

学位論文題名

魚類筋肉タンパク質のゲル形成における
トランスグルタミナーゼの役割に関する研究

学位論文内容の要旨

水産ねり製品の製造過程で知られている”坐り”は肉糊を予め40℃以下の低温で加温してから75℃以上の高温で加熱すると、最終製品の弾力性が著しく増大する現象である。その機構については、これまでの研究によると、魚肉肉糊中のミオシンが低温の加温により秩序ある変性凝集反応を起こし弱いゲルを形成し、そのために次に高温で加熱した時に強いゲルになると考えられている。更に最近に至り、肉糊中に内在するトランスグルタミナーゼ(TGase)によるミオシン重鎖間の架橋重合が坐りに関与している可能性が指摘されている。TGaseはタンパク質内のグルタミン残基とリジン残基間にイソペプチド結合を形成しタンパク質を架橋する反応と、アミンをタンパク質内のグルタミン残基に共有結合的に取り込む反応を触媒する酵素であり、魚肉中にも存在することが知られている。

そこで本研究は坐り易い魚と坐り難い魚の代表としてスケトウダラとサケを選んで、両者の坐り反応を比較研究することで坐りの機構を、特に肉糊の坐りゲル形成機構におけるTGaseの役割を明らかにすることを目的に行われた。まず第一章でスケトウダラ冷凍すり身を用い、この肉糊がNaCl中では良く坐るが、KCl中ではあまり坐らないという既知の事実に基づいて、その原因を追究し、坐りの機構を明らかにしようとした。すなわち、NaClとKClをそれぞれ別々にあるいは二種類の塩を組み合わせて肉糊を調製し、加温・加熱した時のゲルの物性、ミオシン重鎖の架橋重合およびアミン(MDC)のタンパク質への取り込み反応を調べて比較した。第二章ではTGase活性化剤である遊離 Ca^{2+} 量の坐りに及ぼす影響を知るために、すり身中の Ca^{2+} の定量を行い、次いで肉糊中の Ca^{2+} 濃度を変えて坐りへの影響について検討した。第三章では坐りを起こさないことが知られているサケの肉糊

を用いて、肉糊が坐らない原因の解明とTGaseとの関連性を明らかにする目的で、そのゲル化特性、筋肉中のTGase活性レベルと Ca^{2+} 濃度、サケアクトミオシンのTGaseに対する反応性を調べた。第四章では、第三章で示唆されたサケ筋肉中に存在するTGase活性を阻害する成分の検索と同定を行った。さらに第五章でサケ肉糊に坐りを導入するため、廃棄物であるサケ肝臓から抽出したTGaseの性質とその利用価値を調べた。得られた結果は以下の通りである。

(1)スケトウダラ及びサケのすり身肉糊を坐りを行わないで、直接加熱ゲルを形成させたところ、いずれも破断強度が300g程度の加熱ゲルが形成された。この点においては両肉糊には大きな相違点は認められなかった。従来の知見に基づいて、直接加熱ゲルは肉糊タンパク質（特にミオシン）の非共有結合による変性凝集により形成されたものと考えられる。

(2)両肉糊を予め25℃で加温し、いわゆる坐りを行ってから、加熱ゲルの形成（二段加熱）を行った場合を比較した。この場合にはゲルの破断強度に大きな相違が認められた。スケトウダラの場合はその値は1800gに達しており、坐りの効果が顕著に認められたが、サケでは300g以下で坐りの効果はなかった。

(3)スケトウダラ肉糊の坐りの効果はNaCl中では顕著に認められたが、KCl中では非常に弱かった。その原因を検討したところ、KCl中ではNaCl中で顕著に見られる肉糊ミオシン重鎖の架橋重合体の形成とMDCの肉糊タンパク質への取り込みの両反応共にほとんど起きないことがわかった。両塩を $I=0.6$ として種々の比率に混合した肉糊の場合も、生成したゲルの破断強度、ミオシン重鎖の架橋重合体の生成速度と度合、および肉糊タンパク質へのMDCの取り込みのいずれもがNaClの割合が増大するにつれて増加することが認められた。これらの結果は肉糊中のTGaseがKCl中よりはNaCl存在下で作用し易いことを示している。しかし、アセチル化カゼインに対するMDCの取り込み反応によってTGase活性を測定した場合にはNaClとKCl存在下で違いが無いことから、塩の影響は酵素TGase自体に対する影響ではなく、NaCl中では肉糊タンパク質中のミオシン重鎖上のグルタミン残基がTGaseの作用を受け易い構造を取っていると考えられる。

