

筋形質タンパク質および尿素共存下 (*in vitro*) におけるサメ肉ミオシン B の凍結変性

西元 諄一*¹・林 義晃*²・御木 英昌*¹

Effect of Sarcoplasmic Protein and Urea on the Freeze-Denaturation of the Shark Muscle Myosin B (*in vitro*)

Jun-ichi NISHIMOTO*¹, Yoshiaki HAYASHI*² and Hidemasa MIKI*¹

Abstract

The freeze-denaturation of the shark muscle myosin B (MB) (*in vitro*) was examined under the conditions in which sarcoplasmic protein (Sp-P) and /or urea existed. The results were as follows.

(1) In the mixture system of MB:Sp-P at -20°C of storage, the ATPase activity of MB was not affected by Sp-P, but the solubility of MB was controlled by Sp-P.

(2) In the mixture system of MB:Urea, the freeze-denaturation of MB was promoted very much as urea content became higher. At the concentration of 3% (molality: 5mM) and 10% (15 mM) urea in MB, the changes in the solubility and the ATPase activity were found to be equal as that of control, respectively.

(3) In the mixture system of MB:Sp-P:Urea, when Sp-P content was 32% of MB which is about equal as that of concentration in a living body, the degree of freeze-denaturation was greater according as the urea content increased. However, when the urea content was 10% (15 mM) in the mixture system, the freeze-denaturation of MB indicated almost the same change as that of control.

(4) From the above results, it can be concluded that the usual condition of leaching treatment was suitable for the keeping quality of frozen Surimi made from shark muscles.

魚肉の水溶性成分を除くことによって、スケソウダラ冷凍すり身タンパク質の不溶化軽減を図ることができるといわれた^{1,2)}が、他方、コイ、セイゴではそのアクトミオシンの冷凍変性抑制に対し水溶性成分とくに水溶性タンパク質が大きく関係しており、非熱凝固タンパク質、エキス分および無機物も関与する³⁾といわれ相反する報告がなされた。よって、この水溶性成分中の水溶性タンパク質(主として筋形質タンパク質:以下 Sp-P と略す)ならびにサメ肉にとくに多い尿素について、これらの筋原繊維タンパク質の凍結変性への影響を明らかにした

*¹ 鹿児島大学水産学部食糧保蔵学研究室 (Laboratory of Food Preservation Science, Faculty of Fisheries, Kagoshima University, 4-50-20 Shimoarata, Kagoshima, 890 Japan).

*² 現住所: キューピー株式会社 (Present Address: Kyupi Co. Ltd., 1-4-13 Shibuya, Shibuyaku, Tokyo, 150 Japan).

いが、一般に魚肉中の Sp-P 含有割合 (Sp-P/Total protein) は、サメ類では21~24.5%^{4,5)}、硬骨白身魚では21~25%⁶⁾、硬骨赤身魚では35~47%⁷⁾とされている。この様に魚肉タンパク質の1/5~1/3を占める Sp-P は魚肉ミオシン B (以下 MB と略す) の耐凍性に影響する重要な因子であることが考えられ⁸⁾るが、この Sp-P が MB の凍結変性に抑制的か促進的かはつきりしていない。また、水溶性成分中の尿素はタンパク質変性剤であるが、サメ肉中に1500 mg/100 g前後含まれ普通の海産魚 (2~15 mg/100 g) よりはるかに多いにもかかわらず、このためにサメ肉 MB の変質がとくに大きいわけではなく、これらの関係はほとんど研究がないことも指摘されている。⁵⁾

したがって、本報では MB レベルにおけるモデル系で MB の凍結・凍蔵変性に及ぼす Sp-P および尿素の共存の影響を検討した結果をのべる。

実験方法

試料魚 新鮮なホシザメ Spotted shark *Mustelus manazo* をドレス処理後、供試まで-70°C に保管した。

MBゾルおよびSp-P溶液の調製 MBは新井⁹⁾の方法により抽出し、稀釈沈殿後遠心分離 (6000 G, 0°C, 10分間) で沈殿を集め調製した。Sp-P溶液は、リン酸緩衝液 (I = 0.05, pH7.5) で抽出し、透析 (20mm Tris-malate, pH6.8) して調製した。

