 30.34) ^{cdf}	115.64 (± 22.78) ^{dfg}	87.25 (± 6.84) ^{ef}
0.5	49.63 (± 4.46) ^{eg}	15.45 (± 11.40) ^e	12.33 (± 10.42) ^e	6.53 (± 1.60) ^e	6.50 (± 2.30) ^e
1	37.36 (± 6.49) ^{eg}	12.39 (± 4.31) ^e	11.13 (± 3.23) ^e	7.13 (± 3.17) ^e	5.05 (± 1.80) ^e
7.5	16.96 (± 11.41) ^{eg}	11.51 (± 6.17) ^e	10.78 (± 4.26) ^e	7.16 (± 2.16) ^e	5.29 (± 2.73) ^e

The apparent first-order rate constant (K_D) for inactivation of Ca-ATPase activity in the presence of ATP was calculated using the data shown in Figs. 4 (a-e).

Values are mean \pm standard deviation ($n=3$). Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$)

5. 考察

マグロ類やブリ類で発生するヤケ肉は、身質が水っぽくなり、色調は白く、酸味の強い味となり商品価値は大きく低下する。特に、夏場の高水温期の水揚げ時に激動した魚体で発生頻度が高くなることから、高水温期での水揚げを制限したり、激動しにくい水揚げや魚肉の急速冷却法の工夫などの取り組みがなされている。ヤケ肉の発生メカニズムは、水揚げ時の激動による魚体温の 30°C におよぶ上昇と魚体深部の冷却速度が遅く高温状態が続くこと、同時に嫌気的な高温状態でのグリコーゲン分解酵素の活発化による乳酸生成量の増加および ATP 分解による H⁺ 生成により魚肉 pH の酸性化が起こり、酸性 pH 下における筋原線維タンパク質やミオグロビンの熱変性が原因であることが明らかにされている。²⁸⁻³²⁾ 一方、私たちはヤケ肉の発生が水揚げ直後の数時間以内に認められることと魚肉中の ATP の消失が急速に進行する現象に注目した。試験的に調製したヤケ肉の発生条件となる陸上苦悶死サンプルでは、漁獲後 3 時間以内に ATP は完全に消失し、pH も 5.5 付近まで急速に低下することが報告されている。^{13, 14)} しかしながら、酸性 pH 下での筋肉タンパク質の熱変性に及ぼす ATP の影響については研究例が報告されていないため本研究で取り組んだ。ATP の影響を確認するために生理的な塩濃度に近い条件下で研究を行うこととしたが、ミオシンは生理的塩濃度下ではフィラメントを形成し扱いにくいいため、ミオシンの ATPase サイトであり生理的塩濃度下で溶解するミオシン S-1 を使用した。また、ミオシン S-1 を使用することにより、Ca-ATPase 活性と溶液の濁度を変性の指標とすることができた。

マグロミオシン S-1 の調製は、生きた状態で漁獲され高濃度の ATP を含んだ状態で超低温下で急速凍結されたミナミマグロ冷凍品を試験材料として使用することができ、Ca-ATPase 比活性が高く安定したミオシン S-1 で試験を行うことができた。マグロミオシン S-1 は、今野らの方法に準じて、マグロ筋原線維

に対する α キモトリプシン消化条件を決定した後、ミオシン S-1 の PPi-Mg^{2+} によるアクチンからの解離と硫酸分画を組み合わせた方法で純度の高い標品として調製し使用した (Fig. 7)。マグロミオシン S-1 の各 pH 下での 30°C おける加熱処理に対する各濃度 (0.5–7.5 mM) の ATP の影響をミオシン S-1 溶液の濁度と Ca-ATPase 活性を指標に測定した結果、いずれの場合も酸性下における熱変性を強力に抑制することが明らかとなった (Fig. 8–10)。また、添加した ATP 濃度が 0.5 あるいは 1.0 mM の場合、Ca-ATPase 活性の変性様式は、一次反応式による解析で初期の遅い変性とその後速い変性の 2 段階を示した。これは加熱処理時に ATP がミオシン S-1 の Mg-ATPase により分解され、ATP 濃度がほぼ消失した時に急激な変性が進むことが確かめられた (Fig. 10, 11)。本研究で使用したミオシン S-1 の加熱変性条件下における溶液条件と ATP 濃度の関係から、0.5 mM の ATP が存在すれば酸性 pH 下での熱変性は強力に抑制されることも明らかになり、ヤケ肉発生時における ATP の急速な消失はミオシンの酸性下での熱変性の急激な進行の引き金となることが推察された (Fig. 10, Table 2)。

ATP による魚類筋原線維タンパク質の変性抑制作用の分子機序について今後詳細に検討を行う必要があるが、ATP 結合によって引き起こされるミオシンやアクチン分子の構造変化やタンパク質周辺の水和状態の変化に注目している。化学量論的なミオシン S-1 と ATP の結合比は 1 : 1 であるが、本実験条件ではミオシン S-1 に対して ATP が大過剰に存在している。すなわち、0.5 mM の ATP を添加した実験条件では、用いたミオシン S-1 (分子量 10 万 Da) の濃度を基にして計算すると、モル比としてミオシン S-1 の約 50 倍に相当する過剰量である。本試験系では、添加した ATP はミオシン S-1 の熱処理中に ATPase により分解され濃度低下が進行し、濃度がかなり低下した時に急激な変性が進行することが示された。したがって、ATP による変性抑制効果に必要なミオシン S-1 と ATP の化学量論的な量の検討は本試験結果からだけでは明らかにすること

はできない。松浦らおよび大泉らはミオシンおよび筋原線維の熱変性におよぼす糖類の保護効果を Ca-ATPase 活性を指標として検討し、糖類の効果は加熱処理に供するタンパク質濃度の影響を受けず、糖のモル濃度によって決定されることを見出した。^{36, 37)} これは、糖類はタンパク質と直接結合してその効果を現すのではなく、溶媒中の水の構造および性質に影響をおよぼしその効果を現すと推察されている。一方、ATP はミオシン S-1 と結合する性質をもつことから、ATP の保護効果がミオシン S-1 と ATP の結合とは無関係であるとは考えにくい。ミオシン S-1 と ATP の結合に加えて、溶液中の遊離の ATP のなんらかの作用によって保護効果も発現しているものと推察している。

第3章 ATPによるアカシユモクザメミオシンの尿素変性抑制

1. 研究目的

海洋生物は、海水の高塩分・高浸透圧環境に適応するために多様な浸透圧調節機能を発達させてきた。そのなかでも海産サメ・エイ類は特殊であり、生体内に高濃度の尿素を蓄積して浸透圧を海水と同レベルに上昇させることで適応している。このような浸透圧調節の仕組みは尿素浸透性と呼ばれ、海産硬骨魚類とは異なる浸透圧調節メカニズムを獲得している。一方、尿素は強力なタンパク質変性剤であり、タンパク質の立体構造を変え、酵素活性を阻害することが知られている。³⁸⁻⁴¹⁾ これらの尿素の作用は、生物の生命活動に悪影響を及ぼすほど強力な作用であるにも関わらず、海産サメ類の筋肉タンパク質は重篤な筋疾患などの変性を起こしていない。この尿素の影響を打ち消すシステムとして二つの仮説が挙げられている。一つは、尿素とともに浸透圧調節物質として生体内に高濃度で蓄積されている TMAO などのメチルアミン類が尿素変性を抑制していること、¹⁶⁾ もう一つは、尿素存在下で機能するようにサメ類の筋肉タンパク質が特殊な尿素抵抗性を示すことである。¹⁷⁻¹⁹⁾

第1章、第2章に示したように、ATPは魚類筋原線維タンパク質の冷凍変性や酸性条件下における熱変性を抑制する作用を有し、タンパク質の安定化に寄与することが示唆される。しかしながら、典型的なタンパク質変性剤であり、なおかつ魚類体内に存在する尿素の筋原線維タンパク質変性に及ぼす ATP の影響については研究がなされていない。本研究では、アカシユモクザメ *Sphyrna lewini* ミオシンの尿素変性に及ぼす ATP の効果についてミオシン Ca-ATPase の失活速度を指標にして検討した。また、対照として体内に尿素をほとんど含まないマダイ *Pagrus major* を用いて同様の試験を行った。

2. 実験材料

2016年6月に鹿児島県錦江湾で水揚げされたアカシユモクザメ (3.5 kg) の背側普通筋をミンチにし、筋肉と同量のグリセリンと混合してグリセリン筋として -30°C で貯蔵した。また、対照として使用したマダイは、2018年2月に市場で新鮮なものを購入した。

3. 実験方法

(1) ミオシンの調製

アカシユモクザメのグリセリン筋からミオシンの調製は次の方法で行った。すなわち、氷冷下でグリセリン筋に3倍量の 0.1 M KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) 溶液を加えて攪拌し、3,000×g で5分間遠心分離した。この操作を3回繰り返して得られた沈殿に同溶液を3倍量添加してホモジナイズし、3,000×g で5分間遠心分離して沈殿を得た。さらにこの沈殿に同溶液を加えて攪拌と遠心分離の操作を4回繰り返し筋原線維タンパク質を調製した。筋原線維タンパク質に終濃度 0.5 M KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.1 mM DTT, 2 mM MgCl₂, 2 mM ATP を添加して緩やかに攪拌し、氷中で10分間保持した。その後 18,000×g で30分間遠心分離して得られた上清に10倍量の冷蒸留水を加えて希釈沈殿を行い、12,000×g で20分間遠心分離して沈殿を集め、終濃度 0.1 mM DTT, 0.5 mM EGTA, 5 mM MgCl₂, 5 mM ATP を含む 0.5 M KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) 溶液に溶解した。この溶液に飽和硫安溶液を加え40–48%の硫安画分を集め、これを 0.5 M KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) 溶液に透析して硫安を除去し、18,000×g で30分間遠心分離した上清をミオシン溶液とした。マダイミオシンは新鮮肉からアカシユモクザメと同様にミオシンを調製したが、硫安分画は40–50%画分をミオシンとして集めた。

調製したミオシンの純度は、SDS-PAGE で確認し、第1章、第2章と同様に

Laemmli の方法²⁴⁾ に従い、10%アクリルアミドゲルを使用した。

(2) ミオシン ATPase 活性の測定

アカシユモクザメミオシンの Ca-ATPase, K-EDTA-ATPase および Mg-ATPase 活性の KCl 濃度依存性を測定した。各 ATPase 活性の測定条件は以下のとおりである。Ca-ATPase 活性は 5 mM CaCl₂, 25 mM Tris-maleate (pH 7.0), 1 mM ATP, 0.05–0.6 M KCl および 0.1–0.3 mg/mL のミオシン, K-EDTA-ATPase 活性は 5 mM EDTA, 25 mM Tris-maleate (pH 7.0), 1 mM ATP, 0.05–0.6 M KCl および 0.1–0.3 mg/mL のミオシン, および Mg-ATPase 活性は, 5 mM MgCl₂, 25 mM Tris-maleate (pH 7.0), 1 mM ATP, 0.05–0.6 M KCl および 0.5 mg/mL のミオシンの反応組成で 25°C で反応した。遊離する無機リン酸を Gomori 法²²⁾ を用いて比色定量し, 比活性 ($\mu\text{mol Pi}/\text{min}/\text{mg of Myosin}$) を求めた。なお, タンパク質濃度は牛血清アルブミンを標準としてビウレット法により比色定量した。²³⁾

(3) ミオシンの尿素処理とミオシン Ca-ATPase 活性の測定

ミオシン(タンパク質濃度 5 mg/mL)の 0.5 M KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) 溶液に終濃度 0–1 M の尿素を添加して 0°C (氷中) で 24 時間保持した。このミオシン溶液に 4 倍量の氷冷した 0.5 M KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) 溶液を添加し, ミオシン溶液中の尿素濃度を希釈して尿素変性を停止させた。その後, 速やかに同溶液に透析して尿素を除き, ミオシン Ca-ATPase 活性を測定した。ミオシン Ca-ATPase 活性の測定は, 5 mM CaCl₂, 25 mM Tris-maleate (pH 7.0), 1 mM ATP, 0.05 M KCl および 0.1–0.15 mg/mL ミオシンで 25°C で測定した。

(4) ATP 共存下におけるミオシンの尿素変性速度恒数の測定

ミオシン (タンパク質終濃度 5 mg/mL) の 0.5 M KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5)

溶液に終濃度 0.5 mM EGTA, 1 mM MgCl₂, 1 M Urea および 0–2 mM ATP を添加し, 0°C, 10°C, 20°C で保持し, 経時的にその一部を取り出した。取り出したミオシン溶液に 4 倍量の氷冷した 0.5 M KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) 溶液を添加し, ミオシン溶液中の尿素を希釈するとともに冷却して尿素変性と熱変性を停止させた。その後, 冷 0.5 M KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) 溶液に透析して EGTA, MgCl₂, Urea, ATP 等を除いたミオシンの Ca-ATPase 活性を測定した。また, 尿素によるミオシン Ca-ATPase の失活の経時変化は一次反応式に従うことを認めたので, 変性速度恒数 (K_D) を次式にて算出した。

$$K_D = (\ln C_0 - \ln C_t) / t$$

ここで C_0 および C_t は加熱時間 (t 分) 前後における活性の相対値である。

(5) ATP 濃度の測定

各濃度の ATP と 1 M Urea 存在下で各温度で処理したときのミオシン溶液中の ATP 濃度を測定した。すなわち, 前述した ATP と尿素存在下, 0°C, 10°C, 20°C でそれぞれ一定時間処理したミオシン溶液に終濃度 5% の PCA 溶液を添加し除タンパク後, KOH 溶液で中和した溶液を 5,000×g で 5 分間遠心分離し, 得られた上清を 0.45 μm メンブレンフィルター処理した濾液を分析試料とした。ATP 濃度の分析は, 第 1 章, 第 2 章と同様に島津製作所製 HPLC システムを用い, Murata らの方法²¹⁾ に従って行った。

4. 結果

(1) アカシユモクザメミオシンの生化学的な性状

Fig. 12に調製したアカシユモクザメとマダイミオシンのSDS-PAGE図を示す。本実験の方法で筋原繊維からミオシンを調製すると、アカシユモクザメとマダイのどちらにおいても純度の高いミオシンを得ることができた。

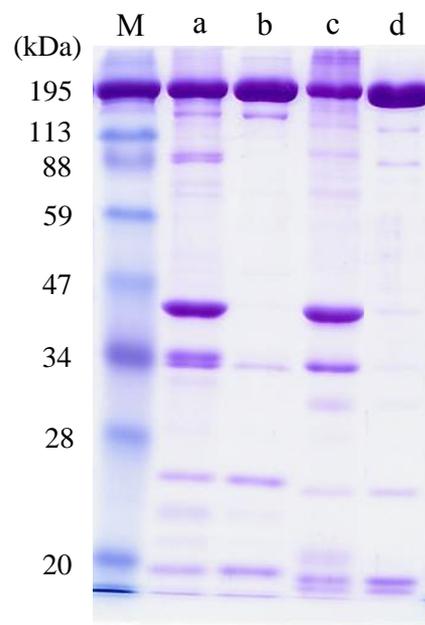


Fig. 12 SDS-PAGE pattern of myosin from myofibrils of scalloped hammerhead and red sea bream. (a) scalloped hammerhead myofibril, (b) scalloped hammerhead myosin, (c) red sea bream myofibril, (d) red sea bream myosin, (M) molecular weight marker.

