

学 位 論 文 題 名

スケトウダラ冷凍すり身におけるミオシンの性状変化と
すり身の品質に関する研究

学位論文内容の要旨

冷凍すり身は日本で開発され、今やグローバルな食品素材として、様々な魚肉タンパク質食品に利用されている。冷凍すり身の品質は、等級付けにより差別化されているが、この等級は、すり身製造者により、原料の鮮度、製造状況、黒皮夾雑物および色調などから判断され決められている。また、日本では主にかまぼこ原料として冷凍すり身を利用してきたことから、かまぼこのゲル物性を指標とした品質評価も行われている。しかし、等級付けやゲル物性による品質評価法は、国際的に統一化されていないこと、冷凍すり身の用途がかまぼこ以外の食品に多く利用されていること、また、いずれもタンパク質化学的指標による品質評価ではないこと、などの理由から、科学的根拠に基づき、かつ国際的に通用する品質評価基準が求められている。

そこで、冷凍すり身に含まれるタンパク質の主成分であり、ゲル形成の役割を担っているミオシンの変性を測定することによって、品質評価を行う提案がなされた。その指標として使われたのが、ミオシン頭部 S-1 の変性の程度を表す Ca-ATPase 全活性である。しかし、この品質評価法は測定方法が煩雑であったために、産業界で広く浸透するに至らなかった。そして、今日までミオシン分子レベルでの冷凍すり身の品質に関わる研究は、ほとんど進んでいないのが現状である。本研究では、ミオシン S-1 および尾部 (rod) の変性を検出するための生化学的指標を組み合わせることで、冷凍すり身中におけるミオシンの構造変化を詳細に調べ、それを品質評価に利用しようとした。

第 1 章では、すり身中のミオシン頭部 S-1 の変性を指標とした冷凍すり身の品質について調べるため、pH スタット法を用いた簡便な ATPase 活性測定システムを開発した。測定試料として、冷凍すり身から調製したすり身ホモジネートを

用い、Ca-ATPase 活性を測定した。そして、すり身中の総タンパク質量と Ca-ATPase 活性値を掛け合わせた Ca-ATPase 全活性と、冷凍すり身の等級との関係について調べた。その結果、Ca-ATPase 全活性は、明らかに陸上すり身と洋上すり身の違いを区別したが、洋上すり身間の等級の違いを明確に区別することはできなかった。つまり、ATPase 全活性を指標としたすり身の品質と、商業的等級付けによるすり身の品質とは、必ずしも一致しないことが明らかにされた。

第2章では、冷凍すり身の品質の違いをさらに詳しく調べるため、すり身ホモジネートを用いて、ミオシン塩溶解性や単量体ミオシン量（ミオシンの凝集の有無）を測定した。その結果、冷凍すり身の中には、ATPase 活性やミオシン塩溶解性は失われていないが、凝集しているミオシンを多く含むものがあることが明らかとなった。

さらに、ミオシンがどこの部位で構造変化を起こしているのかを検出するために、未変性ミオシンとしてスケトウダラ筋原繊維（Mf）を対照に用い、すり身ホモジネートのキモトリプシン消化性を検討した。キモトリプシン消化パターンから、冷凍すり身中ではミオシンに2つの特徴的な構造変化が起こっていることが明らかとなった。一つに、ミオシンフィラメント構造が脆弱であるため、キモトリプシンがその隙間に侵入しやすく、rod 内部での切断が起こり、rod 生成量が減少したことである。もう一つは、すり身ホモジネートを 0.5 M KCl に溶解し、キモトリプシン消化すると、生成した HMM の一部に凝集体が確認されたことである。冷凍すり身の種類により、上記のいずれかの構造変化が起こっていたが、いずれの場合もミオシン凝集を引き起こし、その変化の程度は、単量体ミオシン量の減少として検出することができた。

すり身ホモジネートの形態観察によれば、冷凍すり身の種類に関係なく、Mf の横紋構造が消失しており、このことはミオシンフィラメント構造の脆弱化に由来すると考えられた。また、すり身ホモジネートでは巨大な集合体形成が認められ、すり身ホモジネートを静置した時に、急速に沈降するという現象が起こった。

