

学 位 論 文 題 名

冷凍すり身を原料とした塩すり身のゲル形成機構
に関するタンパク質化学的研究

学位論文内容の要旨

本論文では、冷凍すり身を原料とするとき、肉糊の坐りに伴うゲル物性の増加とミオシン HC の多量化反応に対して大きな影響を及ぼすと考えられる 2 つの要因、すなわちゲル化に際して調節が必要となる肉糊の pH と、冷凍すり身製品中に付加されている糖類の効果を詳細に検討し、その結果を基にして魚類肉糊のゲル形成機構をタンパク質化学的な視点から解明することを目的とした。

本論文の第一章では肉糊のゲル化能に及ぼす pH の影響を検討した。先ず第一節ではスケトウダラすり身の pH を無機の酸と塩基によって微酸性から微アルカリ性の範囲に調節し、それを塩すりして調製した肉糊のゲル化能を検討した。第二節では、一度酸性下で処理したスケトウダラすり身の pH を中性に戻してから塩すりして、肉糊のゲル化能への影響を調べ、すり身の pH がゲル化に及ぼす影響と、肉糊の pH がゲル化に及ぼす影響の違いを比較検討した。第三節では、実際に赤身魚肉中に生成する乳酸をマイワシすり身に加えて pH を変化させ、肉糊のゲル化能に及ぼす影響を調べた。続いて第二章では一般にその冷凍貯蔵性を高めるために冷凍すり身に加えられるソルビトールがその肉糊のゲル化能に及ぼす影響を調べた。以上の第一章と第二章の実験では肉糊中の筋原線維（Mf）タンパク質に起こる変化を SDS-PAGE 法によって分析したため、肉糊のゲル化の過程で形成される Mf タンパク質の高次構造体の本体を知ることは出来ない。そこで、第三章では、サブユニットに解離する前のタンパク質の母体、特にミオシン HC 多量体を含む構造体について情報を得ることを目的とし、肉糊中の Mf タンパク質を高濃度の塩溶液で溶解させた後ゲル濾過法によって分析し、坐りに伴って起こるゲル化の機構をタンパク質化学的な視点から理解する試みを行った。得られた結果は以下のとおりである。

【1】スケトウダラ肉糊の 25℃での坐りに伴うゲル化に対する pH の影響を検討した。破断強度（BS）は pH 7.35 で最大で、それより微酸性でも微アルカリ性でも減少した。一方、肉糊中の Mf タンパク質サブユニットの変化様式も pH で異なり、微酸性ではミオシン重鎖（HC）の

減少に伴いその多量体と未同定成分（X₁成分）の増加が起こるが、X₁成分の生成により多量体が減少することがBSの減少に対応し、また微アルカリ性ではHCの減少が起こりにくく、多量体の生成が少ないことがBSの減少に対応していた。

【2】スケトウダラのすり身を酸性で氷蔵後、中和して塩ずりし、25℃での肉糊のゲル化能とミオシンHCの変化を検討した。その結果、酸性下で氷蔵すると、すり身中のMf Ca-ATPaseが失活し、ゲル化能とミオシンHCの多量化能が低下すること、またpH 6.0で48時間氷蔵後のすり身を中和し、塩ずりして坐らせた場合と、pH 6.0のすり身を直接塩ずりして坐らせた場合のそれらの能力は同じ程度に劣化することが示された。

【3】マイワシ肉糊に乳酸を添加してpHを微酸性とし、25℃でのゲル化能とミオシンHCの多量化能を、坐りゲルと坐りー加熱ゲルで調べた。その結果、微酸性下でのマイワシ肉糊のゲル化は、スケトウダラ肉糊の場合と異なり、X₁成分はほとんど生成しなかった。しかし、微酸性下ではミオシンHCの減少が抑制され、最も巨大なサイズのマイワシ肉糊のミオシンHC多量体であるHCn⁺の生成が起こらない点でスケトウダラの場合と似ており、これがBSの減少に対応した。なお、中性における坐りゲルと坐りー加熱ゲルのBSには大きな差異があるのに、ミオシンHC多量体の量と組成比はほぼ同じなので、坐りー加熱ゲルの示す高いゲル物性にはSDS-尿素混液中で開裂しないミオシンHC間の強い結合の他に、多数の弱い結合の寄与が大きく、また、酸性下の坐りー加熱ゲルのゲル物性が低い原因は強い結合が形成されにくいだけではなく、弱い結合も減少することに起因すると推定した。

