

博士論文

クエン酸ナトリウムの多機能性を利用した  
スルメイカ外套膜筋肉の高度利用に関する研究

北海道大学大学院水産科学院

桑原浩一

平成 20 年

略 語

本論文においては以下の略語を使用した。

HC	: myosin heavy chain
HMM	: heavy meromyosin
LMM	: light meromyosin
EDTA	: ethylenediaminetetraacetic acid
PMSF	: phenylmethylsulfonyl fluoride
kDa	: kilodalton
SDS-PAGE	: sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
TGase	: transglutaminase
MTGase	: microbial transglutaminase
Na	: sodium salt

目 次

緒言	32
実験材料および実験方法	
1. 実験材料	35
2. 実験方法	35
(1)イカ肉ホモジネートの調製	35
(2)イカおよび魚類筋原繊維の調製	35
(3)筋原繊維からのミオシンの調製	35
(4)ミオシンおよび筋原繊維 $Ca^{2+}$ -ATPase 活性の測定	35
(5) $Ca^{2+}$ -ATPase の失活速度の測定	35
(6)各種化合物による加熱および凍結変性抑制作用の解析	36
(7)アクチンの選択的な塩変性と変性抑制作用の解析	36
(8)筋肉からの塩可溶化タンパク質の測定	36
(9)筋肉の塩可溶化指標としての懸濁液の濁度測定	36
(10)クエン酸 Na の塩析作用の検討	36
(11)SDS-PAGE	36
(12)アガロースを含む SDS-PAGE	37
(13)クエン酸 Na のキレート能の測定	37
(14)スルメイカ外套膜筋からの加熱ゲルの調製	37
(15)加熱ゲルの物性測定	38
(16)肉糊および加熱ゲルの pH および塩分濃度の測定	38
(17)タンパク質濃度の測定	38
(18)統計処理	38

実験結果	39
第1章 各種有機酸塩がスルメイカ肉の自己消化に及ぼす影響	39
(1)5℃におけるミオシン分解に対する有機酸塩の影響	39
(2)25℃におけるミオシン分解に対する有機酸塩の影響	46
(3)35℃におけるミオシン分解に対する有機酸塩の影響	47
小考察	52
第2章 各種有機酸塩によるスルメイカ筋原繊維の溶解	53
(1)NaClによるイカ肉筋原繊維の溶解性	53
(2)有機酸塩によるイカ肉筋原繊維の溶解性	55
(3)有機酸塩によって溶解する筋原繊維成分	57
(4)有機酸塩とNaClが共存する場合の筋原繊維の溶解性	58
(5)クエン酸Naによる魚肉筋原繊維の溶解性	61
(6)NaClで溶解したミオシンの分解に対する有機酸塩の影響	61
小考察	64
第3章 スルメイカ外套膜筋肉の加熱ゲル形成に及ぼすクエン酸Naの影響	65
(1)NaClを用いてスルメイカ肉から調製した直接加熱ゲルの特性	65
(2)有機酸塩を用いてスルメイカ肉から調製した直接加熱ゲルの特性	70
(3)魚肉の直接加熱ゲル形成に及ぼすクエン酸Naの影響	72
(4)クエン酸Naを用いたスルメイカの加熱ゲル形成に及ぼす予備加熱の影響	72
(5)クエン酸Naを用いたスルメイカの加熱ゲル形成に及ぼすMTGaseと予備加熱の影響	75
小考察	83
第4章 ミオシンおよびアクチンの変性に及ぼすクエン酸Naの影響	84
(1)クエン酸Na存在下でのCa <sup>2+</sup> -ATPase活性の測定	85
(2)コイ筋原繊維の熱変性に対するクエン酸Naの影響	87
(3)クエン酸Naによるコイ・ミオシンの熱変性抑制作用	89
(4)クエン酸Naがコイ・アクチンの塩変性に及ぼす影響	93
(5)Ca, EDTA存在下でのスルメイカ筋原繊維の熱変性に対するクエン酸Naの影響	97
(6)Ca, EDTA存在下でのスルメイカ・ミオシンの安定性に対するクエン酸Naの影響	100
(7)クエン酸Naがスルメイカ・アクチンの塩変性に及ぼす影響	103
(8)クエン酸Naによるコイ筋原繊維の凍結変性抑制作用	106
小考察	107
総合考察	108
謝辞	113
文献	114

## 緒言

農林水産省(2006)の「平成17年水産物流通統計年報」によると、水産物の総生産量は576万トンで、このうちイカ類は33万トンを占める重要な資源である。利用消費されるイカ類は、ツツイカ目に属するスルメイカ *Todarodes pacificus*, アカイカ *Ommastrephes bartrami*, ケンサキイカ *Loligo edulis*, アオリイカ *Sepioteuthis lessoniana*, ヤリイカ *Loligo bleekeri*, また、コウイカ目に属するコウイカ *Sepia esculenta*, モンゴウイカ *Sepia lycidas* など多くの種類があり、その中で最も魚獲量が多いのはスルメイカの22万トンで、イカ類生産量の60%以上を占める。生産量を反映するように、日本人はイカを好んで食べ、1世帯当たり年間の水産物購入数量によると、イカは常に上位にランクされており、平成17年でみるとマグロ3186g, エビ・カニ3170gに次いで、イカは3061gで3番目に消費量の多い水産物となっている。

長崎県沿岸域のスルメイカは、12月から2月にかけて集中して漁獲されるが、その漁法はイカ釣り漁業だけではなく、定置網などの網漁業においても盛んに漁獲されている。しかし、水揚げ時に網内で、スルメイカ同士が噛み合いを起こすことによって、外套膜などに傷が付いた個体が多数発生する。長崎県内の17の漁業協同組合に対して行った聴取調査では、定置網で漁獲されるスルメイカの3割程度を傷のあるスルメイカ(傷イカと呼ばれる)が占めていることがわかった。このように傷付いたスルメイカの鮮魚としての価値は極端に低くなるため、付加価値向上策が求められている。漁獲時にスルメイカが傷付く現象は、定置網漁業でスルメイカを漁獲している日本海沿岸の各地で見られる現象である。傷イカが安価で取引される理由は外観の傷によるものであり、鮮度など品質劣化が原因ではないので、筋肉の鮮度を生かした食材の開発が期待されている。また、鮮魚として利用されるイカからも、イカ刺身商材などの製造過程で不揃いなイカ端肉が排出され、有効利用法の開発が求められている。

イカは鮮魚として流通させる以外に、塩辛、すゝめ、さきいか、いか燻、いか飯など様々な加工品の原料としても利用されている。平成17年の総水産物食用加工品の生産量は209万トンであり、生鮮冷凍水産物を除いた純粋な加工品で生産量が最も多いのは、66万トンのねり製品である(農林水産省2006)。当然のことながら、ねり製品原料は魚肉すり身である。イカの使用を謳ったねり製品も市販されているが、少量のイカ肉を混合したものや、加熱したイカ肉を細切にして魚肉に添加したものであり、イカ肉を主原料としたねり製品は見受けられない。

前述した傷のある高鮮度スルメイカの有効利用策として、その外観が製品の品質に影響しないねり製品化が考えられる。ねり製品は、水産物筋肉タンパク質の特性を上手く活用した伝統的な水産加工品である。ねり製品は、水に不溶の筋原繊維に食塩を加えて溶解させてゾル状の肉糊とし、肉糊を加熱することで、細長いミオシン分子がネットワーク構造を形成するように凝集して形成されたしなやかな加熱ゲルである。また、高温で加熱する前に低温で一旦予備加熱することで、最終的なゲル物性を向上させる「坐り」工程が導入されている場合もある。予備加熱により、肉糊中のミオシンは部分的な変性を受け、さらに、内在性TGase(EC2.3.2.13)がミオシンに作用し、共有結合であるミオシンの強固な架橋結合を引き起こす(関ら1990, Wanら1994, Nowsadら1996, Nozawaら1997, 塚正ら2000a, 2000b)。この酵素の魚肉中での、生理的な存在理由は不明であるが、スケトウダラなど、ねり製品製造に利用される各種魚類の筋肉に内在している。この酵素のゲル形成に対する有用性が認められるに至り、この酵素の魚肉以外の生物(微生物)からの探索がなされ、放線菌(*Streptovorticillium* 属)に類似の酵素の存在が見出された(Andoら1989)。現在、食品添加物として認められ、ねり製品を含む各種タンパク質食品の品質向上に用いられている。また、肉糊中で起こるミオシンの架橋反応をSDS-PAGEで容易に検出できるシステムが、報告されている(今野,

今村 2000)。

一方、スルメイカ外套膜筋からのねり製品製造の試みはなされているが、成功にいたっていない。製造を困難にしているのは、スルメイカ肉に内在する非常に活性の高いエンド型の金属プロテアーゼが、ミオシン分子をHMMとLMMに切断するためといわれている(Nagashimaら1992, Konno and Fukazawa 1993, 江原ら1994, 石川1999)。この酵素は、他の筋原繊維構成タンパク質、たとえば、アクチンやトロポミオシンをまったく分解せず、ミオシンのみを分解するため、ミオシナーゼと称されている(Okamotoら1993)。ミオシンがゲルを作るには、その細長い分子構造が必須であると考えられる。しかし、この内在酵素はミオシン分子を、そのほぼ中央で切断するため、しなやかなゲルが形成されず、スケトウダラなどの一般的な魚類のゲルに比べると著しく脆い物性となる(Ayensaら2002, Parkら2003, 2005)。スケトウダラなどの魚肉にもミオシンを分解させるプロテアーゼは存在するが、それらは50-60℃の高温で作用するので、一般的な予備加熱条件ではあまり問題とならない(野村ら1993, Caoら1999, 下元ら2006)。しかし、イカ肉中の金属プロテアーゼは、5℃程度の低温下においても高い活性を示すことが明らかにされている。試験管内の反応では、EDTAや*o*-フェナンスロリンなどのキレート剤を添加することで、金属プロテアーゼの活性化に必要なZn, Coを取り除き、本酵素を阻害できる(Konno and Fukazawa 1993, Okamotoら1993, Ayensaら2002)。しかし、これらは食品添加物として実際のねり製品に加えることはできない。また、一般的にねり製品の「坐り」工程においてミオシンの多量化を引き起こすTGaseは、Ca<sup>2+</sup>要求性を示す(関ら1990, Wanら1994, Newsadら1996)。スルメイカ外套膜筋に含まれるTGaseは、魚類よりさらに高濃度のCa<sup>2+</sup>を要求する(Nozawaら2001, Parkら2003)。これは、仮に金属プロテアーゼを阻害するために、キレート作用を有する化合物を加えると、同時にTGaseの活性も阻害することを示している。この問題を克服するため、さまざま

な取り組みがなされてきた。すなわち、自己消化酵素が加熱失活する温度帯での加熱(Parkら2003)、および、その温度帯での微生物由来のMTGase添加などである(Parkら2005)。そのほかにも、自己消化酵素が働かない凍結下での粉碎(石川1999, 山日2006)、加圧などによるプロテアーゼの抑制法(Nagashimaら1992, Perezら2002, Gomezら2002, 2003, Hernandezら2005)が検討されてきた。

魚肉すり身からのゲル形成に関する問題に加え、すり身の品質維持の検討もなされてきた。原料である魚肉(すり身)の品質が最終的なゲル物性に影響を与えるという観点から、すり身中のミオシンの変性程度の解析が行われており(川島ら1973a, 1973c)、簡便に解析する手法も確立されている(Kosekiら2005a, 2005b)。すなわち、すり身の製造あるいは貯蔵中に、いかにミオシンの変性を阻止するかが、ゲル物性の高いゲルを製造する基本的な考え方である。それゆえ、ミオシンの変性抑制化合物の探索は、いまだ重要な課題として残っている。現在、冷凍すり身に広く使用されている化合物は、ソルビトールやショ糖などの糖類である(新井ら1970, 川島ら1973b)。しかし、その甘さが問題であり、甘味の少ない、あるいは甘味の無い化合物での変性抑制法はこれまで開発されていない。変性抑制作用を有する糖類以外の化合物として、グルタミン酸Naや有機酸塩が報告されているが(大泉ら1984)、前者は強い抑制作用を示すものの、強いうま味を有するため添加が難しい、後者は一般的に抑制効果が小さい。従って、現実的な利用において、糖に匹敵する効果を有する化合物は報告されていない。

スルメイカ筋原繊維の変性は非常に特徴的であり、魚類筋原繊維の場合と異なる現象が報告されている。すなわち、Ca<sup>2+</sup>による著しい安定化、NaCl添加による著しい熱変性の促進などが、明らかにされている(Konno 1991b, Konno and Yuasa 1993)。これらの事実は、魚肉と同じ処理をしてもイカの場合は、同じ結果にならないことを意味している。このようなスルメイカ・ミオシンの変性上の特性

も、スルメイカ外套膜筋からねり製品を製造することを困難にしている理由と思われる。

本研究は4つの章から構成され、第1章ではすでに自己消化阻害作用が明らかにされているEDTAと比較しながら、食品添加物として使用可能で、キレート作用が期待できる数種の有機酸塩の中から、スルメイカ肉中の自己消化を抑制する化合物を探索した。第2章では、第1章で抑制作用のあった化合物について、ねり製品製造で必須の筋原繊維の溶解作用の観点から、通常使用されているNaClと比較しながら、その有用性を検証した。すなわち、NaCl無添加で筋肉の溶解が可能かどうかを検討しながら、同時に自己消化への影

響も検討した。第3章では、これらの結果に基づき、実際に有機酸塩のみを利用した加熱ゲルをスルメイカ外套膜筋肉から調製した。この際、坐り効果の有無、また、MTGaseを添加し、その効果も調べた。第4章では、ねり製品原料としてのイカ肉の保存性を考慮し、有機酸塩のミオシン変性抑制作用について検討した。この章では、スルメイカ筋原繊維の変性の解析が複雑であったため、先に、魚類であるコイの筋原繊維に対する影響を、ミオシンおよびアクチンの変性抑制の観点から詳細に検討した。その後、スルメイカ筋原繊維を用いて、Ca<sup>2+</sup>による安定化作用を考慮しながら、変性抑制について検討した。

## 実験材料および実験方法

### 1. 実験材料

研究に使用したスルメイカ *Todarodes pacificus* は長崎近海の定置網で漁獲されたもので、漁獲直後に急速凍結し、 $-50^{\circ}\text{C}$ に凍結保管しておいたものを凍結期間6ヶ月以内に使用した。また、筋原繊維の調製には、主として生きたスルメイカを利用した。対照として用いたコイ *Cyprinus carpio* は生きているものを即殺し、その背肉を用いた。魚肉加熱ゲルの調製に使用したアカアマダイ *Branchiostegus japonicus*、マイワシ *Sardinops melanosticta*、イシモチ（グチ） *Argyrosomus argentatus*、タチウオ *Trichiurus lepturus*、シイラ *Coryphaena hippurus* は、長崎魚市場から高鮮度のものを購入し、その筋肉を用いた。

### 2. 実験方法

#### (1) イカ肉ホモジネートの調製

スルメイカ外套膜肉を肉挽機(南常鉄工製 M-22 型)で処理(孔径 1.2 mm)し、0.12 M NaCl, 24 mM Tris-HCl (pH 7.0), あるいは、24 mM Tris-HCl (pH 7.0) 溶液を5倍量添加してホモジナイズ(Kinematica 社製, PT10-35)したのち、ナイロンメッシュ(#22)を通過させ、ホモジネートとして使用した。ホモジネートに対して、所定の終濃度となるよう、NaCl, EDTA, クエン酸 Na, 酒石酸 Na, コハク酸 Na (いずれも和光純薬工業製, 特級), グルコン酸 Na (藤沢薬品工業製, ヘルシヤス A), あるいは PMSF (シグマ社製)を加え、諸性質に対する各化合物の影響を調べた。いずれの化合物も予め中和し、20 mM Tris-HCl (pH 7.0) 溶液に溶解して使用した。

#### (2) イカおよび魚類筋原繊維の調製

細切りしたスルメイカ外套膜肉、あるいは、コイ背肉から、加藤らの方法(1979)に準じて筋原繊維を調製した。すなわち、氷水で冷却しながら 0.1 M NaCl (または KCl), 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) の緩衝液中でポリトロンホモジナイザー(Kinematica 社製, PT10-35)を用いて、30 秒の

冷却時間を間に入れながら、30 秒ずつ4回ホモジナイズした。その後、同緩衝液での懸濁と遠心分離(3,000 rpm, 5分)を繰り返して、最終的には懸濁液を2層のガーゼでろ過して得られたろ液を筋原繊維とし、所定濃度の様々な化合物を混合して筋原繊維懸濁液とした。なお、スルメイカ肉からの筋原繊維の調製は、吉富と今野の方法(1982)に準じてプロテアーゼによるミオシン分解を抑制するため、上記の緩衝液にさらに 1 mM EDTA, 0.1 mM PMSF を添加した。

#### (3) 筋原繊維からのミオシンの調製

基本的には木村らの方法(1980)に準じ、硫酸分画法を用いて調製した。すなわち、0.5 M KCl に溶解させたコイ筋原繊維に、2 mM ATP-Mg 存在下、飽和硫酸アンモニウム溶液を40%飽和になるよう加え、遠心分離(20,000 x g で20分間)して、沈殿にアクチンを取り除いた。ミオシンを含む上澄みに対して、60%飽和になるようさらに飽和硫酸溶液を加え、遠心分離によりミオシンを沈殿として回収した。この沈殿を 0.5 M KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) で溶解し、同液に透析して使用した。このミオシンにはトロポミオシンなどの不純物が含まれていた。しかし、ミオシンの変性速度測定を目的とした調製であったので、これらは影響がないことを確かめた上で、そのまま使用した。

#### (4) ミオシンおよび筋原繊維 $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性の測定

ミオシンあるいは筋原繊維の  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase は 0.5 M NaCl (または KCl), 15 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1 mM ATP, 25 mM Tris-maleate (pH 7.0) からなる反応組成液を用い、スルメイカ筋原繊維は  $20^{\circ}\text{C}$  で、コイ筋原繊維は  $25^{\circ}\text{C}$  で反応させた。反応停止は過塩素酸を最終濃度 5%になるよう加えて行い、ATP から加水分解の結果生じた無機リン酸を比色定量した(吉富と今野 1982)。

#### (5) $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase の失活速度の測定

筋原繊維あるいはミオシンの加熱変性は、加熱による  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase の失活速度から解析した。試料を試験管に採り、適当な温度で経時的に加熱し

た。この際、各種化合物を添加することで、その化合物の変性に対する影響を検討した。加熱後、水中にて加熱を停止させ、前述の条件で  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性を測定した。失活速度は、得られた活性の失活様式が一次反応に従うと想定し、残存活性の対数値を加熱時間に対してプロットした直線の傾きから算出した（大泉ら 1981）。

#### (6) 各種化合物による加熱および凍結変性抑制作用の解析

筋原繊維あるいはミオシンに様々な濃度の化合物を加え、前述のように加熱失活速度を算出した。そして、大泉らの方法（1981）に従い、得られた失活速度の対数値を添加した化合物濃度に対してプロットした。一般的に両者の間に直線関係が得られるので、その直線の傾き、すなわち、1 M の添加による変性速度の対数値の減少率をその化合物の有する変性抑制作用、E-value として計算した。

#### (7) アクチンの選択的な塩変性と変性抑制作用の解析

魚類筋原繊維で報告されている方法（若目田と新井 1984, 1985, 1986）に従い、コイあるいはスルメイカ筋原繊維に対して、様々な濃度の NaCl あるいはクエン酸 Na を加え、氷冷下で一晩（約 12 時間）塩処理した。その後、アクチン変性が起こらない濃度（コイでは 0.5 M, スルメイカでは 0.2 M）まで NaCl 濃度を希釈した。アクチンの変性は、この塩処理した筋原繊維を加熱したときの、 $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase の加熱失活様式から解析した。すなわち、アクチンが選択的に変性されれば、ミオシンはアクチンの保護を失い、ミオシンそのもの急激な失活が認められ、アクチンが未変性のままであれば、ミオシンはアクチンによって安定化を受けているため、ゆっくりとした失活が起こることが予想される（Yasui ら 1968, 山下ら 1978）。

#### (8) 筋肉からの塩可溶化タンパク質の測定

イカ肉ホモジネートあるいは筋原繊維懸濁液に様々な濃度の化合物を添加し、水中で 30 分間放置した後、遠心分離（20,000  $\times$ g, 30 分間）した。上澄みに回収されるタンパク質濃度を測定し、遠心分離前の懸濁液のタンパク質濃度に対する比を可

溶化率（%）として表した（今野と上田 1989）。なお、タンパク質濃度の測定は、トリクロロ酢酸でタンパク質を沈殿させ、上澄みを除去して乾固したのち 1 M NaOH で溶解し、ビウレット法で比色定量した。また、化合物の添加で溶解し、上澄みに得られたタンパク質成分は、SDS-PAGE により解析した。

#### (9) 筋肉の塩可溶化指標としての懸濁液の濁度測定

Konno らの方法（1997）に従い、筋原繊維懸濁液（タンパク質濃度；0.6 mg/ml）あるいはイカ肉ホモジネートの 350 nm における吸光値を測定して濁度とし、この値の減少を溶解の指標とした。

#### (10) クエン酸 Na の塩析作用の検討

イカ筋原繊維懸濁液（タンパク質濃度；3.0 mg/ml）に、クエン酸 Na を所定の濃度となるよう添加した。その後、2つの方法で5倍に希釈した。第一の方法は、当初のそれぞれのクエン酸 Na 濃度を変えずに希釈した。第二の方法では、当初濃度にかかわらずクエン酸 Na 濃度がすべて 0.25 M となるように希釈した。2つの方法で希釈した筋原繊維懸濁液の 350 nm での濁度を測定した。また、遠心分離（20,000  $\times$ g, 30 分間）で得られた上澄み画分を SDS-PAGE に供し、回収されたタンパク質成分を解析した。

#### (11) SDS-PAGE

内在酵素による自己消化を解析するための SDS-PAGE 用試料は、以下のようにして調製した。イカ肉ホモジネートあるいは乳鉢で搗り潰した加熱ゲルに、8 M 尿素-2 %SDS-2 %メルカプトエタノール-20 mM Tris-HCl 溶液（SDS-UM 溶液）を加えて、沸騰湯中で 2 分間加熱した（沼倉ら 1985）。この操作で、試料の溶解と SDS 処理を同時に行った。これを室温で 30 時間攪拌して溶解したのちに遠心分離（4,000 rpm, 60 分間）し、沈殿に不溶化物を除き、上澄みを SDS-PAGE に供した。なお、自己消化解析の実験において溶解しなかった成分は、コラーゲン由来と思われる筋基質タンパク質で、筋原繊維由来の成分はすべて溶解していることを確かめた。SDS-PAGE は、0.1%の SDS を含



むアクリルアミド濃度 7.5%のスラブゲルを用いて行った (Laemmli 1970)。電気泳動後, Coomassie Brilliant Blue R-250 で染色し, 50%メタノール-7%酢酸水溶液で脱色した。また, 分子量マーカーは GE ヘルスケアバイオサイエンス社製 SDS-PAGE 用 LMW および HMW マーカーキットを用いた。泳動ゲルはスキャナー (シャープ製 JX-330P) で画像をパーソナルコンピュータに取り込み, 電気泳動ゲル画像解析ソフト (GE ヘルスケアバイオサイエンス社製, Image Master II) で各バンドの染色強度を測定し, 全てのバンドの総染色強度に対する各バンドの染色強度を相対値 (%) として示した (沼倉ら 1989)。一般的に, 魚類の HC 分解物は, HC とアクチンの間に泳動される成分の総称である X1 成分として解析されている (沼倉ら 1990, 船津ら 1993)。しかし, イカ肉には分子量 100 kDa のパラミオシンが含まれ (Tsuchiya ら 1980), HC の分解生成物 (100 kDa 断片) と分離できなかったため, まとめて X1(PM)成分として定量した。それゆえ, この値は最初から, 魚類の X1 成分よりも高い値となる。

#### (12) アガロースを含む SDS-PAGE

HC の架橋重合による多量体を分離する場合は, 今野と今村の方法 (2000) に従い, 0.5%アガロースで強固にした 3%ポリアクリルアミドを支持体とするスラブゲル (9 x 8 cm) を使用した。この場合は, 試料の溶解および SDS 処理するための加熱は行わず, 室温で一晩攪拌することで溶解させた。これは, 加熱による高分子ミオシン HC 架橋物のさらなる非共有結合的な凝集を阻止するためである。ゲルの作成は, まず, 電気泳動用アガロース (ナカライテスク製, PG-36) をゲル緩衝液に沸騰水中で溶解させた。その後, アガロースが凝固しない 40°C まで温水中で冷却した。それにアクリルアミド溶液 (和光純薬工業製, 電気泳動用 HG, ビス比 20:1), 重合剤を連続して添加し, 直ちにガラスプレートの上に流し込み, コームを差込み, アクリルアミドを重合させた。アクリルアミドの重合後, ゲルが形成されたガラスプレートを 20°C 前後の水に移し, アガロースを凝固させた。こ

れ以降の電気泳動の操作は, 前述の方法と同様に行った。

#### (13) クエン酸 Na のキレート能の測定

50 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.1 M KCl, 5 mM Tris-HCl (pH 7.0) 溶液に様々な濃度のクエン酸 Na を添加し, そのとき遊離の Ca<sup>2+</sup>濃度を堀場製作所製イオンメーター F-55 (Ca<sup>2+</sup>電極 6583-10C) で測定した。また, キレート滴定法を用い, 一定濃度の Ca<sup>2+</sup>をキレートするために必要なクエン酸 Na 濃度を EDTA と比較することからキレート能を測定した。すなわち, Ca 定量法に準じて (日本薬学会編 1995), Ca<sup>2+</sup>濃度が 0-1.25 mM になるよう調製した CaCl<sub>2</sub>溶液 100 ml に対し, 20% NaOH 1 ml, 10% KCN 3 滴, 10%塩酸ヒドロキシルアミン 3 滴 (いずれも和光純薬工業製) を順に加えて攪拌後, 5 分間静置し, ドータイト NN 粉末 (同仁科学研究所製) 0.1 g を加えて, 溶解させた。これに, 0.01 M EDTA, 0.1 M クエン酸 Na, あるいは, 0.1 M グルコン酸 Na を滴下していき, 指示薬の色が赤から青に変化するために要した容量を求めた。この容量から, それぞれの濃度の Ca<sup>2+</sup>をキレートするのに必要な各化合物の濃度を算出した。

#### (14) スルメイカ外套膜筋からの加熱ゲルの調製

加熱ゲルの調製はスルメイカ外套膜筋を水晒しすることなく, そのまま使用した。すなわち, スルメイカの外套膜筋を肉挽機で 2 回処理 (孔径 3.2 および 1.2 mm) し, 高速カッター (ステファン社製 UM-5 型) で 3 分間播潰した。なお, 播潰の途中で所定量の NaCl, EDTA, PMSF, クエン酸 Na, 酒石酸 Na, グルコン酸 Na, あるいは, 微生物由来の MTGase (味の素製, 1,000 unit/g, Ando ら 1989) を添加し, 最後の 1 分間は減圧下 (400-500 mmHg) で攪拌を行った。得られた肉糊は折径 42 mm の塩化ビニリデンチューブに充填 (肉糊; 50 g/本, 両端のステーブル間; 約 11 cm) し, 直ちに 90°C で 30 分間加熱 (直接加熱ゲル), あるいは, 所定の条件で予備加熱したのち 90°C で 30 分間加熱 (二段加熱ゲル) して, ゲルを形成させた。加熱はいつでも恒温水槽中で行い, 加熱終了後, 直ちに氷水中で 1 時間冷却した。

