

学 位 論 文 題 名

海洋生物資源の複合利用による
魚類筋肉タンパク質の高機能化に関する研究

学位論文内容の要旨

魚肉は人類にとって重要なタンパク質源の一つであり、その消費方法は、鮮魚から調理冷凍食品やねり製品などの各種加工食品まで多岐に渡っている。魚肉加工食品は魚類筋原線維タンパク質 (Mf) の持つ保水能、乳化能、およびゲル形成能などの優れた加工機能性を利用して製造されている。しかし、魚類の Mf は他の脊椎動物の Mf と比べて熱的・化学的に非常に不安定であり、その変性に伴って起こる加工機能性の喪失が利用上の障害となっており、これまで、魚肉の保蔵や加工過程におけるタンパク質変性を抑制するためのさまざまな検討がおこなわれてきた。さらに、魚肉タンパク質の高機能化や新規な機能の付与が達成できれば、それは水産資源の高度利用に大きく貢献すると思われる。

タンパク質の機能改変はタンパク質化学分野における重要な命題であるが、タンパク質に「糖鎖」を導入（糖修飾）すると、その機能を改変できることが明らかになってきた。食糧タンパク質の場合、その機能改変手法として、簡便で化学試薬を用いないメイラード反応を利用した糖修飾が注目を集めている。魚肉タンパク質についても、コイ Mf の水溶化（単糖修飾）、熱安定性の向上（多糖修飾）、乳化能の改変（単糖および多糖修飾）などの機能改変効果が見い出され、糖修飾が魚類 Mf を高機能化できる有効な手法あることが示されている。

本研究では、水産資源利用科学にこのタンパク質の糖修飾技術を応用するためのスキームを検討した。すなわち、チリ産褐藻 (*Lessonia* 属) 由来のアルギン酸ナトリウム (Alg-Na) を、海洋細菌 *Pseudoalteromonas elyakovii* 由来のアルギン酸リアーゼを用いて分解し、平均重合度 6.1 のアルギン酸オリゴ糖 (AO) を調製した。そして、メイラード反応を利用して AO を魚類 Mf 分子中に導入することを試み、魚肉タンパク

質の機能改変を目指した。

第一章では、まずアルギン酸リアーゼ調製条件の最適化を検討した。そして、*P. elyakovii* の培養外液を限外ろ過（濃縮）する際、低タンパク質吸着性限外ろ過膜を使用し、さらに、培地成分のタンパク質をあらかじめ膜に吸着させることで、限外ろ過における酵素活性の回収率を大きく改善し（48.5% → 72%）、その結果、酵素精製の全工程後での回収率は 48% に達した。また同酵素は、その活性発現に Mg^{2+} が必要であり、本研究では $MgCl_2$ 存在下で Alg-Na を分解するが、その脱 Mg の方法として電気透析法を利用することにより、Mg を効率良く除去でき、AO をより高い回収率で得られることを見出した。

続いて第二章では、Mf を AO 修飾できる反応条件の最適化について検討した。まず、AO がタンパク質変性抑制効果を有さないことが明らかとなったが、Mf と AO の混合物（Mf:AO = 1:1-1:9）にソルビトールを添加することによって、凍結乾燥とそれに続く糖修飾過程におけるタンパク質変性を抑制できた。さらに、修飾反応中の温度と湿度を制御することによって Mf のタンパク質変性をより効果的に抑制できることを明らかにした。そして、Mf:AO = 1:9, 50 °C・相対湿度 35% という反応系が、タンパク質変性を効果的に抑制しながら効率良く AO 修飾できる良好な糖修飾条件であることを見出した。なお、SDS-PAGE 分析の結果から、AO は Mf 中のミオシンを特に強く修飾し、またアクチン、およびトロポミオシンも AO 修飾されていることを確かめた（AO 修飾した Mf を以後 Mf-AO と称す）。