凍結貯蔵用サンプル調製 MBゾル10gにSp-P溶液10ml (i, Sp-P混和系) あるいは尿素溶液10ml (ii, 尿素混和系), または尿素を含むSp-P溶液10mlを添加した懸濁液 (iii, Sp-P・尿素混和系) を凍結貯蔵用サンプル (以下 Samp. と略す) とした。

MBの溶解量の測定 凍結 samp. 20ml を流水解凍後, 3.0mKCl 5.0ml を加え KCl濃度を0.6Mとし, 低温室 (5°C) 内で3時間スターラーで攪拌溶解した。その後遠心分離 (9000G, 0°C, 15分間) し, 上澄を希釈沈殿法 (11倍冷水, 1夜放置) で沈殿を生成させた。この沈殿を遠心分離 (6000×g, 0°C, 10分間) で集め 3mKCl と水を加え, KCl濃度を0.6Mに調整して溶解した。溶解した沈殿を100倍量の0.6mKCl-20mm Tris-malate (pH6.8) に対して一夜透析したのち遠心分離 (20000×g, 0°C, 60分間) し, 上澄区分を未変性 MB 溶液とした。これのタンパク質濃度をビュレット法¹⁰⁾で求め [透析時の MB の容積] × [未変性 MB の濃度] を未変性 MB の溶解量として表示した。

MBのCa²⁺-ATPase活性の測定 新井¹¹⁾の方法に準じた。

結果および考察

MBの凍結貯蔵中における変性に及ぼすSp-Pの影響 (i. Sp-P混和系)

a. Sp-P濃度の影響 Sp-Pがアクトミオシン, 筋原繊維の凍結変性に及ぼす影響について, 梅本ら³⁾および志水ら¹²⁾は変性抑制作用を認めているが Sp-P濃度の影響はのべていない。Fig. 1 に Sp-P添加量をかえた samp. を-20°Cで15日間凍蔵した場合の変化を示した。MB溶解性低下は, Sp-Pが40%以上混在すると抑制されたが混在割合による抑制効果に大差はなかった。MB-ATPase活性低下は, Sp-Pの混在によって抑制されず Sp-P混在量が多い

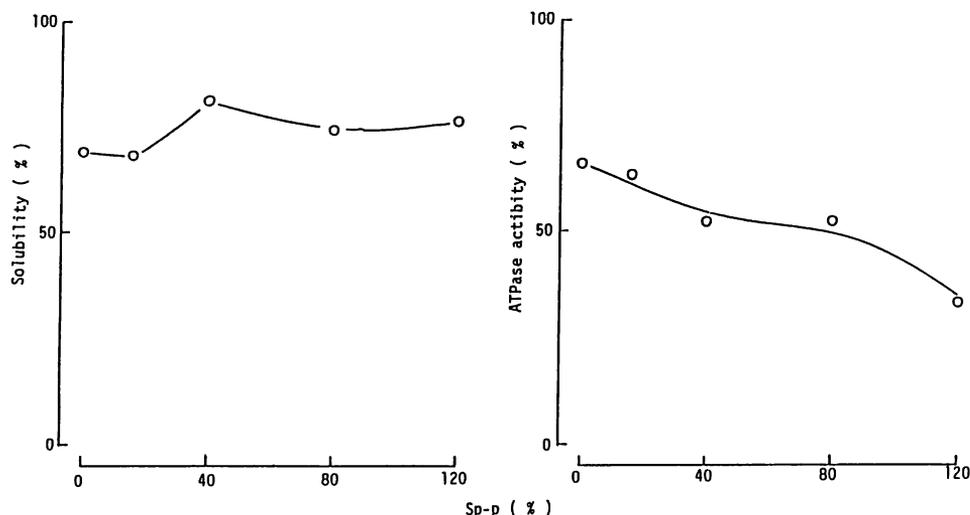


Fig. 1. Effect of Sp-p concentration on the denaturation of myosin B during frozen storage. (stored at -20°C for 15days)