得られたアカシユモクザメミオシンの Ca-ATPase, Mg-ATPase および K-EDTA-ATPase 活性の KCl 濃度依存性を Fig. 13 に示す。Ca-ATPase 活性は 0.05 M KCl で 0.368 $\mu\text{mol Pi}/\text{min}/\text{mg}$ を示し, KCl 濃度が高くなるにつれて活性は低下した。K-EDTA-ATPase 活性は, KCl 濃度の増加にともない著しく高くなり, 0.5 M KCl で 0.683 $\mu\text{mol Pi}/\text{min}/\text{mg}$ と最も高い値を示したが 0.6 M KCl 以上ではやや低下した。一方, Mg-ATPase 活性は, 最も高い値でも 0.007 $\mu\text{mol Pi}/\text{min}/\text{mg}$ であり, Ca-ATPase および K-EDTA-ATPase 活性に比べて非常に低い値を示した。

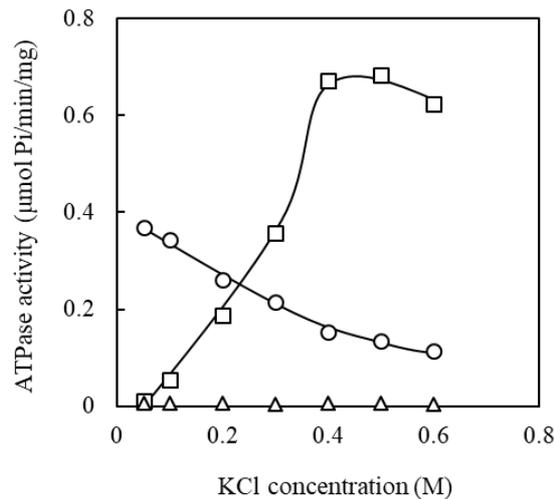


Fig. 13 KCl dependence of activities of the Ca²⁺, K⁺-EDTA and Mg²⁺-ATPase of scalloped hammerhead myosin. The ATPase assay was carried out at 25°C in a reaction medium containing 0.05 - 0.6 M KCl, 25 mM Tris-maleate (pH 7.0), 1 mM ATP, 0.1-0.5 mg/mL myosin and 5 mM CaCl₂ for Ca-ATPase (○), 5 mM EDTA for K⁺-EDTA-ATPase (□) and 5 mM MgCl₂ for Mg²⁺-ATPase (Δ).

(2) 0°C におけるアカシユモクザメミオシン Ca-ATPase の尿素変性

0°C におけるアカシユモクザメミオシンの Ca-ATPase 活性に及ぼす尿素濃度の影響を測定した。ミオシンに終濃度 0–1 M 尿素を添加し、0°C で 24 時間保持した後、透析にて添加した尿素を取り除いたミオシンの Ca-ATPase 活性の測定結果を Fig. 14 に示す。0°C で 24 時間保持した場合、尿素濃度が 0.3 M までは活性の低下は 10%以下であったが、0.4 M 付近から尿素濃度の増加にともなって大きく低下する傾向を示した。

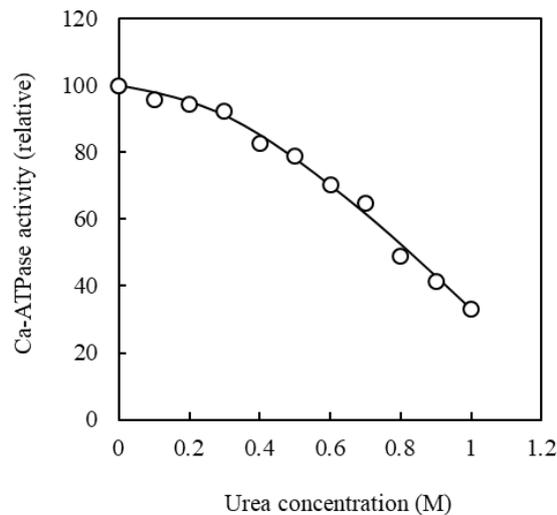


Fig. 14 Effect of urea on the Ca-ATPase activity of scalloped hammerhead myosin. Myosin was treated at 0°C in a medium containing 0.5 M KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) and 0-1 M urea. The treatment was stopped by diluting to 4 times with 0.5 M KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) and dialyzed against 0.5 M KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) to remove urea. The Ca-ATPase activity of myosin was assayed at 25°C in a reaction medium containing 0.05 M KCl, 5 mM CaCl₂, 25 mM Tris-maleate (pH 7.0), 1 mM ATP and 0.1-0.15 mg/mL myosin.

(3) ATPによるアカシユモクザメミオシン Ca-ATPase の尿素変性抑制

ATP 共存下でミオシンに終濃度 1 M の尿素を添加し 0°C で保持したときの Ca-ATPase 活性の経時変化を Fig. 15-(a) に示す。ATP と尿素を添加していないミオシンの Ca-ATPase 活性は、24 時間まで活性の低下はほとんど見られなかったが、ATP 未添加で 1 M 尿素を添加したミオシンの Ca-ATPase 活性は一次反応式に従って失活し、変性速度恒数 K_D は $53.01 \times 10^{-5} \text{ (min}^{-1}\text{)}$ であった。しかし、1 M 尿素存在下 1 mM または 2 mM ATP を添加すると、ミオシン Ca-ATPase 活性の低下が抑制され、 K_D は 1 mM ATP で $12.66 \times 10^{-5} \text{ (min}^{-1}\text{)}$ 、2 mM ATP で $8.38 \times 10^{-5} \text{ (min}^{-1}\text{)}$ であり ATP 未添加で尿素を添加したミオシンの 4–6 倍安定化した。なお、2 mM ATP を添加した方の K_D は小さくなり ATP 濃度が高いとミオシンはより安定化された。この実験系では、 Mg^{2+} と EGTA を添加しているので尿素処理中のミオシンは低活性の Mg-ATPase として ATP を分解しているが、時間経過にともなって ATP は徐々に分解され消失する。この条件でのミオシン溶液中の ATP 濃度の経時変化を確認するため、経時的に取り出したミオシン溶液中の ATP 濃度を測定した。その結果を Fig. 15-(b) に示す。添加した 1 mM および 2 mM ATP は、処理時間の経過とともに濃度は低下し、12 時間後の ATP 濃度はそれぞれ 0.25 mM, 0.64 mM であったが、ミオシン Ca-ATPase 活性の低下は一段階の一次反応式に従っていた。

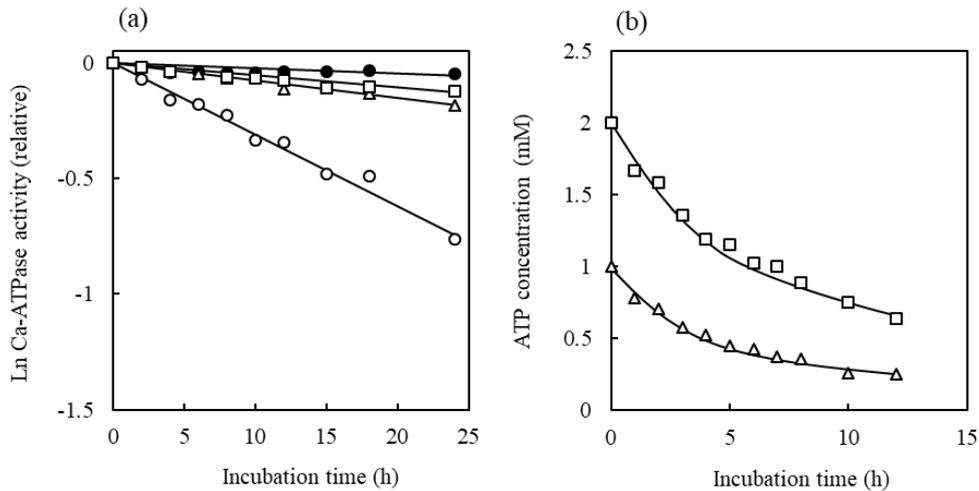


Fig. 15 The urea inactivation of Ca-ATPase activity of myosin from scalloped hammerhead in the presence of ATP and the changes in ATP concentration in myosin solution during incubation at 0°C. Myosin was treated at 0°C in a medium containing 0.5 M KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.5 mM EGTA, 1 mM MgCl₂, with 1 M urea and without urea, with 1 mM or 2 mM ATP and without ATP. (a) Natural logarithmic plot of relative Ca-ATPase activity of scalloped hammerhead myosin as a function of incubation time. The treatment was stopped by diluting to 4 times with 0.5 M KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) and dialyzed against 0.5 M KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) to remove the additives. The Ca-ATPase activity of myosin was assayed in the same method as in Fig. 14. (○): myosin was incubated with 1 M urea and without ATP, (●): myosin was incubated without urea and ATP, (△): myosin was incubated with urea and 1 mM ATP, (□): myosin was incubated with urea and 2 mM ATP. (b) changes in ATP concentration in myosin solution as a function of incubation time during incubation at 0°C. (△): ATP concentration in myosin solution incubated with urea and 1 mM ATP, (□): ATP concentration in myosin solution incubated with urea and 2 mM ATP.

次に、各濃度の ATP 共存下でミオシンに終濃度 1 M の尿素を添加して 10°C と 20°C で保持したときの Ca-ATPase 活性の経時変化と ATP 濃度変化を測定した結果を Fig. 16 に示す。10°C では、ATP と尿素を添加していないミオシンと ATP 未添加で尿素を添加したミオシンの Ca-ATPase 活性は一段階の一次反応式に従って失活し、1 M 尿素を添加することで失活速度 K_D は $144.85 \times 10^{-5} (\text{min}^{-1})$ となり約 5 倍速くなった。一方、1 mM および 2 mM の ATP を添加した場合、

Ca-ATPase 活性の経時変化を一次反応式で解析すると折れ曲がりのある 2 段階の失活様式を示した。1 mM および 2 mM の ATP を添加した場合、それぞれ 2.5 時間および 5 時間までは、Ca-ATPase 活性の低下は緩やかであるが、その後、一次反応式で解析した活性の失活様式は二相性を示し、折れ曲がり後の 2 段階目は急速に失活した。折れ曲がり後の 2 段階目の失活速度は ATP 未添加で 1 M 尿素存在下におけるミオシンの失活速度に近い値であったが、やや小さくなる傾向を示していた (Fig. 16a)。尿素と ATP を添加して処理したときのミオシン溶液中の ATP 濃度を測定すると、1 mM ATP を添加した場合、2 時間でほぼ消失し、2 mM ATP は 4 時間でほぼ消失していた (Fig. 16b)。Ca-ATPase 活性の失活様式と ATP 濃度の低下結果を対応させてみると、ATP が消失する時間と Ca-ATPase 活性が急速な低下を始める時間はほぼ一致していた。一方、20°C で処理した場合、1 M 尿素と 1 mM または 2 mM ATP を添加したミオシンの Ca-ATPase 活性の失活の様相は、それぞれ 1 時間と 3 時間まで緩やかな低下を示し、その後急速に失活する二相性を示した。10°C の場合よりも活性の失活速度は速く、活性が急速に低下するまでに要する時間は短くなった。20°C で処理中のミオシン溶液中の ATP の消失にともなって Ca-ATPase 活性が急速に低下することと、その失活速度は ATP 未添加で尿素を添加したミオシンよりもわずかに遅いことは 10°C で処理したときの結果と同じであった (Fig. 16c, d)。したがって、尿素処理におけるミオシン Ca-ATPase 活性の失活は、ATP を共存させることにより強く抑制され、失活が抑制される時間は ATP の残存濃度に依存することが示された。

