

博士（水産科学） 袁 春 紅

学位論文題名

Seasonal Variation and Species-specificity of
Several Chinese Freshwater Fish Myosin

（数種中国淡水魚の筋肉たんぱく質の特性と季節変化）

学位論文内容の要旨

中国の淡水魚生産量は年々増えており、現在全世界生産量の 6.5 %を占める。しかし、昔ながらの活魚流通が主流で、加工製品としての消費は少ない。今後、近代化に伴う生活に合わせた魚肉の利用形態の多様化が望まれる。魚肉を食料として捉えた場合、筋肉たんぱく質の基礎的な知見なしでは開発も難しいが、コイを除き淡水魚に関する知見はないに等しい。中国の淡水魚養殖には食性の異なる複数の魚種を同じ池で生産させるという大きな特徴がある。その結果、これら数種の魚は夏（30°C）、冬（0°C）の大きな水温の周年変化を同じように受けていることになる。コイを用いた温度馴化の研究から、コイは水温変化に合わせて熱安定性の異なるミオシンを発現して温度変化に対応しているといわれている。この結論が、魚種が変わっても同じであるのかについての明確な結論はない。本研究では中国で広く生産されているハクレン、コクレン、タントウホウ、ソウギョ、コイ、ライギョおよびオオクチバスについて、季節による熱安定性の異なる筋肉たんぱく質、ミオシンの発現および同時期に発現されたミオシンの種間の違いの二面から検討した。

夏、冬の魚の筋原纖維（Mf）の熱安定を ATPase 失活から調べた。ハクレン、コクレン、タントウホウ、ソウギョでは夏と冬の Mf の熱安定性には 20 倍の差があったが、コイでは 4 倍、ライギョ、オオクチバスでは両季節で同じであった。夏のハクレンは最も安定なティラピア程度、冬のハクレンは不安定の魚種として知られているスケトウダラ程度の安定性で、その差は極めて大きかった。これらの魚が同じような水温で生活していることを考えると、Mf の熱安定性は水温のみによって決定されないことを示している。夏の Mf では魚種間の差はほとんどなかったが、冬の Mf では大きな差があり、夏、冬の熱安定性の差が小さい魚種では冬の Mf が非常に安定であることが特徴であった。低温でたんぱく質が機能するためには、そのエネルギー条件にあった柔らかい構造が必

要になるが、ライギョ、オオクチバスの冬のミオシンは強固過ぎる。この矛盾は魚の活動から説明された。寒帶産の海産魚は低温でも活発に動き回る必要があるのに対し、淡水魚は冬の間、餌も採らず、池の底で静かにしている。このような安定な構造を有しても、生きていくための障害とはならないと考えられる。すなわち、いずれの淡水魚も夏の高水温に適応したミオシンを発現することに共通性があり、冬のミオシンの熱安定性はそれほど重要でないことが示唆された。

熱安定性の異なるミオシンがどの季節に発現されるかを知るため、全ての魚種から毎月筋肉を採取し、そのミオシンの熱安定性を解析した。夏の4ヶ月（6-9月）、冬の4ヶ月（12-3月）はそれぞれ同一の安定を示したので、安定性の異なる2種のミオシンのみが発現されていると推定した。2ヶ月の移行期には、2種のミオシンの比が少しづつ変化し、2種のミオシンが交換されていた。この夏冬2種のミオシンの発現の時期は魚種によらず同じであり、夏冬の熱安定性の違いとは無関係であったので、発現そのものは水温で制御されていることが推定された。

Mfを加熱したときのミオシンの変性を塩溶解性、単量体量、およびキモトリプシン消化による頭部（S-1）と尾部（Rod）の生成量の変化から追跡した。いずれの魚種のいずれの季節のMfでもATPaseの失活に先立ち、塩溶解性、単量体量が平行して減少した。そして、ATPaseの失活とS-1の変性が、塩溶解性の低下とRodの変性が対応した。それゆえ、検討した全ての魚種のMfの加熱で、RodがS-1より先に変性するという共通した様式があることが分かった。

