

論文の内容の要旨

水圏生物科学専攻
平成 15 年度博士課程 進学
氏 名 佐藤 佳恵
指導教官 渡部 終五

シログチおよびスケトウダラ普通筋ミオシンに関する原料科学的研究

水産練り製品は魚肉の加熱ゲル化特性を利用した食品であるが、加熱ゲル形成能は魚種によって大きく異なることが知られている。すなわち、スケトウダラ (*Theragra chalcogramma*) は資源量が多いため練り製品の原料魚として広く用いられているが、筋肉の潜在的な加熱ゲル形成能はやや弱いとされる。一方、シログチ (*Pennahia argentata*) 肉は高い加熱ゲル形成能を有するものの本魚種の資源量は少なく、市場の需要を十分に満たすことができない。一方、筋肉の加熱ゲル化には主要構成タンパク質であるミオシンが重要な働きをすることが知られている。したがって、魚肉の加熱ゲル形成能の種特異性はミオシンの違いに起因すると考えられる。今まで、シログチおよびスケトウダラ普通筋ミオシンを対象に動的粘弾性や熱力学的性状が検討され、大きな違いが認められている。しかしながら、未だ両魚種の加熱ゲル形成能の違いを明確に説明する知見は得られていない。

本研究はこのような背景の下、シログチおよびスケトウダラ普通筋を対象に、まずミオシン ATPase の熱安定性および酵素化学的性状を調べた。次に、ミオシンの加熱に伴う構造変化を表面疎水性、プロテアーゼ消化性、濁度の変化などから調べた。さらに、ミオシンの頭部領域を含むサブフラグメントを調製し、その動的粘弾性と熱力学的性状を調べて両魚種間で比較した。得られた研究成果の概要は以下の通りである。

1. ミオシンの酵素化学性状

シログチおよびスケトウダラ普通筋に2倍量の0.45 M KCl溶液を加えて粗ミオシンを抽出し、10 mM Mg^{2+} -ATP存在下の硫酸分画で精製した。まず、 Ca^{2+} -ATPase活性を指標として貯蔵安定性および熱安定性を調べた。0.5 M KClおよび0.1 mM DTT存在下pH 7.0で0に貯蔵したシログチおよびスケトウダラ・ミオシンの Ca^{2+} -ATPase活性を0.05 M KClおよび1 mM $CaCl_2$ を含むpH 7.0の反応液中20で測定し、貯蔵4日間の残存活性から変性速度恒数(K_D)を求めた。その結果、 K_D はそれぞれ 2.7×10^{-6} および $13.0 \times 10^{-6} s^{-1}$ と算定され、シログチ・ミオシンはスケトウダラのその約5倍の貯蔵安定性を示した。さらに20 - 40で熱安定性を調べたところ、シログチ・ミオシンの K_D はいずれの温度においてもスケトウダラ・ミオシンの約半分であった。0を含む K_D のArrhenius plotから算出した活性化エネルギーはシログチおよびスケトウダラ・ミオシンでそれぞれ148.5 および124.3 J/molであった。

次に、両魚種ミオシンの Ca^{2+} -ATPase活性をpH 7.0、0.05 - 0.6 M KClの範囲で調べた。シログチおよびスケトウダラ・ミオシンの活性はともに0.05 M KClで0.523 および0.239 $\mu mol Pi/min \cdot mg myosin$ と最も高く、KCl濃度の増大に伴って低下した。いずれのKCl濃度においてもシログチ・ミオシンの活性はスケトウダラの約2倍であった。また、0.05 M KCl中、pH 5.5 - 8.0の範囲での Ca^{2+} -ATPase活性のpH依存性は両魚種で類似した傾向を示し、シログチおよびスケトウダラ・ミオシンの至適pHはそれぞれ6.2 および6.3と測定された。さらに生理機能を反映するアクチン活性化ミオシン Mg^{2+} -ATPase活性を0.05 M KCl、5 mM $MgCl_2$ 、0.25 mg/mLミオシンおよび0 - 0.15 mg/mLウサギF-actinを含むpH 7.0の反応液中、20で測定した。スケトウダラ・ミオシンの Mg^{2+} -ATPase活性はシログチのそれよりアクチンにより強く活性化され、 Ca^{2+} -ATPase活性とは逆の傾向を示した。アクチン活性化 Mg^{2+} -ATPase活性のHanes-Woolf plotsから算出したシログチ・ミオシンの最大反応初速度は0.165 $\mu mol Pi/min \cdot mg myosin$ と、スケトウダラの0.309 $\mu mol Pi/min \cdot mg myosin$ の約半分であった。しかしながら、アクチンとの親和性は両魚種でそれぞれ1.68 および1.37 μM と類似した値を示した。

2. ミオシンの加熱に伴う構造変化

0.5 M KCl、pH 7.0中、20 - 80で30分間加熱処理を行った後0、2時間冷却したミオシン標品につき0.5 mMの8-anilino-1-naphthalene sulfonate (ANS)を加えて4でさらに15分間放置し、室温で蛍光強度を測定した。その結果、極大波長465 nmにおけるスケトウダラ・ミオシン非加熱標品の蛍光強度はシログチのその約1.2倍であった。一方、シログチ・ミオシンでは加熱に伴う疎水性残基の表面露出がスケトウダラに比べて大きく、60加熱