ほど大きくなった。

b. 貯蔵期間の影響 Sp-P 量16%, 32% (生体内比にほぼ相当), 48%および120%含有 samp.を -20°C に180日間おき経時的に変性度合を調べその結果をFig. 2に示した。MB溶解性は貯蔵期間が長くなるほど低下し, その低下度はSp-Pが48%以下のとき対照よりも大きく, 120%ではわずかに小さかった。MB-ATPase活性も溶解性と同様に低下したが, その低下度は不溶化より顕著であり, 120%が最も大きく16%では対照と大差がなかった。なお, 貯蔵温度の影響は, 図に示さなかったがSp-P共存の有無にかかわらず対照とほとんど同じであった。ただ -50°C 以下では, 変性指標としての溶解性低下およびMB-ATPase活性の失活はほとんど抑制されたがこれらはすでに知られていることである。

MBの凍結貯蔵中における変性に及ぼす尿素の影響 (ii. 尿素混和系)

a. 尿素濃度の影響 尿素はかなり古くからタンパク質の溶剤として用いられておりその作用は, タンパク質の疎水結合を弱めることによるといわれるようになったが, なお不明な点が多い¹³⁾とされている。ところで, サメ肉を晒処理すると尿素が除去されるがその程度は晒条件によって様々である。そこで尿素濃度がMBの凍結変性に及ぼす影響を検討するため尿素フリーのMBゾルに尿素を添加し, -20°C で15日間凍蔵し, 変性指標の変化をFig. 3に示した。これらの変化は凍結・貯蔵の影響と尿素の影響が同時に表示されるが, Fig. 2の変化と対比しながら検討すると, 溶解性およびMB-ATPase活性とも尿素0mmから50mmの間ではその濃度が増大するにつれて直線的に低下し50mm以上でまったく失なわれた。以上のようにMBの不溶化およびMB-ATPase活性低下は尿素濃度が低い程小さかった。この結果は野口ら¹⁴⁾のコイおよびマアジでの50mm尿素添加実験結果と同じ傾向であった。この様なモデル実験では50mm(約250mg/100g相当)尿素存在下で, 凍蔵15日間によりMB-ATPase活

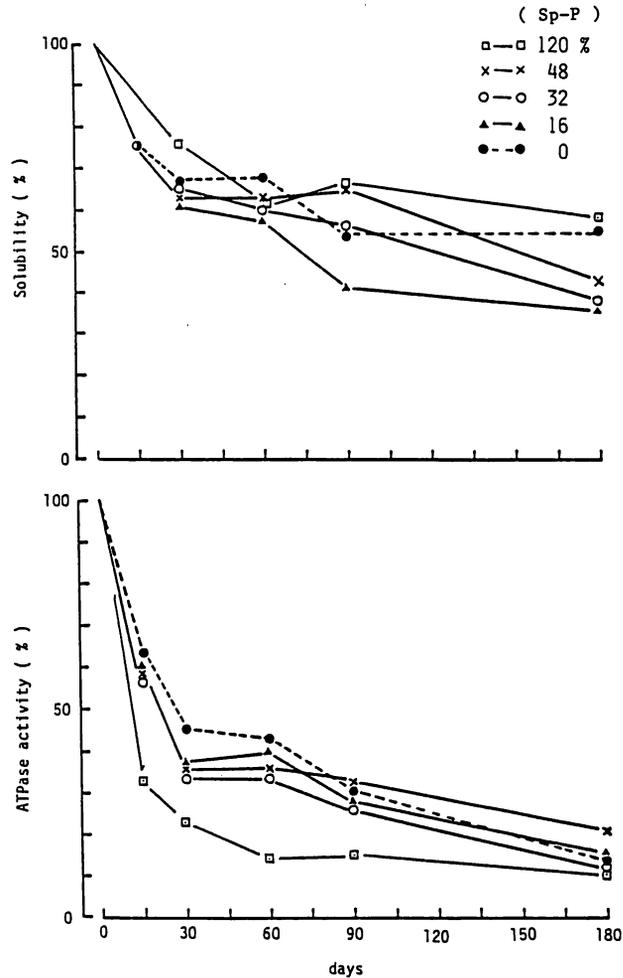


Fig. 2. Effect of storage period on the denaturation of myosin B during frozen storage at -20°C .