(4) NH_4^+ はTGase反応の生産物であるから NH_4Cl を肉糊に添加するとTGaseによるミオシン重鎖の架橋重合やMDCの取り込み反応が阻害される。事実肉糊に NH_4Cl を加えると、mM濃度でこれらのTGase反応は抑制された。また同

時に坐りの効果が失われることが示された。第一章の実験結果から、スケトウダラ肉糊の坐りの効果は二段加熱により顕著に現れるが、二段加熱目の時にはTGaseは失活し、ミオシン重鎖の架橋重合体は形成されない。従って一段目でのTGaseによるミオシン重鎖の架橋重合体の形成が坐りの発現に重要であると結論した。

(5)第二章でスケトウダラ肉糊中の Ca^{2+} を測定し、 Ca^{2+} 濃度の異なる種々の肉糊を調製して坐りに及ぼす Ca^{2+} の影響を詳細に調べた。それらの結果によると、肉糊の坐りは Ca^{2+} 濃度に依存して起こることが示された。肉糊へのCaキレート剤の添加、肉糊の透析、及び希釈による Ca^{2+} 濃度の低下はミオシン重鎖の架橋重合体の生成速度と度合を低下させ、結果的に坐りの効果を低下、失わせた。低 Ca^{2+} 濃度下で生成された二段加熱ゲルでは一段目の加温を行っても、行わない場合も加熱ゲルの破断強度にはほとんど差がなく、低いことを示していた。この事実も一段目の加温（坐り）の時にTGaseによるミオシン重鎖の架橋重合体が生成されなければ、二段加熱目の破断強度の著しい増大を示す坐りの効果は発現されないことを示している。

(6)次にサケの肉糊を用いて坐りが起きない原因の究明を通して、坐りの機構解明を行った（第三～五章）。サケ肉糊は直接加熱でスケトウダラ肉糊と同程度の加熱ゲルを形成する。しかし、二段加熱を行った場合、一段目の加温中にはミオシン重鎖の架橋重合体の形成も、肉糊中に加えたMDCの肉糊タンパク質への取り込みも全く起きないことが明らかになった。この原因の一つは肉糊中のTGase活性レベルが低いことであることがわかった。しかし、サケ肉糊に外部からコイのTGaseを添加しても肉糊中では全く作用しない。この原因はサケ肉糊に存在するアンセリンの阻害作用によることが示された。アンセリンを含まないサケのアクトミオシンにコイTGaseを添加した場合は、サケのアクトミオシン中のミオシン重鎖は架橋重合し、またMDCを添加した場合にはアクトミオシンにMDCが取り込まれた。さらにアクトミオシンにTGaseを添加し、二段加熱を行った場合には坐りが導入されることが示された。

(7)この結果をサケ肉糊の坐り導入に適用するためには、TGase活性を阻害するアンセリンを水晒で除去し、外部からTGaseを添加する方法が考えられる。そのためサケ肝臓のTGaseの利用の可能性を第五章で検討した。この酵素の至適pHは7.5、至適温度は35℃で、MDCに対する K_m 値は0.07mM、アセチル化カゼインに対する K_m 値は2.75mg/mlで、コイ筋肉TGaseに比較すると

ミオシン重鎖の架橋重合能がかなり劣ることが示された。

本研究ではスケトウダラとサケ肉糊の坐りに関する比較研究を通して、坐りの発現は一段目の加温時にTGaseによるミオシン重鎖の架橋重合体の形成が必須であることを示した。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 関 伸 夫
副 査 教 授 猪 上 徳 雄
副 査 助 教 授 今 野 久 仁 彦

学 位 論 文 題 名

魚類筋肉タンパク質のゲル形成における トランスグルタミナーゼの役割に関する研究

水産ねり製品の製造過程中で知られる“坐り”は肉糊を予め40℃以下の低温で加温（坐り）をしてから75℃以上の高温で加熱すると、最終製品の弾力性が著しく増大する現象である。その機構については坐りの際にミオシンの秩序ある変性凝集がおこり、そのために次に高温で加熱したときにより強いゲルが形成されると考えられてきた。しかし、最近に至り、肉糊中に内在するトランスグルタミナーゼ（TGase）によるミオシン重鎖間の架橋重合が坐りに関与している可能性が指摘されている。TGaseはタンパク質内のグルタミン残基とリシン残基の間にイソペプチド結合を形成してタンパク質を架橋すると同時にポリペプチド鎖に分枝構造を導入する反応と、アミンをタンパク質内のグルタミン残基に共有結合的に取り込む反応を触媒する酵素であり、魚類筋肉中にも広く存在している。