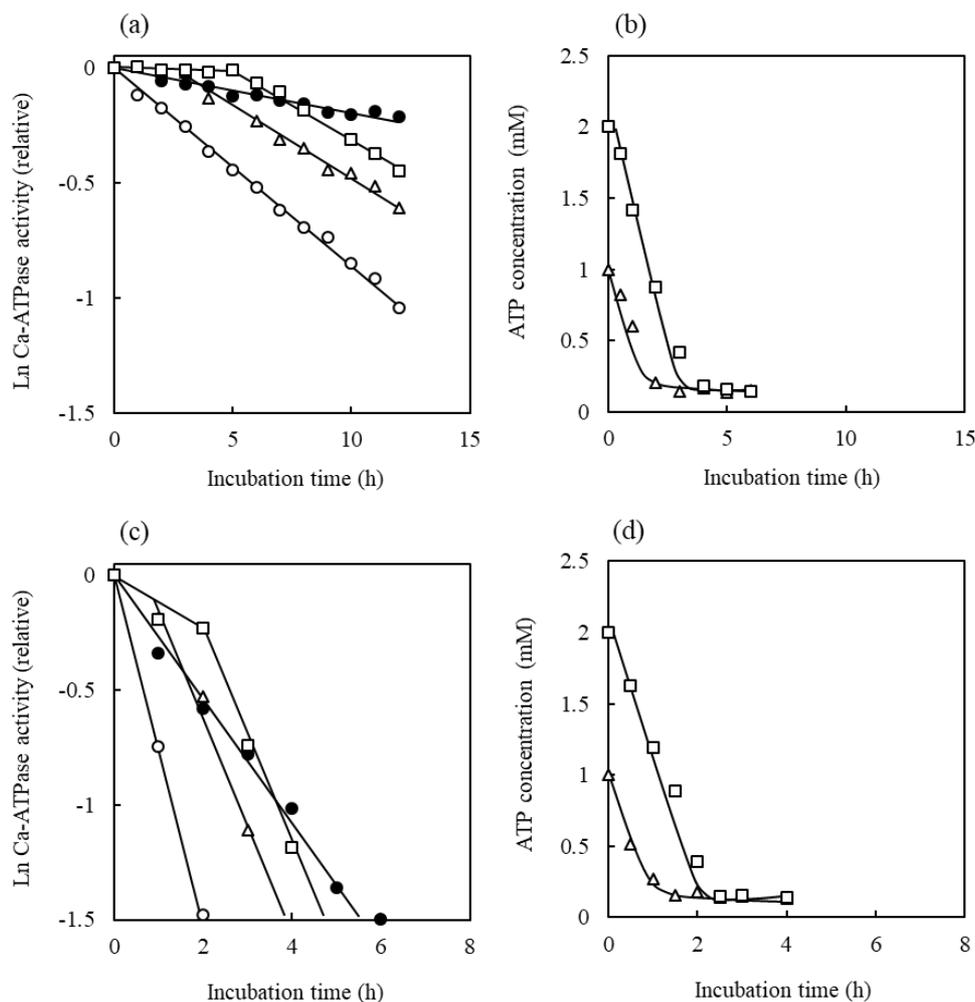


Fig. 16 The urea inactivation of Ca-ATPase activity of scalloped hammerhead myosin in the presence of ATP during incubation at 10 and 20°C. Myosin was incubated at 10 or 20°C in a medium containing 0.5 M KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.5 mM EGTA, 1 mM MgCl₂, 1 M urea and without urea, 1 mM or 2 mM ATP and without ATP. The treatment was stopped by diluting to 4 times with 0.5 M KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) and dialyzed against 0.5 M KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) to remove the additives. The Ca-ATPase activity of myosin was assayed in the same method as in Fig. 14. (a) Natural logarithmic plot of relative Ca-ATPase activity of scalloped hammerhead myosin as a function of incubation time during incubation at 10°C. (○) : myosin was incubated with 1 M urea and without ATP, (●) : myosin was incubated without urea and ATP, (Δ) : myosin was incubated with urea and 1 mM ATP, (□) : myosin was incubated with urea and 2 mM ATP. (b) changes in ATP concentration in myosin solution as a function of incubation time during incubation at 10°C. (Δ) : ATP concentration in myosin solution incubated with urea and 1 mM ATP, (□) : ATP concentration in myosin solution incubated with urea and 2 mM ATP. (c) Natural logarithmic plot of relative Ca-ATPase activity of scalloped hammerhead myosin as a function of incubation time during incubation at 20°C. (○) : myosin was incubated with 1 M urea and without ATP, (●) : myosin was incubated without urea and ATP, (Δ) : myosin was incubated with urea and 1 mM ATP, (□) : myosin was incubated with urea and 2 mM ATP. (d) changes in ATP concentration in myosin solution as a function of incubation time during incubation at 20°C. (Δ) : ATP concentration in myosin solution incubated with urea and 1 mM ATP, (□) : ATP concentration in myosin solution incubated with urea and 2 mM ATP.

以上の各処理条件下でのミオシンの Ca-ATPase 活性の経時変化を一次反応式で解析して得られた変性速度恒数 (K_D) について、結果を Table 3 にまとめた。ATP と尿素を添加していないミオシンの 0°C における K_D は 3.24×10^{-5} (min^{-1}) であるのに対して、ATP 未添加で尿素を添加したミオシンの K_D は 53.01×10^{-5} (min^{-1}) であり失活速度は約 16 倍速くなった。一方、ATP を添加すると K_D の値は小さくなり、ミオシン Ca-ATPase の尿素変性は抑制された。10°C および 20°C の K_D では、ATP が残っている変性初期においては、ATP 未添加で尿素を添加した場合だけでなく、ATP も尿素も添加していないミオシンのみの場合よりも低い値を示した。これは、添加した ATP は、尿素変性だけでなく熱変性も同時に抑制していることを示唆する結果であった。

Table 3 The apparent first order rate constant (K_D) for decrease of Ca-ATPase activity of myosin from scalloped hammerhead in the presence of ATP and urea while being incubated at 0, 10 and 20°C

$K_D \times 10^5$ (min^{-1})		0°C	10°C		20°C	
			Early phase	Late phase	Early phase	Late phase
0 M Urea	0 mM ATP	3.24	29.89	—	416.63	—
	0 mM ATP	53.01	144.85	—	1254.49	—
1 M Urea	1 mM ATP	12.66	11.25	112.65	309.84	875.27
	2 mM ATP	8.38	3.10	106.48	190.93	923.52

From the data of Fig 4 and 5, the apparent first order rate constant (K_D) for decrease of Ca-ATPase activity of myosin from scalloped hammerhead in the presence of ATP and urea was calculated.

(4) ATPによるマダイミオシン Ca-ATPase 尿素変性抑制

サメ類のタンパク質の構造は尿素抵抗性を示すことが報告されており、体内に尿素をほとんど含まない硬骨魚類に比べて尿素による変性を受けにくいと報告されている。前述の実験において、ATPはアカシユモクザメミオシンの尿素変性を抑制することをCa-ATPase活性を指標にして明らかにしたが、サメ類のタンパク質が示す尿素抵抗性の影響も考えられた。そこで、体内にほとんど尿素を含まないマダイを用いてATPによる尿素変性抑制効果をアカシユモクザメ同様にミオシンCa-ATPase活性を指標として検討した。

初めに、アカシユモクザメとマダイのミオシンのみ、あるいは1 M 尿素を添加したミオシン溶液を20°Cで保持した時のミオシンCa-ATPase活性の経時変化をFig. 17に示す。ATPおよび尿素を添加しないミオシンのみの場合、アカシユモクザメとマダイのミオシンCa-ATPaseの K_D はそれぞれ $416.63 \times 10^{-5} (\text{min}^{-1})$ と $494.72 \times 10^{-5} (\text{min}^{-1})$ であり、20°Cにおける両者のミオシンCa-ATPaseの温度安定性はほぼ同じであった。一方、1 M 尿素を添加するとマダイミオシンCa-ATPaseの K_D は $2864.05 \times 10^{-5} (\text{min}^{-1})$ となり、アカシユモクザメの K_D $1254.49 \times 10^{-5} (\text{min}^{-1})$ より約2倍の値を示した。以上の結果は、アカシユモクザメとマダイのミオシンCa-ATPaseの温度安定性はほぼ同じであるが、マダイのミオシンの方が尿素変性を受けやすいことを示している。

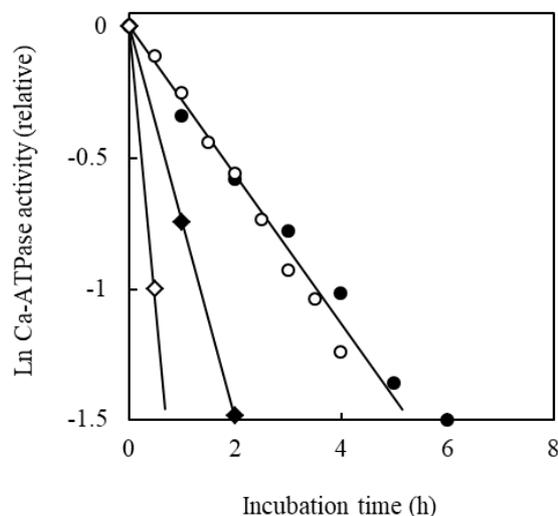


Fig. 17 The inactivation of Ca-ATPase activity of myosin of scalloped hammerhead and red seabream in the presence of urea during incubation at 20°C. Myosin was incubated at 20°C in a medium containing 0.5 M KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.5 mM EGTA, 1 mM MgCl₂, 1 M urea or without urea. The treatment was stopped by diluting to 4 times with 0.5 M KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) and dialyzed against 0.5 M KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) to remove urea. The Ca-ATPase activity of myosin was assayed in the same method as in Fig. 14. (○) : myosin of red seabream was treated without urea, (●) : myosin of scalloped hammerhead was treated without urea, (◇) : myosin of red seabream was treated with urea, (◆) : myosin of scalloped hammerhead was treated with urea.

次に、0.5 mM EGTA、1 mM MgCl₂ と 1 mM あるいは 2 mM ATP 共存下でマダイミオシン (0.5 M KCl) 溶液に終濃度 1 M の尿素を添加して 20°C で保持したときの Ca-ATPase 活性の経時変化と、そのときのミオシン溶液中の ATP 濃度の経時変化を測定した結果を Fig. 18 に示す。ATP を添加した系では、ミオシン Ca-ATPase 活性の失活を一次反応式で解析した様相は二相性を示した。2 mM ATP を添加した場合には 6 時間まで緩やかなミオシン Ca-ATPase 活性の低下を示し、 K_D は $54.10 \times 10^{-5} (\text{min}^{-1})$ であった。これは ATP および尿素未添加のミオシンのみの K_D $494.72 \times 10^{-5} (\text{min}^{-1})$ の 9 分の 1、さらに ATP 未添加で 1 M Urea

を添加したミオシンの K_D $2864.05 \times 10^{-5} (\text{min}^{-1})$ の 53 分の 1 の値であった。1 mM ATP を添加した場合、4 時間までは緩やかな活性の低下を示し、その後急速に失活した。1 mM ATP を添加したミオシン溶液中の ATP 濃度を測定すると、3.5 時間後に ATP はほぼ消失し、ATP が消失する時間と Ca-ATPase 活性が急速な低下を始める時間はほぼ一致していた。したがって、マダイミオシンにおいてもアカシユモクザメミオシンで得られた結果と同様に、Ca-ATPase の尿素変性による失活は ATP により強く抑制されることが示された。

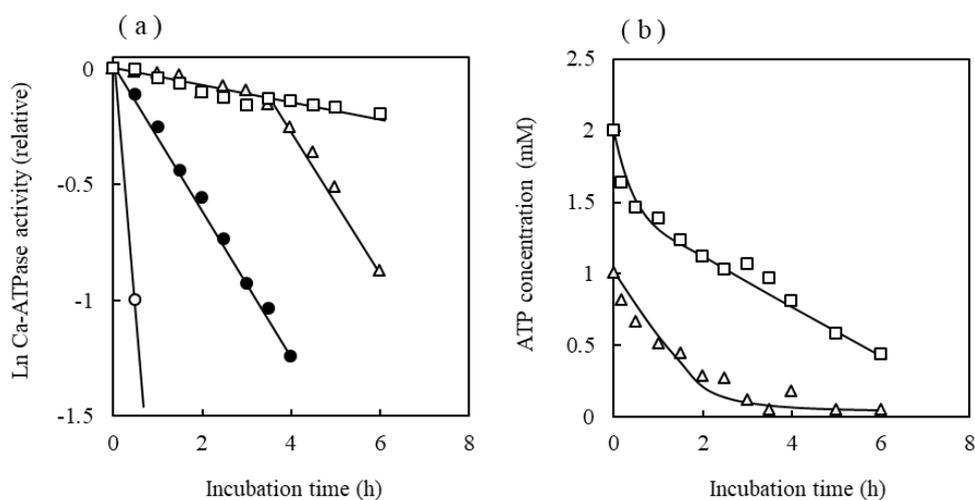


Fig. 18 The urea inactivation of Ca-ATPase activity of red seabream myosin in the presence of ATP during incubation at 20°C. Myosin was treated at 20°C in a medium containing 0.5 M KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.5 mM EGTA, 1 mM MgCl₂, with 1 M urea or without urea, with 1 mM or 2 mM ATP and without ATP. (a) Natural logarithmic plot of relative Ca-ATPase activity of scalloped hammerhead myosin as a function of incubation time. (○) : myosin was treated with 1 M urea and without ATP, (●) : myosin was treated without urea and ATP, (△) : myosin was treated with urea and 1 mM ATP, (□) : myosin was treated with urea and 2 mM ATP. The treatment was stopped by diluting to 4 times with 0.5 M KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) and dialyzed against 0.5 M KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) to remove the additives. The Ca-ATPase activity of myosin was assayed in the same method as in Fig. 14. (b) changes in ATP concentration in myosin solution as a function of incubation time. (△) : ATP concentration in myosin solution incubated with urea and 1 mM ATP, (□) : ATP concentration in myosin solution incubated with urea and 2 mM ATP.