【4】調製したスケトウダラのすり身に0～8%のソルビトール（S）を添加して塩ずりし、20℃と40℃で坐らせ、さらに90℃で加熱して、坐りゲルと坐りー加熱ゲルを調製し、ゲル物性とミオシン重鎖の変化を調べた。その結果、20℃の坐りゲルではS濃度が高い程BSは僅かに高い傾向を示した。このときミオシンHC多量体の中で、HCnが多量に増加し、HCnより分子サイズの大きいHCn⁺は逆に増加しにくくなった。また、X₁成分の増加もS濃度が高い程抑制された。なお、坐りー加熱ゲル中の多量化反応は、全体的に僅かに進んでいることを除けば、坐りゲルの場合と似ていた。また、そのBSには坐りの効果が強く発揮され、S濃度が高い程著しく増加した。一方、40℃の場合は、ミオシンHCの減少、HCnの増加、およびX₁成分の増加はいずれも、S濃度の高い程その変化量が多いが、余り顕著な差ではなかった。また、BSはS濃度が高い程やや大きい値を示すが、坐りの効果は認められなかった。したがって、Sは肉糊中のミオシンHCの変性を抑制し、20℃ではミオシンHC間に起こる多量化反応を緩慢にしてHCnを蓄積し、それに続く高温における弱い結合を形成し易くする様に作用すると考えられた。

【5】ゲル化した肉糊を高濃度の NaCl 溶液と共にホモジナイズし、溶解させた Mf タンパク質を Sepharose Cl-4 B を用いたゲル濾過法によって分析した。すなわち、pH は 6.9 と 6.0 で、タンパク質濃度は 130mg/g と 30mg/g 湿重量の肉糊から 25℃ で坐りゲルを調製した後、0.8M NaCl 溶液と共にホモジナイズし、遠心分離して塩溶性のタンパク質量を測定した。その結果、1) タンパク質濃度が高い場合、pH 6.9 では塩ずり直後は高い溶解性を示すが、坐りに伴い急激に低下した。しかし、pH 6.0 では坐り 12 時間後でも 45% と比較的高い値を保持した。一方、タンパク質濃度が低い場合、いずれの pH の坐りゲルも高い溶解性を示し、坐りが進行しても緩やかに減少するだけであった。2) 遠心分離後の上清（可溶性画分）と沈澱（不溶性画分）中のタンパク質サブユニット組成を調べたところ、pH 6.9 の肉糊の場合は主にアクチン（A）＋トロポミオシン（TM）の成分が可溶化した。不溶性画分中には主に HCn が含まれ X₁ 成分と A＋TM 成分の一部も含まれていた。一方、pH 6.0 の肉糊の場合は多量の A＋TM 成分の他に X₁ 成分が可溶化し、また、不溶性画分中には HCn の大部分が含まれるが、他に大量の X₁ 成分も含まれていた。3) これらの変化は、ゲル化中の肉糊のタンパク質濃度には余り影響を受けず主に pH の変動により大きく影響された。4) 可溶化した Mf タンパク質をゲル濾過法によって分析すると、塩ずり直後の肉糊から溶解した Mf タンパク質は 3 画分よりなりアクトミオシン（AM）の凝集体、ミオシンと少量の AM、および A＋TM を含む成分に相当した。しかし、坐りによるゲル化が進むと、溶解する Mf タンパク質は 2 画分となり、それらは X₁ 成分（150K および 80K が主成分）をも複合した AM の凝集体と A＋TM に相当した。以上の変化は、pH が微酸性（pH 6.0）になると、かなり抑制されて遅くなった。5) 塩ずりに伴って生成するタンパク質凝集体の本体は、SDS-PAGE によるとミオシン HC とその多量体と推定される成分および A から構成されており、ゲル濾過上の挙動からその分子量は少なくとも 2 千万以上に達する程である。塩ずり直後に生成するその凝集体中には相対的に多量のミオシン HC が含まれているが、坐り過程ではその量はむしろ減少した。さらにそのサブユニット組成比は坐りの進行と共に変化し、A に対するミオシン HC、150K、および 80K 成分の比率はいずれも減少する傾向を示した。それゆえ塩ずりおよびその坐りに伴う凝集体の形成に際しては肉糊中のミオシン HC、ミオシン HC 多量体、A、150K、および 80K 成分などがそれぞれ別途に参加して相互に結合しているものと推定された。