本研究は魚類肉糊の坐りゲル形成に及ぼすTGaseの役割を坐り易い魚と坐り難い魚の代表としてスケトウダラとシロサケを選んでその機構を比較研究し、坐りの機構に関する従来の仮説を再検討し、TGaseによるミオシン重鎖の架橋形成が坐りの本質であることを明確にしたものである。まず、第I章でスケトウダラすり身を用い、以下の結果を得た。（1）スケトウダラ肉中には高いTGase活性が存在する。（2）肉糊の坐りはNaCl中では顕著に起きるが、KCl中では弱い。ミオシンの加熱ゲル形成能は両塩での相違が無いことから、この原因を追究したところ、肉糊中のミオシンのTGaseに対する反応性が、KCl中で低下するためであることを明らかにした。すなわちKCl中よりもNaCl中ではミオシン重鎖の架橋重合体が良く形成されるためにゲル形成が顕著に起きることがわかった。（3）肉糊タンパク質に対するアミン（MDC）の取り込み活性もKCl中よりはNaCl中の方が高いことが示された。（4）NaCl中ではMDCは肉糊中のミオシン重鎖に主に取り込まれていたが、KCl中ではいずれのタンパク質にも取り込まれなかった。（5）TGaseの阻害

剤であるアンモニウム塩はミオシン重鎖の架橋重合を阻害し、坐りの効果を消失させた。第 I 章の結果から、スケトウダラ肉糊の坐りの効果は二段加熱により顕著に現れるが、二段加熱目にはTGaseは失活し、ミオシン重鎖の架橋重合体は形成されない。したがって一段目でのTGaseによるミオシン重鎖の架橋重合体の形成が坐りの発現に重要である。第 2 章では肉糊中のTGaseの活性化剤であるCaイオン濃度を正確に定量する方法を検討し、Caイオン濃度と坐り効果の関係を調べた。肉糊中のCaイオン濃度を低下させると、TGaseの活性の低下にともなってミオシン重鎖の架橋重合と坐りの効果が低下した。低Caイオン濃度下での二段加熱ゲルのゲル強度は低いことが示された。この結果も一段目の加温時にTGaseによるミオシン重鎖の架橋重合体が形成されていなければ、二段加熱目でゲルの破断強度の著しい増大を起こす坐りの効果は発現されないことを示している。

第 3 及び 4 章ではサケの肉糊を用いて坐りが起きない原因の究明を通して坐りの機構解明を行った。サケの筋肉中のTGase活性レベルは雌雄、産卵期にかかわらず低かった。そこでサケ肉糊に外部からTGaseを添加して二段加熱を行ったが、一段目の加温中にはミオシン重鎖の架橋重合体の生成も、MDCの取り込みも起きず、TGaseは作用しなかった。この原因はサケ筋肉中に特異的に多量に含まれているアンセリンによるTGase活性の阻害作用によることが明らかになった。サケ肉糊からアンセリンを除去し、TGaseを添加して二段加熱をおこなうと、ミオシン重鎖の架橋重合体の生成、MDCの取り込みも起こり、坐りが導入された。したがって、坐りの発現には一段目の加温中にTGaseによるミオシン重鎖多量体の形成が不可欠であることが示された。第 5 章ではサケ肝臓に多量に含まれるTGaseの利用を目的にその精製を行い酵素の特性を検討した。肝臓の酵素は筋肉由来のものとは酵素学的性状に相違があり、タンパク質の架橋重合能は劣ることが示された。

これらの結果に基づき、坐り中にTGaseによってミオシン分子間に架橋が形成されると、次に高温で加熱した時にこれを枠としてミオシンの熱ゲル化により網目構造が完成され、強いゲルが形成されることを明らかにした。本研究は従来の坐り機構に対して酵素架橋の形成が重要な役割を担っていることを解明した点で画期的であり、高く評価される。したがって、審査員一同は本論文が博士（水産学）の学位論文として十分な内容であると判定した。