5. 考察

海産サメ類は体内にタンパク質変性剤である尿素を 0.2–0.5 M という高濃度で含有している¹⁵⁾にも関わらず重篤な筋疾患を起こさず生命活動を維持できていることについて、ATP が有するタンパク質変性抑制作用に着目し、アカシユモクザメミオシンの尿素変性に及ぼす ATP の保護効果を Ca-ATPase の失活速度を指標として検討した。本実験で用いたアカシユモクザメミオシンの Ca-ATPase, Mg-ATPase および K-EDTA-ATPase 活性を測定したが、活性の特徴は加納ら報告したドチザメのそれとよく似た傾向を示し¹⁷⁾、実験試料として問題ないと判断した。また、ATP はミオシン ATPase の基質であるため、本実験のように数 mM の ATP と高濃度のミオシンを混合した溶液中では ATP は急速に分解して消失するが、0.5 M KCl におけるミオシン Mg-ATPase 活性が 0.006 $\mu\text{mol Pi/min/mg}$ と非常に低いことを利用して、ミオシンに MgCl_2 と EGTA を添加して Ca^{2+} 非存在下の Mg-ATPase 活性とすることで ATP の分解を遅らせて一定時間 ATP 濃度を維持する実験系を構築した。また、尿素を添加し 0°C で 24 時間保持した場合、尿素濃度が 0.3 M まではミオシンの Ca-ATPase 活性はほとんど失活しないことから (Fig. 3)、本実験では尿素を添加し各温度で保持したミオシン溶液を経時的に取り出した後、尿素濃度が 0.3 M 以下になるように速やかに冷 0.5 M KCl, 20mM Tris-HCl (pH 7.5) 溶液で希釈し、同時に氷冷することでそれ以降の尿素の影響を受けにくいように実験方法を工夫した。

Fig. 14 の結果から、尿素濃度が 0.3 M まではアカシユモクザメミオシンの Ca-ATPase 活性はほとんど失活しないこと、Fig. 17 の結果から、1 M 尿素の添加によるミオシン Ca-ATPase の失活速度はマダイよりアカシユモクザメで約 2 倍遅いことが示された。これらの結果は、加納らが報告¹⁷⁻¹⁹⁾しているように、サメ筋原線維タンパク質に尿素抵抗性があることを示すものである。一方、ATP 共存下で尿素を添加した場合、反応溶液中に ATP が残っているあいだはアカシ

ユモクザメとマダイの両者ともミオシン Ca-ATPase の失活が抑制されることから、ATP はミオシン Ca-ATPase の尿素変性を抑制することが明らかとなった。

軟骨魚綱の魚 (cartilaginous fish) では浸透圧調節物質として、尿素が使われている。尿素はタンパク質の高次構造や親和性に影響を及ぼす物質であり、この変性作用を打ち消すメカニズム研究が精力的に行われてきている。尿素と同時に働く浸透圧調節物質としては、ベタインや TMAO のようなメチルアミン化合物がある。特に TMAO はタンパク質変性抑制作用が認められることから、種々研究が行われてきている。^{16,42)} また、サメ・エイ類のタンパク質の構造が尿素耐性を有することが報告されている。^{17-19,43)}

本研究結果は、サメ類の筋肉タンパク質の尿素耐性に関する研究において生理的な濃度の ATP が重要な役割を有することを初めて明らかにした。ATP は生体内で一定濃度を維持されている物質であるので、尿素変性抑制作用に関する研究を行う際には ATP 存在下での研究も必要であると考えている。今後は ATP の尿素変性抑制メカニズムと、尿素変性抑制物質として既に研究されている TMAO と ATP の変性抑制相互作用に関する研究を行う予定である。

第4章 高濃度 ATP 存在下で凍結し解凍したヒラメ肉の性状

1. 研究目的

近年、生食用のヒラメ *Paralichthys olivaceus* を摂食して一過性の下痢や嘔吐を呈する食中毒の事例が増加している。これについて厚生労働省は 2011 年に、ヒラメに寄生する粘液胞子虫 *Kudoa septempunctata* が食中毒の原因であると報告した。⁴⁴⁾ 筋肉に寄生するクドアの肉眼的症状としては、シストを形成するタイプとジェリーミートを呈するタイプの 2 型が知られているが、*Kudoa septempunctata* はシストも形成しなければジェリーミートにもならないため、調理の過程で見逃され、気づかずに食してしまうことが問題となっている。一般に魚類に寄生するほとんどの寄生虫は冷凍や加熱することで死滅させることができ、*Kudoa septempunctata* 食中毒対策についても、-15—-20°C で 4 時間以上の冷凍、または 75°C で 5 分間以上加熱をすることとされている。しかし、このような処理は刺身商材としてのヒラメの商品価値を著しく損ねるとの報告もある。⁴⁵⁾

第 1 章において、ATP が魚類筋原線維タンパク質の冷凍変性を抑制することを確認した。さらに、ATP のタンパク質変性抑制作用については、筋小胞体 Ca-ATPase の熱変性・冷凍変性抑制作用⁴⁶⁾ やミオグロビンメト化抑制作用^{33,34)} などの報告もある。ヒラメ肉においても、活けしめ後に魚肉中に ATP が高濃度で残っている状態で凍結処理を行うことにより、凍結保存中の冷凍変性を抑制した高品質冷凍品の製造が期待される。しかし、このように高濃度の ATP を含む冷凍肉を急速解凍した場合、解凍硬直を引き起こし多量の解凍ドリップが生成するなどの品質低下をとまなうことから、解凍硬直の発生を抑制した解凍方法が求められる。

本研究では、高鮮度魚肉中に存在する ATP のタンパク質変性抑制作用に着目

し、ATP がヒラメ肉の凍結と解凍処理に及ぼす影響を筋原線維タンパク質の生化学的性状および血合肉 Mb のメト化率を指標に測定し、刺身商材として利用可能な高品質冷凍ヒラメの製造方法について検討した。

2. 実験材料

活養殖ヒラメ（平均体重 1.18 kg ($n = 8$), 2015 年 6 月, 10 月) を鹿児島市魚市場にて入手し活けしめして試料とした。頭部側の背骨と尾の付け根に包丁を入れ、ピアノ線で脊髄破壊後、海水氷溶液中で 30 分間脱血冷却して実験に供した。

3. 実験方法

(1) ヒラメ肉の凍結および解凍方法

活けしめ脱血処理したヒラメをフィレに 2 分し、一方は直ちに真空包装し -35°C エタノールブラインにて急速凍結した。残りのフィレは、真空包装して 5°C で 24 時間保存後、同様に急速凍結した。これらの急速凍結したフィレは -20°C で 20 日間保存し、その後解凍して試験に供した。解凍は緩慢解凍と急速解凍を行った。緩慢解凍は $-2-1^{\circ}\text{C}$ の水氷溶液中で 3 時間、急速解凍は 25°C の流水で 5 分間行った。

(2) 魚肉 pH の測定

魚肉の pH は、魚肉 1 g に 10 mL の 20 mM モノヨード酢酸ナトリウム溶液を添加してホモジナイズし、pH メーター (HORIBA 社 pH meter F-71) でホモジネイトの pH を測定した。

(3) 魚肉中 ATP 関連化合物含量の測定

魚肉に含まれる ATP 関連化合物の抽出は胡らの方法に準じて行った。⁴⁷⁾

すなわち、冷凍状態の魚肉 1 g に 10 倍量の 5% PCA 溶液を添加しホモジナイズし、ホモジネイトの pH を 1 M KOH 溶液で 2-3 に調整し、全量を蒸留水で 20 mL に合わせた。これを静置して得られた上澄みに対して 100 mM リン酸緩衝液 (pH 7.5) を 20 mM になるように加えて中和し、0.45 μm のメンブレンフィルターでろ過して ATP 関連化合物の分析用サンプルとした。ATP 濃度の分析は、第 1 章と同様に Murata らの方法²¹⁾ に準じて HPLC で測定した。

(4) ドリップ量の測定

冷凍肉の重量を測定し、緩慢および急速解凍を行った。解凍後の肉表面のドリップをふき取った肉重量を測定し、解凍前重量に対する減少量の百分率をドリップ量 (%) とした。

(5) 筋原線維の塩溶解度およびの Ca-ATPase 活性の測定

凍結前および凍結解凍したヒラメ肉から筋原線維を調製した。すなわち、魚肉を細切し、氷冷下で 5 倍量の 0.1 M KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) 溶液を添加し、3000 \times g で 5 分間遠心分離して沈殿を得た。得られた沈殿に同溶液を 5 倍量添加してポリトロンでホモジナイズを行い、遠心分離 (3000 \times g, 5 分間) して沈殿を得た。沈殿に 5 倍量の同溶液を添加して懸濁攪拌後、同条件で遠心分離し、この操作を 3 回繰り返して得られた沈殿を同溶液に懸濁したものを筋原線維タンパク質として使用した。筋原線維タンパク質の性状は、塩溶解度と Ca-ATPase 活性を指標にして測定した。筋原線維からの塩溶性タンパク質の抽出は以下の方法で行った。筋原線維懸濁液に終濃度 0.5 M KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) 溶液を加えて攪拌後、氷中で 1 時間保持した。その後、終濃度 1 mM ATP-MgCl₂ を添加して攪拌した後、14,000 \times g で 20 分間遠心分離して得られた上清に含まれるタンパク質量を塩溶性タンパク質量とした。塩溶解度は塩溶性

タンパク質抽出前の筋原線維タンパク質量に対する百分率で表した。なお、タンパク質濃度は牛血清アルブミンを標準としてビウレット法により比色定量した。²³⁾

筋原線維 Ca-ATPase 活性は、0.5 M KCl, 5 mM CaCl₂, 25 mM Tris-maleate (pH 7.0), 1 mM ATP, 0.2–0.4 mg/mL Mf の反応組成液を 25°C で反応させ、生成する無機リン酸を Gomori 法²²⁾ に従い比色定量した。

(6) ミオグロビン (Mb) のメト化率測定

ヒラメ血合肉の冷凍保存における色調変化を Mb のメト化率を指標にして測定した。ヒラメ Mb のメト化率測定法は確立されていないので、落合の方法⁴⁸⁾ および井ノ原らの方法^{34,49)} に準じて Mb を単離精製し、精製 Mb から deoxyMb, oxyMb および metMb の調製を行い、各 Mb の可視部吸収スペクトルを測定してメト化率算出式を導出した。なお、ヒラメ血合肉の量は少ないため、メト化率算出式を求めるために使用した精製 Mb の調製は心筋を材料として行った。ヒラメ Mb の性状、メト化率測定法については結果の項で示す。血合肉 Mb のメト化率は、井ノ原らの方法¹¹⁾ に従い血合肉粗抽出液を硫酸分画とフィルター処理により清透化した Mb 粗抽出液について、本試験で確立したヒラメ Mb メト化率算出式を用いて求めた。単離精製した Mb の純度は SDS-PAGE で確認し、Laemmli の方法²⁴⁾ に従い、15%ポリアクリルアミドゲルを使用した。

(7) 統計処理

各試験の測定は 4 検体で行い、得られた実験結果はエクセル統計 (株式会社社会情報サービス社製) を用い、多群間の有意差については Tukey 法で解析し、2 群間では Student's *t-test* で解析した ($p < 0.05$)。

(8) 冷凍解凍刺身の官能評価

官能評価試験のサンプルは、即殺後すぐに -35°C で凍結した後、急速あるいは緩慢解凍したもの、即殺後 5°C で 27 時間冷蔵後 -35°C で凍結し緩慢解凍したもの、即殺後 5°C で 6 時間あるいは 30 時間冷蔵保存したものを使用した。急速解凍と緩慢解凍の方法は、材料の項で前述した方法と同様である。なお、即殺後 5°C で 27 時間冷蔵後凍結したサンプルは前述した分析試験用サンプル品 (5°C , 24 時間冷蔵) に比べて 3 時間長くなっているが ATP 関連化合物組成はほぼ同様であることを確認して試験を行った。凍結解凍条件の異なるヒラメ肉と未凍結のヒラメ肉を刺身で食した際の透明感、食感、呈味、総合評価の 4 項目について、2 種類の刺身を提示し一対比較法による官能評価を行った。官能評価の評点は、透明感の良いものを 1 点、劣るものを 2 点、食感ではコリコリした歯ごたえのあるものを 1 点、劣るものを 2 点とした。呈味は醤油をつけずに評価し、良いものを 1 点、劣るものを 2 点とした。総合評価は総合的に好ましいと判断されるものについて、良いものを 1 点、劣るものを 2 点とした。得られた結果はクレーマーの検定表により解析した。パネルは 20–40 歳代の本研究室の職員および学生の 10 人とした。なお、パネルの刺身食感に対する嗜好性の影響を少なくするため、官能評価試験前に活けしめ後 5°C で 5 時間冷蔵したヒラメの刺身を最も食感が良い刺身として評価する訓練を行った。

4. 結果

(1) 凍結解凍によるヒラメ筋肉の性状変化

活けしめ直後および5°Cで24時間冷蔵したヒラメ筋肉と冷凍保存したヒラメ筋肉のATPとその関連化合物の濃度をTable 4に示す。活けしめ直後のヒラメ筋肉のATP濃度は $6.76 \pm 1.09 \mu\text{mol/g}$ と高い値を示し、-20°Cで20日間の冷凍保存中においても $5.28 \pm 1.00 \mu\text{mol/g}$ と高い値を維持していた。一方、活けしめ後5°Cで24時間冷蔵したヒラメ筋肉のATP濃度は $0.18 \pm 0.05 \mu\text{mol/g}$ まで低下しており、IMPが増加していた。冷凍保存中も $0.11 \pm 0.04 \mu\text{mol/g}$ と非常に低い値でATPはほとんど残っていなかった。Table 5には、活けしめ直後に凍結したヒラメと5°Cで24時間冷蔵後に凍結したヒラメを緩慢解凍または急速解凍した時のヒラメ筋肉中のATPとその関連化合物の濃度を示す。凍結解凍条件に関係なく、解凍によりATPはほとんど消失しIMPが大幅に増加した。活けしめ直後に凍結し緩慢解凍したヒラメ以外で少量のHxが生成した。