#### (15) 加熱ゲルの物性測定

加熱ゲルを氷水から取り出し、室温に2時間放置したのち、ゲル物性の測定に供した。なお、MTGaseを加えて予備加熱のみ行って形成させたゲルについては、室温に放置せず直ちにゲル物性の測定に供した。測定は、加熱ゲルを25 mm幅に輪切りにし、5 mmの球形プランジャーを装着したレオメーター（不動工業製 NRM-2003J）を用いた破断試験により行った。試料台の上昇速度は1分間に60 mmとした。そして、同一試料に対して破断試験を8回行い、得られた破断強度（gw）および破断凹み（mm）の平均値を示した。

#### (16) 肉糊および加熱ゲルの pH および塩分濃度の測定

精秤した加熱ゲルまたは破砕肉に、10倍量の蒸留水を加えてホモジナイズ（Kinematica社製ポリトロン）したのち、pHメータ（堀場製作所製 F-22）で pH を測定した。また、そのろ液の塩分濃度は塩分計（住友化学工業製 Sumisalt 300）を用いて測定し、希釈前の肉中の濃度に換算した。

#### (17) タンパク質濃度の測定

タンパク質濃度は牛血清アルブミン Fraction V を標準タンパク質としたビウレット法で定量した（Gornall ら 1949）。

#### (18) 統計処理

マイクロソフト社の Excel を使用し、一元配置の分散分析および Sheffe test により有意差（ $P < 0.05$ ）の検定を行った。

## 実験結果

### 第1章 各種有機酸塩がスルメイカ肉の自己消化に及ぼす影響

スルメイカ外套膜には、ミオシンを選択的に分解する金属プロテアーゼが存在し (Konno and Fukazawa 1993, Tajima ら 1998), ねり製品などへのスルメイカ肉の利用拡大を妨げている。試験管内の実験結果から、このプロテアーゼは Zn または Co を要求する金属プロテアーゼであることが明らかにされている (Okamoto ら 1993)。それゆえ、EDTA または  $\alpha$ -フェナスロリンなどのキレート剤の添加により、自己消化は抑制できる (江原ら 1992, Konno and Fukazawa 1993, Park ら 2003)。しかし、これらの化合物は食品への使用範囲が非常に限られているか、または、許可されていない化合物である。そこで、食品添加物として認可され、幅広い食品に利用されている有機酸塩のキレート作用に着目し、多価カルボン酸構造を有する各種有機酸塩が、スルメイカ肉に内在する金属プロテアーゼによるミオシンの分解を阻害するかを検討した。

まず、スルメイカ筋肉の自己消化を定量的に検討するためのモデルシステムを確立した。次に、イカ外套膜筋のホモジネートに様々な濃度の各種有機酸塩を添加したのち、所定の温度で加温し、ミオシン分解が抑制されるか SDS-PAGE により解析した。また、NaCl の添加はミオシンのフィラメントを溶解し、切断部位を露出させることで、自己消化を促進させることが明らかにされているので (Konno and Fukazawa 1993, Konno ら 2002), NaCl の影響もあわせて検討した。

#### (1) 5°Cにおけるミオシン分解に対する有機酸塩の影響

イカ肉ホモジネート (0.1 M NaCl) を 5°C で保存し、自己消化の進行を SDS-PAGE パターンの変化から追跡した。同時に、5 mM EDTA による自己消化抑制作用を確認し、その結果を Fig. 1A に示した。また、得られた SDS-PAGE パターンから、

消化分解されずに残存している HC の相対染色強度 (Fig. 1B) を算出し、自己消化の進行速度の指標とした。

試料であるイカ肉ホモジネートそのもののパターンには、軟体動物や節足動物に特有のパラミオシン (PM, Tsuchiya ら 1980) 由来の分子量約 100 kDa のバンドが HC とアクチンの間に検出されている。保持時間の経過に伴い HC は減少し、それと同時に、150 kDa 付近に新たな HC 分解生成物の蓄積が認められるようになった。このバンドに加え、PM の移動度と区別できない 100 kDa 付近のバンドの濃さが上昇し、ミオシンは 150 kDa および 100 kDa に選択的に切断されていることが認められた。この結果は、すでに 25°C における自己消化の研究で報告されている切断パターンと同じであり、分解生成物はそれぞれ HMM および LMM 様断片であると同定されている (Konno and Fukazawa 1993, Yoshioka ら 2005)。すなわち、5°C 付近の低温でも、長時間保存した場合、HC は HMM と LMM に分解されることを確認した。なお、HC 以外のバンドに変化は認められなかった。一方、EDTA を加えておけば、5°C で 20 時間保持しても SDS-PAGE パターンに変化は認められず、スルメイカ肉中の金属プロテアーゼの作用は、EDTA でほぼ完全に抑制できることを確認した。Fig.1B に示すように、イカ肉ホモジネート中の HC の占める割合は 33% であったが、時間の経過に伴い減少し、20 時間後には 13% まで低下した。

ここで用いたイカ肉ホモジネートは、自己消化のモデルシステムとして使用できることを確認したので、次に、有機酸塩の効果について検討した。ホモジネートに 0.5 M となるよう NaCl, クエン酸 Na, 酒石酸 Na, または、グルコン酸 Na を加え、5°C において 20 時間まで保持し、ミオシンの分解を比較した。

保存中の SDS-PAGE パターンおよび HC の相対染色強度をそれぞれ、Fig. 2A および Fig. 2B に示した。NaCl 濃度を 0.1 M から 0.5 M に上昇させると、ミオシンの分解は促進された。これは、既報の結果と一致している (Konno and Fukazawa 1993,

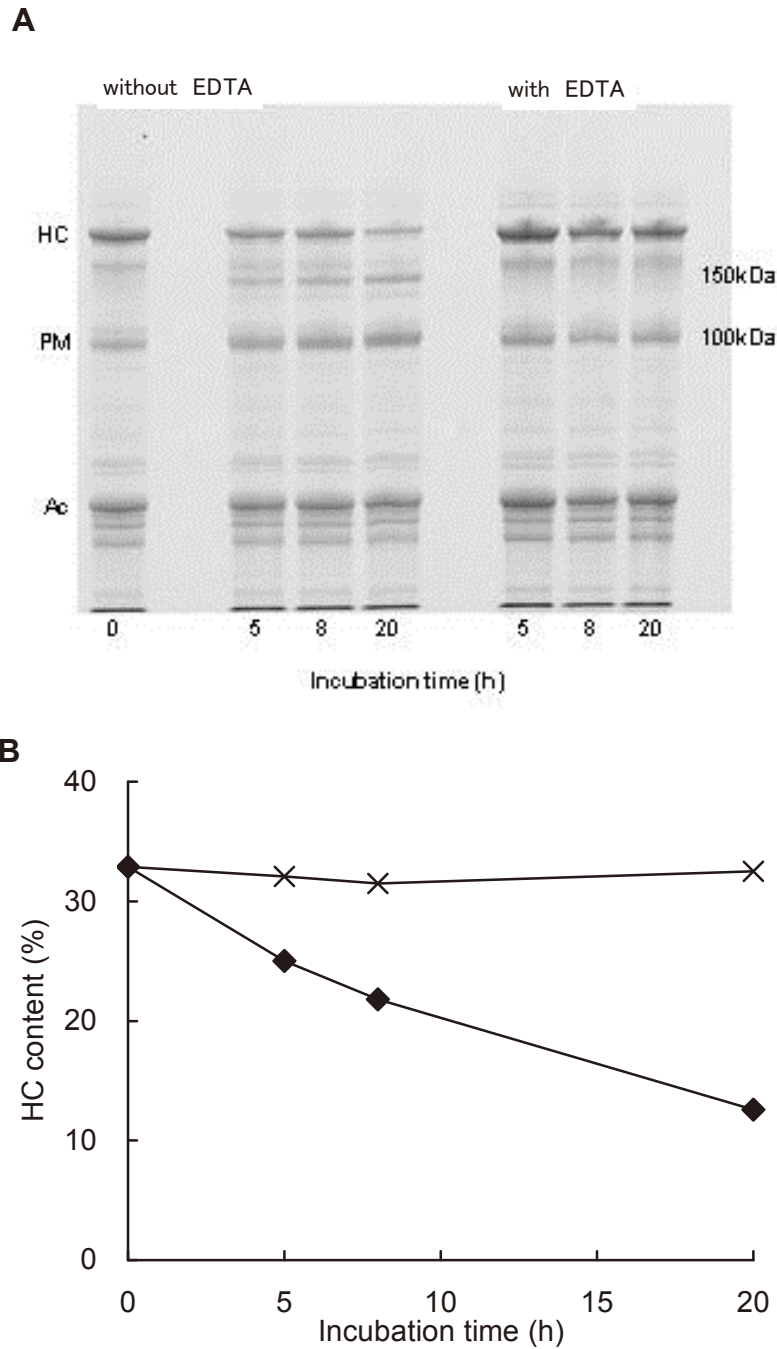


Fig. 1 Effect of EDTA on the myosin degradation in squid meat homogenate incubated at 5 °C. Squid meat homogenate in 0.1 M NaCl (pH 7.0) was incubated at 5 °C with (×) or without 5 mM EDTA (◆). (A) Changes in the SDS-PAGE pattern upon incubation of the homogenate with or without EDTA. (B) Myosin heavy chain content was estimated from the SDS-PAGE pattern in (A) revealed on 7.5 % polyacrilamide gel. HC, PM, and Ac stand for myosin heavy chain, paramyosin, and actin, respectively. The 150 kDa and 100 kDa are the degraded myosin heavy chain fragments produced.

Konno ら 2002)。一方、0.5 M のクエン酸 Na、酒石酸 Na またはグルコン酸 Na を添加した場合、ミオシンの分解はほとんど起こっていなかった。それらのパターンは、Fig. 1 に示した EDTA を添加した場合と、ほぼ同じであり、これらの結果から

用いたすべての有機酸塩には強いミオシン分解の阻害作用があることがわかった。HC が減少しないのに対応して、HC の分解物である 150 kDa の生成も認められなかった。そこで、阻害効果を再確認するため、Fig. 2A の結果から 20 時間保持し

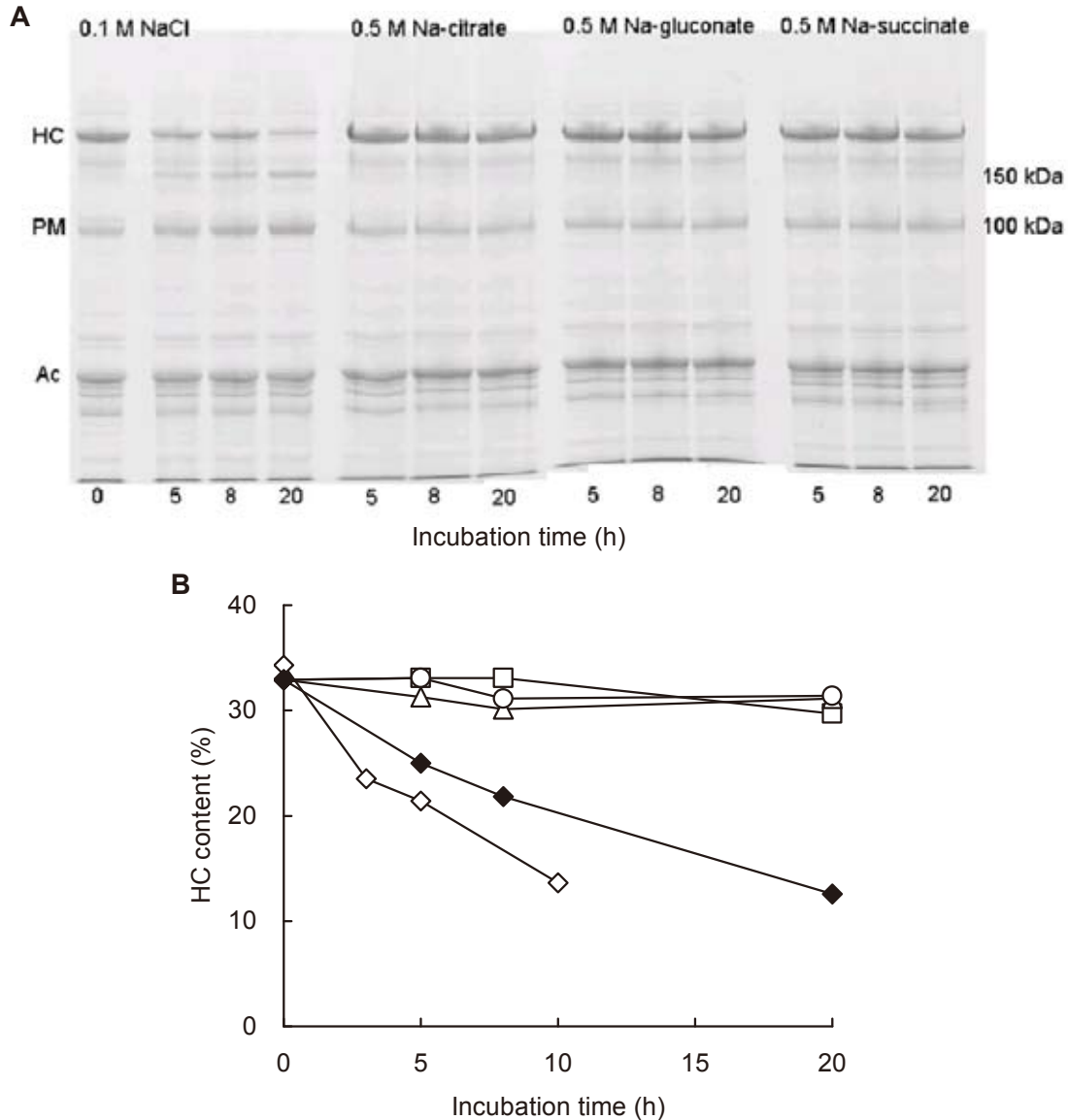


Fig. 2 Effect of NaCl and several organic salts on the myosin degradation in squid meat homogenate incubated at 5 °C. Squid meat homogenate was incubated at 5 °C with 0.1 M NaCl (◆), 0.5 M NaCl (◇), 0.5 M Na-citrate (○), 0.5 M Na-tartrate (□), and 0.5 M Na-gluconate. (A), SDS-PAGE patterns for the incubated homogenates. (B), Remaining myosin heavy chain content was estimated from the patterns in (A) as in Fig. 1. The same abbreviations as in Fig. 1 were used.

た時の SDS-PAGE パターンを抜き出し、Fig. 3 に示した。無添加区 (B) においては、HC の減少および 150 kDa 付近のバンドの生成が明瞭に認められた。EDTA を加えた場合 (C) はそれらがほとんど生成されなかった。EDTA の代わりにクエン酸 Na (D)、酒石酸 Na (E) およびグルコン酸 Na (F) を添加すると、HC の分解、150 kDa 成分の生成が阻害された。この結果から、5°C においては、いずれの有機酸塩を用いた場合でも 0.5 M 以上であれば、金属プロテアーゼを十分に抑制できることがわかった。

ここで用いた 3 種の有機酸塩は、イカ筋肉に含まれる金属プロテアーゼの阻害作用を有することが判明したので、それらの阻害の強さを比較した。そのため、様々な濃度の各有機酸塩をホモジネートに添加し、5°C で 20 時間保持した。そして、残存 HC の相対染色強度を抑制の指標として求め、Fig. 4A に示した。また、HC からの分解生成物を X1(PM)成分として定量し、Fig. 4B に示した。

調製直後のイカ肉ホモジネート中の HC 量は 33%であったが、5°C で保持することによって無添加区では 13%にまで低下した。クエン酸 Na、酒石酸 Na およびグルコン酸 Na のいずれを添加しても、添加濃度が高くなるに従い、ミオシンの分解が抑制され、残存 HC 量が増加した。クエン酸 Na の場合は、用いた最小濃度である 0.1 M の添加でも、残存 HC 量は 29%を維持し、比較的 low 濃度でもミオシンの分解を抑制することが認められた。そして、0.3 M 付近ではほぼ完全に阻害していた。一方、酒石酸 Na およびグルコン酸 Na においても、明らかにプロテアーゼ阻害活性を示すことが分かった。しかし、グルコン酸 Na はクエン酸 Na より効果が小さく、さらに酒石酸 Na の効果は低かった。これは、Fig. 4B の X1(PM)成分の定量からも支持された。しかし、いずれの塩も 0.5 M 以上の添加では、ミオシンの分解をほぼ完全に抑制したので、用いる濃度さえ十分に高ければ、3 種とも自己消化抑制化合物として使用できると判断した。

イカ肉に内在する自己消化酵素は、NaCl 添加によりミオシンが溶解すると、作用しやすくなる

(Konno ら 2002)。そこで、NaCl 存在下の分解が促進される条件において、イカ肉ホモジネートに各有機酸塩を加えた場合に、抑制作用が同じように検出されるかどうかを検討した。供試スルメイカ肉中の塩分濃度を測定したところ、NaCl 換算値で 0.13 M であった。そこで、それに対して NaCl を 0.5 M まで添加し、最終濃度が 0.13 M から 0.63 M としたホモジネートを作成した。この NaCl のみ加えたものを対照とし、これに対して 5 mM EDTA、0.5 M クエン酸 Na、および 0.5 M グルコン酸 Na を加えた試料を作成し、5°C に 20 時間保持した。得られたホモジネート中の残存 HC の相対染色強度を Fig. 5 に示した。すると、NaCl 単独の場合の自己消化は、0.3 M NaCl 付近で最大となり、既報の結果 (Konno and Fukazawa 1993, Konno ら 2002) と同じであった。0.1 M NaCl では、ミオシンがフィラメントを形成することでプロテアーゼによる切断部位 (HMM/LMM) が保護されているため、分解の程度は小さいと考えられた。なお、この現象はフィラメント状態の骨格筋ミオシンの HMM/LMM 部位が、キモトリプシンによって消化されなくなる場合と類似した現象である (Weed and Pope 1977)。なお、0.3 M 以上の NaCl 濃度では、次第に残存 HC 含量は高くなり、プロテアーゼ活性が NaCl によって阻害される傾向が認められた。これに、EDTA、クエン酸 Na あるいはグルコン酸 Na を加えると、NaCl 濃度にかかわらず分解による HC の減少は認められず、ホモジネート調製直後 (34%) と近似する値 (31-33%) となった。この結果は、これら有機酸塩の阻害作用は、NaCl による促進作用を上回り、5°C の低温保存下では、NaCl による内在酵素の分解促進が起こる状態においても分解抑制作用が発現し、0.5 M のクエン酸 Na およびグルコン酸 Na は、EDTA とほぼ同程度の自己消化抑制効果を示すことが明らかとなった。

ここで用いた 3 種の有機酸塩は、いずれもスルメイカ肉の自己消化を抑制したが、その中でクエン酸 Na は最も低濃度で抑制作用を示すことが明らかとなった。これら有機酸塩による金属プロテ

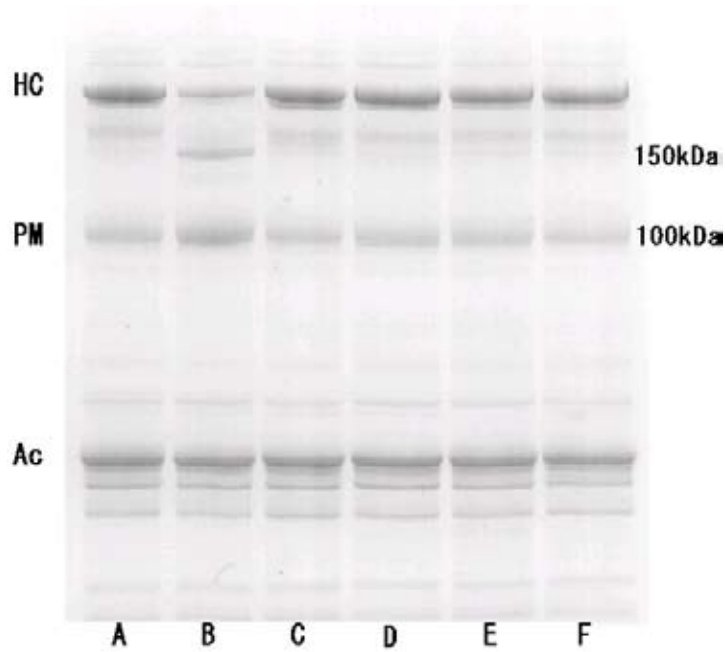


Fig. 3 SDS-PAGE patterns of squid meat homogenate incubated with organic salts at 5 °C. Squid meat homogenate was incubated at 5 °C for 20 hours as in Fig. 2 with 0.5 M Na-citrate (D), 0.5 M Na-tartrate (E), and 0.5 M Na-gluconate (F). (A), (B), and (C) are the homogenate before incubation, one incubated without additives, and one incubation with 5 mM EDTA, respectively. The abbreviations as in Fig. 1 were used.

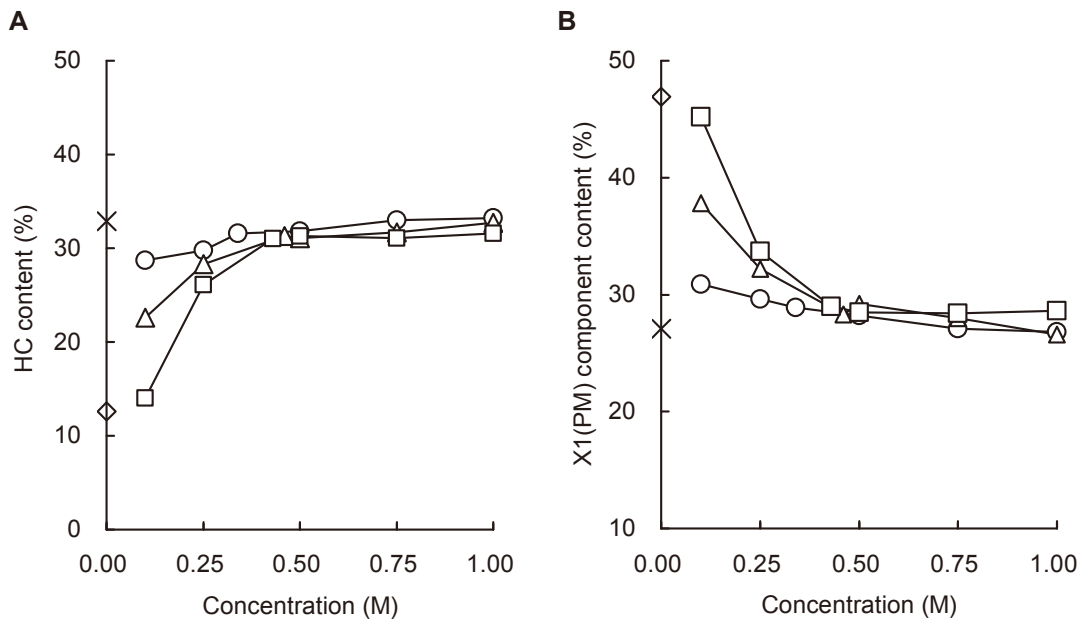


Fig. 4 Concentration dependent suppression of myosin degradation by organic salts. Squid meat homogenate was incubated at 5 °C for 20 hours with various concentrations of Na-citrate (O), Na-tartrate (□), and Na-gluconate (Δ). The homogenate without additives (◇) was also studied. (×) denotes HC content before incubation. (A) and (B) are changes in myosin heavy chain content and X1(PM) component contents, respectively.

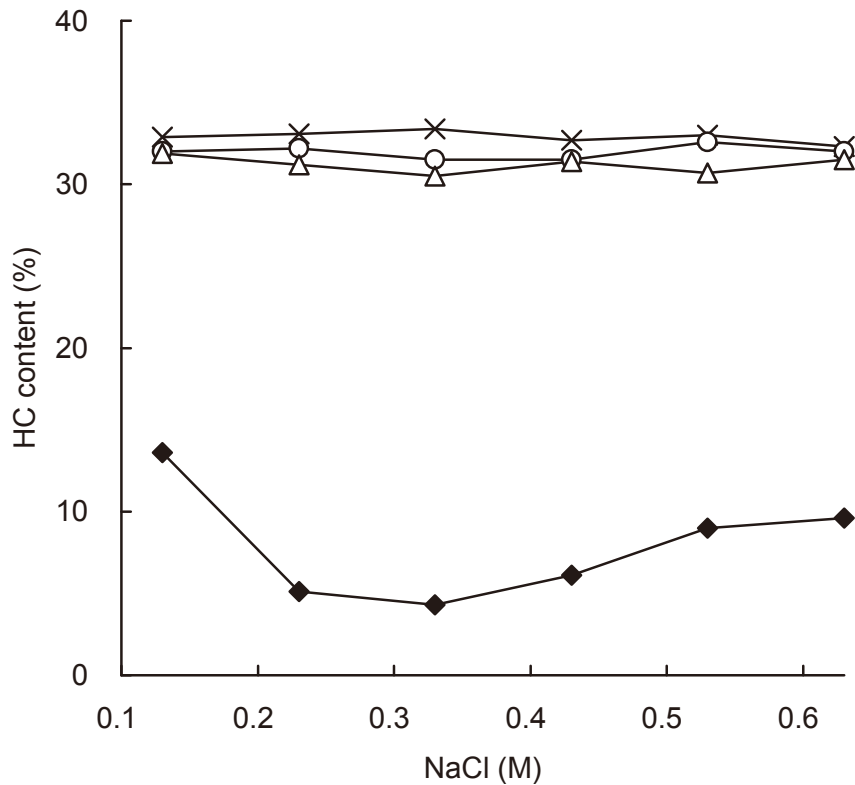


Fig. 5 Suppressive effect of organic salts on myosin degradation in the presence of NaCl. Squid meat homogenate was incubated at 5 °C for 20 hours with either 5 mM EDTA (×), 0.5 M Na-citrate (O), 0.5 M Na-gluconate (Δ) together with various concentrations of NaCl. (◆) denotes the result with NaCl alone.

アーゼ抑制効果は、これらの化合物によるキレート作用が反応機序であると推測された。そこで、キレート作用を確認するため  $\text{Ca}^{2+}$  をモデル金属イオンとして検討した。50 mM  $\text{CaCl}_2$  (pH7.0) 溶液に対し、中和したクエン酸 Na 溶液を加え、そのときの遊離の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を  $\text{Ca}^{2+}$  電極で測定した。 $\text{CaCl}_2$  溶液にクエン酸 Na を徐々に加えていくと、遊離  $\text{Ca}^{2+}$  濃度は次第に低下し、クエン酸 Na にはキレート作用があることを確かめた。なお、クエン酸 Na が 10 mM のときの遊離  $\text{Ca}^{2+}$  濃度から、 $\text{Ca}^{2+}$  とクエン酸 Na の結合定数を求めたところ  $1.94 \times 10^2 \text{ (M}^{-1}\text{)}$  と算出された。

次に、キレート滴定法により、クエン酸 Na のキレート作用を EDTA およびグルコン酸 Na と比較した。ここでも、モデルイオンは  $\text{Ca}^{2+}$  とした。様々な濃度の  $\text{Ca}^{2+}$  を含む溶液をクエン酸 Na, グルコン酸 Na および EDTA 溶液で滴定し、用いた  $\text{CaCl}_2$  濃度に対して、キレートするために要した化合物の滴定量をプロットし、結果を Fig. 6 に示した。使用した溶液中の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度と滴定に用いた各種化合物の濃度との間には直線関係が得られたので、両者は定量的な反応をしていることが確認された。クエン酸 Na は、グルコン酸 Na に比べると明らかに低濃度で  $\text{Ca}^{2+}$  をキレートしたが (Fig.



