

学位論文題名

過酸化脂質と魚類筋原線維タンパク質の
相互作用に関する研究

学位論文内容の要旨

魚肉を原料とした水産食品の主要成分はタンパク質と脂質である。このうち、水産物の脂質は極めて酸化されやすく、加工・貯蔵中におけるその酸化は水産物原料やその加工品の品質を著しく劣化させる要因となっている。それゆえ酸化抑制の技術にかかわる研究が従来数多くなされている。一方、もう一つの主要成分である魚肉タンパク質も著しく不安定で変性しやすく、その変性は魚肉加工品の一種であるねり製品などの品質に大きな影響を与えるため、加工および貯蔵におけるタンパク質の変性制御に関しても広く研究がなされてきた。しかしながら、脂質の酸化とタンパク質の変性の関係など、食品成分間の相互作用に関する研究例はあまり多くない現状にあり、特に脂質の酸化によって生成する過酸化脂質が魚肉タンパク質に及ぼす影響に関する研究は極めて少ないのが実状である。そこで、本研究では、筋原線維(Mf)を魚肉タンパク質のモデルとして用い、過酸化脂質の添加によるその諸性状、とくにATPase活性と構成タンパク質のサブユニット組成の変化を解析することによって、過酸化脂質が魚肉タンパク質の性状に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

本論文の内容は5章からなり、まず第1章および第2章では、トリグリセリド(TG)から自動酸化により過酸化脂質を調製し、それをMfに加える時に起こるATPase活性の変化と、構成タンパク質のサブユニット組成の変化を解析した。第3章および第4章では、Mfの変化を引き起こす過酸化脂質中の成分を分画し、その物質の検索を行なった。そして、これら第1章から第4章までの試験管内のモデル実験から得られた成果をもとに、さらに、第5章では、実際に市販している多脂水産加工品について、その中で起こる脂質の酸化とMfタンパク質の変性のかかわりを検討する試みを行なった。得られた研究結果は以下のとおりである。

- 1) まず、TGの自動酸化によって生成した過酸化脂質(TGOP)をMfに添加すると、過酸化脂質の添加量の増加に伴ってCa-ATPase活性は一旦上昇した後、引き続いて緩やかに低下するという二相性の変化を示し、K-ATPase活性は一方向的に低下する事実が示され

た。これらの2種類のATPase活性の変化は、ミオシンの酵素活性中心近傍に存在するチオール基を化学修飾した場合の変化と類似しており、TGOPによってMf中のミオシンの酵素活性中心近傍でチオール基の酸化を伴う反応が起こることを明らかにした。

- 2) 次に、Mfの構成タンパク質全体に起こる変化を知るため、TGOPの添加によって起こるMfの構成タンパク質サブユニット組成の変化をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)を用いて検討した。その結果、TGOPの添加によって、ミオシン重鎖(HC)の減少とそれに伴うHCの多量体の生成が認められ、TGOPはHCの多量化反応をも引き起こすことを見出した。TGOPによって起こるHC間の結合は尿素、SDSおよび2-メルカプトエタノールの共存下で解離しないことから、あたかも共有結合のような強さであり、この点では、ねり製品のゲル化や塩干品の塩漬・乾燥の過程で起こるHCの多量化反応生成物と類似していることを示した。

TGOPによるK-ATPase活性の低下とHCの多量化は、いずれも初期に速く後期は遅い二段階の一次反応式にしたがって進行すると仮定して解析できた。初期と後期のいずれの反応についてもHCの多量化速度よりもK-ATPaseの低下速度が大きく、ミオシン頭部のチオール基の酸化がHCの多量化よりも先行して起こることが明らかになった。さらに、TGOP濃度と両反応の反応速度の間には比例関係が成立しており、ATPase活性の変化とHCの多量化はいずれもTGOPとMfの間の化学量論的な反応の結果として引き起こされることが示された。それゆえ、これらの反応はMfとTGOPの間の相互作用の結果として引き起こされることが強く示唆された。

- 3) 次に、Mfの変化がTGOP中のいかなる成分によって引き起こされるのかについて検討した。その結果、TGの酸化によって生成する極性成分(PL-fr)がMfのK-ATPase活性の低下とHCの多量化を引き起こす原因物質であることが確かめられた。また、用いたTGOP中には、薄層クロマトグラフィーなどで確認できるほどの高級アルデヒドや遊離脂肪酸の生成は全く認められず、またMfに作用するPL-frはマロンジアルデヒドを含まないことも定性的に確認した。これらの結果はPL-frがTGの分解物ではなく、TG構造を有していることを示すものであるが、PL-frはヨウ化カリウム-デンブレン反応陽性でヒドロペルオキシ基を含む成分であることも明らかになった。これらのことからPL-frはヒドロペルオキシドである可能性が高いと考えられる。
- 4) 上の可能性を確認するため、オレイン酸メチルの光増感酸化反応によって生成するモノヒドロペルオキシドを分離し、Mfに対する作用を検討した。得られたモノヒドロペルオキシ

ドを Mf に添加すると Mf の Ca-ATPase 活性の上昇と K-ATPase 活性の低下、および HC の多量化が起こることが確かめられた。また、TG についても光増感酸化反応を行い、その生成物を Mf に作用させたところ、自動酸化反応によって生成した TGOP による反応と酷似した結果を示し、TGOP 中のヒドロペルオキシドが Mf の変化を引き起こすことを強く示唆した。