Table 4 Effect of postmortem condition until freezing and freezing treatment on ATP and concentration of its related material in meat

postmortem condition until freezing	Before freezing meat		Frozen meat	
	0 h	5°C for 24 h	0 h	5°C for 24 h
ATP ($\mu\text{mol/g}$)	$6.76 \pm 1.09^*$	$0.18 \pm 0.05^*$	$5.28 \pm 1.00^*$	$0.11 \pm 0.04^*$
ADP ($\mu\text{mol/g}$)	$1.83 \pm 0.42^*$	$0.67 \pm 0.08^*$	$1.74 \pm 0.13^*$	$0.63 \pm 0.08^*$
AMP ($\mu\text{mol/g}$)	0.05 ± 0.06	0.16 ± 0.01	0.17 ± 0.05	0.15 ± 0.03
IMP ($\mu\text{mol/g}$)	$2.24 \pm 1.72^*$	$6.96 \pm 0.13^*$	$2.40 \pm 0.61^*$	$7.08 \pm 0.31^*$
Inosine ($\mu\text{mol/g}$)	0.00	0.00	0.00	0.00
Hypoxanthine ($\mu\text{mol/g}$)	0.00	0.00	0.00	0.00

$n = 4$

* Significant differences ($p < 0.05$)

Table 5 Effect of postmortem conditions until freezing and thawing condition on ATP and concentration of its related material in meat

postmortem condition until freezing	Thawing condition			
	Slow thawing		Quick thawing	
	0 h	5 °C for 24 h	0 h	5 °C for 24 h
ATP (μmol/g)	0.15 ± 0.03	0.10 ± 0.03	0.11 ± 0.04	0.09 ± 0.05
ADP (μmol/g)	0.64 ± 0.11	0.48 ± 0.16	0.64 ± 0.05 *	0.40 ± 0.11*
AMP (μmol/g)	0.15 ± 0.01	0.14 ± 0.04	0.14 ± 0.03	0.10 ± 0.07
IMP (μmol/g)	8.11 ± 0.21	7.50 ± 1.86	8.73 ± 0.49	7.04 ± 1.66
Inosine (μmol/g)	0.00	0.00	0.00	0.00
Hypoxanthine (μmol/g)	0.00	0.22 ± 0.22	0.20 ± 0.21	0.42 ± 0.31

n = 4

* Significant differences (*p*<0.05)

活けしめ直後および 5°C で 24 時間冷蔵したヒラメ筋肉の pH と、それぞれを凍結し緩慢解凍および急速解凍したヒラメ筋肉の pH を Table 6 に示す。活けしめ直後の pH は 6.98 ± 0.03 と高い値を示し、5°C で 24 時間冷蔵後は 6.63 ± 0.27 まで低下した。ヒラメを凍結し解凍した場合、すべての凍結解凍条件において pH は 6.4 前後まで低下し、凍結および解凍条件による差はなかった。結果は示さないが、解凍前の冷凍状態のヒラメ筋肉の pH は凍結前の pH とほぼ同じであり、冷凍保存中の pH 低下はみられず、解凍時に pH 低下が進むことを認めた。

Table 6 Effect of postmortem conditions until freezing and thawing condition on pH of meat

postmortem condition until freezing	0 h	5°C for 24 h
Before freezing	6.98 ± 0.03	6.63 ± 0.27
Slow thawing	6.42 ± 0.02	6.47 ± 0.03
Quick thawing	6.41 ± 0.04	6.39 ± 0.10

$n = 4$

活けしめ直後および 5°C で 24 時間冷蔵したヒラメ筋肉の凍結前および凍結解凍した各筋肉から調製した筋原線維の塩溶解度を Fig. 19 に, Ca-ATPase 活性を Fig. 20 に示す。活けしめ直後のヒラメ筋原線維の塩溶解度は $94.18 \pm 0.92\%$ と高い値を示したが, 5°C で 24 時間冷蔵後は $76.00 \pm 3.88\%$ まで低下し, 有意差が認められた ($p < 0.05$)。凍結解凍したサンプルの中では, 活けしめ直後に急速凍結し緩慢解凍した筋肉から調製した筋原線維の塩溶解度が最も高く $72.26 \pm 2.70\%$ であった。これは, 5°C で 24 時間冷蔵後凍結した凍結肉を急速あるいは緩慢解凍した肉に対して有意 ($p < 0.05$) に塩溶解度が高く, また, 5°C で 24 時間冷蔵した未凍結肉の筋原線維 (塩溶解度 $76.00 \pm 3.88\%$) と有意差 ($p < 0.05$) はないことを示した。Ca-ATPase 活性においても, 活けしめ直後の筋肉から調製した筋原線維で $0.115 \pm 0.004 \mu\text{mol Pi}/\text{min}/\text{mg}$ と高い値を示したのに対し, 5°C で 24 時間冷蔵後は $0.097 \pm 0.002 \mu\text{mol Pi}/\text{min}/\text{mg}$ に低下し有意差 ($p < 0.05$) が認められた。塩溶解度と同様に, 凍結解凍したサンプルの中では, 活けしめ直後に急速凍結し緩慢解凍した筋肉から調製した筋原線維の Ca-ATPase 活性が $0.084 \pm 0.002 \mu\text{mol Pi}/\text{min}/\text{mg}$ と最も高く, 5°C で 24 時間冷蔵後凍結した凍結肉を急速あるいは緩慢解凍したサンプルに対して有意 ($p < 0.05$) に高い値を示した。この値は 5°C で 24 時間冷蔵した筋肉から調製した筋原線維の Ca-ATPase 活性に比べてやや低い値を示した ($p < 0.05$)。なお, 活けしめ直後に急速凍結した筋肉を緩慢あるいは急速解凍したサンプルから調製した筋原線維の塩溶解度と Ca-ATPase 活性は, それぞれ $72.26 \pm 2.70\%$ と $67.66 \pm 1.12\%$, $0.084 \pm 0.002 \mu\text{mol Pi}/\text{min}/\text{mg}$ と $0.078 \pm 0.003 \mu\text{mol Pi}/\text{min}/\text{mg}$ であり, Fig. 19, 20 に示した 6 群間のデータで行った有意差検定では差は認められないが, この 2 群間のみの有意差検定は有意差 ($p < 0.05$) を示した。以上の結果から, ヒラメ肉の凍結解凍処理においては, 凍結前の魚肉の鮮度状態, 特に ATP の含有および解凍方法が解凍後の筋原線維タンパク質の性状に影響を及ぼすことが明らかとなった。

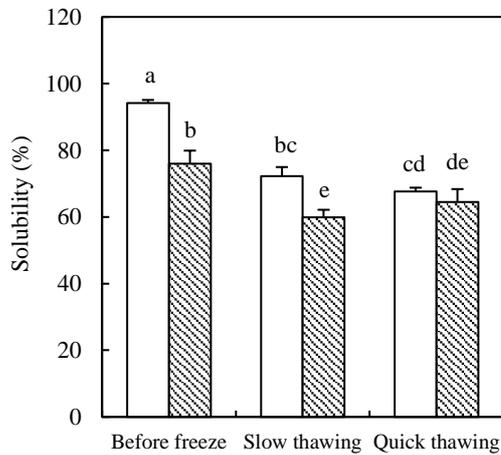


Fig. 19 Effect of postmortem time and freeze-thawing conditions on extractability of salt soluble protein from myofibrillar protein. Olive flounder were killed by instantaneous killing method. Samples for preparation of Mf were raw or freeze-thawing muscle. (□): muscle which postmortem time was within 1h, (pre-rigor muscle), (▨): muscle which postmortem time was 24 h at 5°C, (after-rigor muscle). Vacuum packed fillets which were pre-rigor and after-rigor muscle were frozen at -35°C with alcohol brine. Slow thawing was performed at -2°C to -1°C in iced water for 3 h. Quick thawing was performed at 25°C in flowing water for 5 min. Extractability of salt soluble protein from Mf was measured as protein concentration in centrifugal supernatant of mixture solution of 0.5 M KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM ATP-Mg, 2 mg/ml Mf, which the mixture solution was kept for 1 h at 0°C ($n = 4$). Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$).

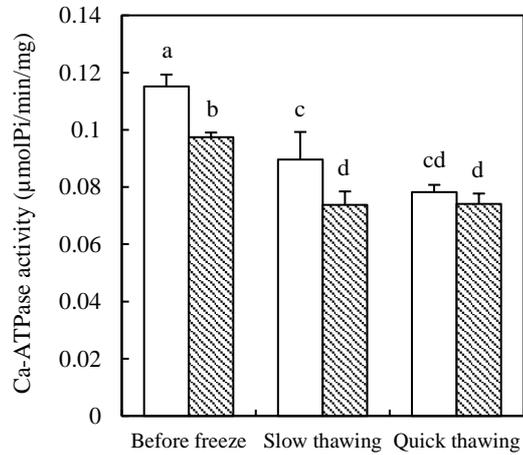


Fig. 20 Effect of postmortem time and freeze-thawing conditions on Mf Ca-ATPase activity. Mf samples were the same as Fig. 19. Samples for preparation of Mf were (□): muscle which postmortem time was within 1h, (pre-rigor muscle), (▨): muscle which postmortem time was 24 h at 5°C, (after-rigor muscle). Ca-ATPase activity was measured in 0.5 M KCl, 5 mM CaCl₂, 25 mM Tris-maleate (pH 7.0), 1 mM ATP, 0.2-0.4 mg/mL Mf at 25°C ($n = 4$). Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$).

(2) 凍結時の鮮度と解凍方法がドリップ発生量に及ぼす影響

活けしめ直後に凍結した魚肉と 5°C で 24 時間冷蔵後に凍結した魚肉をそれぞれ緩慢解凍および急速解凍した時のドリップ量を Fig. 21 に示す。緩慢解凍と急速解凍を比較すると、活けしめ直後に凍結した魚肉と 5°C で 24 時間冷蔵後に凍結した魚肉のどちらも緩慢解凍でドリップ量が少なく、急速解凍でドリップ量が多い結果となった。特に、活けしめ直後に凍結した魚肉の場合、緩慢解凍した魚肉のドリップ量が最も少なく $0.52 \pm 0.46\%$ であったのに対して、急速解凍した魚肉は解凍硬直を起しドリップ量が $4.76 \pm 1.26\%$ と最も多く、他のサンプルに対して有意差 ($p < 0.05$) が認められ、解凍方法の違いによるドリップ量の差は顕著であった。一方、活けしめ後 5°C で 24 時間冷蔵後に凍結した肉の場合、解凍後のドリップ量は、緩慢解凍が $1.52 \pm 0.38\%$ 、急速解凍が $2.08 \pm 1.26\%$ であり、緩慢解凍でドリップ量が少ない結果となったが有意差 ($p < 0.05$) は認められなかった。Table 4 で示したように、活けしめ後 5°C で 24 時間冷蔵した場合、魚肉中に ATP はほとんど残っていないため、凍結後急速解凍しても多量のドリップの発生はなかった。一方、活けしめ直後に凍結したヒラメ冷凍肉には高濃度の ATP が含まれているので急速解凍ではドリップは発生するが、緩慢解凍を行うことによりドリップの発生量は抑制できることが認められた。

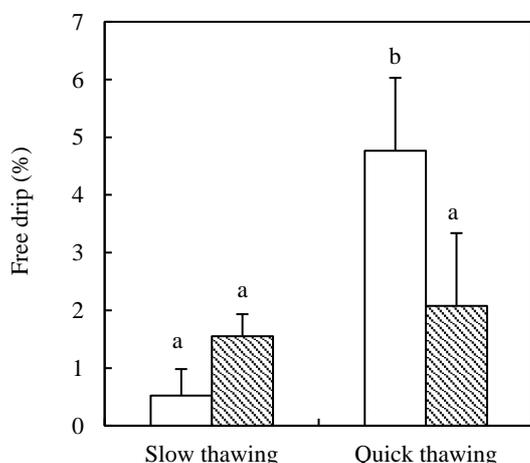


Fig. 21 Effect of thawing conditions on free drip volume. The samples of freeze-thawing fillets were prepared as the same as Fig. 19 ($n = 4$). (□): muscle which postmortem time was within 1h, (pre-rigor muscle), (▨): muscle which postmortem time was 24 h at 5 °C, (after-rigor muscle). Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$).

(3) ヒラメ Mb のメト化率測定法の確立

ヒラメは白身魚であるが、少量含まれる血合肉の色調は刺身の品質評価に影響する要因である。血合肉の色調は Mb のメト化の影響を受けるので、本研究ではヒラメ Mb のメト化率測定法について検討した。ヒラメの血合肉量は少ないので Mb を調製する材料として心臓を用いた。ヒラメ Mb の調製は、落合らの方法⁴⁸⁾ および井ノ原らの方法⁴⁹⁾ に従って行った。すなわち、活けしめ直後に入手した心臓を使用し、細切した心筋に3倍量の 0.1 M KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) を添加してホモジナイズした後、遠心分離をして上清を得た。この上清の 70–90%飽和硫酸アンモニウムを沈殿として集め、これを同緩衝液に透析し cMb 溶液を得た。これをフィルター (Minisart RC15) で処理し、得られたろ液を Superdex 200 prep grade カラム (GE Healthcare 製) に供してゲルろ過を行った。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。調製したヒラメ Mb の SDS-PAGE パターンを Fig. 22 に示す。この Mb を用いて, deoxyMb, oxyMb および metMb を井ノ原らの方法⁴⁹⁾ 準じて調製し、それぞれの Mb について可視部吸収スペクトルを測定した。deoxyMb の調製はヒドロ亜硫酸ナトリウムの添加で行った。⁵⁰⁾ metMb はフェリシアン化カリウムの添加により調製した。⁵¹⁾ 得られた可視部吸収スペクトルを Fig. 23 に示す。各スペクトルは一点で交わる Isosbestic point (IS 点と略) を示し、その波長は 523 nm であった。各スペクトルと IS の吸光値を利用し、ヒラメ Mb のメト化率算出式を以下のように導出した。

$$\text{ヒラメ Mb メト化率 (\%)} = -92.33 (A_{550}/A_{523}) + 152.76 \cdots (1)$$

ただし、A₅₅₀ と A₅₂₃ は 550 nm および 523 nm における吸光値である。得られたメト化率算出式を用いて、実際にヒラメ血合肉から抽出した cMb 溶液のメト化率を測定した。

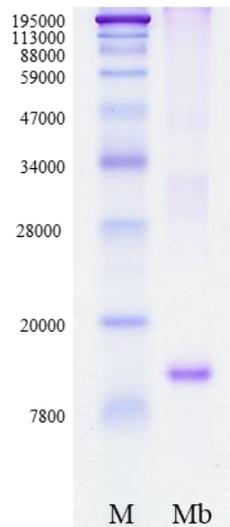


Fig. 22 SDS-PAGE pattern of purified olive flounder myoglobin (Mb). Mb: purified olive flounder Mb. M: molecular weight marker.