標品の最大蛍光強度は非加熱標品のそれぞれ 142%および 106%であった。

また、非加熱標品および 50 までの加熱処理標品を pH 7.0、10、1/200 重量比の α -キモトリプシンで処理して SDS-PAGE 分析に供した。ミオシン分子は 2 本の重鎖と 4 本の軽鎖の 6 つのサブユニットからなる。N 末端側の球状部分は頭部サブフラグメント-1 (S1) と呼ばれ、C 末端側の線維状部分は尾部ロッドと呼ばれる。プロテアーゼ限定分解の条件により、S1 およびロッドの N 末端側約半分を含む H-メロミオシン (HMM) を生じる。スケトウダラ・ミオシン重鎖の消化速度はシログチのそれより約 8 倍大きかった。シログチ HMM は加熱処理標品においてもほとんど消化されなかったが、スケトウダラ HMM は非加熱標品であっても多くの部位で切断された。以上のように、シログチ・ミオシンはプロテアーゼ消化性の点からも構造安定性が高かった。

さらに、加熱処理標品の重合体形成を検討した。両魚種ミオシンはともに 30 以上の加熱処理により濁度の増大がみられ、40 および 70 で極大値を示した。シログチおよびスケトウダラ・ミオシンの最大濁度は 70 加熱標品でみられ、それぞれ非加熱標品の 578% および 410%であった。また、スケトウダラ・ミオシン非加熱標品の表面 SH 基量はシログチのその約 1.2 倍と測定されたが、両魚種とも加熱に伴い増大し、80 加熱標品では同程度となった。総 SH 基量は両魚種とも 80 加熱標品において非加熱標品の 90%となり、10%の SH 基が酸化あるいは分子間 SS 結合を形成していると考えられた。なお、SDS-PAGE の条件を変えて SS 結合の有無を調べたが、両ミオシン間で明確な差は認められなかった。

3. HMMおよびS1の動的粘弾性と熱力学的性状

シログチおよびスケトウダラ普通筋原線維を、HMM調製では 0.5 M KClおよび 1 mM CaCl_2 存在下、S1 調製では 0.05 M KClおよび 1 mM EDTA存在下で α -キモトリプシン処理した後、10 mM Mg^{2+} -ATP存在下の硫酸分画に付した。S1 はさらに陰イオン交換カラムなどを用いて精製した。約 30 mg/mLのHMM標品につき 5 - 80 の昇温に伴う粘弾性変化を調べた。その結果、シログチHMMの貯蔵弾性率 (G') および損失弾性率 (G'') は 56 から 80 まで増大した。一方、スケトウダラHMMの G' は 30 から増大し始め、60 からは増大傾向をやや大きくしたが、 G'' は 33 に極大値を示した後はほとんど変化しなかった。シログチおよびスケトウダラHMMの 80 における G' 値はそれぞれ 43 および 15 Paと、シログチHMMで著しく高かった。示差走査熱量測定 (DSC) の結果、シログチおよびスケトウダラHMMはそれぞれ 19 - 67 および 19 - 54 の温度範囲でいずれも 4 つの転移温度 (T_m) を示した。なお、スケトウダラHMMの T_m はシログチHMMの対応する T_m より低温側にあった。シログチHMMでは最も高温の T_m (56) は G' が急激に増大する温度と一致した。一方、スケトウ

ダラHMMの粘弾性の変化と T_m の間にはとくに明確な相関はみられなかった。

次に、約 20 mg/mLのS1 標品の動的粘弾性の測定では、シログチS1 のG'は 38 から 80 まで増大し続け、80 における値は 189 Paと測定された。これに対して、スケトウダラS1 のG'の増大はシログチのそれに比べて小さく、80 の値は 57 Paに過ぎなかった。既報の両魚種ミオシンの粘弾性変化と比較すると、シログチS1 のG'増大領域はミオシンが示す 2 つのG'増大領域中、高温側のものに相当した。一方、スケトウダラ・ミオシンではこのような高温側でのG'の増大はみられず、本結果は両ミオシンの違いをよく説明した。両魚種S1 ともG''はG'と同様に 38 から増大する傾向がみられた。DSCの結果、シログチS1 の熱容量 ΔC_p は 35 および 43 に極大値を示し、スケトウダラS1 の極大値 26 および 28 よりも高温側にあった。両魚種S1 標品ともDSC曲線と粘弾性変化の間に明確な対応関係はみられなかった。

以上、本研究により、 Ca^{2+} -ATPase活性を指標とした K_D およびプロテアーゼ消化性からシログチ・ミオシンの構造安定性はスケトウダラのそれより高いことが明らかになった。また、非加熱シログチ・ミオシンの表面疎水性や表面SH基量はスケトウダラのそれに比べて小さいが、加熱に伴う変化は大きいことが明らかとなった。さらに、シログチではS1 がミオシンの高温領域でのゲル化に寄与すること、スケトウダラではその効果が小さいことが示唆された。これらの結果は、シログチおよびスケトウダラ普通筋ミオシンの加熱ゲル化特性の違いの一端を説明するもので、食品化学上に資するところが大きいと考えられる。