魚種ごとのミオシンRodの内部構造の違いをキモトリプシン消化が比較した。夏のミオシンの低温（10°C）での消化ではいずれも单一のHMM（165 kDa）とLMMに選択的に切断された。しかし、冬のミオシンの切断は魚種によって異なった。コイ以外は夏の切断とあまり差がなかった。コイでは特徴的に長いHMM（180 kDa）が生成され、別の切断箇所が存在することが分かった。これは、日本で用いられているコイの切断パターンとよく似ていた。温度を上昇させた消化から、夏に比べ冬のハクレンのRodの内部構造はかなり脆弱であることが分かった。

Rodの構造を比較するため、単離したRodの加熱によるUnfoldingを比較した。いずれの魚種の夏のMfから調製したRodはよく似た2つのUnfoldingピークを示した。この結果はS-1の部分だけでなくRodの部分の安定性は調べた全ての魚種でよく似ていることが結論された。しかし、冬のRodは魚種ごとに大きな違いを示した。ハクレン、コクレン、タントウホウ、ソウギョでは夏の低い温度域のUnfoldingと似た温度帯（35°C）

で一つの Unfolding を示した。他の魚種ではやはり 2 つのピークを示す Unfolding であった。このとき得られた低温でのピークはハクレンなどで得られたピークとよく似ていた。それゆえ、熱安定性の高い部分を持つことがこれらの魚種の特徴であった。これらの Unfolding の由来を知るため、夏冬のハクレン Rod を LMM と S-2 に切断してさらに検討した。すると、LMM には夏冬の差がなく、35°C 付近で Unfolding が起きた。しかし、S-2 については、両者で異なった。夏の S-2 は高温で Unfolding が起きたが、冬の S-2 は LMM と類似した低温で Unfolding が起きた。このことが Rod の Unfolding の違いの原因であると結論した。ライギョの Rod では夏冬の差が認められず、頭部 S-1 部分のみならず、Rod 部分の構造もあまり変化していないことが確かめられた。Rod の熱凝集は安定な S-2 を有するものほど起こりにくいことが認められた。そして、Rod 全体の Unfolding が起きた後に凝集が著しく進行することが分かった。すなわち、安定な S-2 を有しない冬のハクレン Rod の熱凝集は夏のそれより 10°C 程度低い温度で起きた。

魚肉の利用の一つの形態はすり身製造である。これまで、淡水魚のすり身のゲル形成能はいずれも劣っており、スケトウダラのすり身のようなゲルが形成されないと報告されている。そこで、生産量が多く、価格の低いハクレンを用いて、ゲル化特性を検討した。これまでの結果に基づき、夏および冬の期間に調製したすり身を用いて検討した。すると、夏（6, 9 月）、冬（12, 3 月）のミオシンを持つすり身はそれぞれ同じようゲル形成をした。夏のすり身は冬より 10°C 高温でゲルを形成した。この温度差はミオシンの有する熱安定の差で説明できた。この結果は、熱安定性の異なる魚種では最適加熱温度が異なるという結果を支持するものであった。同じ魚種でありながら、漁獲時期が異なると、それらから調製したすり身のゲル形成が大きく変化するという事実はこれらの魚種をすり身材料として利用する場合に非常に重要なことである。これらは、海産魚では考慮する必要のことである。

以上の結果は、これから中国産の各種淡水魚の貯蔵、利用を考えるときに貴重な情報となると考えられる。また、これまで、淡水魚のゲル形成能は劣り、ゲル物性に優れたものは製造できないといわれていたが、少なくともハクレンは十分なゲル形成能を有し、さらにスケトウダラに匹敵する坐り効果が得られたため、すり身製造に適した魚種であることを明らかにした。

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 足立 伸次
副査教授 佐伯 宏樹
副査部長 福田 裕 (水産総合研究センター)