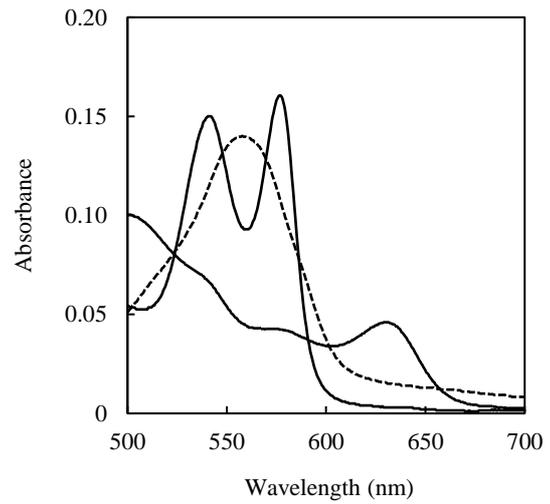


Fig. 23 Visible absorbance spectra of deoxyMb, oxyMb and metMb from cardiac muscle of olive flounder. The visible absorbance spectra of deoxyMb (-), oxyMb (- -) and metMb (· · ·) were measured. Protein concentration of Mb was measured as 0.25 mg/mL in 0.1 M KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5).

(4) 凍結時の鮮度が解凍後の血合肉のメト化率に及ぼす影響

活けしめ直後に凍結した魚肉 (ATP 濃度 $6.36 \pm 0.33 \mu\text{mol/g}$, pH 6.89 ± 0.06) および活けしめ後 5°C で 24 時間冷蔵後に凍結した魚肉 (ATP 濃度 $0.10 \pm 0.06 \mu\text{mol/g}$, pH 6.59 ± 0.02) をそれぞれ緩慢解凍後, 血合肉を切り出し井ノ原らの方法¹¹⁾で粗 Mb 溶液を調製しメト化率を測定した (Fig. 24)。活けしめ直後に凍結し解凍した血合肉 Mb のメト化率は $45.50 \pm 7.60\%$, 活けしめ後 5°C で 24 時間冷蔵後に凍結した魚肉を解凍した血合肉 Mb のメト化率は $66.64 \pm 3.21\%$ で有意差 ($p < 0.05$) が認められ, 活けしめ直後の高濃度 ATP を含有する魚肉で凍結解凍時の Mb のメト化が抑制される結果を示した。また, 活けしめ後 5°C で 24 時間冷蔵したものの血合肉 Mb のメト化率は $44.28 \pm 5.20\%$ であり, 活けしめ直後に凍結し解凍した血合肉 Mb のメト化率 $45.50 \pm 7.60\%$ とは有意差が認められない結果を示した。

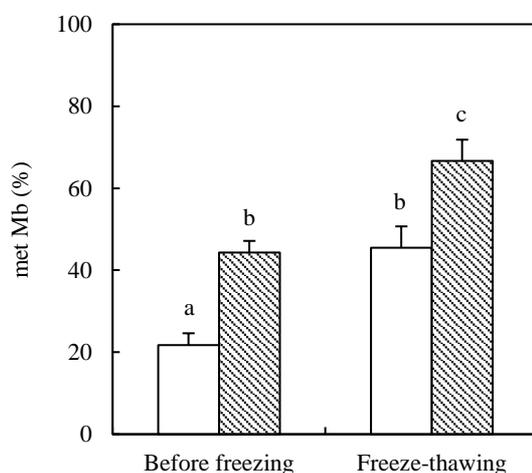


Fig. 24 Effect of postmortem time and freeze-thawing treatment on metmyoglobin formation. The samples of raw and freeze-thawing fillets were prepared as the same as Fig. 19 ($n = 4$). (□): muscle which postmortem time was within 1h, (pre-rigor muscle), (▨): muscle which postmortem time was 24 h at 5°C , (after-rigor muscle). Crude Mb solution was prepared from dark muscle by the method of Inohara *et al*¹¹⁾ and then analyzed the ratio of metMb formation by using the formula 1. Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$).

(5) 凍結解凍ヒラメ刺身の官能評価

筋肉中に ATP が高濃度で存在している状態で凍結した魚肉では解凍時に解凍硬直を引き起こす場合がある。このように解凍硬直を起こした魚肉は多量のドロップを発生し、解凍後の品質が低下することが知られている。本研究でも Fig. 21 に示したようにドロップの発生量が異なることが確認された。そこで、解凍硬直が刺身の品質におよぼす影響について調べるため、活けしめ直後に凍結したヒラメを緩慢と急速の方法でそれぞれ解凍し、刺身で食した際の品質について、順位法による官能評価を行った結果を Table 7 (サンプル A, B) に示す。活けしめ直後に凍結し緩慢解凍を行った魚肉の刺身 (A) と急速解凍を行った魚肉の刺身 (B) の食感を比較した結果、前者は肉に透明感があり、肉の表面も滑らかで、コリコリした歯ごたえがあり呈味があると評価されたが、後者は肉のちぢれが認められ、食感も滑らかさがないパサついた硬い物性を示した。クレーマーの検定表にて解析を行った結果、いずれの評価項目も緩慢解凍した魚肉が有意 ($p<0.05$) に優れていることが認められた。さらに、凍結時の鮮度が異なる冷凍ヒラメの刺身の評価を行うため、活けしめ直後に凍結したヒラメと活けしめ後 5°C で 27 時間冷蔵後に凍結した肉を緩慢解凍した時の刺身の品質について官能評価を行った結果を Table 7 (サンプル A, C) に示す。活けしめ直後に凍結した魚肉 (A) と、活けしめし 5°C で 27 時間冷蔵後に凍結した魚肉 (C) をそれぞれ緩慢解凍した時の刺身の品質の比較では、前者が透明感で優れている評価が得られたが、食感、呈味、総合評価では差は示さなかった。以上の結果より、活けしめ直後に急速凍結し緩慢解凍したヒラメ刺身 (A) は、他の凍結解凍条件で調製したヒラメ刺身 (B, C) と比較して高品質であることが明らかとなった。次に、活けしめ直後に凍結し緩慢解凍した冷凍ヒラメ (高鮮度冷凍ヒラメと略) の刺身 (A) と未凍結のヒラメ刺身の透明感、食感、呈味、総合的な品質について順位法で官能評価を行った結果を Table 7 (サンプル

A と D および A と E) に示した。高鮮度冷凍ヒラメ解凍刺身 (A) と活けしめ後 5°C で 6 時間冷蔵したヒラメ刺身 (D) を比較した場合、透明感と食感は後者 (D) が有意 ($p<0.05$) に優れていたが、呈味と総合的な好みでは有意差はみられない評価を示した。また、高鮮度冷凍ヒラメ解凍刺身 (A) と活けしめ後 5°C で 30 時間冷蔵したヒラメ刺身 (E) の比較では、すべての評価項目において有意差は認められない結果を示した。

Table 7 Sensory evaluation of olive flounder sashimi prepared under different conditions of postmortem time and thawing method

Sensory evaluation	Sample							
	A	B	A	C	A	D	A	E
Transparency	11*	19*	12*	18*	18*	12*	16	14
Texture	10*	20*	14	16	18*	12*	17	13
Taste	12*	18*	15	15	14	16	16	14
Total evaluation	12*	18*	15	15	15	15	16	14

Sensory evaluation was performed by the method of paired comparisons with ten of panel. The transparency, texture, taste and overall judgement of sample (A) and (B) or sample (A) and (C) or sample (A) and (D) or sample (A) and (E) were compared. The results were analyzed by the Kramer test table. Postmortem time at 5 °C and thawing condition of sashimi sample were,
A, Immediate freezing at -35 °C after instantaneous killing and then thawing slowly;
B, Immediate freezing at -35 °C after instantaneous killing and then thawing quickly;
C, Postmortem time was 27 h at 5 °C until freezing and then thawing slowly;
D, Postmortem time was 6 h at 5 °C after instantaneous killing (non-frozen);
E, Postmortem time was 30 h at 5 °C after instantaneous killing (non-frozen);
* Significant difference ($p<0.05$).

5. 考察

近年、ヒラメに寄生する *Kudoa septempunctata* による食中毒が報告された。⁴⁴⁾ この寄生虫に関しても対策として冷凍による寄生虫の致死処理が提唱されているが、これらの処置をすると魚肉品質が低下すると報告されている。⁴⁵⁾ ヒラメ肉について高品質刺身として消費が可能な冷凍解凍処理に関する研究は十分に なされていないのが現状である。本研究では、魚肉タンパク質の冷凍変性抑制に関する ATP の作用^{33, 34, 46)} を参考に、ヒラメの活けしめ後の冷蔵保存や凍結解凍後の ATP 関連化合物の濃度変化および高濃度 ATP 存在下における魚肉の凍結と解凍方法が筋原線維タンパク質の生化学的性状やドリップ量の発生に及ぼす影響の測定および刺身としての官能評価試験を行い、これらの結果を総合的に考察することにより最適な冷凍解凍法について明らかにすることを目標とした。ヒラメ肉の凍結解凍後の筋原線維タンパク質の性状については、塩溶解度と Ca-ATPase 活性を指標に測定を行った結果、活けしめ直後の ATP を高濃度に含む筋肉において高い値を維持することが明らかとなった (Figs. 19, 20)。同時に、解凍方法が筋原線維タンパク質の性状に影響することが示され、高濃度の ATP を含む冷凍肉の解凍では緩慢解凍したものの方が急速解凍した場合よりも筋原線維タンパク質の塩溶解性度や Ca-ATPase 活性が高く維持されることが認められた。高濃度 ATP を含む冷凍肉の解凍では、解凍硬直によるドリップの発生を抑制することが重要であることが指摘されている。^{52, 53)} 本研究でも高濃度 ATP を含むヒラメ冷凍肉の解凍で解凍方法がドリップ発生量に影響することを確認したが (Fig. 22), 緩慢解凍処理で対処できることが示された。また、これら解凍肉の官能評価を行い、解凍方法が刺身品質に大きく影響することも確かめられた。魚肉タンパク質の品質を評価する科学的な指標として筋原線維タンパク質の塩溶解度や Ca-ATPase 活性を用いた研究としては、冷凍すり身の品質評価があげられる。⁵⁴⁾ 冷凍すり身から調製した筋原線維タンパク質の塩溶

解度や Ca-ATPase 活性とかまぼこゲル物性に強い相関が認められたことから、冷凍すり身タンパク質の研究は筋原線維タンパク質研究方法を導入することにより飛躍的に進んだ。また、水産物の冷凍変性についても筋原線維 Ca-ATPase を指標にして研究がなされ、凍結温度や保存温度の影響などが明らかにされている。^{55, 56)} なお、これらの研究は ATP が存在しない状態での冷凍に関する研究であり、死後硬直以降で ATP がほぼ消失した鮮度の水産物の冷凍保存に関するものである。ATP の筋肉タンパク質に対する変性抑制作用については、魚類ミオシンの熱変性^{9, 10)} や Mb のメト化³³⁾ など各種タンパク質の変性抑制効果について報告がなされている。これらの結果は、ATP が各種魚肉タンパク質に対して強い変性抑制作用を有することを示している。本研究では活けしめ直後の ATP を高濃度に含むヒラメ肉を急速凍結し緩慢解凍をすることにより、筋原線維タンパク質の変性や Mb のメト化進行が抑制された解凍肉を得ることが可能であることが示された。この処理で得られる解凍肉は、活けしめ後チルド状態で 1 日保存した肉に比べて筋原線維タンパク質の塩溶解度に有意差は無く、刺身としての透明感や食感、呈味、総合評価で差は認められず、また、IMP の生成量はほぼ同じであった (Table 4, 5, 7)。なお、5°C で 24–27 時間冷蔵した ATP がほぼ消失しているヒラメ肉を急速凍結後、解凍した肉では筋原線維タンパク質の性状は有意に低下し、官能評価では活けしめ直後に冷凍したものに比べて透明感で有意差は見られ、品質の低下傾向が認められた (Fig. 20, 21, Table 7)。魚肉タンパク質の品質を測定する方法として筋原線維タンパク質の塩溶解度や Ca-ATPase 活性を指標とする研究例を示したが、これらの指標と刺身品質の官能評価との関係について検討した研究例は少なく、このような研究手法を今後の魚肉品質研究へ応用していきたいと考える。

ヒラメの刺身では、活けしめ直後の活き作りでは食感を楽しむが、これは IMP の生成がほとんど無いものであるため呈味の少ないコリコリとした白身の刺身

として認識されている。一方、ヒラメの味を引き出すために活けしめ後 1 日程度冷蔵し IMP 濃度を高くしたものが、一般に高品質ヒラメ刺身として消費されている。活けしめ後急速凍結し高濃度の ATP を含有する冷凍ヒラメ肉を緩慢解凍した場合、5°C で 24–30 時間冷蔵した肉に比べて、透明感があり、IMP 含量はほぼ同量である刺身品質であることが明らかとなった。