6A), EDTA に比べると明らかに高濃度を必要とした (Fig. 6B)。たとえば, 0.5 mM の  $\text{Ca}^{2+}$  をキレートするのに必要な EDTA 濃度は約 0.5 mM であるのに対して, クエン酸 Na は 8 mM, グルコン酸

Na はさらに高濃度の 37 mM を必要とした。得られた直線の傾きから, キレート作用の大きさを EDTA と比較すると, クエン酸 Na は 1/17, グルコン酸 Na は 1/114 であった (Fig. 6C)。

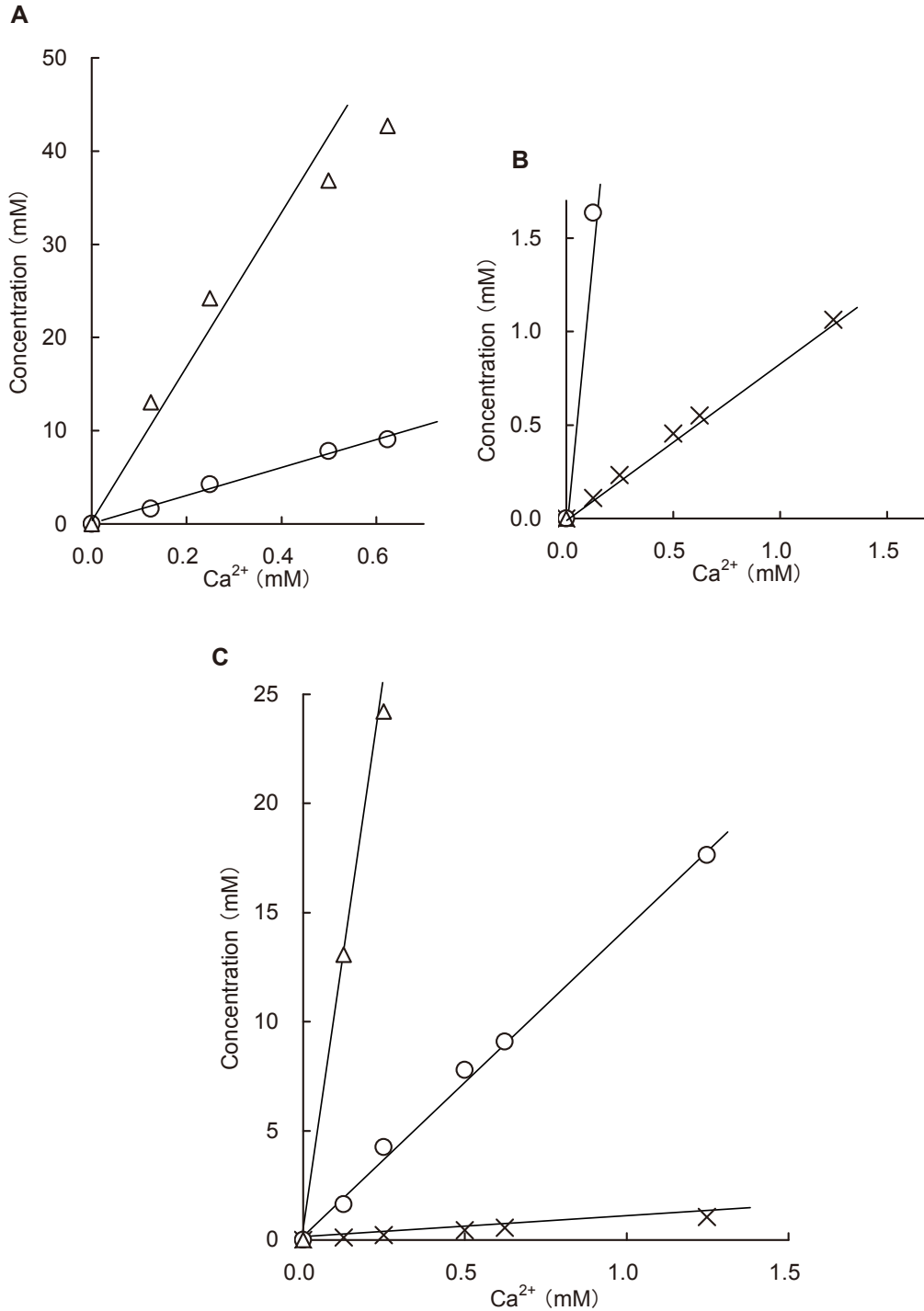


Fig. 6 Comparison of the chelating ability of organic salts with EDTA. Calcium ion at various concentrations were titrated with 0.01 M EDTA (cross marks in B and C), 0.1 M Na-citrate (circles in A, B, and C) and 0.5 M Na-gluconate (triangles in A and C). Concentrations of titrants required for a complete chelation were plotted against calcium ion concentrations.

(2) 25°Cにおけるミオシン分解に対する有機酸塩の影響

各種有機酸塩は 5°Cの低温下では、モデルとしたスルメイカ肉ホモジネート中ミオシンの分解をほぼ完全に抑制することが明らかとなった。そこで、保存温度を 25°Cに上昇させ、それらの阻害作用を比較した。ホモジネートに 0.5 M のクエン酸 Na, 酒石酸 Na およびグルコン酸 Na, あるいは 5 mM の EDTA を加えて、25°Cに保持した場合の HC 量の変化を Fig. 7 に示した。ミオシンの分解を確認するため、5°Cの場合は 20 時間まで反応を追

跡する必要があったが、25°Cでは 5 時間までの加温中に HC 量の減少が起き、対照の無添加の系では 32%から 6%にまで低下した。5°Cの場合、0.5 M のクエン酸 Na, 酒石酸 Na およびグルコン酸 Na は、ほぼ完全に HC 量の減少を抑制したが (Fig. 2), 25°Cではこれらの抑制効果は異なった。クエン酸 Na は EDTA と同等の抑制作用を示し、HC の減少を強く抑制したが、酒石酸 Na およびグルコン酸 Na は、抑制作用が認められるものの、0.5 M の濃度で加えても、抑制作用は明らかに小さかった。

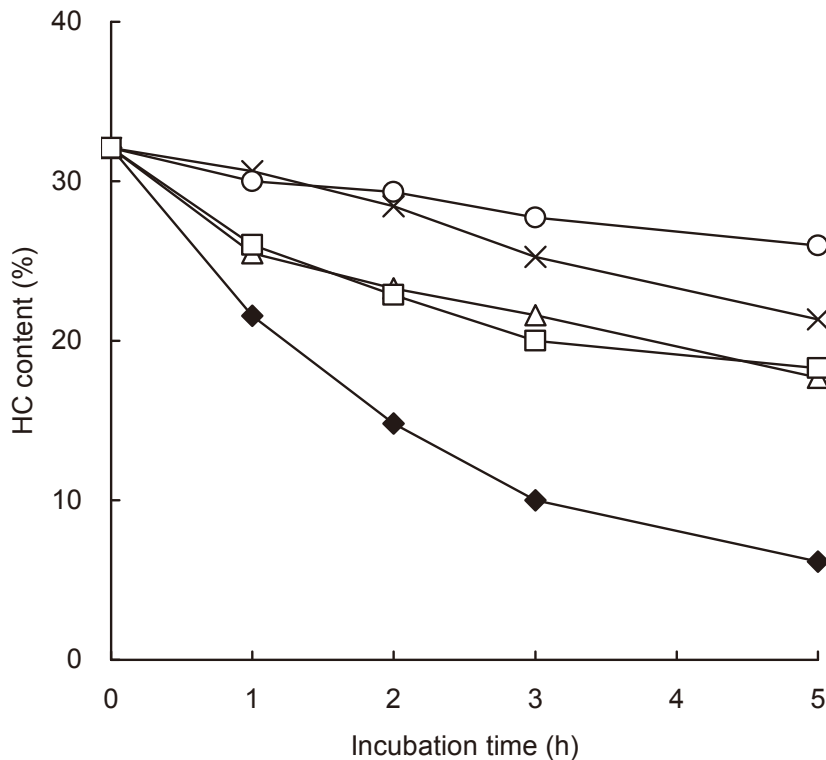


Fig. 7 Suppressive effect of organic salts on the myosin degradation in squid meat homogenate at 25 °C. Basic procedures were the same as in Fig.2 except the incubation temperature. Squid meat homogenate in 0.1 M NaCl, pH 7.0 was incubated at 25 °C without additives (◆), with 5 mM EDTA (×), with 0.5 M Na-citrate (○), with Na-tartrate (□), or with Na-gluconate (△) respectively. Decrease in myosin heavy chain content was estimated from the SDS-PAGE pattern of the homogenate.

次に、クエン酸 Na, コハク酸 Na およびグルコン酸 Na の 25°Cでの抑制作用について濃度を変えて検討した。ここでは、酒石酸 Na に換えて、同じ2価のカルボン酸であるコハク酸 Na を用いた。25°Cで5時間イカ肉ホモジネートを保持した時の、残存 HC 量を Fig. 8A に示した。Fig. 5 の実験結果から、高濃度の NaCl は逆に自己消化を抑制することが示唆されたため、高濃度域に注目して検討を加えた。25°Cにおいても低温での結果と同じように、NaCl 濃度が 0.3 M 付近で最も自己消化が進み、HC は痕跡程度にまで低下した。さらに、NaCl 濃度を 1.0 M 付近まで上昇させると、明らかに自己消化が抑制された。クエン酸 Na は、かなり低い濃度の添加でもミオシン分解を抑制し、約 0.25 M 以上の添加で、HC 量は加温前の値に近づき、ほとんど自己消化は認められなくなった。グルコン酸 Na の場合は NaCl を添加した場合と類似し、低濃度の添加ではかえって自己消化を促進させる現象が認められ、約 0.35 M で最も自己消化が促進された。それ以上の濃度になると濃度依存的に阻害が認められ、最大阻害を引き出すためには、約 1.0 M 付近まで上昇させる必要があった。コハク酸 Na の全体的な濃度依存性は NaCl の場合と同様で、約 0.2 M で最大分解を示した。そして、0.2 M のコハク酸 Na を加えた方が NaCl を加えた場合より著しいミオシン分解が起こった。それ以上の濃度では、濃度上昇とともに自己消化の抑制作用が認められたが、その程度はクエン酸 Na やグルコン酸 Na に比べると小さく、1.0 M まで上昇させても完全な抑制は認められなかったため、抑制作用は小さいと判断した。

一般的に、食品に添加物を加える場合は重量%で添加される。そこで、Fig. 8A で得られた3種の有機酸塩および食塩の作用を%濃度に換算し Fig. 8B に示した。その結果、%濃度で評価してもクエン酸 Na の自己消化抑制作用は、グルコン酸 Na やコハク酸 Na よりも高いことが明らかであり、約 8%のクエン酸 Na の添加で自己消化をほぼ完全に抑制した。グルコン酸 Na およびコハク酸 Na の作用は同じ程度であり、抑制には 20%の添加が

必要であった。また、NaCl の場合 Fig. 8A では 1 M までしか示さなかったが、さらに濃度を上昇させて詳細に調べた結果、20%程度にまで濃度を上昇させると、自己消化をかなり抑制することが示された。それゆえ、非常に高濃度の食塩を加えるイカ製品、たとえばイカの塩辛の製造中には、筋肉由来のプロテアーゼによる分解が抑制されている可能性も示唆された。また、高濃度の NaCl の使用は自己消化抑制手段の一つであることを初めて示したが、これ以上の検討は行わなかった。

### (3) 35°Cにおけるミオシン分解に対する有機酸塩の影響

スルメイカ筋肉の自己消化の研究から 35°Cでは、金属プロテアーゼに加え、セリンプロテアーゼによる分解も顕著に検出されることが知られている (Konno and Fukazawa 1993)。そこで、イカ肉ホモジネートを 35°Cに保持した場合の有機酸塩添加によるミオシン分解抑制作用を調べた。35°Cで5時間まで加温したときのホモジネートの SDS-PAGE パターンを示した (Fig. 9)。また、得られた泳動パターンから残存 HC 量 (Fig. 10) を求めた。なお、この実験ではプロテアーゼ阻害剤として EDTA に加え、セリンプロテアーゼの阻害剤である PMSF も使用した。Fig. 9 に示したように、この温度では 25°Cよりもさらにミオシンの分解は顕著になり、無添加ホモジネートでの HC 量は1時間で大きく減少し、7%に達した。それ以降は漸減し痕跡程度となった。また、5°Cや 25°Cでは HC からの分解生成物として 150 kDa や 100 kDa のバンドが検出されたが、35°Cではそれらの蓄積は認められなかった。この結果は、金属プロテアーゼにより生成したこれら断片がさらに内部で切断されたことを示唆する。

EDTA を添加しても 25°Cとは異なり、HC の分解はあまり抑制されなかった。そして、生成した断片は低温の場合と異なり、190 および 55 kDa 付近の新たなバンドであった。この分解は、セリンプロテアーゼによるミオシン分解生成物と考えられた (Konno and Fukazawa 1993)。逆に、セリンプロテアーゼの阻害剤である PMSF を加えると、こ

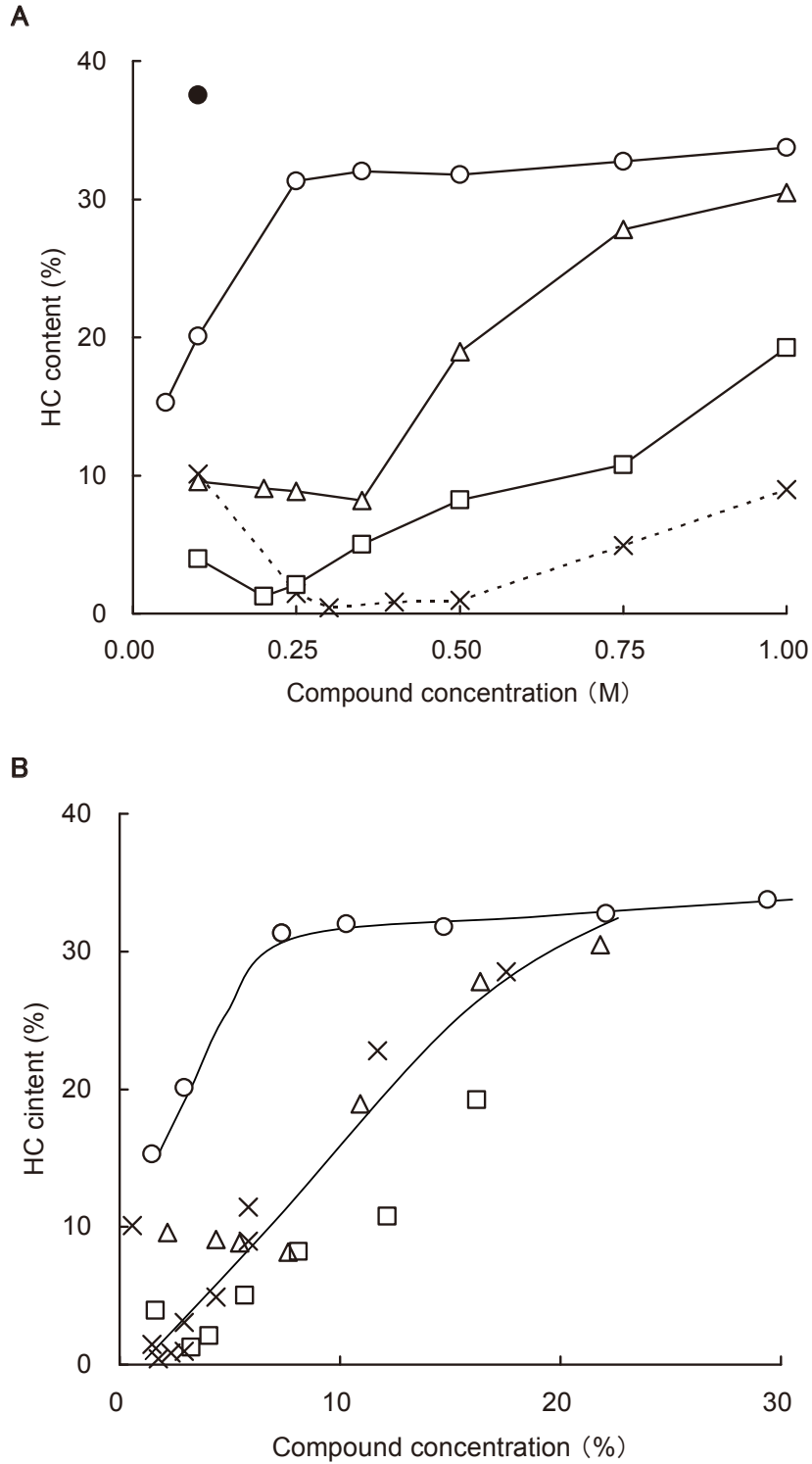


Fig. 8 Suppression of myosin degradation by organic salts. Squid meat homogenates in the presence of various concentrations of NaCl (cross marks), Na-citrate (circles), Na-succinate (squares), or Na-gluconate (triangles) were incubated at 25 °C for 5 hours. Remaining myosin heavy chain contents as estimated from the SDS-PAGE patterns were plotted as a function of the concentrations of salts in molar (A) or percent (W/V) bases (B). The closed circle in (A) denotes heavy chain content for the suspension before incubation.

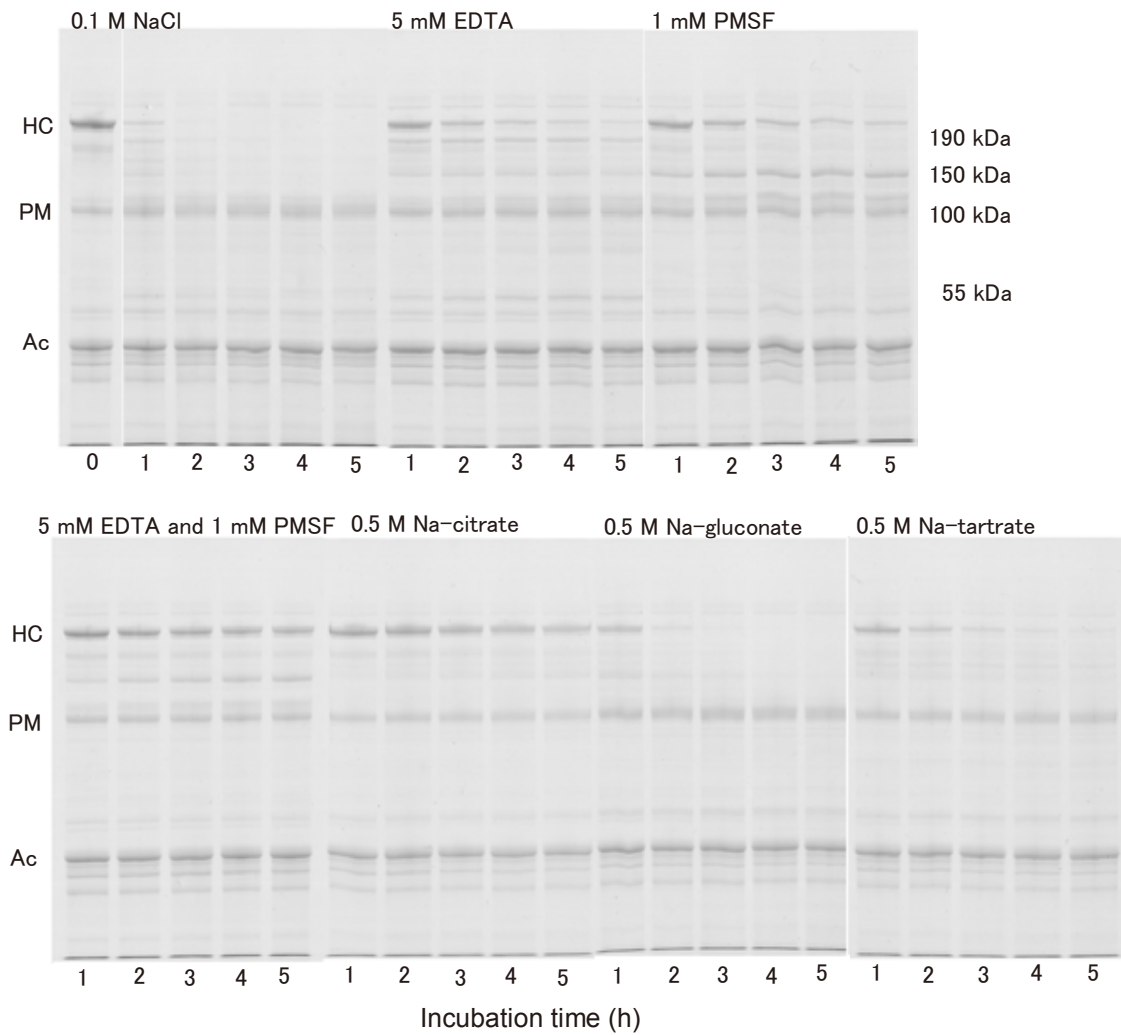


Fig. 9 Myosin degradation at 35 °C and the suppression by organic salts. Squid meat homogenate in 0.1 M NaCl was incubated at 35 °C without additives (0.1 M NaCl), with 5 mM EDTA, with 1 mM PMSF, with 5mM EDTA and 1 mM PMSF, with 0.5 M Na-citrate, with 0.5 M Na-tartrate or with 0.5 M Na-gluconate. The myosin degradation pattern was analyzed on SDS-PAGE. HC, PM and Ac stand for myosin heavy chain, paramyosin and actin, respectively. The 190 kDa, 150 kDa, 100 kDa, and 55 kDa are the degraded myosin heavy chain fragments produced.

これらの生成は認められなくなり、低温で見出された金属プロテアーゼによるミオシン HC の消化生成物である 150 および 100 kDa のバンドが現れた。この温度では PMSF は EDTA よりもミオシンの分解を強く抑制したので、セリンプロテアーゼによるミオシン分解が顕著であると判断した。そこで、PMSF と EDTA の両方を加えると、分解はかなり抑えられ、それぞれ単独の添加で認められた生成物が少量検出されたが、残存 HC 量は 5 時間後でも 21% と高い値を維持していたので、2 種の阻害剤の組み合わせは、十分に高い阻害効果があると判断した。しかし、セリンプロテアーゼの阻害剤である PMSF は、もちろん食品には添加できない。これまで、食品に添加可能なセリンプロテアーゼ

の阻害剤が存在することが報告されているので、ジャガイモ添加 (Konno and Fukazawa 1993) はセリンプロテアーゼを抑制する手段の一つと考えられる。

クエン酸 Na を添加すると、EDTA+PMSF 添加の系と同じように、ミオシン HC の減少はほとんど観察されず、分解生成物と推定される明瞭なバンドも検出されなかった。これらのことから、クエン酸 Na は金属プロテアーゼだけではなく、セリンプロテアーゼも抑制している可能性が推察された。しかも、他の 2 種のグルコン酸 Na、酒石酸 Na では、ほとんど阻害活性が認められないことを考えると、有機酸塩の中でもクエン酸 Na は非常に特徴的な阻害活性を示すことが明らかになった。

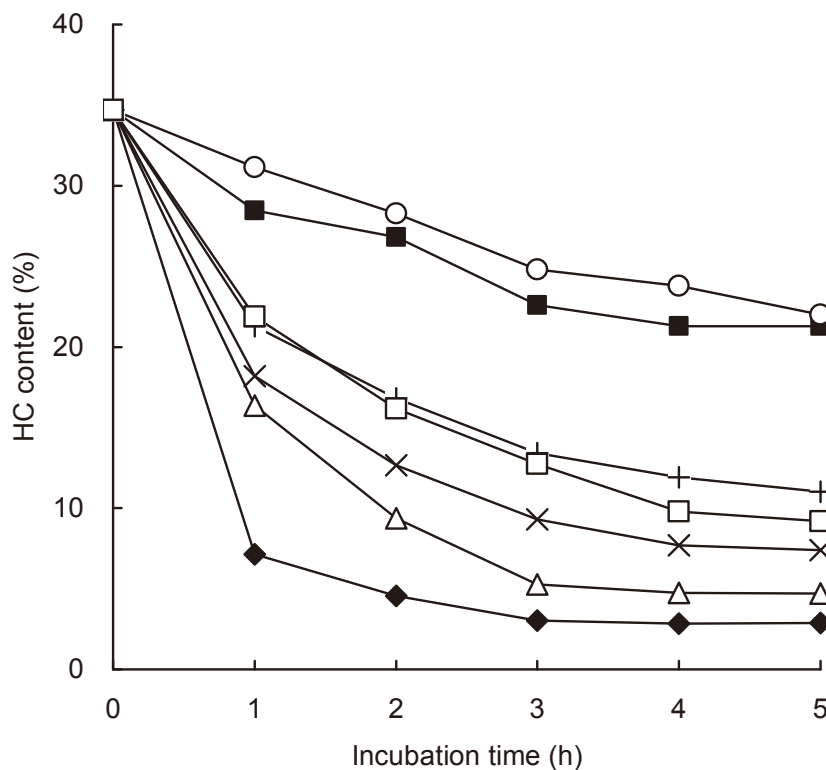


Fig. 10 Effect of organic salts on the myosin degradation in squid meat homogenate at 35 °C. Myosin heavy chain contents in the pattern shown in Fig. 9 were estimated. The incubation medium contained no additives (◆), 5 mM EDTA (×), 0.5 M Na-citrate (○), Na-tartrate (□), Na-gluconate (Δ), 1 mM PMSF (+), or 1 mM PMSF and 5 mM EDTA (■), respectively.