第3章では、冷凍すり身におけるミオシンの性状変化の原因を探るため、鮮度が異なる原料魚を使用していた2つのすり身工場（A,B）において、すり身製造過程におけるミオシンの性状変化を追跡し、さらに、冷凍すり身の凍結貯蔵中に起こるミオシンの性状変化について調べた。

すり身製造において、採肉から水晒し、リファイナー工程までは、両工場とも

Mf 構造にほとんど変化は起こっていなかった。しかし、A 工場では脱水工程で一部横紋構造の破壊が認められ、B 工場では、すでにすり身の状態にまで形態変化を起こしていた。形態観察とキモトリプシン消化性の結果から、スクリュープレスによる物理的負荷がミオシンフィラメント構造の脆弱化の原因であり、不可逆的な横紋構造の破壊を引き起こしたものと推測された。また、添加物として加えられる重合リン酸塩にも、構造変化を促進する作用があることがわかった。2 つのすり身工場のいずれの製造過程においても、S-1 変性はほとんど認められなかったのに対し、ミオシン尾部に共通した構造変化が起こっていることが確認された。しかし、その構造変化の程度には違いが認められ、A 工場の冷凍すり身では、B 工場のすり身に比べ、rod 生成量の減少が非常に小さく、単量体 HMM 量が減少していた。一方、B 工場の冷凍すり身は、rod 生成量が減少しており、単量体 HMM 量も大きく減少していた。さらに脱水工程で、すでにミオシン塩溶解性や単量体ミオシン量が大きく減少していることもわかった。B 工場の冷凍すり身中で起こった著しいミオシン変性には、原料の鮮度が大きく影響していると推測された。製造直後の冷凍すり身では、Mf 構造の破壊は起こっているものの、巨大な集合体形成は認められなかった。しかし、 -20°C で凍結貯蔵すると、集合体形成が進行される様子が観察されたため、この現象は凍結変性によるものであると考えられた。

冷凍すり身中で起こっているミオシンの構造変化には、2 つのパターンがあることをすでに示した。冷凍すり身を -20°C で凍結貯蔵すると、貯蔵前にすでに起こっていたミオシンの構造変化が、さらに促進される傾向を示した。凍結変性により引き起こされたミオシンの構造変化のパターンは、市販の冷凍すり身を分析した場合にも認められたことから、これら 2 つのパターンが、冷凍すり身中で起こるミオシンの凍結変性パターンであると考えられた。また、冷凍すり身の凍結貯蔵試験においても、ミオシン凝集が最も速く進行することがわかった。

本研究では、スケトウダラ冷凍すり身中のミオシンの性状変化について、数種の冷凍すり身を用いて詳細に分析し、さらに、冷凍すり身の製造過程および凍結貯蔵中における性状変化についても追跡した。その結果、冷凍すり身では、ミオシン頭部では構造変化を起こしていなくても、尾部では特徴的な構造変化を起こしていることが明らかにされた。また、冷凍すり身では、変性の原因は異なっても、ミオシンの凝集が最も速く進行することを見出したため、単量体ミオシン量は、最も敏感なミオシン変性検出指標として利用できるという結論に達した。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 今 野 久仁彦
副 査 教 授 尾 島 孝 男
副 査 教 授 加 藤 登 (東海大学)
副 査 助教授 佐 伯 宏 樹

学 位 論 文 題 名

スケトウダラ冷凍すり身におけるミオシンの性状変化と すり身の品質に関する研究

冷凍すり身は当時低価格魚種であったスケトウダラから練り製品製造のための中間素材として北海道で開発された製品である。現在は、国際的な食品素材として、魚肉による組織化の原理としながらも、いわゆる練り製品以外のいろいろな食品素材として用いられている。冷凍すり身の価格はその品質によって決定されるが、その品質はすり身製造業者による個々の等級付けに頼っている。また、すり身を利用する立場の業者は最終製品であるかまぼこゲルを製造し、そのゲル物性を指標としてすり身の品質を独自に評価してきた。これらは、現場的な指標であっても、科学的、普遍的、国際的な指標とはいいがたい。それゆえ、すり身を開発した日本に国際的に通用する品質評価指標の開発が求められている。これまですり身に含まれるタンパク質の評価に基づいたすり身の科学的指標として ATPase 全活性が唯一の提案である。