以上の結果は、ヒラメ筋肉に寄生する *Kudoa septempunctata* による食中毒対策として、ヒラメを凍結してクドアを失活させ、なおかつ、高品質刺身商材として利用可能な冷凍ヒラメの製造方法を提供するものである。*Kudoa septempunctata* の寄生の可能性がある場合、ヒラメ 1 尾ずつについて感染の検査を行い出荷することが義務づけられている。一方、クドア対策として-15°C –-20°C で 4 時間以上の冷凍処理が提唱されている。⁴⁵⁾ 高品質ヒラメ冷凍刺身商材の実用化に向けては、冷凍保存温度および保存期間と品質の関係など、今後検討しなければならないこともあるが、魚体内に高濃度の ATP が残る方法で活けしめと急速凍結をし、その後解凍硬直を起こさない緩慢解凍を行うことで、刺身商材として利用可能な高品質冷凍ヒラメの製造が可能であることが明らかになった。養殖ヒラメの出荷形態として今後応用されることを期待する。

総括

近年，漁業や養殖場では短時間で水揚げから凍結まで行うことができるようになり，死後硬直前の鮮度が良い状態，つまりは魚肉内に ATP が含まれた状態で凍結することが可能となった。これまでは，高品質な冷凍水産物といえばマグロやサーモンが多かったが，水揚げや加工技術の発達により冷凍マグロやサーモン以外の高品質冷凍水産物も流通するようになった。さらに，世界中でワールドチェーンの整備も進められ，冷凍水産物の市場規模が拡大するとともに，高品質で冷凍変性を起こしにくい冷凍水産物の製造が求められている。ATP は K 値や死後硬直など水産物の鮮度指標にも使用されることから，鮮度や冷凍品の品質保持に影響を及ぼすことは想定できるが，食品科学的な視点から ATP と魚類筋肉タンパク質の関係を追及した研究は少ない。ATP の魚類筋肉タンパク質の安定化作用の研究について，1966 年に Mackie らは ATP によるタラのみオシンの凝集変性抑制を報告し¹²⁾，1986 年に吉岡らはティラピアのみオシン Ca-ATPase の熱変性に対する ATP の保護効果を報告^{9,10)}しているが，それ以降の研究報告はほとんどない。そこで，本研究では，ATP の魚類筋肉タンパク質の安定化作用について，冷凍変性，熱変性，pH 変性，尿素変性に対する変性抑制効果を検討し，そのメカニズムを解明することで水産物の鮮度保持や冷凍品の品質向上のための技術開発に応用することを目的とした。

第 1 章では，ATP による魚類筋原線維タンパク質の冷凍変性抑制作用について検討した。ATP はみオシン ATPase の基質であるため，通常の生理的条件下では筋原線維タンパク質に ATP を添加した直後から急激に ATP の分解が進み，筋原線維タンパク質を凍結処理する前に添加した ATP が分解することが予想された。本試験では，低 KCl 濃度での筋原線維タンパク質の K-EDTA-ATPase 活性が非常に低いことを確認し，0.1M KCl 溶液に懸濁した筋原線維タンパク質に EDTA を共存させることにより ATPase 活性を抑制し，凍結保存試験中の ATP

濃度を一定に維持した試験溶液を調製することを可能とした。スケトウダラとグチのどちらも凍結期間が長くなるにつれてアクトミオシンの抽出率と全活性は低下したが、共存する ATP 濃度が高いほどアクトミオシンの抽出率と全活性は高く、変性速度は遅くなった。この結果から、ATP は魚類筋原線維タンパク質の冷凍変性を抑制することが明らかとなった。ATP による魚肉タンパク質の安定化作用については、熱変性抑制に関する研究報告はあるものの、熱変性と冷凍変性はタンパク質の変性メカニズムが異なるものであり、魚肉タンパク質の冷凍変性を ATP が抑制することは新しい知見である。

第 2 章では、マグロ類やブリ類などで問題となっているヤケ肉の発生メカニズムと ATP の関係に着目した。ヤケ肉は、海水温が高い夏場に発生しやすく、魚体温の上昇と漁獲時の激動による筋肉 pH の低下が原因とされている。また、ヤケ肉では致死直後の ATP がほとんど消失していることが報告されている。^{13,14)}そこで、第 2 章では、ATP の消失が酸性 pH 下におけるミオシンの熱変性にどの程度影響を及ぼすのか、酸性 pH 下においても ATP はミオシンの熱変性を抑制するかについて検討した。ミナミマグロから調製したミオシン S-1 を pH5.5-7.5 に調整した 0.1M KCl 溶液に溶解し、Mg-ATP 存在下で 30°C で加熱処理した結果、Mg-ATP が共存することで、S-1 の濁度上昇速度および Ca-ATPase 活性の失活速度は遅くなった。しかし、S-1 溶液中の ATP が分解され消失すると Ca-ATPase 活性は急速に失活した。この 2 段階の失活は、pH5.5-7.5 までのすべての pH 条件で確認することができた。これらの結果は、ATP が酸性 pH 下での筋原線維タンパク質 (ミオシン S-1) の熱変性を抑制することを示している。マグロやブリ類のヤケ肉発生は、水揚げ時の激動を原因とした筋肉タンパク質の酸性 pH 化、魚体温の上昇が原因と考えられてきたが、本研究で ATP 濃度の低下が筋原線維タンパク質の酸性 pH 下における安定性を損なうことが明らかにされた。すなわち、生体内で局所的な pH 低下が起こったとしても、ATP が

存在すれば、急激な変性が引き起こされることを抑制することを示唆する結果である。ヤケ肉発生時における ATP の急速な消失はミオシンの酸性下での熱変性の急激な進行の引き金となると推察された。

第 1 章および第 2 章で、ATP は魚類筋原線維タンパク質の冷凍変性と酸性 pH 下での熱変性を抑制することが示唆された。その分子機序については今後詳細に検討を行う必要があるが、ATP 結合によって引き起こされるミオシンやアクチン分子の構造変化やタンパク質周辺の水和状態の変化に注目している。ATP は ATPase の基質であり、ATPase を持つミオシン S-1 と ATP は化学量論的には 1 : 1 で結合する。Mg²⁺ 存在下で ATP 再生系を用いてミオシン Ca-ATPase の熱変性に及ぼす ATP の変性抑制作用を測定した吉岡らの研究結果でも^{9,10)}、ATP はミオシンに化学量論的に、すなわち等モルで結合して変性抑制作用を発揮することを報告している。しかし、本研究の第 1 章、第 2 章の実験条件ではミオシン S-1 に対して ATP が過剰に存在しており、ATP による変性抑制に必要なミオシン S-1 と ATP の化学量論的な量の検討は本試験結果からだけでは明らかにすることはできないが、第 1 章でアクトミオシン抽出率が ATP 濃度依存性を示したことから、第 2 章で酸性 pH 下でのミオシン S-1 の加熱による濁度上昇が ATP 濃度依存性を示したことから ATP の変性抑制効果は ATPase 活性部位への結合によるものだけではないと推察している。松浦および大泉らは、ミオシンおよび筋原線維の熱変性に及ぼす糖類の保護効果を Ca-ATPase 活性を指標として検討し、糖類の効果は加熱処理に供するタンパク質濃度の影響を受けず、溶媒中の糖のモル濃度によって強く影響されることを見出した。^{36,37)} これは、糖類はタンパク質と直接結合してその効果を現すのではなく、溶媒中の水の構造および性質に影響を及ぼしその効果を現すと考えられ、ATP による変性抑制作用も糖類の保護効果に近い分子機序が存在するのではないかと考えられた。しかし、ATP はミオシン S-1 と結合する性質をもつことから、ATP の保護効果がミオシ

ン S-1 と ATP の結合とは無関係であるということは考えにくく、ミオシン S-1 と ATP の結合に加えて、溶液中の遊離の ATP の何らかの作用によって保護効果が発現しているものと推察する。例えば、ATP はミオシンに非共有結合ではあるが強固に結合してミオシンのコンフォーメーションをある一定に保つこと、あるいはミオシン S-1 の ATPase サイクルにおける水和量とのエントロピー変化に関する測定結果からミオシンタンパク質分子周囲の水分子との相互作用について報告がなされている。^{6,57)} また、単離したミオシンは 2mM ATP 溶液に溶解することも報告されており⁷⁾、これらのことから ATP はミオシン分子表面の水和構造に影響を及ぼしていることが推察される。

第 3 章では、アカシユモクザメのミオシン Ca-ATPase の尿素変性に対する ATP の変性抑制効果について検討した。ATP-Mg 存在下でアカシユモクザメミオシンに 1M 尿素を加えて一定温度で保持し、その後、透析により ATP-Mg と尿素を取り除いたミオシンの Ca-ATPase 活性を測定した結果、ATP が存在することで Ca-ATPase 活性の失活が抑制されることが明らかになった。第 2 章の Ca-ATPase の測定結果と同じように、ミオシン溶液中に ATP が残っているあいだは Ca-ATPase はほとんど失活しなかったが、ATP が分解して消失するとともに Ca-ATPase は失活した。また、体内に尿素をほとんど含まないマダイミオシンにおいても同様の結果が得られた。これらの結果から、ATP は筋肉タンパク質の尿素変性を抑制することが示唆され、生体内において、サメ類の筋肉タンパク質が尿素変性を起こしにくくなっていることに ATP も寄与していることが推察された。サメやエイ類などの筋肉中に高濃度で存在する尿素のタンパク質変性作用を消去するメカニズムの研究は、魚類生理学や生化学で注目されてきた重要な課題であり、生体内に存在するメチルアミン化合物の尿素変性抑制作用とサメ類の筋肉タンパク質そのものに尿素耐性があることが明らかにされてきたが、本研究で明らかにされた ATP による尿素変性抑制作用は新たな尿素

変性消去メカニズムを示すものであった。今後は、サメ類の生体内に高濃度で存在するメチルアミン化合物と ATP の尿素変性抑制の相互作用について研究を進める予定である。メチルアミン化合物の中でも、特に、TMAO はタンパク質変性抑制作用が認められている。^{16, 42)} 現在、TMAO と ATP の尿素変性抑制相互作用に関する研究に取り組んでいる。TMAO と ATP が共存することでサメミオシン ATPase 活性の尿素変性を抑制する可能性を示す結果が得られており、引き続き研究を行う予定である。また最近、ATP の新たな作用として、ATP が *hydrotrope* として疎水性タンパク質の溶解性維持に関与していることが報告されている。^{58, 59)} 一方、尿素もタンパク質の疎水性側鎖やペプチド主鎖と相互作用することから、ATP のタンパク質安定化作用はタンパク質の疎水性部分の性質や構造状態に関係していることが推察される。

第4章では、ヒラメの高品質冷凍刺身の製造を目的とし、凍結前の魚肉の鮮度が凍結解凍後の品質におよぼす影響について検討した。ヒラメの活けしめ後の冷蔵保存や凍結解凍後の ATP 関連化合物の濃度変化および高濃度 ATP 存在下における魚肉の凍結と解凍方法が筋原線維タンパク質の生化学的性状やドロップの発生に及ぼす影響の測定、さらには刺身としての官能評価試験を行い、これらの結果を総合的に考察した。活けしめ直後の ATP を高濃度に含んだ状態で凍結し緩慢解凍したヒラメから調製した筋原線維は、塩溶解性と Ca-ATPase 活性が冷凍品の中では最も高い値を示し、官能評価においても最も良い評価が得られた。高鮮度冷凍ヒラメは、活けしめ直後の未凍結のヒラメ肉と比べると、生化学的性状および官能評価で劣っていたが、一晩冷蔵した未凍結のヒラメ肉とは生化学的性状および官能評価において差はなかった。刺身の評価は、食べる人の嗜好性に大きく左右され、主に、活けしめ直後のコリコリした食感を好む人と、死後硬直後に ATP が IMP に分解され旨味が増した状態を好む人に分かれる。今回の高鮮度冷凍ヒラメの解凍後の刺身は、一晩冷蔵したヒラメの刺

身と同等の品質であるといえ、冷凍品であっても刺身として十分通用する品質であると評価した。この研究が養殖ヒラメのみならず、様々な水産物冷凍品製造技術の開発に応用されることを期待する。

これまでの研究成果を参考に、現在、海外輸出に向けた養殖ブリ高品質冷凍品の製造を試みている。日本の平成 27 年度の海面養殖業生産額を魚種別にみると、ブリ類は 24.7%と最も多い。ブリ類の生産額が多い理由としては、ブリの輸出货量・輸出額の増加が挙げられ、統計を取り始めた平成 20 年に比べて 3.5 倍に増加している。⁶⁰⁾ そのほとんどは米国向けの一酸化炭素処理 (CO) を施した“CO ブリ”といわれる製品で、鮮度が低下しても血合肉の色調がほとんど変化しないため、鮮度誤認の問題から日本や EU、アジア諸国などでは販売が禁止されている。しかしながら、近年の日本食ブームにより、中国や香港、EU への輸出も増えつつあり、今後ますます輸出増大が見込まれている。日本から海外に製品を送る場合、空輸と船便の 2 通りがあるが、コスト面から、冷凍品を船で輸出する方法が求められている。また、アニサキスなどの寄生虫による食中毒対策のため、国や地域によっては刺身などの生食を提供する際には冷凍解凍して提供することが義務付けられている。ブリ冷凍品の最大の問題は、血合肉が褐変することであり、凍結保存中の血合肉の褐変を抑制したブリ冷凍品の開発が求められている。井ノ原らは、ATP が魚類 Mb のメト化の進行を抑制することを報告し^{33,34)}、第 4 章では、ATP を高濃度に含むヒラメ肉の血合肉 Mb のメト化率が ATP ほとんどを含まないものに比べて低いことを明らかにした。現在、この研究の成果をもとに、適切な処理かつ短時間で水揚げから凍結まで行い高濃度 ATP を含むブリ冷凍品を製造し、凍結保存試験を行っているところであり、高濃度 ATP を含むサンプルで凍結保存中の血合肉のメト化の進行が抑制される結果が得られている。魚肉中に高濃度の ATP を残すためには、水揚げから一貫した鮮度管理が必要である。古くから水産物の鮮度維持には温度