各種化合物の自己消化抑制作用は温度によって大きく変化することが明らかとなったので、加温温度による阻害程度の違いを 25, 35, および 45°C で比較した。用いた化合物は、NaCl, クエン酸 Na, およびグルコン酸 Na である。分解に伴う HC 量の低下を測定し、Fig. 11 に示した。0.5 M NaCl 存在下で測定した場合、3 つの温度で HC の分解が最も速やかなのは最も低温の 25°C であり、35, 45°C の順に遅くなった。この結果から、自己消化に関わるプロテアーゼはそれほど安定でなく、温度上昇に伴い、プロテアーゼの熱失活が起こっていることが推定された。クエン酸 Na の場合はいずれの温度でも、分解の程度が小さく、温度によらず抑制していることを確認した。この結果には、プロテアーゼ活性に対する温度の影響、酵素失活に対する温度の影響、および、各温度でのクエン酸 Na による活性抑制作用という、複数の因子が

影響しているものと考えられる。いずれにせよ、クエン酸 Na は、どの温度でも自己消化を抑制すると結論した。

グルコン酸 Na を添加した場合の 25°C での自己消化の進行速度は NaCl より小さく、抑制作用が確認されたが、35°C では NaCl よりかなり速く HC 量は減少した。すでに、ソルビトールを添加すると、プロテアーゼそのものが安定化を受け、失活が抑制され、無添加では起こらない高温でも自己消化が進むことが報告されている (Konno ら 2002)。また、グルコン酸 Na にはソルビトールと同等の変性抑制効果が報告されている (竹下ら 1999)。従って、ソルビトールと構造の類似するグルコン酸 Na も、逆にプロテアーゼの熱失活を抑制し、分解を促進したものと考えられた。それは、45°C でも同程度の分解が進行していることから支持された。

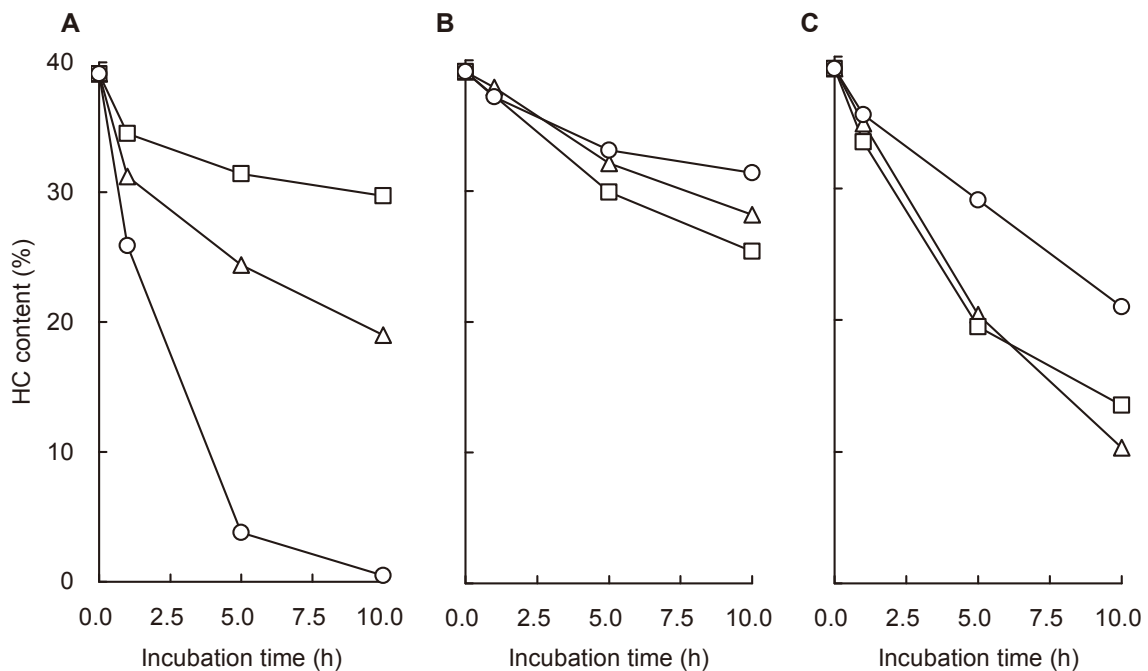


Fig. 11 Effect of temperatures on the myosin degradation in the presence of various salts. Squid meat homogenate was incubated at 25 (circles), 35 (triangles), 45 (squares) °C in the presence of either 0.5 M NaCl (A), 0.5 M Na-citrate (B), or 0.5 M Na-gluconate (C). Decrease in myosin heavy chain contents was estimated from the SDS-PAGE patterns of the homogenates.

## 小考察

本章では、スルメイカ外套膜をねり製品原料として利用する上で、大きな障害となっている内在性プロテアーゼの制御を目的に研究を行った。このプロテアーゼは、活性中心に Zn または Co を有する金属プロテアーゼであることが知られており (Okamoto ら 1993)、試験管の中では EDTA や *o*-フェナンスロリンなどのキレート剤で阻害できる (江原ら 1992, Konno and Fukazawa 1993)。しかし、これまで、多様な食品に添加が許可されている食品添加物の中で、本酵素を阻害できる化合物の報告はない。そこで、本研究は EDTA と同じように分子内にカルボキシル基を持つ有機酸塩に注目した。すなわち、それらの有するキレート作用を用い、スルメイカ外套膜に含まれている金属プロテアーゼから金属イオンを奪い、ミオシン分解を抑制する試みを行った。試験に用いた有機酸塩は、3 価のカルボン酸であるクエン酸 Na, 2 価のカルボン酸であるコハク酸 Na および酒石酸 Na, さらにグルコースの誘導体であり、1 価のカルボン酸であるグルコン酸 Na である。これらのミオシン分解抑制作用を調べるために、スルメイカ外套膜筋ホモジネートをモデル系として実験を行った。さらに、抑制作用に対する温度の影響を調べるため、処理温度を変えて詳細に検討した。

低温下 (5°C) では、いずれの有機酸塩も一様に自己消化を抑制し、ほぼ完全阻害が得られ、価数に関係なく、試験した有機酸塩を高濃度添加すれば、EDTA と同等のミオシン分解阻害作用を示した。試験に用いた有機酸塩の中では、クエン酸 Na

が最も低濃度で顕著な抑制作用を示し、0.25 M 付近の低濃度でミオシンの分解を完全に抑制した。

処理温度を 25°C にすると、クエン酸 Na 以外の有機酸塩の阻害作用は小さくなり、十分な効果が得られないことを見出した。本研究の結果からクエン酸 Na は唯一、EDTA に匹敵する自己消化抑制作用を有する化合物であることが明らかとなった。キレート滴定により、そのキレート作用を EDTA と比較したところ、Ca<sup>2+</sup> に対する結合の強さは EDTA の 1/17 程度で、自己消化を阻害した濃度 (EDTA で 5 mM, クエン酸 Na で 100 mM) の比に類似したことから、クエン酸 Na による阻害作用は金属キレート作用であると判断した。

さらに高温の 35°C では、金属プロテアーゼに加え、セリンプロテアーゼの作用も発現しており、それを阻害するには EDTA とともに、PMSF を加える必要があった。この条件でも、クエン酸 Na 単独の添加は EDTA + PMSF と同程度の抑制を示した。クエン酸 Na がどのような作用でセリンプロテアーゼの活性阻害を引き起こすのか不明であるが、クエン酸の官能基がセリンプロテアーゼの活性中心にあるセリンの水酸基に直接作用するとは考えにくいので、間接的な効果かもしれない。たとえば、基質となるミオシンに対して、分解されないような安定化、あるいは保護している可能性がある。いずれにせよクエン酸 Na は、イカ筋肉に内在する強い 2 種類のプロテアーゼを阻害する食品添加物として、ねり製品などの製造に使用可能であると判断した。



## 第2章 各種有機酸塩によるスルメイカ筋原繊維の溶解

本研究の主たる目標の一つは、これまで自己消化の問題により製品化できなかったスルメイカ筋肉についての、ねり製品化法を開発することにある。第1章では、スルメイカ外套膜筋の利用加工で大きな問題である自己消化によるミオシンの分解が、有機酸塩、特にクエン酸 Na を 0.25 M 程度加えると、ほとんどの温度帯でほぼ完全に抑制できることを、筋肉ホモジネートを用いた実験から明らかにした。一方、ねり製品製造工程には、魚肉あるいはすり身に 3%程度の食塩を加え、筋原繊維を溶解する操作がある。これは、生理的イオン強度下でミオシン分子同士の静電的イオン結合によって形成されるフィラメント構造を、高濃度の塩を加えることによって崩壊させ、ミオシンを単量体に解離させる反応である。この場合、現場で使用される「塩」は食塩 (NaCl) であるが、スルメイカ筋肉の自己消化を抑制させた各有機酸の Na 塩も「塩」の一種である。そこで、第2章ではこれら有機酸塩による筋原繊維の溶解作用について検討することにした。

有機酸塩による筋原繊維の溶解について、すでに竹下ら (1999) は、第1章でも使用した1価のカルボン酸であるグルコン酸 Na が、魚肉筋原繊維を溶解させる性質を有することを報告している。第1章において、筋肉ホモジネートを用いてスルメイカ肉の自己消化抑制作用を検討している際に、有機酸塩を添加すると、肉眼的に筋肉ホモジネートが透明になり溶解している現象を認めた。そこで、クエン酸 Na を主体とした有機酸塩が、スルメイカ肉筋原繊維の塩溶解性に及ぼす影響を詳細に検討することにした。すなわち、スルメイカ肉の自己消化を強く抑制するクエン酸 Na が、スルメイカ肉筋原繊維の塩溶解性を有していれば、自己消化を停止させると同時に、食塩の添加なしにイカ肉筋原繊維を溶解することとなり、新たなタイプの加熱ゲルの開発が可能になると考えた。

### (1) NaCl によるイカ肉筋原繊維の溶解性

イカ筋肉から調製した筋肉ホモジネート (希釈により、ほぼ NaCl 濃度を無視できる) に対して様々な濃度の NaCl を加え、5°Cで6時間保持したのちに遠心分離し、上澄みに溶解されたタンパク質を回収した。そして、遠心分離前の全タンパク質に対する比をタンパク質溶解度 (%) と定義し、Fig. 12 に結果を示した。0.2 M 以下の NaCl 濃度では溶解は認められないが、0.3 M 以上になると溶解度は高くなり、0.5 M NaCl での溶解度は約 65% になった。なお、試料として筋肉ホモジネートを用いたため、塩不溶性の筋基質タンパク質は回収されていないので、溶解度は約 65% であるが、後に示すように、筋原繊維構成タンパク質のほとんどが抽出されていることを SDS-PAGE により確認した。また、第1章において、自己消化を強く阻害した 5 mM EDTA には、溶解作用は認められなかった。

Fig. 12 の検討では、抽出時間を6時間に固定したが、十分な溶解が起きない可能性もあった。そこで、0.5 M NaCl に調製したイカ肉ホモジネートを 5°Cで24時間まで保持し、溶解度の変化を Fig. 13 に示した。溶解は、NaCl 添加後短時間で起こり、1時間ではほぼ最大の 71% となり、その後の増加は認められなかった。肉眼的にホモジネートの透明化が観察されたので、同じ試料を用いて、350nm で測定した濁度から簡便に可溶化を判断できないか検討した。Konno ら (1997) は筋原繊維懸濁液の濁度から筋原繊維の溶解を簡便に測定できることを報告している。そこで、濁度法で求めた溶解性と遠心分離法で求めた溶解性の関係を Fig. 14 に示した。これによると、イカ肉ホモジネートを用いた場合も、溶解度と濁度との間には、高い直線性をもつ有意な負の相関 ( $P < 0.01$ ) が認められた。この結果から、筋原繊維懸濁液のみならず、イカ肉を直接ホモジナイズしたホモジネートを用いた場合においても、濁度は筋原繊維の溶解を検出出来ることが明らかとなった。ホモジネートの濁度の変化を測定することは、様々な添加物を加えてねり製品を生産する製造現場において、筋原繊維の溶解を簡便に判断出来る優れた手法で

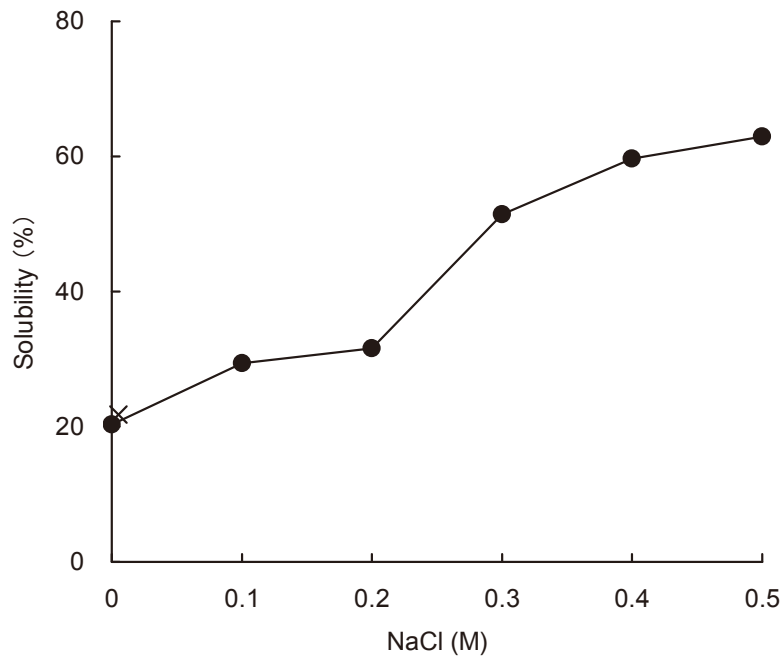


Fig. 12 Solubilization of squid meat homogenate with NaCl. Squid meat homogenate was incubated for 6 hours at 5 °C with various concentrations of NaCl (●), or with 5 mM EDTA (×). The mixture was centrifuged at 20,000 × g for 30 min. Protein content in the supernatant was estimated and the ratio to total protein content was calculated as solubility.

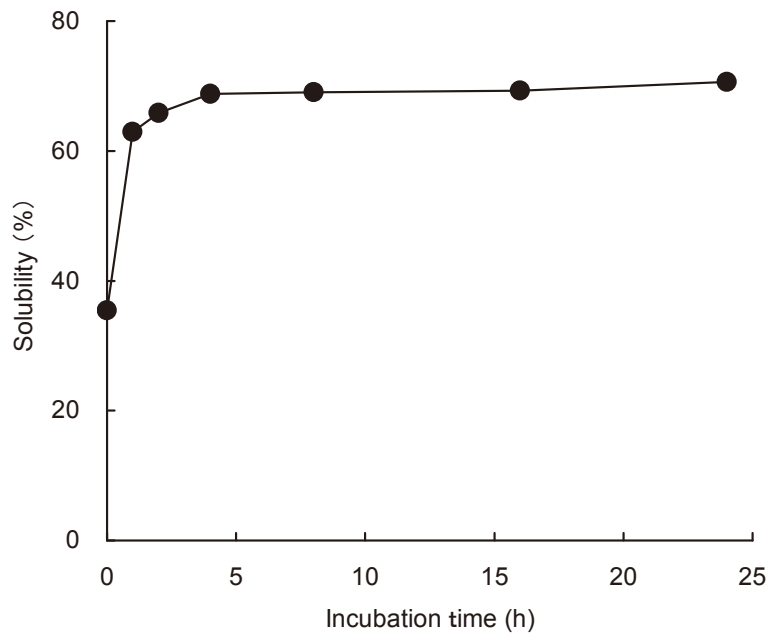


Fig. 13 Time dependent solubilization of squid muscle proteins with 0.5 M NaCl. Squid meat homogenate was incubated with 0.5 M NaCl at 5 °C for various time. The procedures to calculate the solubility was the same as in Fig. 12.

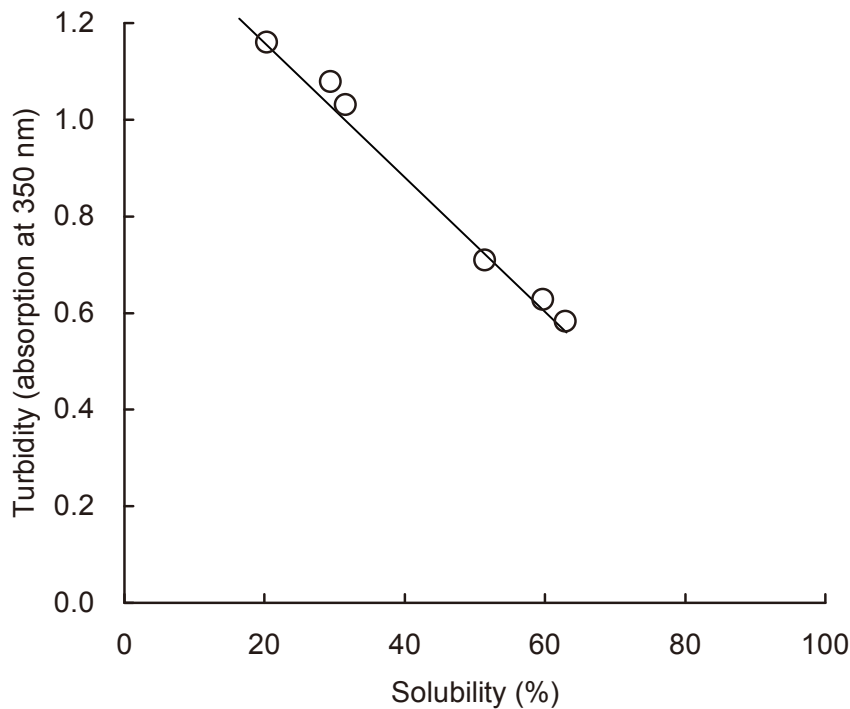


Fig. 14 Turbidity of the muscle homogenate as an index of solubility. The muscle homogenate was suspended in various concentrations of NaCl as in Fig. 12, and their absorption was measured at 350 nm. The same mixtures were centrifuged to estimate solubility as in Fig. 12, too. The absorptions were plotted as the function of solubility.

ある。

## (2) 有機酸塩によるイカ肉筋原繊維の溶解性

筋原繊維懸濁液を用いて、有機酸塩による筋原繊維の溶解を濁度法で検討した。筋原繊維懸濁液に高濃度の各種化合物溶液を、所定濃度になるように加えた。このとき、最終タンパク質濃度はすべて一定 (0.6 mg/ml) となるように調節した。この筋原繊維懸濁液の 350 nm における吸光値を測定し、筋原繊維懸濁液の濁度とし、この値の減少を溶解の指標とした。なお、前述したように Konno ら (1997) は筋原繊維懸濁液の濁度が、筋原繊維の溶解を定量的に反映することを明らかにしており、予めイカ筋原繊維懸濁液においてもホモジネ

ートと同様に、可溶化タンパク質量と濁度との間に、高い相関関係があることを確認した。検討した有機酸塩はクエン酸 Na、コハク酸 Na およびグルコン酸 Na であり、それらの溶解作用を NaCl と比較検討した。その結果を Fig. 15 に示した。

まず対照とした NaCl の場合は、0.2 M までは高い濁度を示しているため、筋原繊維構造は保持され、溶解は起きていないことがわかった。しかし、0.25 M 以上の添加で急激な濁度低下が起こり、この濃度の NaCl で筋原繊維の溶解が起こった。そして、約 0.35 M で最小値に達し、この濃度が溶解するのに十分な濃度であると考えられた。この結果は基本的に Fig. 12 の結果と同じであった。

次に、3 価のクエン酸 Na を使用すると、NaCl の場合よりもかなり低濃度から急激な濁度の低下が起こり、0.1-0.15 M でほぼ最小値となった。この結果は、クエン酸 Na は NaCl より強い溶解作用を有することを示している。クエン酸 Na が完全解離していると仮定してイオン強度を計算すると、同濃度の NaCl の 5 倍の値となった。これらの事実から、筋原繊維タンパク質を溶解させるために必要なクエン酸 Na 溶液のイオン強度は、溶解に必要な NaCl のイオン強度を十分に越えると判断した。すなわち、0.1 M クエン酸 Na の添加は、0.5 M NaCl の添加に相当するので、イオン強度の計算上、0.1 M クエン酸 Na による筋原繊維タンパク質の溶解は、当然予想される現象であると思われる。

ただし、高濃度になるとクエン酸 Na と NaCl では、異なる現象が確認された。すなわち、NaCl の場合は、筋原繊維の溶解後 1.0 M まで濃度を上昇させても濁度は低いままであったが、クエン酸 Na の場合は、0.25 M よりも高濃度になると濁度は徐々に増加した (Fig. 15A)。すなわち、何らかの理由で、一度溶解した筋原繊維タンパク質の不

溶化が起きていることが示唆された。この現象については後述する。

さらに 2 価のカルボン酸であるコハク酸 Na による筋原繊維の溶解作用 (Fig. 15C) も、クエン酸 Na 同様 NaCl よりも大きく、やや低い濃度で溶解が確認され、約 0.25 M 付近から濁度は低下し 0.35 M で最小値となった。この現象も、完全解離と仮定したイオン強度が NaCl の 2.5 倍であることを考えると説明できる。また、高濃度のコハク酸 Na を添加すると、クエン酸 Na と同様に、濁度がやや高くなる現象が認められた。これらの結果から、用いた 3 種の有機酸 Na には程度の差こそあれ、NaCl と同等か、あるいはそれよりも強い筋原繊維の溶解作用があると結論した。特に、3 価の酸であるクエン酸 Na の示す溶解作用は非常に強く、NaCl を添加すること無しに筋原繊維の溶解が可能であることを示している。

なお、1 価のグルコン酸 Na を筋原繊維懸濁液に添加しても (Fig. 15B)、濃度上昇に伴って濁度は次第に低下し、溶解作用が認められた。この場合、溶解に必要なグルコン酸 Na 濃度は、NaCl とほぼ同濃度の 0.35 M 付近であった。これは同濃度にお

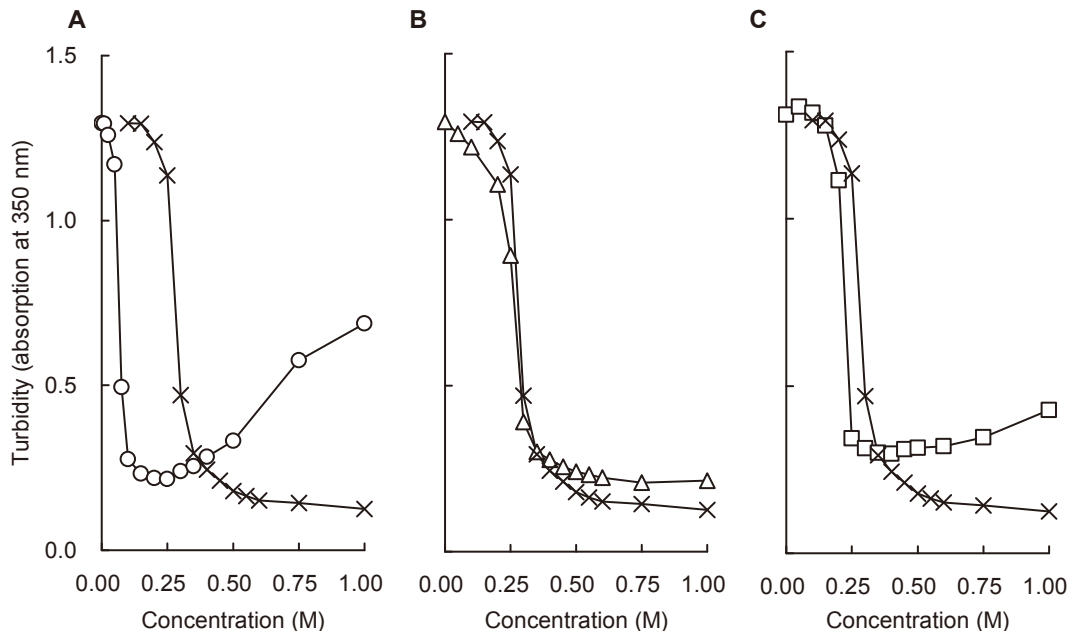


Fig. 15 Solubilization of squid myofibrils with some organic salts. Myofibrils suspension (0.6 mg/ml) was added by various concentrations of NaCl (cross marks in A, B, and C), Na-citrate (circles in A), Na-gluconate (triangles in B), and Na-succinate (squares in C). Turbidity of the suspension was the index of the solubility.

けるグルコン酸Na溶液のイオン強度がNaClのそれと一致するので、当然の結果であると思われる。また、グルコン酸Naの場合は、クエン酸Naのような高濃度の添加による濁度の再上昇は認められなかった。

### (3) 有機酸塩によって溶解する筋原繊維成分

筋原繊維中のミオシンが有機酸塩によって溶解されていることを確認するため、有機酸塩の添加によって濁度の低下した筋原繊維を遠心分離に供し、可溶化成分と不溶成分に分離し、可溶化成分をSDS-PAGEで解析した (Fig. 16)。まず、高い濁度を示した0.1 M NaClに懸濁した筋原繊維では、

上澄みにはほとんどタンパク質が検出されず、ミオシンの溶解は起こっていなかった。しかし、0.5 M NaCl 中では溶解が起こり、上澄みにはミオシンとアクチンのほとんどが回収された。すなわち、この条件では、筋原繊維構成タンパク質のほとんどが抽出されていることを確認した。また0.5 M NaClと同様に、0.1 Mのクエン酸Naを用いてもミオシンやアクチンがほとんど溶解していることが確認できた。さらに、0.5 Mのグルコン酸Naあるいは0.25 Mのコハク酸Naにおいても、遠心上清にミオシンHCとアクチンのバンドが認められ、筋原繊維の溶解が確認された。

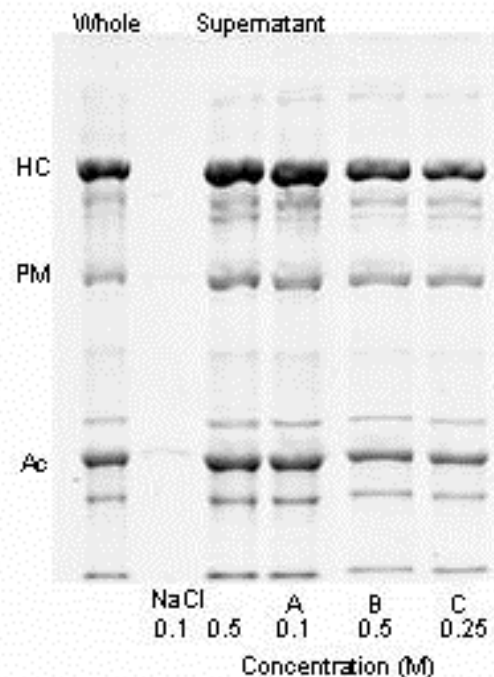


Fig. 16 Protein composition of soluble fraction of myofibrils with organic salts. Squid myofibrils suspended in media containing 0.1 or 0.5 M NaCl (NaCl 0.1 and 0.5) and 0.1 M Na-citrate (A 0.1), 0.5 M Na-gluconate (B 0.5), and 0.25 M Na-succinate (C 0.25) as in Fig.15 were centrifuged at 20,000 x g for 15 min to obtain solubilized proteins in the supernatant. SDS-PAGE patterns of the supernatants were compared with the pattern for the homogenate before centrifugation (Whole).