本研究では、すり身の主成分であるミオシンの変性状態をすり身の品質の指標とみなし、各種生化学的指標を用いていかなる性状変化がミオシンに起きているのかを分子内レベルで検討した。すなわち、実際に市販されている各種等級の冷凍すり身中のミオシンの分析を行った。さらに、このようなミオシンの性状変化がすり身製造工程中のどの段階で起きる製造段階ごとのミオシンの性状変化を追跡した。これらの結果に基づき、いかなるミオシンの性状変化がもっとも敏感にすり身のミオシン変性を捕まえられるか、あるいはすり身の品質は何をもって評価できるか提案した。

第一章では、これまで提案された唯一の科学的指標である Ca-ATPase 全活性は合理的な指標であるが、広く普及しなかったのはその操作、測定方法の煩雑さにあると推定された。そこで、最初に ATPase 活性を簡便に測定するため、pH スタットによる測定法を開発した。さらに、測定のすり身試料としてのすり身ホモジネートを直接使用できる系を開発した。これを用い、市販のすり身の ATPase 活性、タンパク質量を分析し、全活性を測定した。その結果、全活性によって洋上すり身と陸上すり身の区別はできるが、それ以上の区別は難しいと結論した。

第二章では、そこで、すり身中のミオシン分子に起きている構造変化を、塩溶解性、単量体ミオシン量、キモトリプシン消化性による頭部、尾部の変性、さらに位相差顕微鏡によるフィラメント構造などから調べた。その結果、すり身中にはATPaseは保持しているが凝集しているミオシンが存在することがわかった。この凝集の程度はすり身間で大きく異なっていたので、ATPaseに比べて非常に敏感に性状変化を検出できる指標であることがわかった。すり身ホモジネートのキモトリプシン消化、および、位相差顕微鏡観察から、すり身中では筋原繊維構造がすでに破壊されており、その結果、ミオシン尾部での切断が起きるように変化していることがわかった。また、ミオシンの凝集に対応するように、一部のHMMには凝集しているものが存在することがわかった。そして、いずれの変化が起きていても、単量体ミオシン量の減少（ミオシン凝集量の増大）として検出できることを明らかにした。凝集体はATP存在下での硫酸分画で容易に定量できた。調製したすり身ホモジネートは短時間の間に沈殿する巨大な集合体として存在することを顕微鏡観察から明らかにした。

第三章では、すり身で認められたミオシンの構造変化がすり身製造のどの工程で起こるか、すり身工場において、工程中の肉（落とし身、水晒し肉、精製肉、脱水肉、すり身）を採取し、その中でミオシン変性を分析した。なお、2工場では明らかに鮮度の異なる原魚を使用していたので、その影響についても検討した。その結果、どちらの工場においても、製造中のATPase活性の低下は認められなかった。そして、精製肉まではほとんど筋原繊維構造、ミオシンの構造変化は認められなかった。しかし、物理的な脱水工程を経た脱水肉で、位相差顕微鏡観察により筋原繊維構造の破壊が認められ、それに対応するようにキモトリプシン消化によるミオシン尾部内での切断が起こった。なお、鮮度の悪い材料を使用したほど変化の程度が大きかった。これらはすり身ホモジネートで認められた、多くミオシンの構造変化であった。しかし、ここまでの工程では市販すり身ホモジネートで認められた巨大な集合体は認められなかった。この巨大な集合体は製造した冷凍すり身を -20°C で1-3ヶ月保存することで、初めて認められるようになった。それゆえ、この凝集はすり身の冷凍変性の結果により形成されたものと結論した。また、冷凍保存中にすり身製造中におきていたミオシンの構造変化はさらに進行することが明らかになった。ただし、冷凍中の変性様式は単純でなく、尾部内部でのキモトリプシン切断が促進されるタイプと、尾部内部での切断はあまり進行せず、生成HMMが凝集する2タイプに識別された。そして、それらの結果としてのミオシン変性が市販すり身中で確認された。

これまで知見のほとんどなかった冷凍すり身中のミオシンの性状を明らかにし、それらの構造変化はどの段階で起きるのかを明らかにした研究成果は、すり身の国際的評価指標に関して重要な知見を与えるものである。それゆえ、審査員一同は博士（水産科学）の学位を授与される資格があるものと判定した。