性は完全に失せたが、サメ肉中では300mm前後の尿素が含まれているのに加熱ゲル形成能からみた耐凍性が強い魚種として知られており、¹⁵⁾ この相違の説明には今後の研究成果をまたねばならない。

b. 貯蔵期間の影響 尿素がMBに対し3% (濃度 5 mm), 10% (15 mm), 19% (29 mm) および30% (44mm) 存在する samp. を -20°C に180日間おき経時的に変性度を測定した結果を Fig. 4 に示した。尿素が44mmでは15日間で溶解性, MB-ATPase 活性ともにほとんど失われたが濃度が低い程その低下度は小さく貯蔵中に徐々に低下した。低濃度 (3% : 5 mm 以下) ではその溶解性は対照とほぼ同じ程度で変性速度に大きな影響はないものと考えられたが, MB-ATPase 活性はたとえ低濃度でも50%以上失活した。しかし, 50 mm含有の場合, -70°C において半年間貯蔵で活性が約50%保持された。したがって, -70°C のような極低温に貯

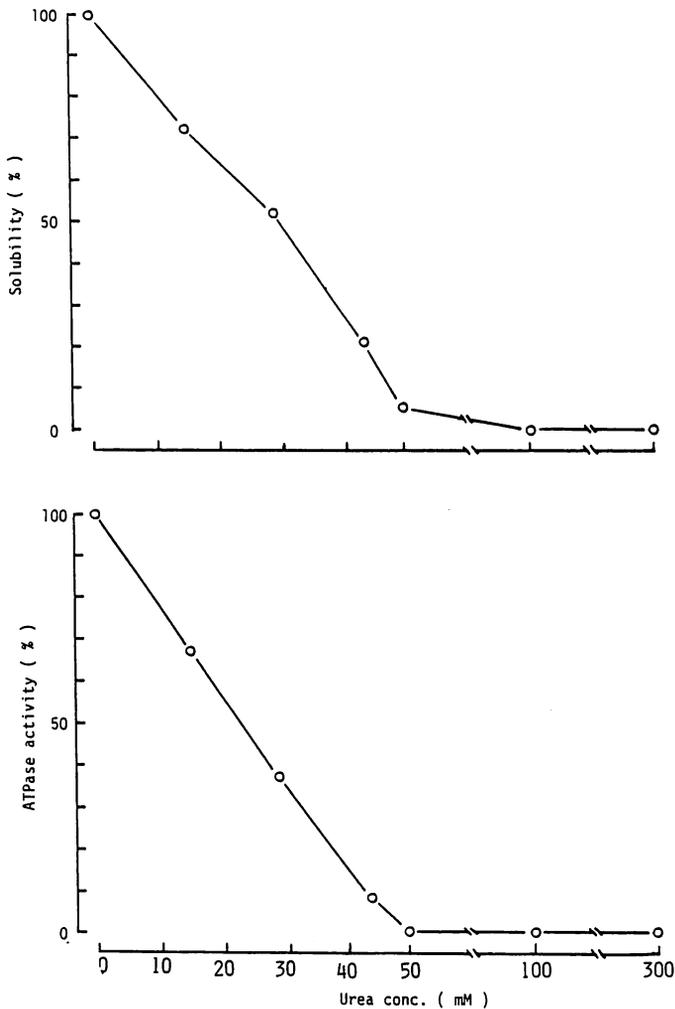


Fig.3. Effect of Urea concentration on the denaturation of myosin B during frozen storage.
(stored at -20°C for 15days)

蔵しても30%(約50 mM)尿素存在下においては長期貯蔵により溶解性, MB-ATP-ase 活性は完全に喪失することはないが減少はまぬがれないことがわかった。しかしながら, 板鰐類ではその体内タンパク質が尿素に対して特異的性質をもつことがいくつかのべられており,^{16,17)} 板鰐類の筋肉乳酸脱水素酵素は約400 mMの尿素の存在で適正な機能を発揮すること¹⁸⁾を, また, サメ類筋肉の筋原繊維 Mg-ATPase 活性が生理的濃度で高まることも報告されている。¹⁹⁾ したがって, 尿素混在下での MB 凍蔵中の不溶化, ATPase 活性低下に対して, サメ類筋肉 MB は他の魚類のそれより抵抗性があるのではないかと考えられる。