クエン酸 Na による筋原繊維の溶解を、筋肉ホモジネートを用いて再検討した。まず 0.1 M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.0) に懸濁した筋肉ホモジネートを遠心分離し、タンパク質溶解度を求めた。次に、様々な濃度のクエン酸 Na を添加した筋原繊維懸濁液を 5°C において 20 時間保持した後、濁度を測定した。そして両者をクエン酸 Na 濃度の関数として Fig. 17A に示した。0.1 M NaCl に懸濁した筋肉ホモジネートは、クエン酸 Na 無添加でも溶解度は約 24% (主に水溶性タンパク質) で、クエン酸 Na を添加していくと、溶解度は上昇し、0.1-0.25 M の添加で最大値に達した。しかし、それ以上の濃度になると逆に溶解度の低下が起これ、0.75-1.0 M の添加では 12% と不溶化が起きていることを確認した。この時、濁度の変化も、0.1-0.25 M クエン酸 Na で最小値を示し、それ以上の濃度で上昇した。このように高濃度のクエン酸 Na の添加は不溶化を引き起こすことが示されたため、0.1 および 1.0 M クエン酸 Na を添加した筋原繊維を遠心分離し、上澄みを SDS-PAGE で解析した (Fig. 17B)。これによると 0.1 M のクエン酸 Na で溶解していたミオシンとアクチンのバンドは、1.0 M クエン酸 Na 添加では、全く上澄みに回収されなくなり、再不溶化が起きていることを再確認した。塩の添加により、一旦溶解したタンパク質が再不溶化する現象は、塩析作用と考えられる。塩析作用は多価イオン化合物で顕著であることが知られているので、3 価の酸であるクエン酸にその作用が大きくても、不思議ではない。

Fig. 15 の結果では、1.0 M クエン酸 Na で不溶化したときの濁度は、クエン酸 Na 無添加時の筋原繊維懸濁液の濁度とは一致せず、約 30% 程度の低い濁度を示した。Fig. 17 の結果によると、このときミオシンを含めたすべてのタンパク質成分が不溶化しているため、この 2 つの条件でのタンパク質の物理的な状況が異なることが推定される。一般的に、微細な懸濁物を含む溶液ほど高い濁度を示し、巨大な凝集物はかえって低い濁度を示すことが知られており、また、塩析によって形成される沈殿物は、容易に沈殿するような大きな集合体

である。これらのことより、再不溶化した筋原繊維が低い濁度を示す原因は、一旦溶解された筋原繊維が再度集合し、より巨大な集合体を形成したものと推定される。また、別の可能性として、高濃度のクエン酸 Na により筋原繊維が変性を起こし (若目田ら 1983, 若目田, 新井 1983, 佐伯ら 1986, 1989), 結果として筋原繊維の不溶化が起きたことも考えられるが、筋原繊維の変性に対するクエン酸 Na の影響については第 4 章で詳しく述べる。

高濃度のクエン酸 Na 添加による不溶化が、塩析効果による現象かどうかを以下のような方法で検証した。まず、Fig. 15 の場合と同じように、筋原繊維懸濁液 (タンパク質濃度; 3.0 mg/ml) にクエン酸 Na を 0 から 1.15M になるようそれぞれ添加後、これらの混液を 2 つの条件で希釈した。第一の条件は、最初に添加したそれぞれのクエン酸 Na 濃度を変えないよう、それぞれの濃度のクエン酸 Na を含む溶液で 5 倍に希釈した。得られた希釈溶液の濁度 (Fig. 18) は、Fig. 15A の結果と同じように、0.25 M で最小値となり、それ以上の濃度で上昇が認められた。第二の条件は、希釈後の最終クエン酸 Na 濃度が最初の濃度にかかわらず、同じ 0.25 M になるよう 5 倍に希釈した。この 0.25 M クエン酸 Na は筋原繊維を溶解し、濁度が最小値になる濃度である。すると、1.0 M 付近で認められた高い濁度は低下し、最初のクエン酸 Na 濃度に関係なく、一定の低い濁度を示した (Fig. 18)。この結果は、クエン酸 Na 濃度を低下させることで、集合したタンパク質が再溶解したことを示している。これらのことから、高濃度のクエン酸 Na をイカ肉筋原繊維に加えると不溶化して濁度が高くなる現象は、塩析効果によるものと判断した。

#### (4) 有機酸塩と NaCl が共存する場合の筋原繊維の溶解性

各有機酸塩は単独で筋原繊維を溶解することが明らかとなった。これまで、グルコン酸 Na による魚類筋原繊維の可溶化に関する研究から、NaCl が共存すると、溶解作用は協同的に発揮されることが明らかにされている (竹下ら 1999)。そこで、

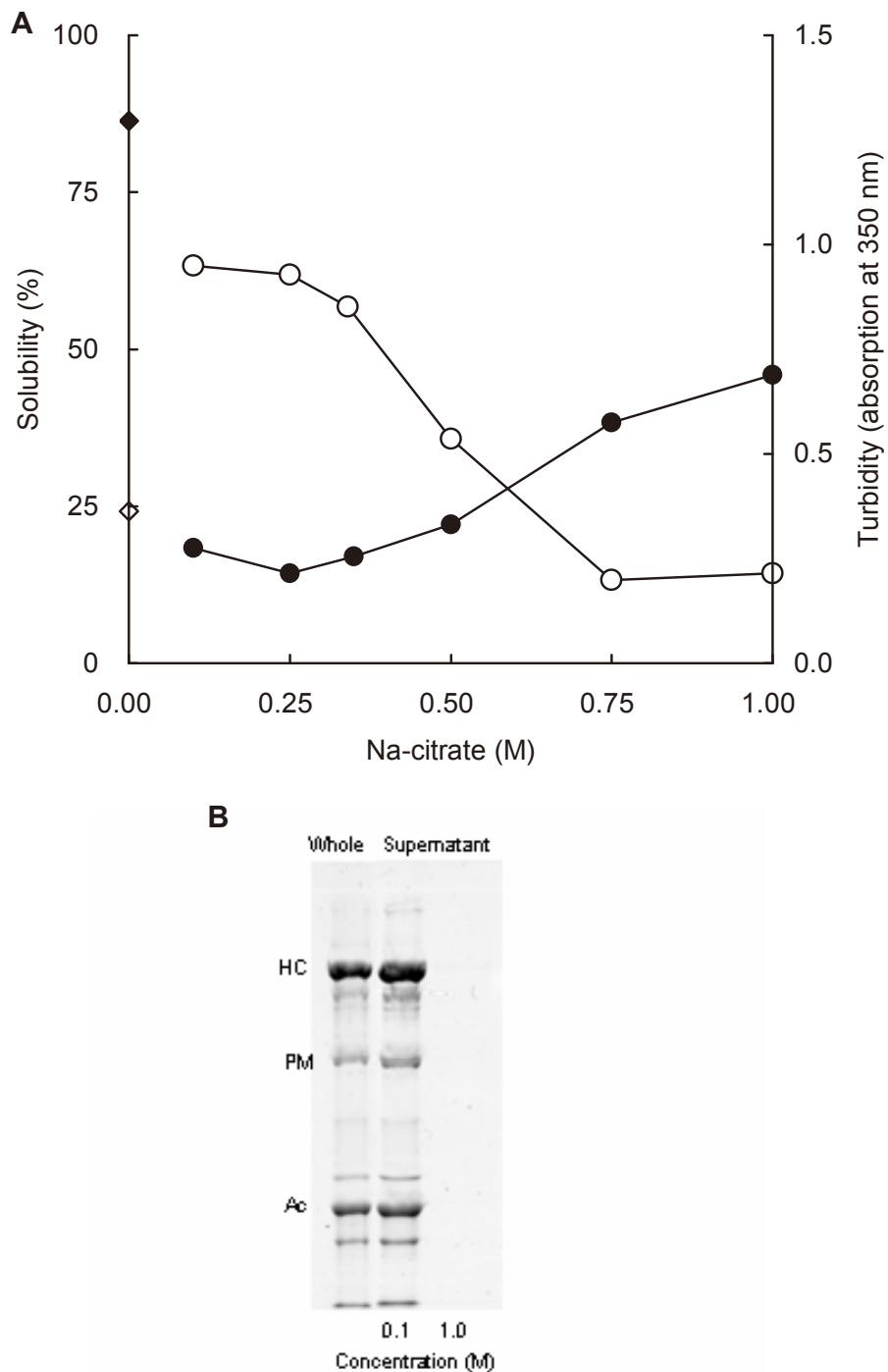


Fig. 17 Two different effects of Na-citrate on the solubilization of squid myofibrils. (A), Solubilization of squid meat homogenate with various concentrations of Na-citrate as measured by using the centrifugal method (open circles) and the turbidity measurement method (closed circles) as in Figs. 12 and 16, respectively. (B), The supernatants obtained at 0.1 and 1.0 M Na-citrate were analyzed on SDS-PAGE.

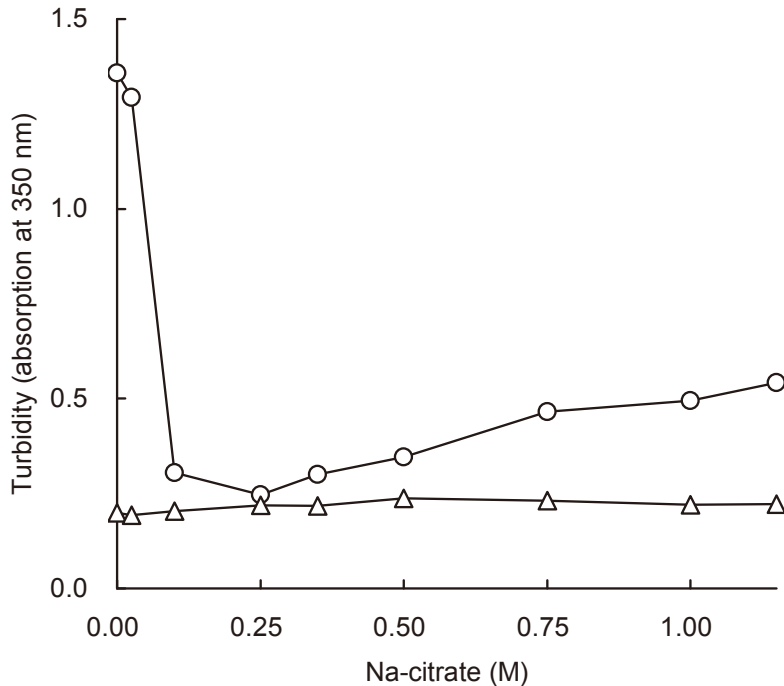


Fig. 18 Reversible solubilization of squid myofibril upon reduction of Na-citrate concentration. Myofibrils were suspended in the medium containing various concentrations of Na-citrate. The mixtures were diluted by 5 folds in two ways; keeping the respective original concentrations (circles) and adjusting the concentration to 0.25 M (triangles).

NaCl によるイカ肉筋原繊維の溶解作用に対して、各種有機酸塩の共存はどのように作用するか、可溶化のための NaCl 濃度要求性の変化から調べた (Fig. 19)。

NaCl のみの場合は、Fig. 15 に示した場合と同様に、0.25 M から 0.35 M の間で濁度低下 (溶解) が起きていた。これに 0.05 M のクエン酸 Na を加えると、0.05 M NaCl 付近ではさほど影響はないが、NaCl 単独では溶解しない 0.1 M から 0.25 M の間で筋原繊維の溶解が起きており、溶解に必要な NaCl 濃度は約 0.1 M 低くなった。この結果は、クエン酸 Na と NaCl の溶解作用が、両者の和として作用することを示している。さらに 0.1 M のクエン酸 Na 添加では、それ単独でも強い溶解作用が確認されているので、いかなる NaCl 濃度でも筋原繊維は溶解した。それ以上の 0.25 M、0.5 M のクエン酸 Na でもそれは同じであった (Fig. 19A)。

コハク酸 Na (Fig. 19C) あるいはグルコン酸 Na (Fig. 19B) を添加した場合も、溶解に必要な NaCl 濃度は低下した。0.1 M グルコン酸 Na を添加すると、0.25 M NaCl でほぼ完全に筋原繊維が溶解され、必要な NaCl 濃度を 0.1 M 低下させた。このことは、グルコン酸 Na と NaCl の溶解作用がほぼ同じであるという結果と一致している。0.25 M コハク酸 Na の場合は、0.25 M グルコン酸 Na より強い溶解作用を示した。この結果は、コハク酸 Na 単独の溶解作用がグルコン酸 Na よりも高いことに対応している。そして、どちらも 0.5 M にすると、それ単独で溶解が起こるため、NaCl 濃度に関係なく溶解が認められた。このように、いずれの有機酸塩も NaCl と協同的に筋原繊維を溶解させたことから、筋原繊維の溶解に必要な NaCl は、完全あるいは部分的に有機酸塩と置き換えることが可能である。



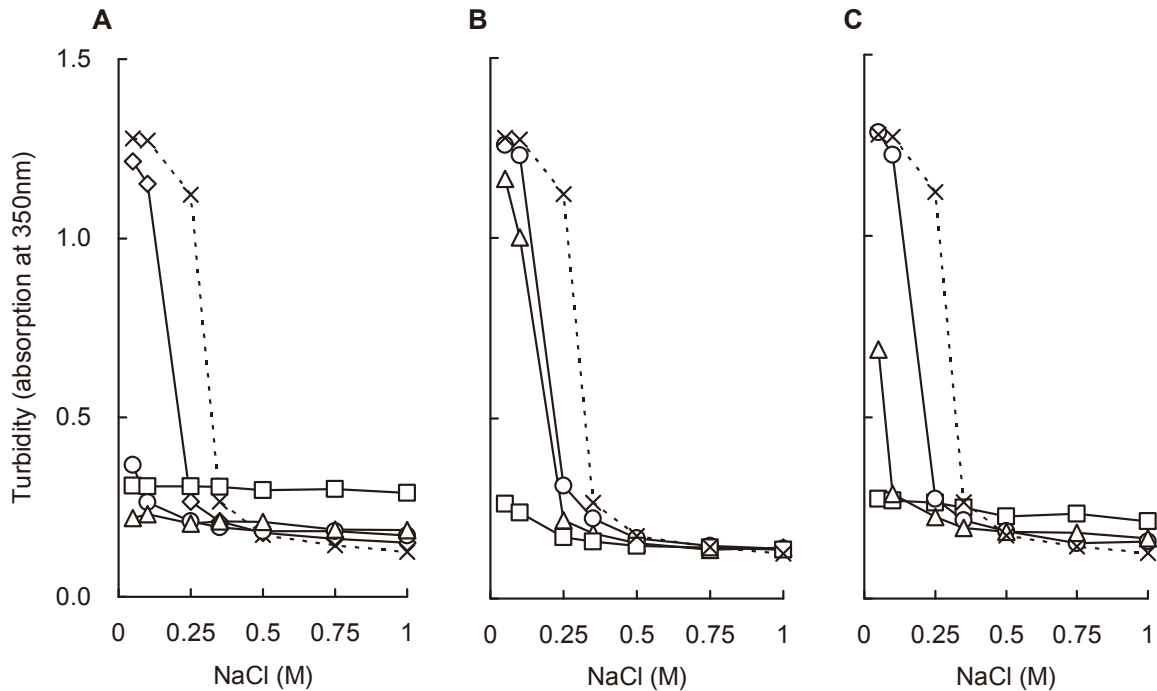


Fig. 19 Solubilization of squid myofibril by organic salts in the presence of NaCl. Squid myofibrils were suspended in media containing various concentrations of NaCl together with 0.05 M (diamonds), 0.1 M (circles), 0.25 M (triangles), or 0.5 M (squares). Sodium citrate (A), sodium gluconate (B) and sodium tartrate (C) were used.

(5) クエン酸 Na による魚肉筋原繊維の溶解性

クエン酸 Na の筋原繊維溶解作用が、イカ外套膜筋ばかりでなく、魚肉でも同様に認められるかを調べるため、クエン酸 Na によるコイ肉筋原繊維の溶解性を NaCl の場合と比較した。この実験では、用いた筋原繊維にすでに 0.1 M NaCl が含まれており、それに対してさらに NaCl, あるいはクエン酸 Na を加えた結果を Fig. 20 に示した。NaCl をさらに 0.15 M 加えると（最終濃度 0.25 M）筋原繊維の溶解が起きた。これに対してクエン酸 Na は、0.05 M の添加でほぼ完全な溶解が得られ、スルメイカ肉に対する作用と同様にコイ肉筋原繊維に対しても、NaCl より低濃度で可溶化させることが確かめられた。

(6) NaCl で溶解したミオシンの分解に対する有機酸塩の影響

各有機酸塩は NaCl と同等、あるいは、それ以上に強い筋原繊維の溶解作用を有することが明らかとなった。第 1 章では、イカ肉ホモジネートの自己消化が 0.3 M NaCl 付近で最も強く進行することを明らかにした。そこで、各有機酸塩と NaCl を共存させることによって自己消化の NaCl 濃度依存性がどのように変化するか調べるため、様々な条件のイカ肉ホモジネートを 25°C で 5 時間インキュベートし、ミオシンの分解を SDS-PAGE で解析した結果を Fig. 21 に示した。

NaCl のみの場合は、第 1 章の Fig. 8 と同様に 0.25 M NaCl で自己消化が進み、HC 含量は最も低い値

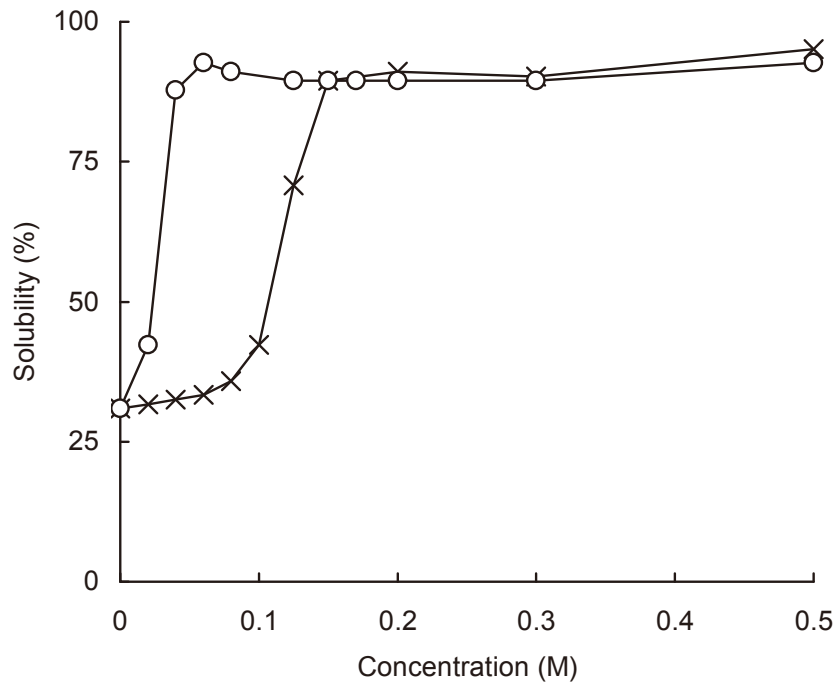


Fig. 20 Solubilisation of carp myofibrils with NaCl or Na-citrate. Carp myofibrils (0.1 M NaCl, pH 7.5) were further added by various concentrations of NaCl (cross marks) or sodium citrate (circles). Solubility was estimated by using centrifugal method.

となった。しかし、0.1 M クエン酸 Na を添加すると、顕著な自己消化抑制作用が認められ、いかなる NaCl 濃度においても分解されずに残っている HC 量は高くなった。特に、0.25 M NaCl 付近での著しい分解も認められなくなった。さらに 0.75 M NaCl 以上では、ほぼ完全に自己消化を抑制した。クエン酸 Na 濃度が 0.25 M または 0.5 M では、いかなる NaCl 濃度においても、ほぼ自己消化を抑制した (Fig. 21A)。なお、0.25 M および 0.5 M クエン酸 Na が共存する場合、NaCl 濃度が高くなると残存 HC 量はやや低くなり、ミオシン分解物はやや増える現象が認められたが、その原因は明らかに出来なかった。

0.1 M グルコン酸 Na を共存させると (Fig. 21B)、低濃度の NaCl (0.25 M 以下) では逆に自己消化を促進した。解離したミオシンは、酵素による切断部位が露出した状態にあり、分解が促進される。0.1 M のグルコン酸 Na で認められた分解促進作用は、NaCl との共同的作用によりミオシンが解離し、分解されやすい状態になることが、低濃度のグルコン酸 Na による分解抑制作用を上回るため、結果的に分解作用が勝り、見かけ上の促進作用として現れたものと思われる。このような傾向は、0.25 M グルコン酸 Na の場合にも同様に観察された。一方、0.5 M グルコン酸 Na では、0.25 M 前後の NaCl による自己消化促進効果が観察されな

くなり、0.1 M クエン酸 Na を添加した場合と類似の NaCl 濃度依存性を示した。ただし、残存 HC 量は 0.1 M クエン酸 Na よりも低く、グルコン酸 Na の自己消化抑制作用はクエン酸 Na よりも弱いことを確認した。これらのことから、グルコン酸 Na を添加する場合は、その濃度を考慮しないと、逆に自己消化の促進も起こりうることを示された。

NaCl 存在下でのコハク酸 Na の自己消化抑制作用 (Fig. 21C) は、NaCl 濃度に関わらず、クエン酸 Na およびグルコン酸 Na よりも弱かった。特に 0.1 M NaCl では、コハク酸 Na 濃度を 0.5 M まで上昇させても、分解促進作用を示した。この結果も、コハク酸 Na のミオシン溶解作用が比較的大

きいため、かえってプロテアーゼによる切断部位を露出させ、促進作用が勝ったためであろうと推察した。高 NaCl 濃度になるとやや分解は軽減されたが、その程度は非常に小さかった。

これらの有機酸塩の中で、NaCl 存在下においても強い自己消化抑制作用を有するのは、クエン酸 Na のみであることが確かめられ、0.25 M 以上のクエン酸 Na を添加すれば NaCl による自己消化促進作用は無視できると結論した。一方、他の有機酸塩はその抑制作用が弱く、NaCl 存在下ではあまり抑制作用が期待できないこと、しかも、筋原繊維溶解作用があるため、逆に自己消化を促進する場合もあり、利用が難しいと判断した。

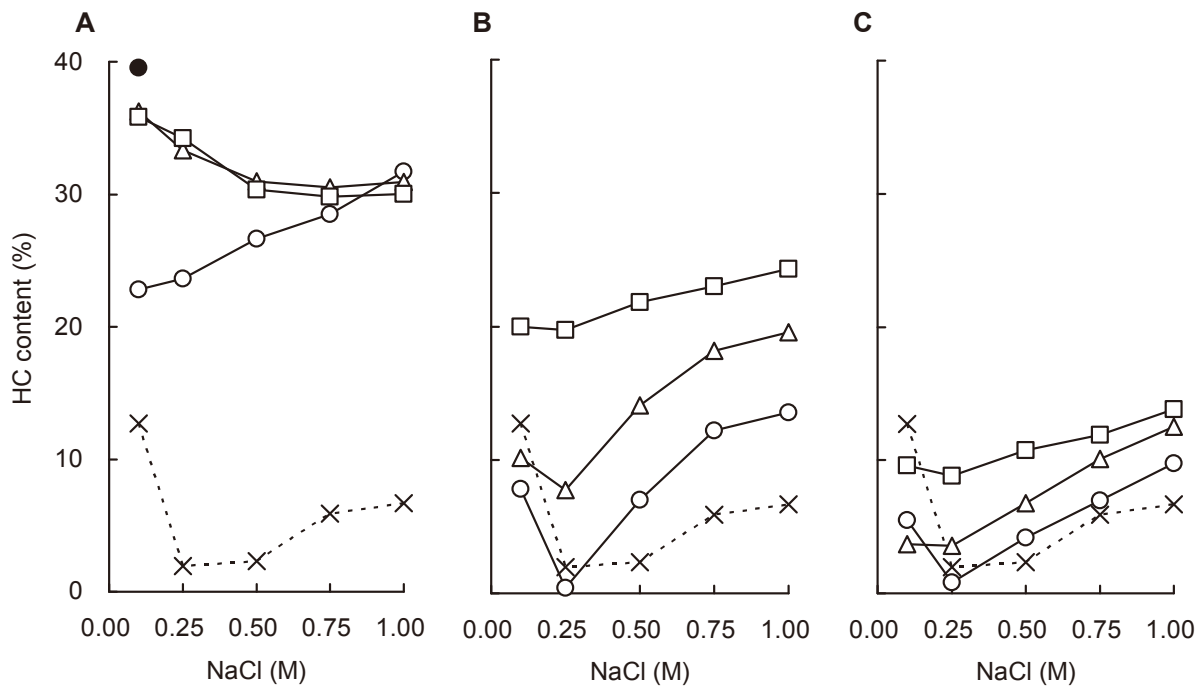


Fig. 21 Suppression of myosin degradation with organic salts in the presence of NaCl. Squid muscle homogenates were incubated at 25 °C for 5 hours in the media containing various concentrations of NaCl together with no (cross marks), 0.1 M (circles), 0.25 M (triangles), or 0.5 M (squares) of Na-citrate (A), Na-gluconate (B), or Na-succinate (C). Myosin heavy chain contents were estimated from the SDS-PAGE patterns of the incubated homogenates.