- 5) 以上の結果は、全て試験管内のモデル実験によって得られたものであるが、次に、これらの反応が実際の水産加工品（イワシ類の煮干し製品と素干し製品）の中で起こっているかどうかを知るため、製品中の脂質の酸化と Mf タンパク質の変化を検討した。脂質の酸化度合は過酸化物質および酸化によって生成する PL-fr の総量から判定したところ、すべての製品中で脂質酸化がかなり進行していることを示唆した。他方 Mf タンパク質は 8 M 尿素-2 % SDS 溶液に対する可溶化率が低下しており、しかも SDS-PAGE 図型において HC 量が減少していることを認めたので、HC の多量化がかなり進行していることを示唆した。これらの結果は定量的ではないが、Mf タンパク質は、脂質の酸化進行の程度と強く対応するような変化傾向を示すことが認められるので、これらの製品における HC の多量化は過酸化脂質によって引き起こされた可能性が高いと判断される。

本研究は、過酸化脂質が、既に知られているような水産食品の色調や臭気を劣化させるだけでなく、Mf タンパク質と反応し、そのミオシンの酵素活性中心近傍のチオール基の酸化や HC の多量化などの大きな構造変化を引き起こすこと、また、これらの Mf タンパク質の構造変化は、両者の化学量論的な相互作用の結果として生ずることを初めて明らかにすることができた。さらに、このような反応が、市販の水産加工品中で起こっている可能性も示唆された。それゆえ、これらの成果は、水産食品とその原料の加工・貯蔵中に起こるタンパク質と脂質の変化と両者の相互作用が水産食品の品質に及ぼす影響を解明し、その制御を図るために必要な基礎的知見として、極めて重要であると考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 高 間 浩 蔵
副 査 教 授 新 井 健 一
副 査 教 授 関 伸 夫
副 査 助 教 授 林 賢 治
副 査 助 教 授 今 野 久 仁 彦

水産物に多く含有される高度不飽和脂肪酸は、空气中酸素と容易に反応して脂質ペルオキシドを生成するが、その生成・分解過程で生ずる脂質ペルオキシラジカルやアルコキシラジカルなどの活性遊離基は水産物の貯蔵・加工中における変色、変味、酸敗などの原因となることから、その生成制御に関する技術開発に関わる研究が従来より広くなされてきた。一方、魚類筋肉の主要成分である筋原繊維タンパク質は、陸上動物筋肉のそれに比べて著しく不安定であり、変性しやすいことが知られている。本来、脂質成分にしろ、タンパク質成分にしろ、それらの劣化・変質は食品として好ましいものではないが、とくに伝統的な加工食品における色、味、物性などの付与は原料成分、とりわけ脂質成分とタンパク質成分の理化学的変化とそれらの相互作用によってもたらされている場合が多いものと考えられる。事実、ねり製品や塩干品などの水産加工品では、タンパク質の変性反応をむしろ巧みに利用したものであることが最近までの研究で明らかにされつつある。

本研究は、魚類筋肉の主要成分である脂質成分が易酸化性であり、加工・貯蔵中の酸化的変質が免れないことを前提にして精製マイワシ油を自動酸化させ、一方、筋原繊維タンパク質が食品物性に影響する機能性タンパク質であることに着目し、両者間の相互作用メカニズムを解明し、それを制御することによる新規な加工技術開発の緒にすることを目的として行われた。

本研究で得られた成果について審査員一同が評価した点は、概略以下の通りである。

- (1)過酸化脂質による筋原繊維タンパク質の変性は化学量論的に進行し、ミオシンの酵素活性中心近傍のチオール基を酸化させることに基づくものであることを ATPase 活性の測定から明らかにした。
- (2)過酸化脂質はミオシン重鎖同志の共有結合的多量化反応をも誘発することを SDS-PAGE によって明らかにし、さらにこの反応はミオシン分子のチオール基の酸化反応に引き続くものであることを指摘した。

- (3)前記2項のいずれのタンパク質変性も過酸化油脂中の極性成分によって引き起こされ、その本体がグリセリド構造を維持したままのヒドロペルオキシドであると推定した。
- (4)光増感反応によってオレイン酸メチルエステル標品からそのモノヒドロペルオキシドを調製し、それが上記タンパク質変性の原因物質となることを確かめ、さらに同様の反応で得たトリグリセリド型ヒドロペルオキシドを用いて確認した。
- (5)加熱処理で調製した多量化程度の異なるタンパク質と過酸化脂質との反応実験から、脂質の過酸化に先行して生じた変性タンパク質は、過酸化脂質との反応性がより大であることを示した。
- (6)水産干製品モデルとして調製した魚肉ひき肉と未酸化油脂との混合物の乾燥・貯蔵実験から、油脂非混合区に比し、有意にタンパク質の多量化が進行することを認め、それが共存する脂質の過酸化と明らかに関連していることを指摘した。
- (7)脂質過酸化が起りやすい典型的な水産加工品としてマイワシ・カタクチイワシの煮干し、およびニシンの素干し品においても、極性脂質区分の増大とミオシン重鎖の多量化が平行することを見だし、この多量化は前項までに示したモデル実験の結果に裏づけられたタンパク質変性であるとした。

以上の結果は、脱脂処理を伴わない食品加工原料、とりわけ高度不飽和脂質に富む水産原料では、その加工・貯蔵中のタンパク質多量化変性進行の多くが脂質成分の過酸化極性物質、ヒドロペルオキシドとの反応によってもたらされることを初めて指摘したものである。このことは、これまで殆ど顧みられることがなかった多くの伝統的水産食品加工技術の基本原理に関わり得る知見であり、とくに魚肉加工における新たなる技術開発に対して多大なる示唆を与えるものとしてその意義は大きい。

よって、審査員一同は博士の学位を授与されるに値するものと判定した。