第三章から第六章においては、Mf の諸機能におよぼす AO 修飾の影響について検討した。まず第三章では、Mf-AO の溶解性について検討した。Mf 中の主成分であるミオシンとアクチンは、高イオン強度溶媒 (0.5 M NaCl) 中ではアクトミオシンを形成して溶解するが、低イオン強度溶媒 (< 0.16 M NaCl) には溶解しない。しかし、AO 修飾にともなって Mf の 0.05 M NaCl (pH 7.5) に対する溶解度は増大し、0.5 M NaCl 中での溶解度とほぼ等しくなった。このとき、溶解度のイオン強度依存性が失われていることも明らかとなった。このように、AO 修飾によって Mf の低イオン強度溶媒中への溶解性が著しく改変され、魚類筋肉タンパク質が水溶化できることを確認した。この Mf の水溶化は 40-50 $\mu g/mg$ の AO が結合すると顕在化したが、その際 AO との結合によって消失した有効性リジンは約 4% に留まっていた。

魚類 Mf の優れた加工機能性は、その塩溶液中での溶解性や熱安定性と密接に関わっている。また、多くの食品の pH は弱酸性であり、食品加工に加熱処理は欠かせない。そこで第四章では、Mf-AO の化学的および熱的安定性を検討した。その結果、Mf-AO は溶媒の NaCl 濃度に関係なく、ミオシンやアクチンの等電点（それぞれ 5.52 および 5.10）付近でも高い溶解性を維持した。さらに、AO 修飾によって Mf の熱安定性が改変されることを見い出し、糖結合量が $227\text{ }\mu\text{g/mg}$ の Mf-AO の pH 7.5 および pH 5.5 における溶解度は、50-80 °C, 2 h 加熱処理してもほとんど変化しなかった。

また第五章において、食糧タンパク質にとって重要な加工機能性の一つである乳化能も、AO 修飾によって改変できることが明らかとなった。特に、Mf-AO (AO 結合量 = $227\text{ }\mu\text{g/mg}$) は、対照として用いたアクトミオシンよりも 6 倍以上高い乳化安定性を示し、他の食糧タンパク質（カゼイン、アルブミン、および大豆タンパク質）と遜色ない安定なエマルジョンを形成した。また、Mf-AO は弱酸性 (pH 5.5) 下においても優れた乳化能を示し、さらに、加熱処理 (80 °C, 2 h) しても、その乳化能に変化しなかった。そして第六章においては、Mf-AO が他の食糧タンパク質と同等の酸化安定性に優れたエマルジョンを形成できることを明らかにした。

以上の結果は、AO 修飾によって Mf が水溶化し、さらに熱安定性と乳化能が改変されることを示している。すなわち、AO が単糖修飾（水溶化と乳化能の改変）と多糖修飾（熱安定性と乳化能の向上）双方の効果を併せ持つ優れた機能改変素材であることが明らかとなった。

このように、AO 修飾によってさまざまな新機能を得た魚肉タンパク質を食品素材として利用するためには、その食品学的安全性に関する調査が必要である。そこで第七章では、糖結合量がほぼ同じ ($170\text{-}200\text{ }\mu\text{g/mg}$) ながら褐変度（メイラード反応の進行度合い）が異なる Mf-AO を調製し、Rec-assay および Ames test に供した。さらに、実際の摂取を考え、高分子タンパク質の Mf-AO を *in vitro* でペプシンおよびトリプシン消化した Mf-AO でも安全性試験を実施した。その結果、いずれの Mf-AO およびその消化物においても変異原性は全く検出されなかった。

本研究は遺伝子工学的視点からの検討もおこなった。すなわち第八章において、*P. elyakovii* 由来のアルギン酸リアーゼをコードする遺伝子 (*alyPEEC*) をクローニン

グして、発現させた遺伝子組換え酵素を用いても、従来のアルギン酸リアーゼと同様の分子サイズの AO を調製できることを見い出した。さらに、これを Mf に導入して水溶化できることを明らかにした。

本研究の成果を総括すると、三種の海洋生物資源（魚肉・褐藻・海洋細菌）の複合利用によって、高機能を有するネオグリコプロテイン (Mf-AO) を調製できたといえる。そして、Mf-AO が広範囲な塩濃度溶媒に溶解できること、さらには弱酸性溶媒に溶解し、加熱処理に対して安定であることを示した一連の成果は、魚肉の食品素材としての利用価値を高めると同時に、魚肉の新規な利用形態の開発に繋がると思われる。