## 小考察

魚肉からのねり製品製造において、魚肉の筋原繊維構造を塩の作用で溶解させる「塩ずり」のステップは欠くことのできない工程である。この筋原繊維を溶解する工程は、スルメイカ外套膜筋肉からねり製品を製造する場合も必須であると考えられる。第2章では、第1章でスルメイカの自己消化を抑制する作用が明らかになった有機酸塩の「塩」としての役割について検討した。筋原繊維を溶解させるためには、ミオシンのフィラメント構造を構築していた静電結合を、添加したイオンの作用で消失させることが必要である。用いた有機酸塩はいずれもイオン化合物であるため、ミオシン分子の尾部間の静電結合の解消作用が期待される。実際に筋原繊維の溶解作用を比較すると、3価の酸であるクエン酸、2価の酸であるコハク酸、1価の酸であるグルコン酸の順に、溶解作用が高いことが実証された。これらの溶解作用を比較すると、1価の酸であるグルコン酸 Na が実際に現場で用いられている NaCl と同程度であったが、クエン酸 Na とコハク酸 Na はいずれも NaCl より明らかに強い溶解作用を示した (Fig. 15)。特に、クエン酸 Na は NaCl の 1/5 程度の濃度で溶解する非常に強い溶解作用を有することが分かった。また、有機酸塩と NaCl は協同に溶解作用を示したため (Fig. 19)、低食塩含有ねり製品 (食塩は単に食味の観点から添加)、あるいは、食塩無添加ねり製品の製造が、十分に可能であることが示された。

イカ筋肉に内在する金属プロテアーゼはミオシン分子尾部の中央付近で、HMM と LMM に切断する (Konno and Fukazawa 1993)。この部位は、生理的な塩濃度下ではミオシンがフィラメントを形成することで内部に埋没し、切断から保護されている。しかし、溶解が起これば、切断部位が露出され、ミオシン分解は促進される (Konno and

Fukazawa 1993, Konno ら 2002)。それゆえ、有機酸塩による自己消化抑制作用も、溶解性を考慮して考察する必要があると考えた。このような危惧は、グルコン酸 Na やコハク酸 Na を筋原繊維の溶解に利用した場合に起こりうることを示された (Fig. 21)。しかし、クエン酸 Na には非常に強い筋原繊維の溶解作用があったにも関わらず、そのような促進作用は認められなかった。おそらく、それ以上に強い自己消化抑制作用があるため、クエン酸 Na 自体や NaCl 添加による溶解で起こる自己消化促進作用が現れなかったものと思われる (Fig. 21A)。これらの結果は、現実的にはクエン酸 Na が筋原繊維に対して塩として作用する溶解作用と無関係に、自己消化を阻害する作用を有していることを示す。すなわちクエン酸 Na は、イカ筋肉からねり製品を製造する上で重要な2つの作用を兼ね備えていることを初めて示すことができた。なお、クエン酸 Na は、高濃度になると塩析作用が顕著になり、不溶化する現象が見出されたが、塩析作用が起きるクエン酸 Na 濃度は、イカ筋原繊維の自己消化抑制と溶解に必要な濃度に比べてかなり高いこと、また塩析による不溶化がおこっても自己消化抑制作用は、減少しないことを確認した (Fig. 8)。ただし、ねり製品の製造などにおいて、溶解作用を目的としてクエン酸 Na を使用する場合は、0.25 M 付近が最適であり、高濃度の添加では、逆に不溶化を引き起こすことに注意が必要である。

本章の結果を総合すると、適切なクエン酸 Na 濃度を設定することにより、スルメイカ肉の自己消化を制御し、同時に筋原繊維を溶解させることができ、スルメイカ肉加工品の製造に応用可能であると判断できる。また、クエン酸 Na の筋原繊維溶解作用は、魚類筋原繊維でも認められたので、魚肉への応用も十分可能であると考えられる。

### 第3章 スルメイカ外套膜筋肉の加熱ゲル形成に及ぼすクエン酸Naの影響

魚肉からのねり製品製造方法をそのまま利用し、スルメイカ肉からねり製品を製造しようとしても、著しく脆い物性の加熱ゲルしか調製できず、結果として、スルメイカ肉はねり製品原料として不適切であると判断されている。この主原因はスルメイカ肉に内在する自己消化酵素が、ゲル形成に最も重要な役割を果たすミオシンを特異的に分解するためと解釈されている。それを支持するように、ミオシンを特異的に分解するプロテアーゼを持たないコウイカ（江原ら1992）からは、優れた物性を有する加熱ゲルが形成されると言われている（志水ら1981）。

ねり製品製造原理の一つとして、弾力性に富む加熱ゲルを形成するには、加熱に先立ち筋原繊維を溶解する必要がある。食塩が肉糊製造に利用されるのはそのためであるが、食塩の添加は、さらにスルメイカ肉の自己消化を促進するので（Konno and Fukazawa 1993）、この問題を克服するため、様々な試みがなされている。すなわち、プロテアーゼが作用しないような条件を選択して、ゲル化法が検討されている。例えば、スルメイカ肉の凍結粉碎肉を出発材料として、高速カッターによる強い攪拌を利用することで、食塩無添加の加熱ゲルの製造が報告されている（石川1999, 山日2006）。また、プロテアーゼを加熱、加圧、酵素阻害剤などにより抑制する方法（Nagashimaら1992, Perezら2002, Gomezら2002, 2003, Parkら2003, Hernandezら2005）、プロテアーゼ活性の抑制と微生物由来の架橋酵素を組み合わせた方法（Parkら2005）などが試みられている。

第1章および第2章の結果から、クエン酸Naは、自己消化をほぼ完全に抑制し、しかも筋原繊維をかなり低濃度で溶解させるため、食塩無添加での加熱ゲル形成の可能性が示された。クエン酸Naによるプロテアーゼ活性阻害作用は、溶解状態においても、高温においても認められたため、イカ肉の自己消化抑制に、普遍的に利用できることを明らかにした。なお、このクエン酸Naは食品

添加物として広く認可されているものであり、スルメイカ肉からの加熱ゲル化に利用できる化合物である。

また、魚肉から弾力、あるいはしなやかさに富んだ加熱ゲルを調製するために、塩ずりした肉糊を低温で保持するいわゆる「坐り」と呼ばれる予備加熱工程が、しばしば導入されている。この予備加熱中に起こるミオシンの多量化反応は、加熱ゲルの物性を向上するために重要とされている（沼倉ら1987a, 1987b, 塚正ら1990, 今井ら1996）。この反応は、数mMのCa<sup>2+</sup>を必要とする内在性のTGaseによる触媒作用と報告されている（塚正と志水1991, Wanら1994, Nowsadら1996）。第1章の結果から、クエン酸Naによるスルメイカ肉自己消化の抑制は、2価の陽イオンに対するキレート作用によると結論された。従って、クエン酸Naの添加は、Ca<sup>2+</sup>を必要とする内在性TGaseによるミオシンの多量化反応を阻害することが予想される。

そこで第3章では、始めに、肉糊にクエン酸Naを加えてスルメイカ肉ミオシンの自己消化を抑制すれば、ゲル形成能はどのように変化するのかについて検討した。さらに、活性化にCa<sup>2+</sup>を必要としない微生物由来のMTGaseを添加することで、ミオシンの架橋反応を促進させれば、ゲル物性の向上は認められるかという観点から検討を行った。

#### (1) NaClを用いてスルメイカ肉から調製した直接加熱ゲルの特性

まず始めに、内在している酵素による自己消化が、ゲル物性に及ぼす影響を再確認した。予備加熱いわゆる「坐り」工程を省略し、肉糊を直ちに高温で加熱する直接加熱ゲル形成を想定して、NaClが0.5 mol/kgとなるように加えて播潰した肉糊を折径42 mmの塩化ビニリデンチューブに充填し、直ちに90°Cで加熱した。90°Cで加熱した場合の肉糊中心部の品温履歴を追跡し、Fig. 22に示した。品温がほぼ90°Cに到達するのに、約15分間を要した。このような温度上昇中にどのような自己消化が起こるかを追跡しようとしたが、上記

のような大きな肉糊では、分析する場所によって温度履歴が異なり、結果をきちんと解析できないことが予想された。それを克服するため、少量の肉糊を真空包装（袋込みの厚さは約 0.6 mm）し、ほぼ均一の温度上昇が期待できる形状とした。そして、品温上昇曲線を 10°C ごとに区切り、段階的に温度上昇させる昇温モデル条件を作成し（Fig.22）、昇温モデル条件に従って、10°C から順に、10°C 間隔で 80°C まで昇温させた。各温度での加熱終了後、直ちに氷水中に浸漬して反応を停止

し、肉糊中の HC 含量を示した（Fig. 22）。

10°C で約 2 分間の処理だけでミオシンの分解が進行し、HC は 30% から 24% に低下し、その後 40°C に達する 4 分程度の時間で、18% に低下した。しかし 50°C 以上では、それ以上の HC の減少は起こらなかった。これらの結果から、この加温条件では、スルメイカ肉糊中の自己消化は 40°C まで上昇する比較的短時間で起こるが、50°C 以上ではプロテアーゼの失活が起こるため、それ以上、自己消化は進行しないであろうと推定した。

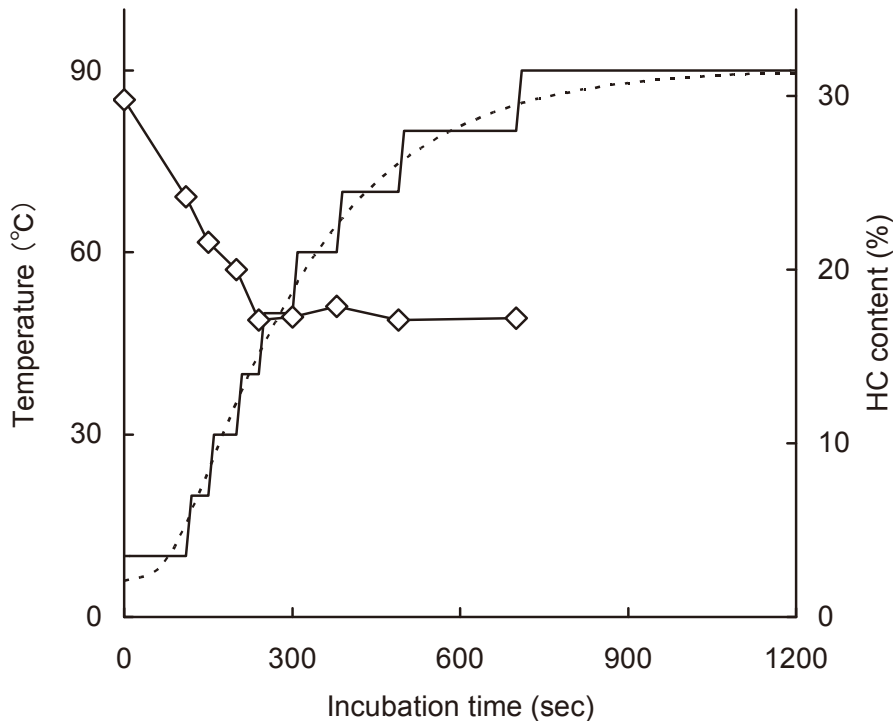


Fig. 22 Temperature and myosin degradation of heating process with salted squid meat paste. Squid meat paste ground with 3 % NaCl was stuffed into polyvinylidene tubing (diameter 27 mm), and heated in water bath of 90 °C. Internal temperature was monitored by using inserted temperature sensor (dashed line). Temperature raise was simulated by assuming the step-wise increase of the temperatures (solid line) to follow myosin degradation. Meat pastes stuffed into small pouch (thickness 0.6 mm) were heated in a step-wise manner as programmed. The pastes were taken out after incubation up to planned temperatures from the water bath. The meat paste was dissolved into SDS/urea/mercaptoethanol solution by shaking overnight. Myosin heavy chain content (diamonds) for the incubated pastes was estimated from the SDS-PAGE patterns.

そこで、スルメイカ肉糊から作成した加熱ゲルの破断強度を測定した。すなわち、真空式の高速カッターを用い、NaClを0.5 mol/kgになるよう添加して肉糊とし、前述の塩化ビニリデンチューブに充填したあと、90°Cで直接加熱ゲルを調製した。また、様々な温度で予備加熱した後に90°Cで加熱した二段加熱ゲルも調製し、それらの破断強度を測定した。予備加熱条件は、5および10°Cでは20時間、20および30°Cでは2時間とした。このとき得られた加熱ゲルをSDS-UM溶液に溶解したのち、SDS-PAGEに供して残存するHCの含量を測定し、Fig. 23に示した。

得られた加熱ゲルの中では、直接加熱ゲルのゲル物性が最も高く360 gw程度の破断強度を示した。加熱ゲル中のHC量は、調製した直後の加熱する前の肉糊中では約29%であったのに対し、直接90°Cで加熱してもHC含量は14%まで低下した。この変化はFig. 22で得られた結果を再現している。そして、いかなる温度で予備加熱しても、いずれも300 gw以下の破断強度しか示さず、かえって物性の劣化を引き起こすことを確認した。これは、予備加熱した温度帯は、ミオシンの分解が顕著に起こる温度帯（Fig. 22）であったためと考えられ、加熱ゲルのHC量は加熱温度に関わらず、

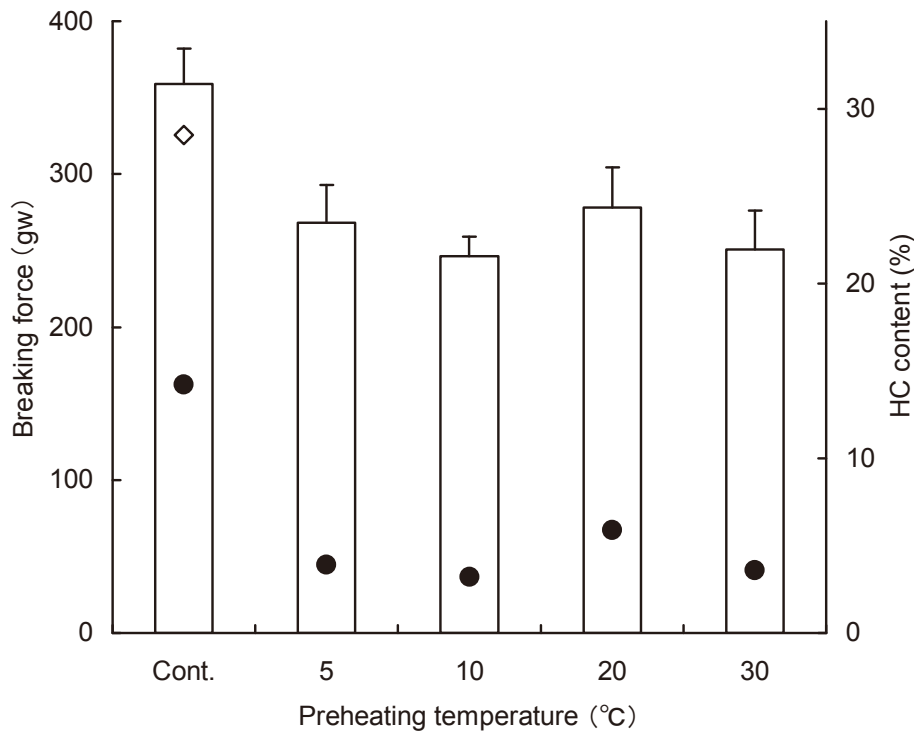


Fig. 23 Effect of preheating on the gel strength of the thermal gel prepared from squid meat and the myosin degradation. Squid meat paste was prepared as in Fig. 22. The paste was preheated for 20 hours at 5 and 10 °C , or for 2 hours at 20 and 30 °C. The preheated pastes were further heated at 90 °C for 30 min. The thermal gels were sliced with a thickness of 25 mm, and their gel strength was assessed by measuring breaking force and strain on a rheometer equipped with a spherical plunger (diameter, 5 mm) with a raising rate of the sample table at 6 cm/min. The breaking force for the gels was estimated (bars). The thermal gels were also dissolved into SDS/urea/mercaptoethanol solution, and applied to SDS-PAGE. Myosin heavy chain content (closed circles) were estimated. Diamond indicates the HC content in salted meat before incubation.

予備加熱を行うことで著しく低下した。すなわち、第1章および第2章で筋肉モデルとして用いたイカ肉ホモジネートで得られた結果が、肉糊においても再現された。

このHCの減少により、第1章の結果と同じく150 kDaの分解生成物が認められ、スケトウダラやマイワシなどの予備加熱肉糊中で認められるHCが多量化(沼倉ら1990, 塚正ら1990, 今井ら1996)して、減少しているのではないことを確認した(結果は図示しない)。また、予備加熱条件に

関わらず、二段加熱ゲルの破断強度が、直接加熱ゲルよりも低い値を示したことも、架橋によるHCの多量化が起こっていないことを示唆している。ここで得られた加熱ゲル中のHC含量と破断強度との間には、Fig. 24に示したように有意な正の相関( $P < 0.01$ ,  $r = 0.98$ )が認められた。すなわち、予備加熱を行っても多量化せず、物性向上作用が認められないスルメイカ肉の加熱ゲルにおいては、ミオシンの自己消化を抑制することが加熱ゲル物性の向上に繋がると推察した。

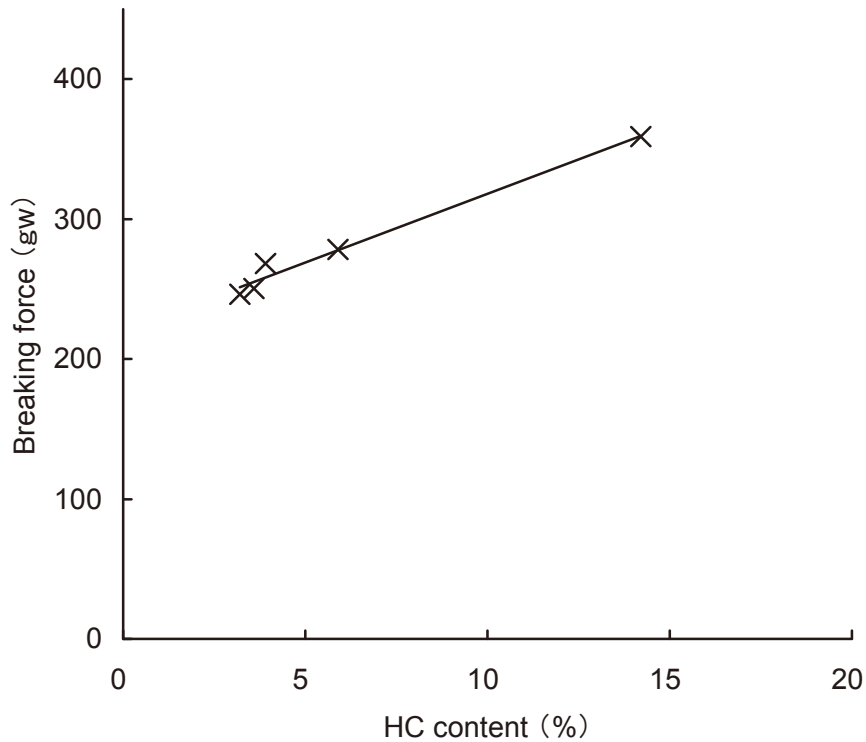


Fig. 24 Relationship between breaking force and myosin degradation for the thermal gels. The results in Fig. 23 were used for producing the graph.



次に、プロテアーゼ阻害剤添加によるゲル物性改善効果を検討した。すなわち、金属プロテアーゼの阻害剤として EDTA を、セリンプロテアーゼの阻害剤として PMSF (Konno and Fukazawa 1993, 江原ら 1994) を NaCl とともに加え、ゲルを形成した。また第 2 章において、イカ肉中で起こる自己消化が、共存する NaCl 濃度の影響を強く受けることを明らかにしたので、イカ肉に添加・播漬する際の NaCl 濃度も変化させた。このような諸条件下で調製した直接加熱ゲルの破断強度を、Fig. 25 に示した。なお、すでに報告されているように (石川 1997, 山日 2006) イカ肉では、高速カッターを用いれば、NaCl を加えることなしに、加熱ゲルを調製することができ、得られた破断強度 (420 gw) は、十分に加熱ゲルとみなすことのできる値であった。それに NaCl を添加してゲルを作成し

たところ、NaCl 濃度の上昇に伴い、破断強度は低下した。通常、魚肉に使用する 2-3% の NaCl 添加 (0.34-0.51 mol/kg に相当) では、350 gw 程度の破断強度しか示さなかった。

一方、5 m mol/kg の EDTA を加えた場合は、いずれの NaCl 濃度においても破断強度は上昇し、NaCl 無添加では 500 gw に達した。これに、さらに PMSF を加えると低 NaCl 濃度では、EDTA 単独の場合と差は認められなかったが、NaCl が 0.2 mol/kg 以上になると EDTA 単独でみられた破断強度が若干減少する傾向が無くなり、いずれの NaCl 濃度でも同じ破断強度を示すようになった。このことは、高温で作用するセリンプロテアーゼの作用が、NaCl 添加系で顕著になるものの、それを PMSF で阻害すればゲル物性は上昇することを示している。これらの結果から、肉糊を加熱する際

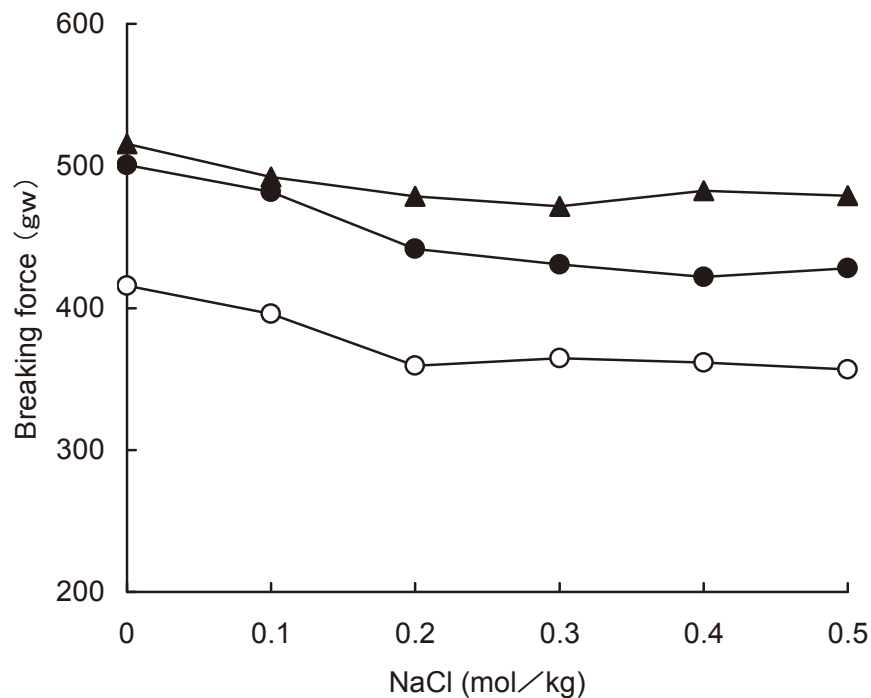


Fig. 25 Effect of EDTA and PMSF on the breaking force for the thermal gel prepared with NaCl. Salted squid meats with various concentrations of NaCl containing no additives (open circles), 5 mM EDTA (closed circles), or both 5 m mol/kg EDTA and 5 m mol/kg PMSF (closed triangles) were heated at 90 °C for 30 min. The breking force for the gels produced were measured as in Fig. 23.

には、必ずプロテアーゼが作用する温度帯を通過するので、その間に自己消化が起こってしまうこと、そのため、如何にしてプロテアーゼを阻害するかが、重要であることを再確認した。

(2) 有機酸塩を用いてスルメイカ肉から調製した直接加熱ゲルの特性

次に、第1章で強い自己消化阻害活性を示した有機酸塩の効果について検討した。この実験では、NaCl も有機酸塩も加えていない試料、0.51 mol/kg の NaCl を加えた試料、5 m mol/kg の EDTA を加えた試料を対照とした。各有機酸塩がゲル物性に及ぼす影響を比較するため、およそ 0.5 mol/kg までの濃度となるようクエン酸 Na、酒石酸 Na およびグルコン酸 Na を加えて調製した肉糊を直接 90°C で加熱してゲルを作成し、それらの加熱ゲルの破断強度を Fig. 26A に示した。なお、0.5 mol/kg クエン酸 Na を添加した場合の加熱ゲルは、著しく離水した異質なゲルであったため測定から除外

したが、この原因は、第2章で明らかにしたように、高濃度のクエン酸 Na による筋原繊維タンパク質の塩析作用によって、一旦溶解した筋原繊維タンパク質が凝集したため、ゲルにならなかったと考えられる。この結果は、肉糊の加熱ゲル形成には、均一な分散が起こる筋原繊維の溶解が必須条件であることを示している。Fig. 26A によると、無塩加熱ゲルの破断強度は 410-424 gw を示した。約 0.5 mol/kg の NaCl は、かえってゲル物性を低下させ、破断強度は 350 gw と低い値を示した。一方、金属プロテアーゼを阻害する EDTA を添加すると、501 gw まで上昇した。これらは Fig. 25 の結果と一致していた。次に 3 種類の有機酸塩をそれぞれ添加すると、いずれも添加濃度が増すほど破断強度が高くなる傾向を示した。その中でクエン酸 Na のゲル物性増強効果が最も大きく、0.34 mol/kg で最大値 680 gw に達した。この値は 5 m mol/kg の EDTA を添加した場合より明らかに高い値であっ

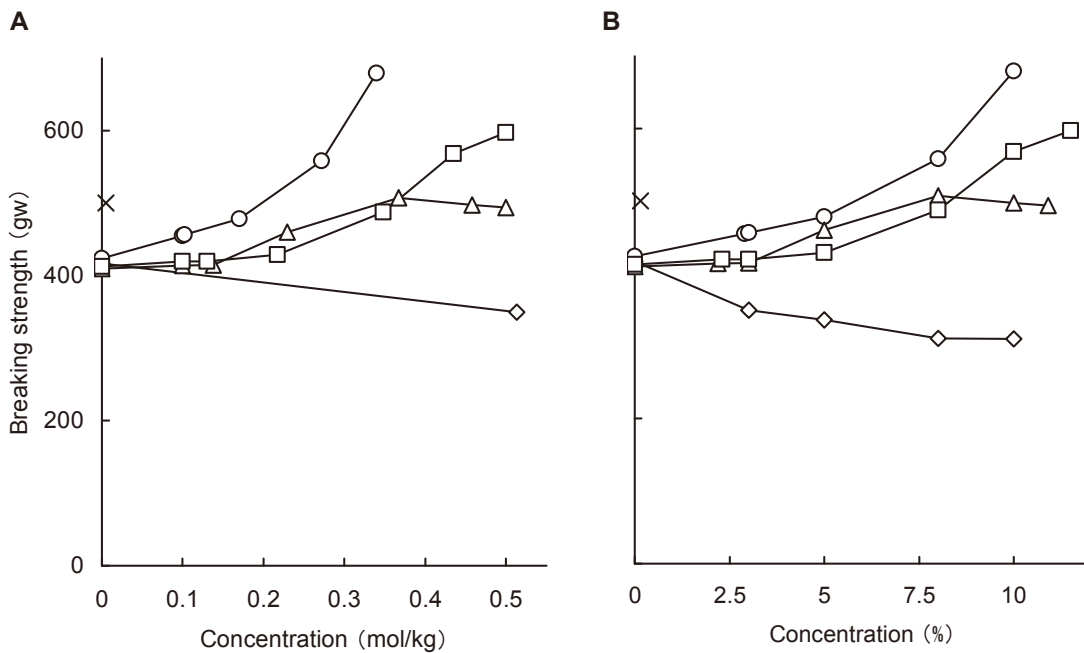


Fig. 26 Effect of several organic salts on the thermal gel formation of squid meat. Salted meat of squid was prepared by adding various concentrations of NaCl (diamonds), Na-citrate (circles), Na-gluconate (triangles), or Na-tartrate (squares). The paste with 5 mM EDTA was also prepared (cross mark). The other procedures for the production of the thermal gel were the same as in Fig. 23. The concentration of the compounds added was expressed in molar concentration (A) and weight % (B).