MBの凍結貯蔵中における変性に及ぼす Sp-P および尿素共存の影響

魚肉の冷凍すり身は, 筋原繊維, Sp-P および尿素等が混合された状態であるので, モデル

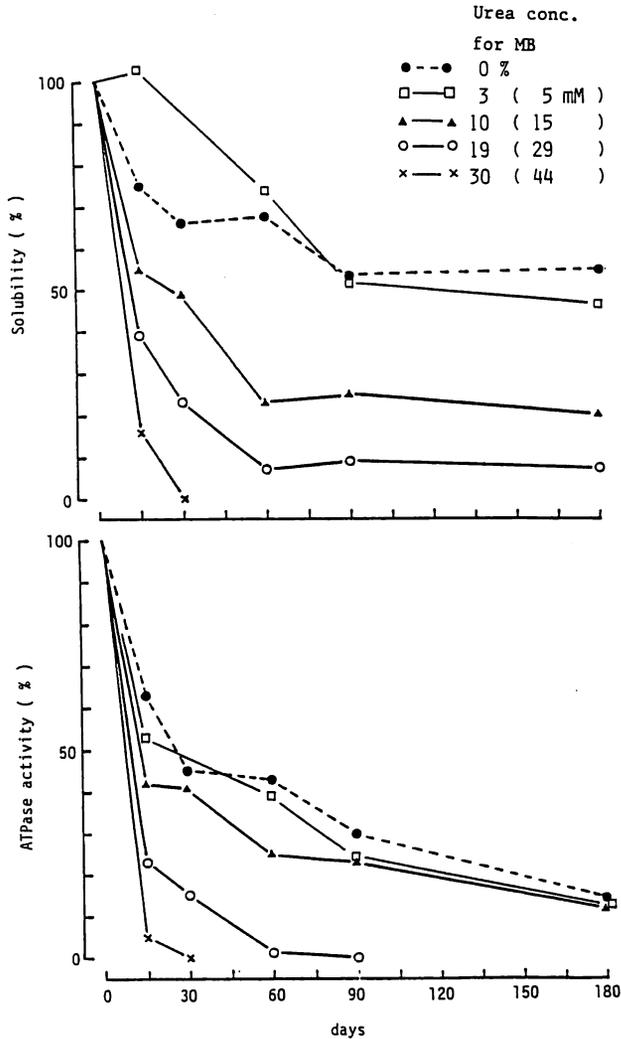


Fig. 4. Effect of storage period on the denaturation of myosin B in Sp-P and urea mixture during frozen storage at -20°C .

系において Sp-P を MB に対し 32% (生体内の割合にほぼ相当する) 含む試料に尿素含有割合を変化させた共存 samp. を調製し、 -20°C で凍蔵した。その結果は Fig. 5 のようであった。MB の溶解性の低下は尿素濃度が高いほど大きかったが、尿素 10% (15 mM) レベルの共存系では対照とほぼ同等であった。MB-ATPase 活性は、溶解性の変化と同じ傾向を示したが、尿素 10% (15 mM) ないし 13% (19 mM) 共存でも対照とほぼ同等の変化であった。水溶性の尿素は肉の晒処理で除去されるが、これの含有のとくに多いサメ肉では晒処理によって完全に除去し難く、しかも歩留の低下が著るしい (たとえば、尿素除去率は切身の場合約 73%、挽肉で約 96%、また 2~3 mm 角ブロックで 54%、10 mm 目ミンチ肉 89.2%^{*} との報告があり、歩留は切身の場合 30~50%、挽肉で 10% 内外であった)。よって、凍蔵中の MB 変質防止のため

* 昭和 55 年度鹿児島県水産試験場事業報告書 化学部編 (1982), pp. 1-52.