学位論文題名

Seasonal Variation and Species-specificity of Several Chinese Freshwater Fish Myosin

(数種中国淡水魚の筋肉たんぱく質の特性と季節変化)

中国の淡水魚生産量は年々増えており、現在全世界生産量の65%を占める。しかし、昔ながらの活魚流通が主流で、加工製品の形態の流通は少ない。今後、近代的生活に合わせた魚肉の利用形態の多様化が望まれる。魚肉を食料として捉えた場合、筋肉たんぱく質の基礎的な知見なしでは利用開発は難しいが、日本での研究対象は海水魚であるため、淡水魚に関する知見は全くないに等しい。特に、淡水魚養殖で考慮しなければならないのは、これら養殖魚は夏(30°C)、冬(0°C)の間で水温の大きな周年変化を受けているということである。これは海水魚の利用では全く問題とならないことである。コイを用いた温度驯化の研究から、コイは水温変化に合わせて熱安定性の異なるミオシンを発現して温度変化に対応しているといわれている。この結論が、魚種が変わっても同じであるのかについての明確な結論はない。本研究では中国で広く生産されているコイ目のハクレン、コクレン、タントウホウ、ソウギョ、コイ、およびススキ目のライギョおよびオオクチバスについて、筋肉たんぱく質ミオシンの季節による熱安定性の違いおよび同時期の種間の違いの二面から検討した。

第一章では、魚肉の利用の一つの形態であるすり身のゲル形成について利用面から検討した。これまで、淡水魚のすり身のゲル形成能はいずれも劣っており、スケトウダラのすり身のようなゲルが形成されないと報告されている。そこで、生産量が多く、価格の低いハクレンを用いて、ゲル化特性を検討した。これまでの結果に基づき、夏および冬の期間に調製したすり身を用いて検討した。すると、夏(7, 9月)、冬(12, 3月)のミオシンを持つすり身はそれぞれ同じようゲル形成をした。夏のすり身は冬より10°C高温でゲルを形成した。この温度差はミオシンの有する熱安定の差で説明できた。この結果は、熱安定性の異なる魚種では最適加熱温度が異なるという結果を支持するものであった。同じ魚種

でありながら、漁獲時期が異なると、それらから調製したすり身のゲル形成が大きく変化するという事実はこれらの魚種をすり身材料として利用する場合に非常に重要なことである。これらは、海産魚では考慮する必要のないことである。

第2、3章では各種魚種の夏と冬の魚の筋原纖維 (Mf) の熱安定を ATPase 失活から調べた。夏と冬の Mf の安定性は違っていたが、魚種差が認められた。ハクレン、コクレン、タントウホウ、ソウギョでは夏と冬の Mf の熱安定性には 20 倍の差があったが、コイでは 3 倍、ライギョ、オオクチバスでは両季節で同じであった。夏のハクレンは最も安定なティラピア程度、冬のハクレンは不安定の魚種として知られているスケトウダラ程度の安定性で、その変化は極めて大きかった。これらの魚が同じような水温で生活していることを考えると、Mf の熱安定性は種に固有のものであり、水温のみによって決定されるわけではないことを示している。夏の Mf では魚種間の差はほとんどなかったが、冬の Mf では大きな差があり、夏冬の熱安定性の差が小さい魚種では冬の Mf が非常に安定であることが特徴であった。低温でたんぱく質が機能するためには、そのエネルギー条件にあった柔らかい構造が必要になるが、ライギョ、オオクチバスの冬のミオシンはこの水温では安定過ぎる。この矛盾は魚の活動から説明された。寒帯産の海産魚は低温でも活発に動き回る必要があるのに対し、淡水魚は冬の間、餌も採らず、池の底で静かにしている。このような安定な構造を有しても生きていくための障害とはならないと考えられる。