た。一方、酒石酸 Na では 0.5 mol/kg で 600 gw の破断強度を示した。これらに比べると、グルコン酸 Na 添加による破断強度上昇は小さく、0.5 mol/kg で EDTA 添加と同等の 500 gw であった。

ねり製品の製造現場では、添加物は重量%で加えることが多い。そこで、Fig. 26A に示した mol/kg の表示を%濃度に換算して Fig. 26B に示した。なお、NaCl は 10%までとし、NaCl の添加量が増すに従って破断強度は低くなり、8 および 10%NaCl を添加した場合の平均値は、無添加よりも有意 ( $P < 0.05$ ) に低かった。重量%で表しても、Fig. 26A と同じようにクエン酸 Na は最小量の添加で最大の効果が得られることが解った。各有機酸塩を 10%添加した場合の加熱ゲルの破断強度を比較すると、クエン酸 Na、酒石酸 Na およびグルコン酸 Na の破断強度は、それぞれ 679, 569 および 497 gw

を示し、いずれも EDTA 添加の場合と同等あるいはそれ以上の高い値となった。これらの値は、直接加熱ゲルの破断強度としては十分高い値である。なお、10%のクエン酸 Na、酒石酸 Na およびグルコン酸 Na を加えた加熱ゲルの pH は、それぞれ 6.8, 6.6 および 6.5 であり、大差ない値であった。pH が 6.5-7.5 付近の微小な pH の違いで、内在酵素による HC 分解への影響はほとんど無いことをホモジネートで確認したので、この破断強度の違いは、僅かな pH の違いによる自己消化抑制程度の差ではないと考えられた。

そこで Fig. 26B で有機酸塩をそれぞれ 10%加えた加熱ゲル中の HC 含量を求めて、自己消化がどのように阻害されているか検討し、結果を Fig. 27 に示した。まず EDTA を加えて播潰した直後のイカ肉糊の HC 量は 34%であるが、その加熱ゲルで

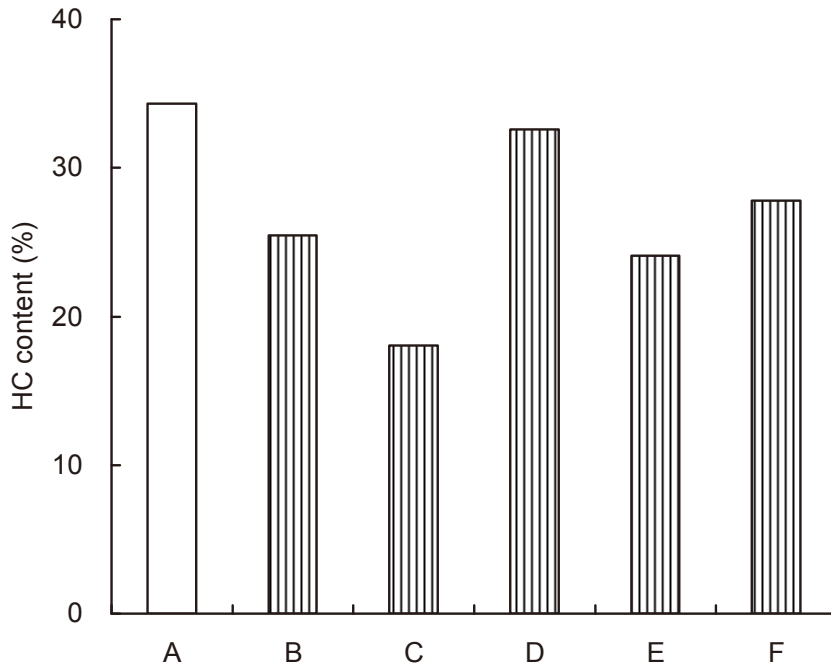


Fig. 27 Myosin degradation in the thermal gels prepared with various compounds. The gels prepared in Fig. 26 were used for analysis of the myosin degradation. The procedures for analysis are the same as in Fig. 23. HC content in salted meat before heating (A), one for the gel with 5 mM EDTA (B), with 3 % NaCl (C), with 10 % Na-citrate (D), with 10 % Na-gluconate (E), and with 10 % Na-tartrate (F) were estimated from the SDS-PAGE patterns.

は26%となり、加熱中の分解が確認された。第1章の結果から、EDTAは35°Cでは自己消化を抑制しないこと (Fig. 10)、および直接高温で加熱する場合の昇温過程で自己消化は進行すること (Fig. 22) から、EDTAを加えて直ちに90°Cで加熱しても、自己消化を完全に抑えることは出来なかったものと考えられる。また、3%のNaClを加えた加熱ゲルのHC量は、EDTA添加の場合よりもさらに少なく、18%であった。これらに対して、クエン酸Na、酒石酸Na、またはグルコン酸Naを加えて調製したゲルのHC量は、それぞれ33、28、または24%であった。これらの値は、いずれもNaClを加えた加熱ゲルのHC量より高い値で、より高い破断強度を示した加熱ゲルほどHC量は高く維持されていた。その中でも、クエン酸Naは最も高い値を示し、EDTAを加えた場合よりもミオシンの分解を抑制した。また、第1章の35°Cで解析した自己消化抑制効果 (Fig. 10) と、ここで示した直接加熱ゲル中の残存HC量とは、同じ順序であったことから、昇温過程で自己消化が進行する直接加熱ゲル中の残存HC量には、金属プロテアーゼだけでなく35°C以上で作用するセリンプロテアーゼ (Konno and Fukazawa 1993) も強く関与していると考えられた。

Fig. 26と27の結果は、程度の差はあるが、3種の有機酸塩はいずれもミオシンの分解を抑制することで加熱ゲルの破断強度を向上させることが示唆された。また、クエン酸Naを添加した加熱ゲルでは、調製直後の肉糊と同程度のHC含量を示したことから、高温加熱する際の昇温過程においてもミオシンの分解をほぼ完全に抑制することが確認できた。なお、図示していないが、破断凹みはいずれの加熱ゲルにおいても類似した値(7mm前後)を示した。

次に、添加するクエン酸Na濃度を変えて、直接加熱ゲルを調製し、そのSDS-PAGEパターンから、自己消化が抑制されているか検討した (Fig. 28)。また、そのSDS-PAGEパターンからHC含量を求めた (Fig. 29)。低濃度のクエン酸Na (0.05-0.15 mol/kg) では、HCの分解抑制はやや

不完全であり、150 kDa (HMM) や100 kDa (LMM) 断片が検出され、HCの分解が認められた。しかし、0.25 mol/kg以上のクエン酸Naを添加すれば、ミオシンの分解はほぼ完全に阻止されていた。なお、この0.25 mol/kgは第2章で明らかにしたように、筋原繊維を十分に溶解する濃度である。

### (3) 魚肉の直接加熱ゲル形成に及ぼすクエン酸Naの影響

クエン酸Na単独の添加で、これまでゲル形成が困難であるといわれてきたスルメイカ外套膜筋肉から優れたゲル物性を有する直接加熱ゲルが形成されることを示した。そこで、このクエン酸Naがイカ以外の魚肉のゲル化にも適応されるか検討を加えた。その際、通常通りNaClを添加して製造した加熱ゲルと比較した。用いた魚種は長崎沿岸で漁獲されたアマダイ、マイワシ、グチ、タチウオ、シイラであり、これらはねり製品材料として地元で利用されている魚種である。これらの水晒した魚肉に、クエン酸NaあるいはNaClを加えた肉糊から直接加熱ゲルを調製し、得られたゲルの破断強度および破断凹みをFig. 30に示した。なお、クエン酸NaおよびNaClの添加濃度は、いずれも筋原繊維を溶解する3%とした。

魚種によって得られる破断強度の差は認められたが、NaClとクエン酸Na添加の間には、ほとんど差が認められなかった。ただし、優れた坐り効果を有することが知られているグチ (志水 1974) に対しては、クエン酸Na添加ゲルはNaCl添加ゲルに比べて、明らかに低いゲル物性を示した。グチのNaCl添加ゲルの場合は、加熱中に予備加熱的な作用が発現し、「坐り」効果が多少現れたものと考えられ、クエン酸Naは「坐り」効果を抑制したと思われた。

### (4) クエン酸Naを用いたスルメイカの加熱ゲル形成に及ぼす予備加熱の影響

Fig.30でクエン酸Naは、グチ肉糊の「坐り」を抑制することが推察された。クエン酸Naを加えることで、スルメイカ肉中のミオシンの分解を抑制し、加熱ゲルの破断強度を向上することに成功したが、このゲルは直接加熱ゲルである。一方、

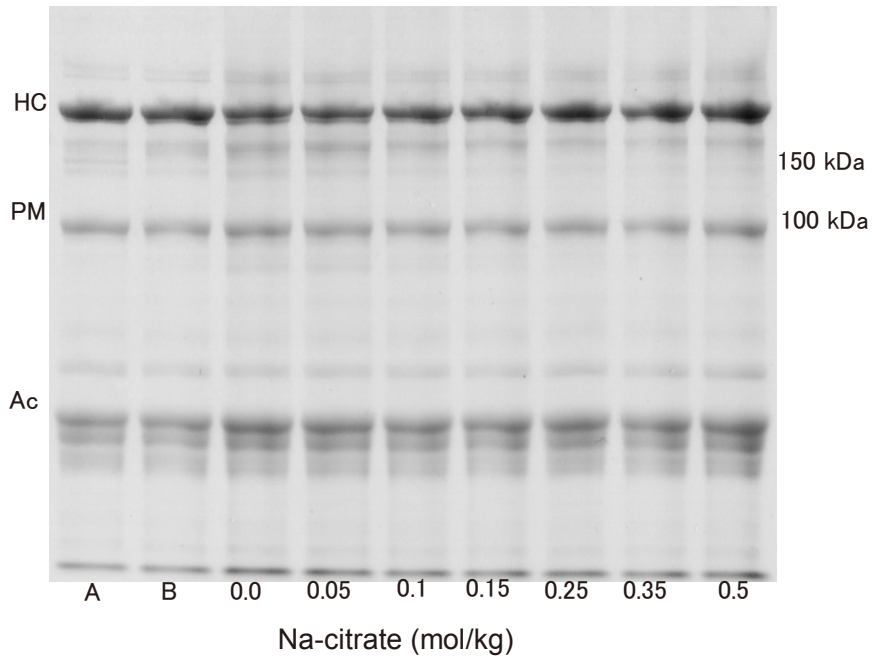


Fig. 28 Myosin degradation in the thermal gel of squid meat prepared with Na-citrate. Salted squid meat pastes were prepared by grinding with various concentrations of Na-citrate, and were heated at 90 °C for 30 min. SDS-PAGE patterns for the thermal gels produced were compared. (A) and (B) are the patterns for the squid meat used before salting, and just salted before heating, respectively. 150 kDa and 100 kDa are the degraded myosin heavy chain products.

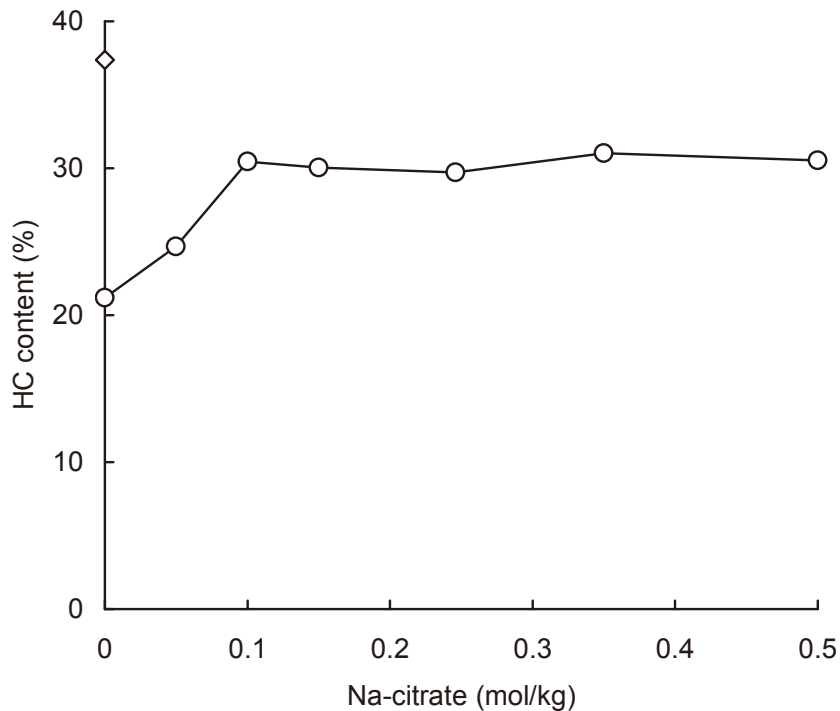


Fig. 29 Suppressive effect of Na-citrate on the degradation of myosin during the heating. The myosin heavy chain content in the pattern shown in Fig. 28 were estimated. Open diamond denotes HC content for the sample before heating.

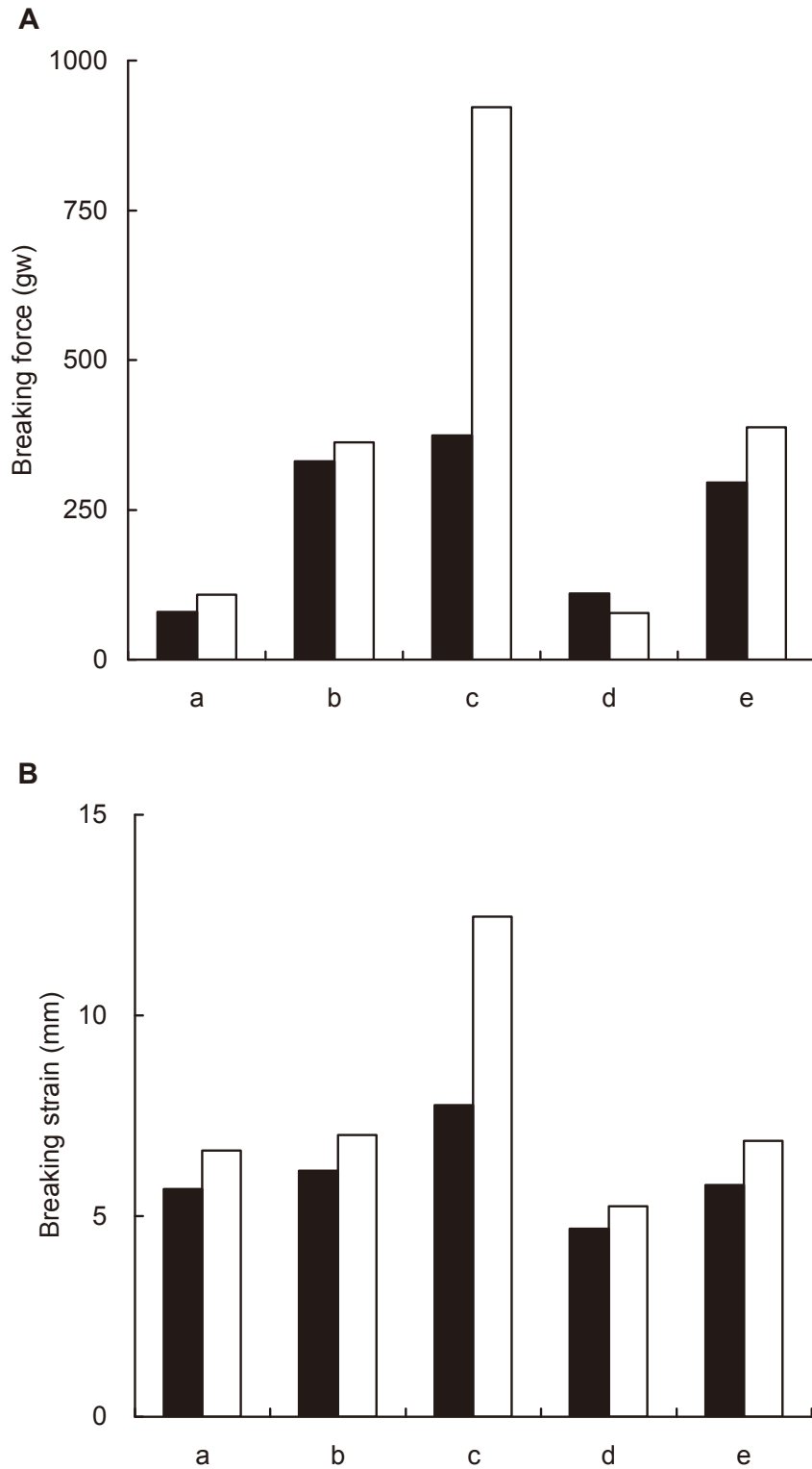


Fig. 30 Comparison of the gel properties of some fish meat prepared with Na-citrate and with NaCl. Fish meat was ground with either 3 % Na-citrate (closed bars) or 3 % NaCl (open bars). The meat pastes were heated at 90 °C for 30 min. The breaking force (A) and the breaking strain (B) for the gels were measured. The fish species used are Japanese tilefish (a), sardine (b), croaker (c), hairtail (d), and dolphinfish (e).

魚肉と同様にスルメイカ筋肉にも  $\text{Ca}^{2+}$  依存性の TGase が存在し、ミオシンの架橋反応を引き起こすことが報告されている (Nozawa ら 2001, Park ら 2003)。しかし、クエン酸 Na はキレート作用を有するので、この内在性 TGase の活性化を引き起こす  $\text{Ca}^{2+}$  を奪うことになる。すなわち、クエン酸 Na を添加した場合は内在性 TGase によるミオシンの架橋反応は期待できないことが予想される。

そこで、クエン酸 Na を使用したスルメイカ肉糊で、予備加熱の影響(「坐り」効果)を確認した。0.25 mol/kg のクエン酸 Na を添加したスルメイカ肉糊を 20°C から 40°C (5°C 間隔) で 2 時間予備加熱して、二段加熱ゲルを調製した。これらの物性および加熱ゲル中の HC 含量を Fig. 31 に示した。なお、対照として、直接加熱ゲルも調製した。破断凹みは、30°C で 2 時間予備加熱した場合が対照よりもやや高い値を示したが、破断強度は予備加熱を行っても対照とほとんど変わらず、予備加熱の効果が認められなかった。また、HC 含量は予備加熱によってほとんど変化せず、自己消化がほぼ完全に抑制されていること、さらにミオシン HC の架橋反応が進行していないことを確認した。すなわち、予想通りクエン酸 Na を加えた肉糊では、ミオシンの多量化は認められず、ゲル物性向上作用も見出されなかった。

魚類の内在性 TGase は mM オーダーの  $\text{Ca}^{2+}$  で活性化を受けるが、スルメイカに内在する TGase は 10 mM 以上の  $\text{Ca}^{2+}$  を必要とすることが報告されているので (Nozawa ら 2001)、この濃度のクエン酸 Na の添加は、たとえ活性の高い TGase が存在していても、活性を発現できないものと思われる。

#### (5) クエン酸 Na を用いたスルメイカの加熱ゲル形成に及ぼす MTGase と予備加熱の影響

次に、クエン酸 Na を加えたスルメイカ肉加熱ゲルに、予備加熱による「坐り」効果を発現させる目的で、 $\text{Ca}^{2+}$  を必要としない微生物由来の MTGase を用い、さらにゲル物性が向上するか検討した。Park ら (2005) はスルメイカ肉加熱ゲルの物性向上には、5 unit/g 前後の MTGase を添加することが有効であると報告している。そこで、自

己消化を十分抑制した 0.25 mol/kg のクエン酸 Na を添加した肉糊に、さらに 10 unit/g までの MTGase を加えて 35°C で 2 時間の予備加熱を行って、二段加熱ゲルを調製した。得られた加熱ゲルの物性を測定し、Fig. 32 に示した。MTGase 無添加の直接加熱ゲルに比べて、MTGase を加えて 35°C で予備加熱したゲルの方が高い破断強度、破断凹みを示した。MTGase 添加量が 2.5 unit/g で最大破断強度である 709 gw が、1 unit/g で最大破断凹みである 8.3 mm が得られた。さらに多量の MTGase を添加してもその効果は認められず、逆に破断凹みは減少する傾向になり、脆く、硬さが強調された好ましくないゲルであると判断した。

さらに、最適な予備加熱条件を探るため、予備加熱温度の影響を検討した。予備加熱温度を 20°C から 40°C として、予備加熱時間を 2 時間とした二段加熱ゲルを調製し、加熱ゲルの破断強度 (Fig. 33A, B, C) および破断凹み (Fig. 33D, E, F) を測定した。このとき使用した MTGase は、Fig. 32 の結果から適量と考えられた 1 および 2.5 unit/g、また、多少多めと判断された 5 unit/g とした。予備加熱温度が 20°C から 35°C まで高くなるに従って、得られたゲルの破断強度は高くなった。40°C ではやや低下したので、最適温度は 35°C であると判断した。35°C での破断強度を比較すると、Fig. 32 で示したように、MTGase 添加量 2.5 unit/g が高い値を示した。一方、5 unit/g という多量の MTGase を添加すると、反応速度が大きくなったためか、1 あるいは 2.5 unit/g で認められた反応温度依存性が認められなくなった。破断凹みも破断強度と同様な変化を示し、1 および 2.5 unit/g の MTGase の添加では 35°C で最も高い値を示した。そして、5 unit/g になると、反応温度による違いは認められなくなった。5 unit/g の MTGase では、反応が瞬時に起こるため、反応温度の違いによる影響が観察されないものと思われる。

これら加熱ゲルの特性を折り曲げ試験 (西岡 1993) から判断した。予備加熱条件に関わらず、2.5 および 5 unit/g を添加した加熱ゲルは、2 つ折りで 2 辺に分離してしまう「1」という低い評価で

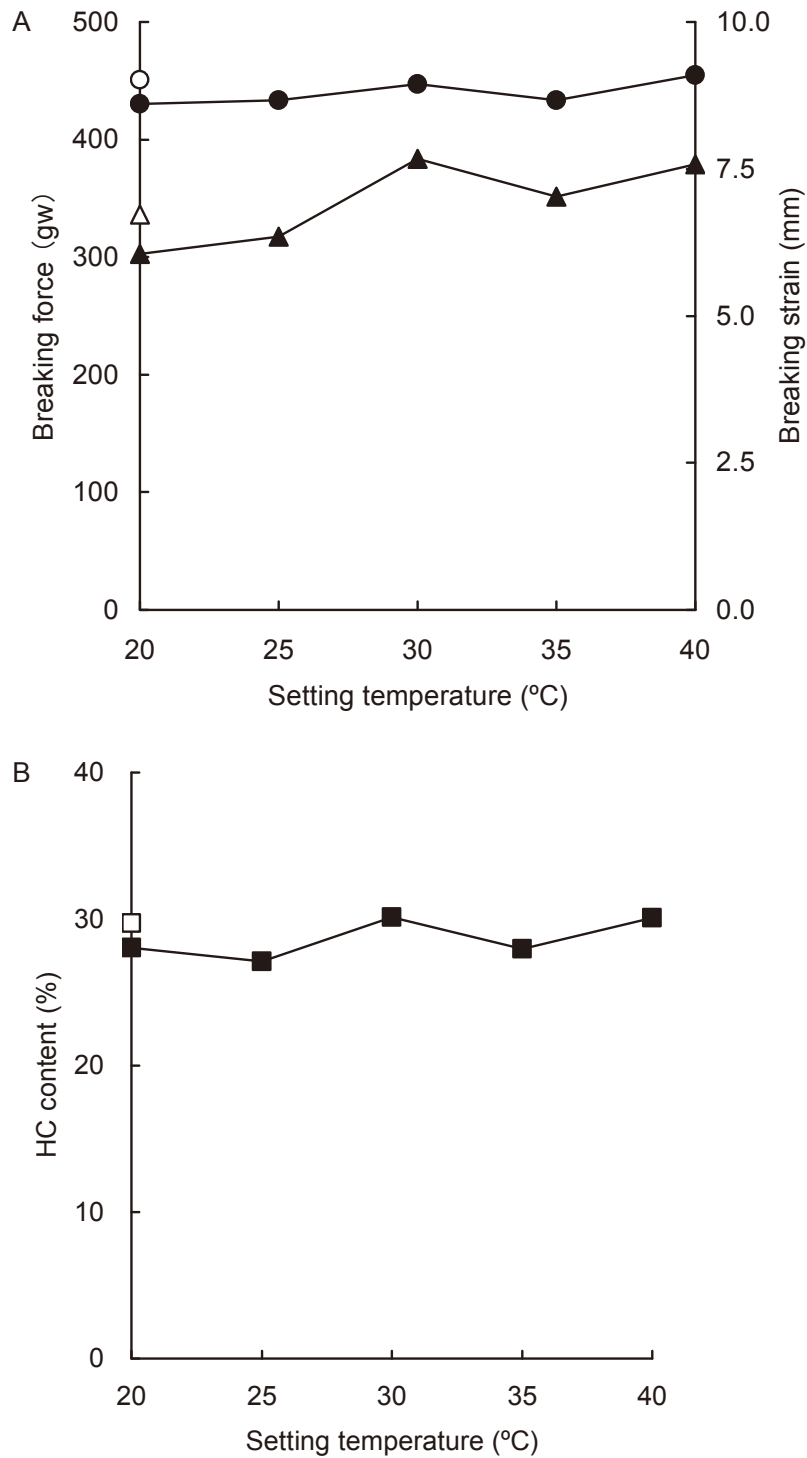


Fig. 31 Effect of preheating on the gel properties and on myosin degradation. Squid meat paste ground with 0.25 M Na-citrate was preheated at various temperatures for 2 hours, and further heated at 90 °C for 30 min. (A), The breaking force (circles) and breaking strain (triangles) for the gels were measured. (B), Myosin HC content (closed squares) was estimated from the SDS-PAGE patterns for the gels dissolved into SDS-UM. Open symbols in (A) and in (B) denote the results for the gel without preheating process.



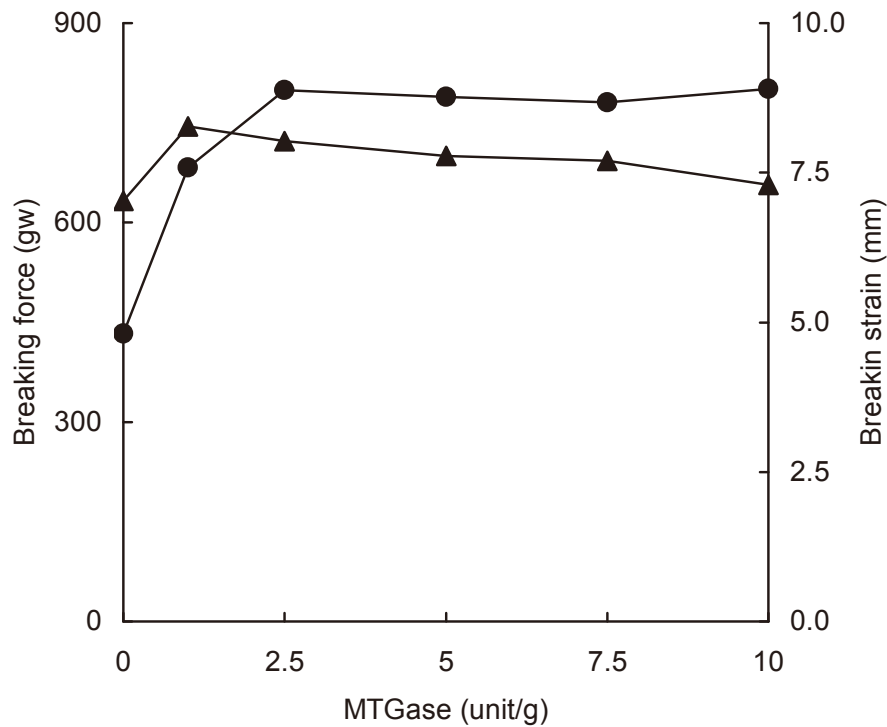


Fig. 32 Promotive effect of MTGase on the thermal gel formation of squid meat prepared with Na-citrate. Squid meat paste ground with 0.25 M Na-citrate was added by various contents of MTGase. The pastes were preheated at 35 °C for 2 hours, and heated at 90 °C for 30 min. The breaking forces (circles) and strains (triangles) for the gels were measured.