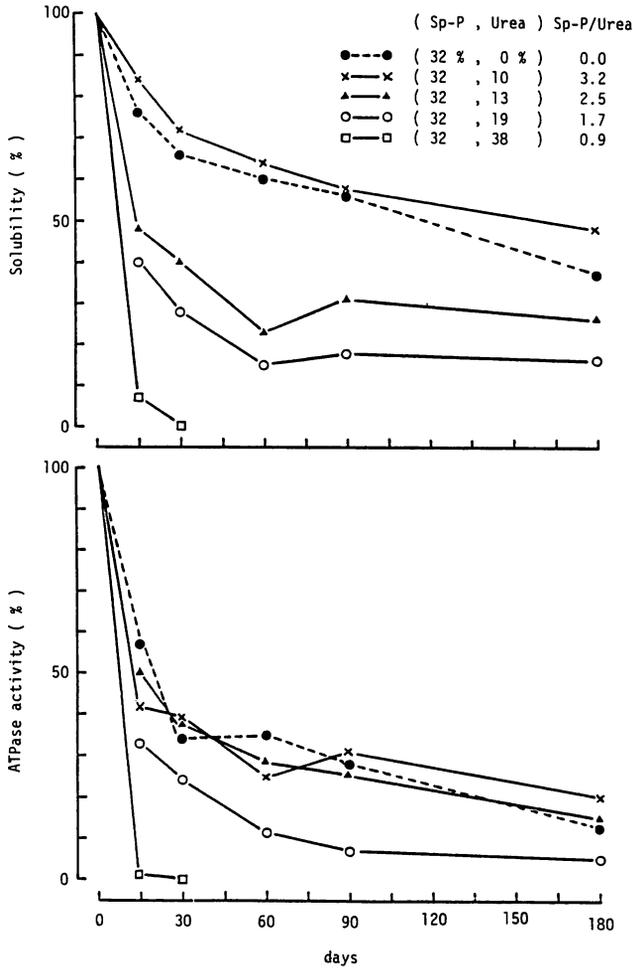


Fig. 5. Effect of storage period on the denaturation of myosin B in Sp-P and urea mixture during frozen storage at -20°C .

めの尿素除去(晒処理)は必要最小限にすべきであるが、本実験の結果では尿素的低濃度(MB に対して10~13%, 濃度15~19 mm)において変性度合が対照と大差なかったことから尿素共存限界濃度はMB に対し10%(15 mm)程度と考えてよからう。すなわち、サメ筋肉には漁獲後の保管温度履歴によって変動はあるもののMB に対しほぼ19%(29 mm)の尿素が存在するので尿素量をおおよそ半分には減ずればよいことになる。

また、Sp-P は魚肉すり身の加熱ゲル形成能に阻害的である^{20,21)}と考えられているから出来るだけ除去すべきであるが、晒処理によるSp-P の除去率はツマリツノザメの場合、水晒: 39%, 塩化カルシウム晒: 53%, アルカリ晒: 56%であり実際に充分除去し難い。しかしながら、MB とSp-P の混在系においてSp-P が16%のときMB-ATPase 活性低下度が対照と同等であった(Fig. 2)ことを考慮すると、魚肉中のSp-P 量が全タンパク質中20~25%で筋原

繊維タンパク質が約60%であるのでSp-P量が半分になるとMBに対するSp-Pの割合がほぼ16%となり本実験での耐凍性保持レベルに一致する。したがって現在実施されている晒処理は冷凍すり身品質保持上適当な方法といえよう。

以上のようなMBレベルのモデル系における結果は、晒肉レベルでの変化を推測する手がかりになるが単純に適用できない。しかし、晒肉レベルでのMB変性に及ぼす尿素の作用において、MBの安定性を期待しうる混在割合は前述の値が目安となると考えられる。

要 約

ホシザメ筋肉を用いてSp-Pおよび尿素、あるいはこれらが共存する状態 (*in vitro*) でのMBの凍結・凍蔵における変性への影響を検討した。

- (1) MB-Sp-P 混和系における -20°C 貯蔵では、Sp-Pによる溶解性低下抑制作用を認めたが、MB-ATPase 活性低下抑制は認められなかった。
- (2) MB-尿素混和系では、尿素濃度が高いほど変性は促進されたが、溶解性はMBに対する重量比3% (濃度5 mM) で、MB-ATPase 活性は10% (濃度15 mM) において対照と同等の変化であった。
- (3) MB-Sp-P 尿素混和系ではSp-PをMBに対し32% (生体内の割合にほぼ等しい) 含む場合尿素濃度が高いほど変性は大きかったが、尿素10% (濃度15 mM) 含有の混合系では対照とほとんど同じ程度の変化を示した。
- (4) 以上より、通常の晒処理条件はサメ冷凍すり身の品質保持上適当であると判断された。

終りに試料の入手に御便宜をはかって下さった鹿児島県北薩水産業改良普及所の平原 隆技師ならびに御協力下さった阿久根市漁業協同組合および市来町漁業協同組合の各位に厚くお禮申し上げます。また、実験を補助された下川明彦君に感謝します。