管理が有効であることが知られている。特に、シラスなど魚体が小さく活けしめ操作が困難で品質劣化の激しい魚種では、漁獲後の温度管理が非常に重要で、適切な温度管理をすることでプロテアーゼ活性を抑制した鮮度管理を行っている。また、活けしめ後の保存温度は魚肉の ATP 分解速度と死後硬直に影響を及ぼすことが知られている。魚肉の凍結時に高濃度の ATP が残る活けしめ方法や致死後の ATP 分解を抑制する温度管理など、水揚げから一貫した鮮度管理を行い、ATP による冷凍変性を抑制した水産冷凍品の製造に応用されることを期待する。

本研究結果により、ATP は生体内において高エネルギー物質としての作用のみならず、各種タンパク質の熱変性や酸性 pH 変性、尿素変性を抑制する重要な機能を有していること、また、その変性抑制作用は生理的な ATP 濃度で十分発揮されることが明らかとなった。この研究結果は、生体内各種タンパク質のホメオスタシスに関する ATP の生理的機能（変性抑制作用）の研究と、冷凍変性抑制に関わる高濃度 ATP を含有する高品質冷凍品の製造と流通・消費に関する応用研究に発展することが期待される。

参考文献

- 1) 平成 29 年度食料需給表 農林水産省, 2018
- 2) 世界の統計 2018 総務省統計局, 2018, p14
- 3) 世界漁業・養殖業白書 2018 国連食糧農業機関 (FAO)
- 4) 世界漁業・養殖業白書 2010 国連食糧農業機関 (FAO)
- 5) Saito T, Arai K, Matsuyoshi M. A new method for estimating the freshness of fish. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1959; **24**: 749-750
- 6) Nelson DL, Cox MM. (山科郁男 監修, 川寄敏祐, 中山和久 編集) 「レーニンジャーの新生化学」(上) 第 4 版 廣川書店. 東京. 2006; 704-714.
- 7) Asai H. Chromatography of myosin. *Biochemistry* 1963; **2**: 458-461
- 8) Ouellet L, Laidler K.J, Morales M.F. Molecular kinetics of muscle adenosine triphosphate. *Arch. Biochem. Biophys.* 1952; **39**: 37-50.
- 9) 吉岡武也, 新井健一. ミオシン Ca-ATPase の熱変性におよぼす ATP の保護効果. 日水誌 1986; **52**: 1829-1836.
- 10) 吉岡武也, 浜井昌志, 今野久仁彦, 新井健一. ATP による魚類ミオシンの熱変性抑制の再検討. 日水誌 1991; **57**: 143-147.
- 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) Mackie M.I. The effect of adenosine triphosphate, inorganic pyrophosphate and inorganic tripolyphosphate on the stability of cod myosin. *Biochim. Biophys. Acta* 1966; **115**: 160-172.
- 13) 福島英登, 田中竜介, 福田裕. 養殖マグロでみられるヤケ肉の発生要因とその肉質性状. 「生鮮マグロ類の高品質管理 ー漁獲から流通までー」(日本水産学会 監修, 今野久仁彦, 落合芳博, 福田裕 編集) 恒星社厚生閣, 東京. 2010; 43-53

- 14) 塩谷 格, 田代 高. ストレス緩和によるマグロ類ヤケ肉防止. 「生鮮マグロ類の高品質管理 ー漁獲から流通までー」(日本水産学会 監修, 今野久仁彦, 落合芳博, 福田裕 編集) 恒星社厚生閣, 東京. 2010; 118-127.
- 15) Watabe S, Ochiai Y, Kanoh S, Hashimoto K. Proximate and protein compositions of requiem shark muscle. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.* 1983; **49**: 265-268.
- 16) Yancey PH, Somerot G. Counteraction of urea destabilization of protein structure by methylamine osmoregulatory compounds of elasmobranch fishes. *Biochem. J.* 1979; **183**: 317-323
- 17) Kanoh S, Watabe S, Takewa T, Hashimoto K. Urea-resistibility of myofibrillar proteins from the requiem shark *Triakis scyllia*. *Nippon Suisan Gakkaishi*. 1985; **51**: 1713-1716
- 18) Kanoh S, Niwa E, Osaka Y, Watabe S. Effects of urea on actin-activated Mg^{2+} -ATPase of requiem shark myosin. *Comp Biochem Physiol.* 1999; **122B**: 333-338
- 19) 加納哲, 渡辺都, 丹羽栄二. ドチザメ・ミオシン α ヘリックス構造に及ぼす尿素の影響 日水誌 2000; **66**: 882-887.
- 20) 村田裕子, 岡崎恵美子, 木村メイコ, 今村伸太郎, 平岡芳信, 木村郁夫. 高濃度の ATP を含有する魚肉微細化物のゲル形成能と冷凍耐性. 水産技術 2010; **2**:105-110.
- 21) Murata Y, Henmi H, Nishioka F. Extractive components in the skeletal muscle from ten different species of scombroid fishes. *Fisheries Science*. 1994; **60**: 473-478.
- 22) Gomori G. A modification of the colorimetric phosphorus determination for use with a photoelectric colorimeter. *J. Lab. Clin. Med.* 1942; **27**: 955-960.

- 23) 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.
- 24) Laemmli UK. Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; **227**: 680-685.
- 25) 碓谷敏紀, 木村郁夫, 新井健一. コイ背肉ミオシンからサブフラグメント-1の調製とその生化学的性質について. 日水誌 1981; **47**: 947-955.
- 26) Barron S, Eisenberg E, Moos C. Actin-myosin interaction : Inhibition of the myosin adenosine triphosphatase by actin. *Science.* 1966; **151**: 1541-1542.
- 27) Kimura I, Arai K, Takahashi K, Watanabe S. Earliest event in the heat denaturation of myosin. *J. Biochem.* 1980; **88**: 1703-1713.
- 28) 小長谷史郎, 小長谷康夫. 常温における赤身魚の筋原線維タンパク質の変性：“ヤケ肉”発生の要因. 東海水研報, 1978; **96**: 67-74.
- 29) Konagaya S, Konagaya T. Acid denaturation of myofibrillar protein as the main causes of formation of “yake-niku”, a spontaneously done meat, in red meat fish. *Nippon Suisan Gakkaishi.* 1979; **45**: 245.
- 30) 生鮮マグロ類の高品質管理 —漁獲から流通まで— (日本水産学会 監修, 今野久仁彦, 落合芳博, 福田裕 編集) 恒星社厚生閣, 東京. 2010.
- 31) Konno Y, Konno K. Myosin denaturation in "Burnt" bluefin tuna meat. *Fish. Sci.* 2014; **80**: 381-388.
- 32) Huang M, Choi S, Ochiai Y, Watabe S. Evaluation of biochemical properties of burnt and normal meat in Pacific bluefin tuna (*Thunnus orientalis*). *Int. J. Nutr. Food Sci.* 2017; **6**: 203-210.
- 33) Inohara K, Kimura I, Yuan C. Suppressive effect of ATP on autoxidation of tuna oxymyoglobin to metmyoglobin. *Fish.Sci.* 2013; **79**: 503-511.

- 34) Inohara K, Kurogi S, Onoue Y, Hamada M, Tamotsu S, Kimura I. Suppressive effect of ATP contained in muscle on the browning of amberjack *Seriola dumerili* dark muscle during frozen storage. *Nippon Suisan Gakkaishi*. 2014; **80**: 965-972 (in Japanese with English abstract).
- 35) 今野久仁彦, 加藤早苗, 江湖正育. コイ筋原線維を出発材料としたミオシン・サブフラグメント-1 の簡便な調製法. 日水誌 1990; **56**: 1885-1890.
- 36) Matuura M, Ooizumi T, Arai K. The protective effect of sugar against thermal denaturation of biochemical properties of carp myosin. *Nippon Suisan Gakkaishi*. 1984; **50**: 521-529 (in Japanese with English abstract).
- 37) Ooizumi T, Hashimoto K, Ogura J, Arai K. Quantitative aspect for protective effect of sugar and sugar alcohol against denaturation of fish myofibrils. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1981; **47**: 901-908 (in Japanese with English abstract).
- 38) Wetlaufer DB, Malik SK, Stoller L, Coffin RT. Nonpolar group participation in the denaturation of proteins by urea and guanidinium salts. Model compound studies. *J. Amer. Chem. Soc.* 1964; **86**: 508-514
- 39) Takashima H, Kasuya M. Inactivation of myosin A by low concentrations of urea. *Arch. Biochem. Biophys.* 1967; **118**: 475-487
- 40) Finer EG, Franks F, Tait MJ. Nuclear magnetic resonance studies of aqueous urea solutions. *J. Amer. Chem. Soc.* 1972; **94**: 4424-4429
- 41) Fuery CJ, Attwood PV, Withers PC, Yancey PH, Baldwin J, Guppy M. Effects of urea on M₄-lactate dehydrogenase from elasmobranchs and urea-accumulating Australian desert frogs. *Comp. Biochem. Physiol.* 1997; **117B**: 143-150
- 42) Lin TY, Timasheff SN. Why do some organisms use a urea-methylamine mixture as osmolyte? *Biochemistry* 1994; **33**: 12695-12701

- 43) Bonaventure J, Bonaventure C, Sullivan B. Urea tolerance as a molecular adaptation of elasmobranch hemoglobins. *Science* 1974; **186**: 57-59
- 44) Sugita-Konishi Y. Foodborne disease caused by *Kudoa septempunctata*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 2012; **78**: 828-831 (in Japanese).
- 45) Sugita-Konishi Y, Sato H, Ohnishi T. Novel foodborne disease associated with consumption of raw fish olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Food safety* 2014; doi: 10.14252/food safetyfscj.2014026.
- 46) 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.* 2016; doi: 1007/s12562-015-0940-1.
- 47) Hu Y, Zhang J, Ebitani K, Konno K. Development of simplified method for extracting ATP-related compounds from fish meat. *Nippon Suisan Gakkaishi* 2013; **79**: 219-225 (in Japanese with English abstract).
- 48) Ochiai Y, Watanabe Y, Uchida N, Ozawa H, Watabe S. Biochemical and thermodynamic characteristics of myoglobin from the skeletal muscle of sei whale *Balaenoptera borealis*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 2010; **76**: 86-694 (in Japanese with English abstract).
- 49) Inohara K, Onoue Y, Kimura I. Method of measuring the ratio of metmyoglobin formation in fish meat. *Nippon Suisan Gakkaishi* 2015; **81**: 456-464 (in Japanese with English abstract).
- 50) 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.
- 51) 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.
- 52) 村田裕子, 萩原光仁, 舟橋均, 上野久美子, 岡崎恵美子, 木村郁夫, 福田裕. 高鮮度冷凍クジラ肉の解凍方法の開発. 水産技術 2008; **1**: 37-41.
- 53) Bito M. Changes in NAD and ATP levels and pH in frozen-stored skipjack meat in relation to amount of drip. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1978; **44**: 897-902 (in Japanese with English abstract).
- 54) Katoh N, Nozaki H, Komatsu K, Arai K. A new method for evaluation of the quality of frozen surimi Alaska pollack relationship between myofibrillar ATPase activity and kamaboko forming ability of frozen surimi. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1979; **45**: 1027-1032 (in Japanese with English abstract).
- 55) Fukuda Y, Tarakita Z, Kawamura M, Kakehata K, Arai K. Denaturation of myofibrillar protein in chub mackerel during freezing and storage. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1982; **48**: 1627-1632 (in Japanese with English abstract).
- 56) 福田 裕. 冷凍による変性. 「水産加工とタンパク質の変性抑制」(新井健一編) 恒星社厚生閣, 東京. 1991; 9-16.
- 57) Suzuki M, Shigematsu J, Fukunishi Y, Harada Y, Yanagida T, Kodama T. Coupling of protein surface hydrophobicity change to ATP hydrolysis by myosin motor domain. *Biophys. J.* 1997; **72**: 18-23.
- 58) Partel A, Malinowska L, Saha S, Alberti S, Krishnan Y, Hyman A. ATP as a biological hydrotrope. *Science* 2017; **356**: 753-756.
- 59) Rice AM and Rosen MK. ATP controls the crowd. *Science* 2017; **356**: 701-702.
- 60) 財務省 「貿易統計」

謝辞

博士學位論文をまとめるにあたり、温かい激励とご指導、ご鞭撻をいただいた鹿児島大学水産学部教授 木村郁夫先生に厚く御礼申し上げます。大学4年生の時に木村先生の研究室に配属になり研究を進めていくうちに、難しいけれども面白い研究の世界に魅了されました。就職か進学か悩んでいた私を大学院に導いてくださったことにはじまり、研究の初歩的なことや研究に向かう姿勢、学術論文の書き方など本当に多くのことを辛抱強くご指導いただきました。また、積極的に学会発表をさせていただいたことや、企業との共同研究に参加させていただいたことは、私の研究者人生の糧になる貴重な経験となりました。このような経験ができたのも木村先生の研究室に在籍していたからこそだと思っております。木村先生のもとで研究生活を送れたことは、私にとって生涯の財産となりました。心より感謝申し上げます。

また、本論文を提出するにあたり、副査として多くのご助言をいただきました鹿児島大学農学部教授 安部淳一先生、鹿児島大学農学部教授 侯徳興先生、鹿児島大学水産学部准教授 加藤早苗先生、鹿児島大学水産学部准教授 塩崎一弘先生に厚く御礼申し上げます。くわえて、分析やサンプリングにご協力くださった鹿児島県水産技術開発センターの保聖子氏と鹿児島大学水産学部の教職員の皆様にも深謝いたします。

最後に、これまで自分の思う道を進むことに対し、温かく見守り支えてくれた家族に深い感謝の意を表して謝辞と致します。