本論文の結果より、肉糊の坐りに伴うゲル化においては、まず初めに肉糊中のあらゆるタンパク質成分が相互に結合して大きな分子サイズの凝集体を構成する（ただしミオシン HC 間の結合が最も強い）こと、次に、凝集体を構成するタンパク質成分の組成は坐りの進行と共に変動し、

かつ分子サイズは徐々に巨大化してゆくことが明らかとなった。

学位論文審査の要旨

主査	教授	新井健一
副査	教授	信濃晴雄
副査	教授	関伸夫
副査	助教授	猪上徳雄
副査	助教授	今野久仁彦
副査	教授	鮫島邦彦（酪農学園大学）

本論文は、冷凍すり身を原料とするとき、その肉糊の坐りに伴って起こるゲル物性の増加とミオシン重鎖（HC）の多量化反応に対して大きな影響を及ぼす2つの要因、すなわち肉糊のpHと、糖類の効果を検討し、その結果から魚類肉糊のゲル形成機構をタンパク質化学的な視点から解明することを目的としたものである。得られた結果の中、評価される点は以下のとおりである。

【1】スケトウダラ肉糊を25℃で坐らせ、それに伴うゲル化に対するpHの影響を検討した結果、破断強度（BS）はpH 7.35で最大で、微酸性でも微アルカリ性でも減少すること、また微酸性の肉糊中ではミオシンHCの減少に伴いその多量体と未同定成分（X₁成分）の増加が起こるが、X₁成分の生成の分だけ多量体が減少すること、また微アルカリ性ではミオシンHCの減少が起こり難く多量体の生成が少ないことがそれぞれBSの減少に対応することを認めた。

【2】スケトウダラのすり身を酸性で氷蔵後に中和して塩ずりし、25℃での肉糊のゲル化能とミオシンHCの変化を検討した。その結果、酸性下で氷蔵中にすり身のMfCa-ATPaseが失活し、ゲル化能とミオシンHCの多量化能は微酸性下のすり身を直接塩ずりして坐らせた場合と同じ様に劣化することを認めた。

【3】マイワシ肉糊に乳酸を添加して微酸性とし、25℃におけるゲル化能とミオシンHCの多量化能を、坐りゲルと坐りー加熱ゲルで調べた。その結果、微酸性下でのマイワシ肉糊のゲル化は、スケトウダラ肉糊の場合と異なり、X₁成分をほとんど生成しないが、ミオシンHCの減少が抑制され、巨大な多量体成分の生成が起こらない点でスケトウダラの場合と似ており、これがBSの減少に対応することを認めた。なお、中性における坐りゲルと坐りー加熱ゲルのBSに

は大きな差異があるのに、ミオシン HC 多量体の生成量と組成比はほぼ同じなので、坐り－加熱ゲルの示す高いゲル物性には SDS－尿素混液中で開裂するようなミオシン HC 間の弱い結合の寄与が大きく、また、酸性下の坐り－加熱ゲルのゲル物性が低い原因は、ミオシン HC 間の強い結合だけではなく弱い結合も減少することに起因すると推定した。