熱安定性の異なるミオシンがどの季節に発現されるかを知るため、全ての魚種から毎月筋肉を採取し、そのミオシンの熱安定性を解析した。夏の 4 ヶ月 (6-9 月)、冬の 4 ヶ月 (12-3 月) はそれぞれ同一の安定を示したので、安定性の異なる 2 種のミオシンのみが発現されていると推定した。2 ヶ月の移行期には、2 種のミオシンの比が少しずつ変化し、2 種のミオシンが交換されていた。この夏冬 2 種のミオシンの発現の時期は魚種によらず同じであり、夏冬の熱安定性の違いとは無関係であったので、発現そのものは水温で制御されていることが推定された。

Mf を加熱したときのミオシンの変性を塩溶解性、単量体量、およびキモトリプシン消化による頭部 (S-1) と尾部 (Rod) の生成量の変化から追跡した。いずれの魚種のいずれの季節の Mf でも ATPase の失活に先立ち、塩溶解性、単量体量が平行して減少した。そして、ATPase の失活と S-1 の変性が、塩溶解性の低下と Rod の変性が対応した。それゆえ、検討した全ての魚種の Mf の加熱で、Rod が S-1 より先に変性するという共通した様式があることが分かった。

魚種ごとのミオシン Rod の内部構造の違いをキモトリプシン消化が比較した。夏のミオシンの低温 (10°C) での消化ではいずれも単一の HMM (165 kDa) と LMM に選択的に切断された。しかし、冬のミオシンの切断は魚種によって異なった。コイ以外は夏の切断とあまり差がなかった。コイでは特徴的に長い HMM (180 kDa) が生成され、別の切断箇所が存在することが分かった。これは、日本で用いられているコイの切断パターンとよく似ていた。温度を上昇させた消化から、夏に比べ冬のハクレンの Rod の内部構造はかなり脆弱であることが分かった。

第4章では Rod の構造を比較するため、単離した Rod の加熱による構造破壊、Unfolding

の様子を比較した。いずれの魚種についても夏の Mf から調製した Rod はよく似た 2 つの Unfolding ピークを示した。この結果は S-1 の部分だけでなく Rod の部分の安定性は調べた全ての魚種でよく似ていることが結論された。しかし、冬の Rod は魚種ごとに大きな違いを示した。ハクレン、コクレン、タントウホウ、ソウギョでは夏の低い温度域の Unfolding と似た温度帯 (35°C) で一つの Unfolding を示した。他の魚種ではやはり 2 つのピークを示す Unfolding であった。このとき得られた低温でのピークはハクレンなどで得られたピークとよく似ていた。それゆえ、熱安定性の高い部分を持つことがこれらの魚種の特徴であった。これらの Unfolding の由来を知るため、夏冬のハクレン Rod を LMM と S-2 に切断してさらに検討した。すると、LMM には夏冬の差がなく、35°C付近で Unfolding が起きた。しかし、S-2 については、両者で異なった。夏の S-2 は高温で Unfolding が起こったが、冬の S-2 は LMM と類似した低温で Unfolding が起きた。このことが Rod の Unfolding の違いの原因であると結論した。ライギョ、オオクチバスの Rod では夏冬の差が認められず、頭部 S-1 部分のみならず、Rod 部分の構造もあまり変化していないことが確かめられた。Rod の熱凝集は安定な S-2 を有するものほど起こりにくいことが認められた。そして、Rod 全体の Unfolding が起きた後に凝集が著しく進行することが分かった。すなわち、安定な S-2 を有しない冬のハクレン Rod の熱凝集は夏のそれより 10°C程度低い温度で起きた。

以上の結果は、これから中国産の各種淡水魚の貯蔵、利用を考えるときに貴重な情報となると考えられる。また、これまで、淡水魚のゲル形成能は劣り、ゲル物性に優れたものは製造できないといわれていたが、少なくともハクレンは十分なゲル形成能を有し、さらにスケトウダラに匹敵する坐り効果が得られたため、すり身製造に適した魚種であることを明らかにした。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。