学位論文審査の要旨

主査	助教授	佐伯宏樹
副査	教授	今野久仁彦
副査	教授	宮下和夫
副査	助教授	澤辺智雄

学位論文題名

海洋生物資源の複合利用による 魚類筋肉タンパク質の高機能化に関する研究

魚類筋原線維タンパク質 (Mf) は熱的・化学的に非常に不安定であり、その変性に伴って起こる加工機能性の喪失が利用上の障害となっている。そこで本研究では、還元末端を有するアルギン酸オリゴ糖 (AO) と Mf の反応性リジン残基の間に起こるメイラー・ド反応を利用して Mf 分子中に AO の導入を試みた。そして得られた糖タンパク質 (ネオグリコプロテイン) の加工機能におよぼす影響を、食品科学的視点から検討した。学位論文は八章より構成されている。以下に各章の概要を示す。

まず第一章では、海洋細菌 *Pseudoalteromonas elyakovi* からのアルギン酸リアーゼ調製条件の最適化を検討し、酵素活性の回収率を大きく改善させることに成功した。そして電気透析法との組み合わせにより、効率的な AO 製造方法を確立した。

続いて第二章では Mf を AO 修飾できる反応条件の最適化について検討し、糖修飾過程におけるタンパク質変性を抑制しながら、効率的に魚肉タンパク質を糖修飾する技術を確立した。なお SDS-PAGE 分析の結果から、AO は Mf 中のミオシンを特に強く修飾することを確認した。

第三章から第六章においては、Mf の諸機能におよぼす AO 修飾の影響について検討した。まず第三章で AO 修飾した Mf (Mf-AO) の溶解性について検討したところ、AO 修飾によって Mf の低イオン強度溶媒中への溶解性が著しく改変され、魚類筋肉タンパク質が水溶化できることを確認した。この Mf の水溶化は 40-50 $\mu\text{g}/\text{mg}$ の AO が結合すると顕在化したが、その際 AO との結合によって消失した有効性リジンは約 4% に留まっていた。続いて第四章では、Mf-AO の化学的および熱的安定性を検討した。その結果、Mf-AO は溶媒の NaCl 濃度に関係なくミオシンやアクチンの等電点付

近でも高い溶解性を維持した。さらに、AO 修飾によって Mf の熱安定性が改変されることを見いだした。また第五章において、食糧タンパク質にとって重要な加工機能性の一つである乳化能も、AO 修飾によって改変できることを明らかにした。特に、Mf-AO (AO 結合量 = 227 $\mu\text{g}/\text{mg}$) は、対照として用いたアクトミオシンよりも 6 倍以上高い乳化安定性を示し、他の食糧タンパク質と比べても遜色ない安定なエマルジョンを形成した。また、Mf-AO は弱酸性 (pH 5.5) 下においても優れた耐熱性乳化能を示した。そして第六章においては、Mf-AO が他の食糧タンパク質と同等の酸化安定性に優れたエマルジョンを形成できることを明らかにした。

第七章では、微生物学的手法を用いた食品安全性試験 (Rec-assay および Ames test) によって、AO 修飾した Mf およびその消化物には変異原性が見いだされないことを証明した。さらに遺伝子工学的視点からの検討もおこなった。すなわち第八章において、*P. elyakovii* 由来のアルギン酸リアーゼをコードする遺伝子 (*alyPEEC*) をクローニングして、発現させた遺伝子組換え酵素を用いても、従来のアルギン酸リアーゼと同様の分子サイズの AO を調製できることを見だし、これを Mf に導入して水溶化できることを明らかにした。

このように本研究は、三種の海洋生物資源 (魚類・褐藻・海洋細菌) の複合利用によって高機能を有する食用ネオグリコプロテインの調製に成功したもので、申請者は魚肉タンパク質の新規な利用形態の開発に貢献しうるさまざまな知見を見いだした。主論文発表会においては審査員より 6 件、一般聴講者より 5 件の研究内容に関する質問がなされたが、申請者はいずれも適切な回答をおこない、研究に対する理解を深めさせた。以上、本論文の知見と発表会における討論を通して、審査員一同は主論文の学術的価値を認め、本研究の申請者が博士 (水産科学) の学位を授与される資格のあるものと判定した。