【4】スケトウダラのすり身に 0～8 % のソルビトール (S) を添加して塩ずりし、20℃と 40℃で坐らせ、さらに 90℃で加熱して、坐りゲルと坐り－加熱ゲルを調製し、ゲル物性とミオシン HC の変化を調べた。その結果、20℃の坐りゲルでは、S 濃度が高い方が BS は僅かに高く、ミオシン HC 多量体の中で分子サイズの大きい成分が増加し難くなった。また、X₁成分の増加も S 濃度が高い程抑制された。坐り－加熱ゲル中の多量化反応は、全体的に僅かに進んでいることを除けば、坐りゲルの場合と似ていた。なおその BS には坐りの効果が強く発揮され、S 濃度が高い程著しく増加した。一方、40℃の場合は、ミオシン HC の減少、多量体の増加、および X₁成分の増加はいずれも、S 濃度の高い程大きいのが、顕著な差ではなかった。また、BS は S 濃度が高い程やや大きい値を示すが、坐りの効果は認められなかった。したがって、S は低温下におけるミオシン HC 間の強い結合反応を緩慢にして分子サイズの小さな多量体成分を蓄積し、それに続く高温における弱い結合を形成し易くする様に作用すると考えられた。

【5】ゲル化した肉糊を高濃度の NaCl 溶液に溶解させ、Mf タンパク質を SepharoseCl- 4 B を用いたゲル濾過法によって分析した。その結果、(1) pH 6.9 では塩ずり直後は高い溶解性を示すが、坐りに伴い急激に低下した。しかし、pH 6.0 では坐り 12 時間後でも比較的高い値を保持した。(2) 遠心分離後の上清 (可溶性画分) と沈澱 (不溶性画分) 中のタンパク質サブユニット組成を調べたところ、pH 6.9 の肉糊の場合は、初めはミオシン HC、後期はその多量体成分の他、常にアクチン (A) + トロポミオシン (TM) 相当の成分が可溶化した。不溶性画分中には主に多量体が含まれ X₁成分と A + TM 成分の一部も含まれていた。一方、pH 6.0 の肉糊の場合は多量の A + TM 成分と X₁成分の他にミオシン HC とその多量体成分が可溶化し、また、不溶性画分中にも同じ成分が含まれていた。(3) この組成はゲル化中の肉糊のタンパク質濃度には余り影響を受けず、主に pH の相違により大きく影響された。(4) ゲル濾過法によると、塩ずり直後の肉糊から溶解した Mf タンパク質は 3 画分よりなり、アクトミオシン (AM) の凝集体、ミオシン、および A + TM を含む成分に相当していた。しかし、坐りによるゲル化が進むと 2 画分となり、それらは X₁成分 (150K および 80K が主成分) をも複合した AM の凝集体と A + TM 成分に相当した。以上の変化は pH が微酸性 (pH 6.0) になるとかなり抑制された。(5) 塩ずりに伴って生成するタンパク質凝集体はミオシン HC とその多量体と推定される成分および A から構成

されており、その分子量は少なくとも2千万以上に達するほどである。塩ずり直後に生成するその凝集体中には相対的に多量のミオシン HC が含まれているが、坐り過程ではその量はむしろ減少し、さらにそのサブユニット組成比は坐りの進行と共に変化した。

以上の結果より、肉糊の坐りに伴うゲル化においては、まず初めに肉糊中のあらゆるタンパク質成分が相互に結合して大きな分子サイズの凝集体を構成する（ただしミオシン HC 間の結合が最も強く、アクチンとその他成分間のそれは弱い）こと、次に、凝集体を構成するタンパク質成分の組成は坐りの進行と共に変動し、かつ分子サイズは徐々に巨大化してゆくことが明らかとなった。

本論文は、ねり製品の品質を左右する肉糊の坐りに伴うゲル化の機構を、タンパク質化学の視点から初めて明らかにすると共に、ねり製品原料として利用し難い赤身魚類の肉糊の欠点をも解明した点で、食品学上に貢献することが非常に大きい。以上の点を高く評価して、審査員一同は、申請者が博士（水産学）の学位を授与される十分な資格があると判定した。