文 献

- 1) 西谷喬助・武田二美男・田元 馨・田中 修・福見 徹・久保 正・鳥谷部憲男 (1960) : 摺身の凍結と応用に関する研究 第3報 凍結魚におよぼす塩類の影響(1). 北水試月報, 17, 373-384.
- 2) 西谷喬助・武田二美男・田元 馨・田中 修・北林 透 (1961) : 摺身の凍結と応用に関する研究 (第6報) ホッケの冷凍摺身について (その1). 北水試月報, 18, 391-397.
- 3) 梅本 滋・村木義雄 (1969) : 魚肉アクトミオシンの冷凍変性に及ぼす魚肉水溶性成分の影響. 東海水研報, 60, 191-194.
- 4) 志水 寛・清水 亘 (1960) : 水産動物に関する研究—X X V III. 魚類筋肉の蛋白組成. 日水誌, 26, 806-809.
- 5) WATANABE S., Y. OCHIAI, S. KANO and K. HASHIMOTO (1983) : Proximate and Protein Compositions of Requiem Shark Muscle. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 49, 265-268.
- 6) 志水 寛 (1981) : 肉タンパク質. "新版魚肉ねり製品" (岡田 稔・衣巻豊輔・横関源延編), 初版, pp. 21-23 (恒星社厚生閣, 東京).
- 7) 鈴木たね子 (1976) : 筋肉タンパク質. "白身の魚と赤身の魚" (日本水産学会編), pp. 42-46 (恒星社厚生閣, 東京).

- 8) 西元諄一・是枝 登 (1979)：晒魚肉の耐凍性・加工性について。日水誌, 45, 989-993.
- 9) 新井健一 (1974)：魚類筋肉タンパク質の調製。"水産生物化学・食品学実験書" (齊藤恒行・内山 均・梅本 滋・河端俊治編), pp.179-182 (恒星社厚生閣, 東京)。
- 10) GORNALL, A. G., C. J. BARDAWILL and M. M. DADID (1949)：Determination of Serum Proteins by means of the Biuret Reaction. *J.Biol.Chem.*, 177, 751-766.
- 11) 新井健一 (1974)：魚類筋肉タンパク質の特性の測定。"水産生物化学・食品学実験書" (齊藤恒行・内山均・梅本 滋・河端俊治編), pp.184-194 (恒星社厚生閣, 東京)。
- 12) 志水 寛・四方 純・藤岡 恰 (1974)：魚類筋原繊維の冷凍耐性に及ぼす筋肉圧搾液の影響。日水誌, 40, 271-274.
- 13) 中沢 淳・中沢昌子・早石 修 (1976)：タンパク質の相互作用。"タンパク質化学3—高次構造—" (安藤鋭郎・今堀和友・伊勢村寿三・早石 修編), pp.673-674 (共立出版, 東京)。
- 14) NOGUCHI, T. and J. J. MATSUMOTO (1970)：Studies on the Control of the Fish Muscle Proteins during the Frozen Storage- I. Preventive Effect of Na-glutamate. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 36, 1078-1087.
- 15) 志水 寛 (1981)：ゲル形成能。"新版魚肉ねり製品" (岡田 稔・衣巻豊輔・横関源延編), 初版, pp. 59-60 (恒星社厚生閣, 東京)。
- 16) 坂口守彦 (1981)：非タンパク態窒素化合物。"魚介類の微量成分・その生化学と食品化学" (池田静徳編), pp.25-27 (恒星社厚生閣, 東京)。
- 17) 須山三千三 (1984)：生化学的特性。"資源生物としてのサメ・エイ類" (谷内 透・須山三千三編, 日本水産学会監修), pp.122-123 (恒星社厚生閣, 東京)。
- 18) YANCEY, P. H. and G. N. SOMERO (1978)：Urea-requiring lactate dehydrogenases of marine elasmobranch fishes. *J. Comp. Physiol.*, 125, 135-141.
- 19) NISHIMOTO, J. (1981)：Effect of Urea on the Mg^{2+} -ATPase Activity of Myofibrils prepared from Elasmobranch Muscle. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 47, 1391.
- 20) 岡田 稔 (1964)：かまぼこの足に対する水晒しの影響。日水誌, 30, 255-261.
- 21) 志水 寛・西岡不二男 (1974)：マアジ・アクトミオシンと筋形質たん白の熱凝固の際の相互作用。日水誌, 40, 231-234.