あったのに対し、1 unit/g では、2つ折りで亀裂を生じる「2」の評価であった。しかし、魚肉で優れたゲルといわれている「4」、「5」の高い評価のゲルは調製できなかった。破断強度や破断凹みの値だけからは判断できないゲル特性を考慮すると、MTGase の添加量は少ない (1 unit/g) 方が、比較的しなやかなゲルを形成できると考えられた。また、生産レベルでの実用化を想定した場合、短時間で進行する反応を制御するのは困難であるため、低濃度で同じ効果が得られるのであれば、低濃度にして比較的緩慢に反応を進行させる方が制御は容易と考え、以下の試験で添加する MTGase は 1 unit/g とした。

次に、0.25 mol/kg クエン酸 Na と 1 unit/g MTGase を添加したイカ肉糊を 35 あるいは 45°C で反応させ、高温加熱を行わない、いわゆる「坐り」ゲルの物性の変化を追跡した。35°C で予備加熱した場合は、予備加熱 180 分間までの間に、破断強度は 200 gw まで、および破断凹みは 8.5 mm まで上昇した (Fig. 34A)。これに対して 45°C では、破断強度および破断凹みともに、予備加熱 30 分間までに急激な上昇を示し、その後の変化は緩慢となった。破断強度は 35°C より高く 300 gw、破断凹みは 9 mm となった (Fig. 34B)。なお、結果は示さないが、MTGase を加えずに、いずれの温度で 3 時間保持してもゲル化しなかった。

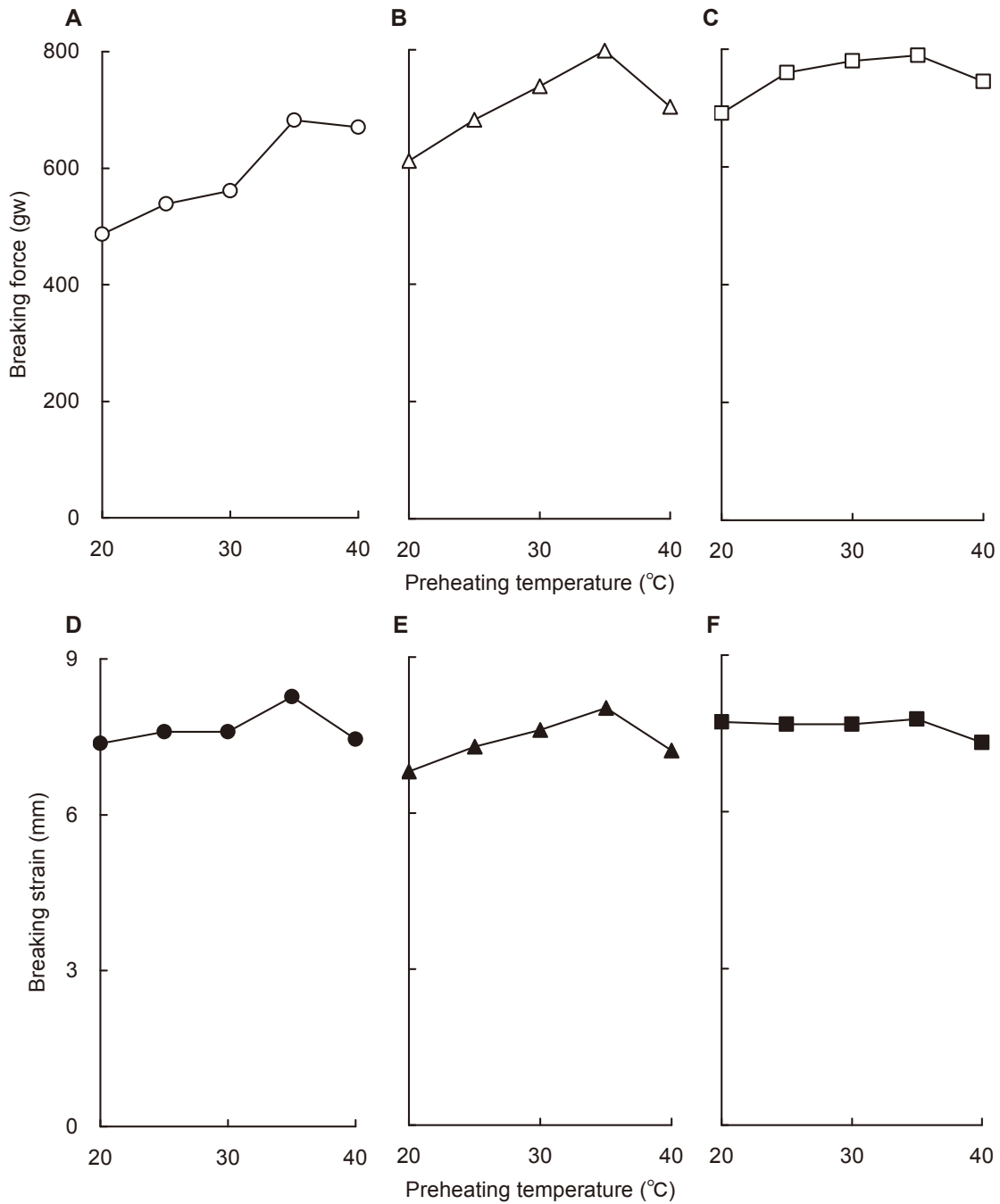


Fig. 33 Effect of MTGase on the gel properties of the thermal gel of squid containing Na-citrate. Squid meat pastes containing 0.25 M Na-citrate were added by 1 unit (A,D), 2.5 unit (B,E) or 5 unit/g meat (C,F) of MTGase. The pastes were preheated at various temperatures for 2 hours, and heated at 90 °C. A, B, and C are the breaking force, and D, E, and F are breaking strain for the gels.

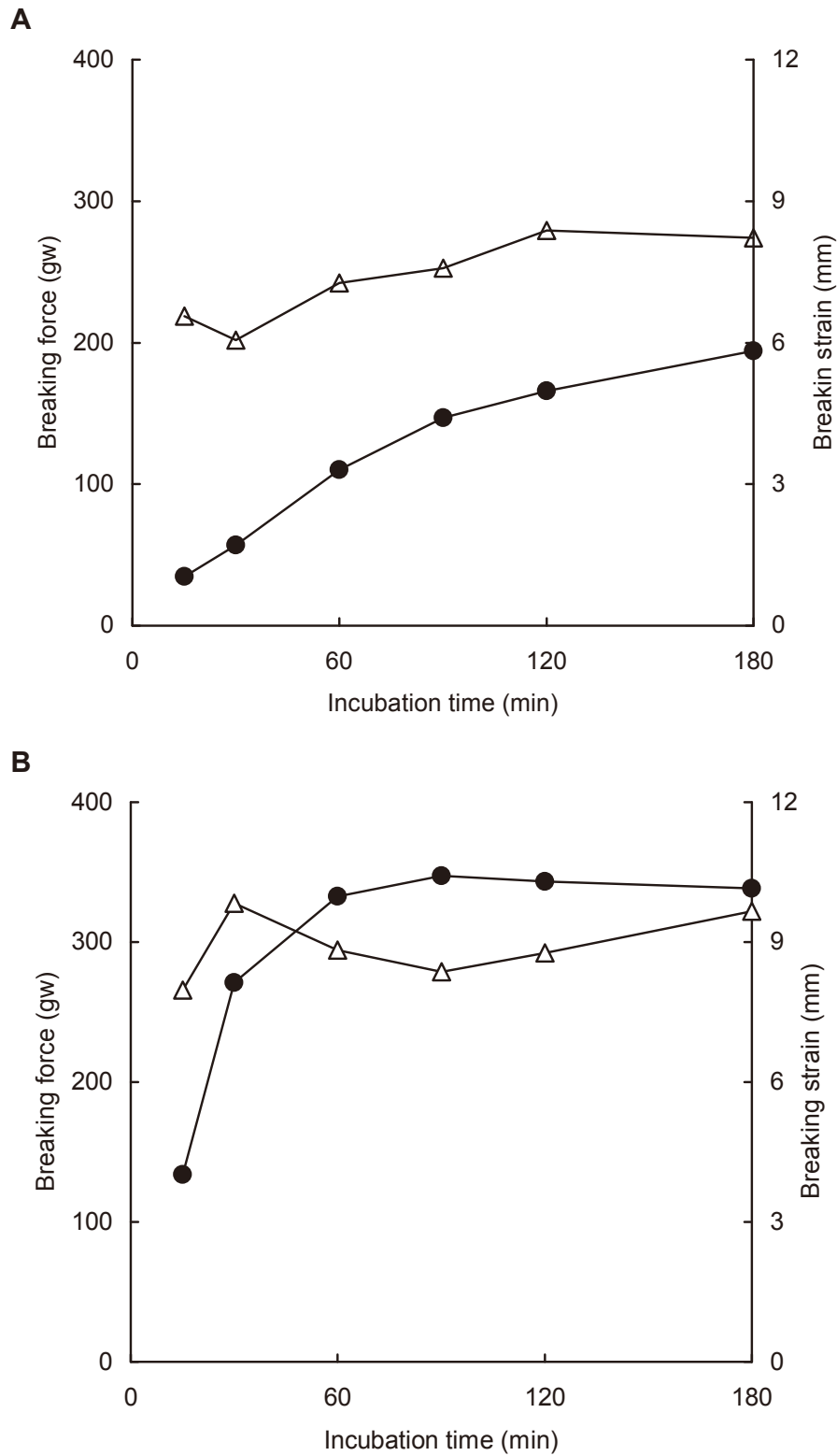


Fig. 34 Promoting effect of MTGase on the thermal gel formation of squid meat. Squid meat paste containing 1 unit/g MTGase and 0.25 M Na-citrate was preheated at 35 °C (A), or at 45 °C (B) for various time. The breaking force (closed circles) and the strain (open triangles) for the gels were measured.

Fig. 34 の結果は、35 および 45°C で MTGase を作用させると、高温加熱しなくてもスルメイカ肉のゲル化は可能であることを示している。この理由として、MTGase によるミオシンの架橋反応が進行していることが期待された。そこで、高分子量であるミオシン HC の多量化生成物を 3.3% アクリルアミド/0.5% アガロースを支持体とした SDS-PAGE で解析した。得られた SDS-PAGE パターンを Fig. 35 に示した。なお、いずれの温度で予備加熱しても、0.25 M のクエン酸 Na の作用により、反応中にミオシンの分解物である 150 kDa などの生成は認められなかった。

35°C では、予備加熱時間の経過に伴い、緩やかに HC の減少が認められ、15 分間では HC の 2 量体や 3 量体が生成された。そして 30 分間になると、HC の多量体だけでなく、使用した非常に低濃度のポリアクリルアミドゲル内に浸入できず、ゲルの先端にとどまっている成分も検出された。さらに反応時間が 120 分間以上になると、HC は痕跡程度となり、2 量体や 3 量体、さらに、アクリルアミドゲル内に浸入できない成分まで消失した。この結果は、ミオシン架橋体が不溶性の多量化物に変化したことを示している。

45°C の場合は、35°C で観察されたミオシン HC の変化がさらに速やかに進行した。すなわち加温 15 分間後には、2 量体およびアクリルアミドゲル内に進入できない成分が検出され、予備加熱時間が 30 分間以上になると、HC は痕跡程度となり、アクリルアミドゲル内に浸入できない成分も消失した。

加熱ゲル物性との定量的な相関は明らかではないが、アクリルアミドゲル内に進入できない成分、HC の多量化物および HC が、痕跡程度になった予備加熱時間、すなわち 35°C の 120 分間および 45°C

の 30 分間は、Fig. 34 に示したそれぞれの予備加熱温度で破断凹みが最大値を示した時間と一致した。そこで、不溶化を解析するため、SDS-UM 溶液への溶解率を測定し、Fig. 36 に示した。溶解率は反応温度に関わらず徐々に低下し、35°C では 75% まで、45°C では 50% にまで達した。45°C では 35°C よりも短時間で溶解率は低下した。また、45°C では 35°C よりも常に低い溶解率を示した。以上述べたように、SDS-PAGE パターンおよび SDS-UM 溶液への溶解性の低下から、1 unit/g の MTGase の作用によって、スルメイカ・ミオシンの多量化物が形成されていることを確認した。

次に、Fig. 34 と同様に、MTGase を 1 unit/g として 35 あるいは 45°C で 240 分間まで予備加熱した二段加熱ゲルを調製し、その物性を Fig. 37 に示した。なお、対照は直接高温で加熱した直接加熱ゲルとした。35°C で予備加熱した場合は、120 分間まで破断強度および破断凹みは高くなる傾向を示した。これに対して 45°C では、破断強度および破断凹みともに、60 分間までに上昇は終了し、それ以上予備加熱時間が長くなっても、変化しなくなった。得られたゲルの中では、35°C で 120 分間予備加熱したゲルのみが、折り曲げ試験は「2」で、その他の条件のゲルは「1」であった。また、対照の直接加熱ゲルでみられた加熱後の顕著な離水（約 20 重量%）は、35°C で 120 分間予備加熱したゲルでは約 12% まで減少した。

以上のように、MTGase はクエン酸 Na を加えて自己消化を抑制したスルメイカ肉糊中のミオシンを多量化させる効果を有し、ゲル物性を向上させることが明らかとなった。この事実は、MTGase とクエン酸 Na の併用によって、イカ肉ねり製品製造に「坐り工程」を導入してゲル物性を改良できることを示唆している。

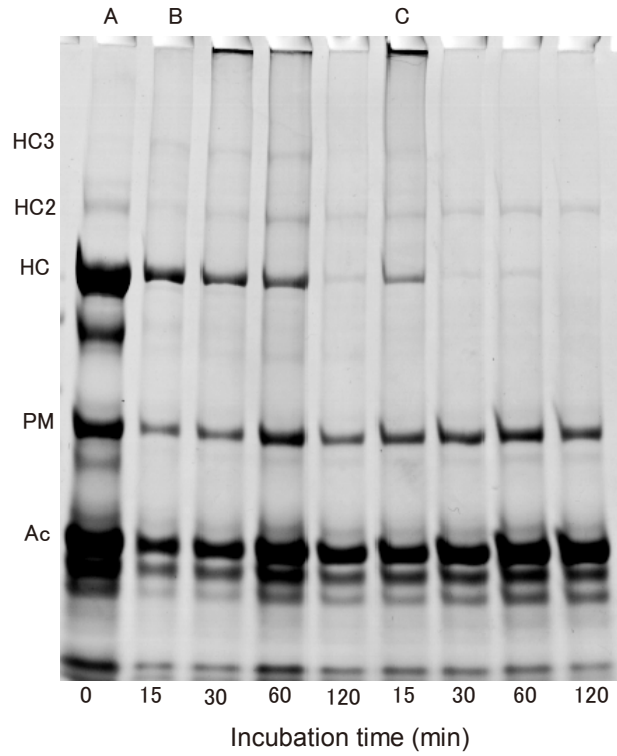


Fig. 35 Myosin cross-linking reaction induced by MTGase in squid meat paste. Squid meat pastes containing 0.25 M Na-citrate and 1 unit/g of MTGase were preheated at 35 °C (B), or at 45 °C (C) for various min. (A) is the sample before preheating. Myosin cross-linking reaction was revealed on agarose/polyacrylamide gel. HC, PM, Ac are myosin heavy chain, paramyosin and actin, respectively. HC with numbers are myosin HC polymers.

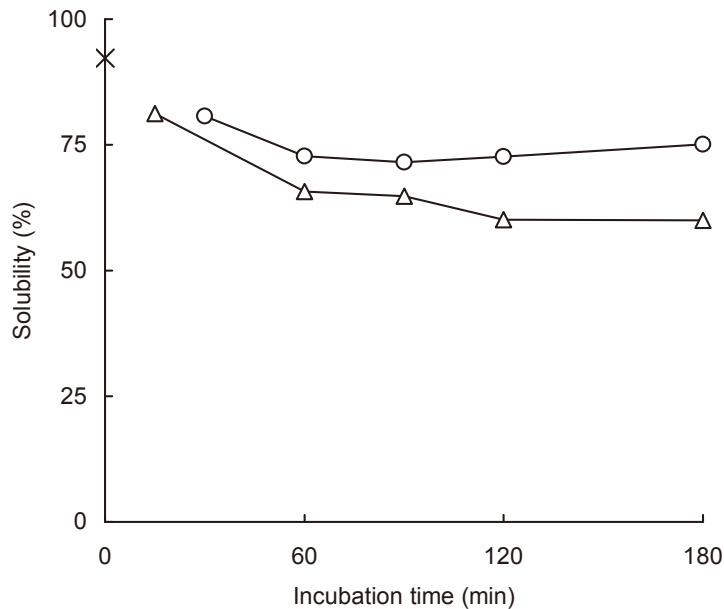


Fig. 36 Decrease in the solubility of proteins in squid thermal gel into SDS-UM solution. The same preheated gels as in Fig. 35 were dissolved into SDS-UM solution by shaking overnight. The recovery of the protein in the supernatant by centrifugation at 4,000 x g for 30 min was estimated by measuring protein concentrations. Samples preheated at 35 °C (circles), and ones at 45 °C (triangles), and one without preheating (cross mark) were compared.

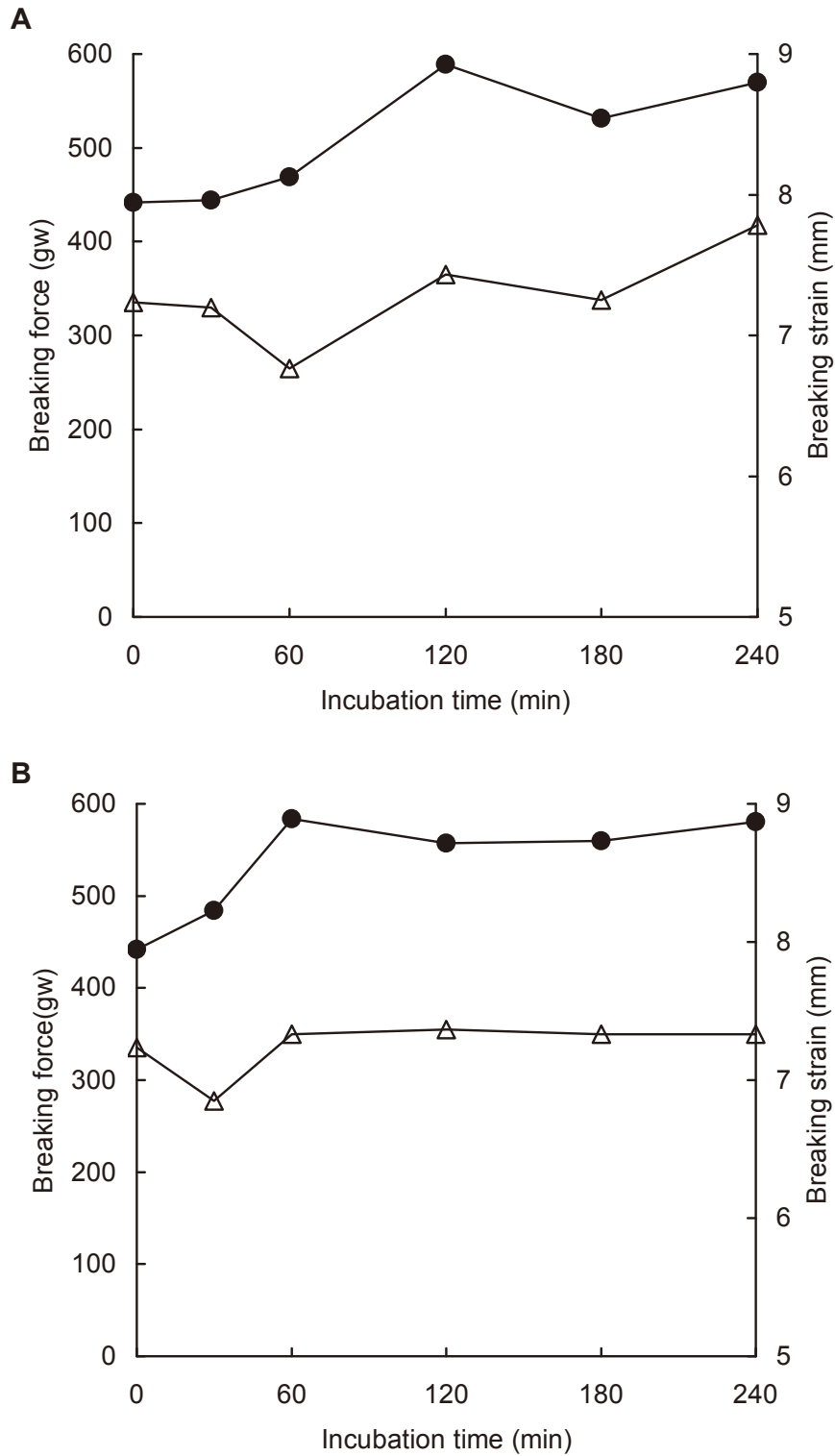


Fig. 37 Promotive effect of MTGase on the thermal gel of squid meat. Squid meat pastes containing 0.25 M Na-citrate was added by MTGase (1 unit/g) and preheated at 35 (A) or at 45 °C (B). The preheated gels were further heated at 90 °C for 30 min. The breaking force (closed circles) and strain (open triangles) for the gels were measured.

## 小考察

前章までのスルメイカ肉ホモジネートを用いたモデル試験の結果から、クエン酸 Na は、自己消化の抑制および筋原繊維の溶解の両作用があることを明らかにした。これらの結果は、クエン酸 Na がイカ肉のねり製品化に、非常に適した化合物であることを示している。そこで、本章では実際にスルメイカ外套膜筋肉から加熱ゲルを調製し、その効果を検証した。クエン酸 Na を添加した加熱ゲル中では自己消化が起こっていないことを確認し、モデル系での結果が実際の加熱ゲルでも成立することを見出した。そして、残存 HC 量を高く維持することにより、優れたゲル物性を示すゲルの形成が初めて可能となった。ここで得られたゲル物性は、600 gw を越えており、十分加熱ゲルとみなせるものであった。ただし、クエン酸 Na によるミオシンの自己消化を抑制する明らかな機構は、金属プロテアーゼの活性化因子である金属 (Okamoto ら 1993) をキレートすることにあるので、予備加熱による「坐り」効果が期待できない。事実、クエン酸を添加した二段加熱ゲルでは、いわゆる予備加熱によるゲル物性向上効果（「坐り」効果）がまったく検出されず、「坐り」効果に密接に関係するミオシン架橋体の生成も認められなかった。この結果は、Ca<sup>2+</sup>依存型のスルメイカ筋肉内在性ミオシン架橋酵素 (TGase) による反応 (Nozawa ら 2001) が、クエン酸 Na によって阻害されている可能性を示唆している。

現在、内在性 TGase に特徴が類似した外来性 TGase (MTGase) が、食品加工分野で広く利用されている。放線菌の一種から発見されたこの酵素は、ミオシンの架橋反応を触媒するという反応は内在性 TGase と同じであるが、Ca<sup>2+</sup>要求性は無いのが特徴である (Ando ら 1989)。この酵素であれば、クエン酸 Na で Ca<sup>2+</sup>がキレートされている条件においても、予備加熱することによりミオシンを多量化させ、結果としてスルメイカ加熱ゲルの

物性を向上させる可能性がある。様々な検討の結果、特に、しなやかなゲルを作るためには、適切な添加量、反応温度、反応時間の設定が重要であり、適量の MTGase (1-2 unit/g) を使い、最適温度 (35°C) で 1-2 時間予備加熱すると、ゲル物性は向上することを明らかにした。また、反応を短時間で進行させるため、多量の MTGase の使用や、高温 (たとえば 45°C) で短時間反応させることは、かえって好ましくないゲルを形成させることを示した。

本章では、イカ肉ばかりではなく、クエン酸 Na が魚肉のゲル形成に及ぼす影響も検討した。調製した直接加熱ゲルにおいては、NaCl とさほど大きな違いは認められなかったが、坐り効果が大きい魚種に対しては、坐り効果を消失させた。それゆえ、坐り効果を示さない魚種、たとえばシロサケには十分使用できると考えられる。このように、クエン酸 Na を使用した加熱ゲルは坐り効果を示さないというデメリットがあり、それを補うには MTGase が必要である。しかし、食塩をまったく加えなくとも、ねり製品を製造できるというこれまでにない優れた特性を有している。これにより、塩味を自由に調整したねり製品が製造可能である。

本研究で使用したイカ肉は、魚肉の場合のように水晒しをせず、イカ肉をそのままねり製品に加工している。経験的に、イカ肉を水晒しすると、本来は水に不溶であるはずの筋原繊維が水和により溶出し (Katsumi and Matsumoto 1969)、歩留りおよびタンパク質濃度が低下する。さらに、イカ独特の味が失われてしまう。このような観点からイカ肉をそのまま使用したが、イカの味を利用したねり製品を製造した方が、消費者には受け入れられると予想される。これら、本研究成果に基づいた原理を利用することで、これまで不可能であったスルメイカ肉からのねり製品の製造が可能となったことは、産業的に重要な意味があると考えている。

#### 第4章 ミオシンおよびアクチンの変性に及ぼすクエン酸 Na の影響

スルメイカ外套膜および魚肉を食品として利用するために、最も重要な役割を果たすのが筋原繊維タンパク質、特にミオシンである (Samejima ら 1969, 1981, 高士ら 1970, Kawakami ら 1971, 高士 1973, Yasui ら 1980)。それゆえ、第1章では、スルメイカ外套膜筋のミオシンが選択的に分解される自己消化をいかに抑制するかについて検討し、食品添加物として利用可能なクエン酸 Na の添加で、ほぼ完璧な抑制が可能であることを示した。さらに、第2章では、スルメイカ外套膜筋肉のねり製品への利用を想定し、ゲル化に必要なミオシンの溶解が、クエン酸 Na の添加で可能となり、NaCl 無添加でも溶解できることを示した。第3章では、クエン酸 Na の持つ2つの重要な機能を利用し、クエン酸 Na のみを添加すると、現場で応用可能なレベルで、スルメイカ外套膜筋肉から加熱ゲル化物が調製できることを示した。

次の問題は、スルメイカ筋肉のゲル化の主体タンパク質であるミオシンの変性に、クエン酸 Na はどのような影響を与えるかという点である。すなわち、クエン酸 Na はミオシン変性を促進するのか、抑制するのか、あるいは、何の影響も与えないのかという問題である。これまで、ミオシンの変性を防止するため、数多くの試み、提案がなされている。ミオシンが非常に不安定なため、長期間の保存は不可能であったスケトウダラ筋肉の不安定さを克服したのが、ソルビトールやショ糖の添加である (新井ら 1970, 川島ら 1973b)。糖類の添加により、すり身の長期間の凍結保存が可能となり、魚介類の筋肉から新たな食品素材であるスケトウダラ「冷凍すり身」が開発され、「冷凍すり身」は国際的な水産製品となり、SURIMI はそのまま英語として使用できる状況になっている。その後も、ミオシンの変性を効果的に抑制する化合物の探索、開発がなされ、これまで報告されている変性抑制化合物には、糖類、糖アルコール類に加え、ある種のアミノ酸塩、および有機酸塩が含まれている (大泉ら 1982, 1984, 松浦ら 1984,

Noguchi and Matsumoto 1970, 1971)。変性抑制の程度は添加物の濃度に依存することが、大泉ら (1981) による各種化合物を用いた定量的な解析から、詳細に調べられた。そして、化合物による変性抑制作用の大きさはそれぞれ固有であるから、使用する化合物の種類と濃度がわかれば、期待できる変性抑制作用が計算できることが報告された。その後、硫酸 Na, 硫酸カリウムおよび硫酸アンモニウムなどの塩類も、ミオシンの変性を抑制することが報告された (Torigai and Konno 1996, Konno 1998, Hayashi and Konno 2006)。いずれの場合も、筋原繊維のミオシンの変性指標として、定量的な解析が容易な  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性の失活が利用されている。この指標は、すり身の生化学的品質評価にも使用され、すり身中のミオシン変性の程度がすり身の品質を反映するという考え方に基づいた解析方法である (川島ら 1973a)。

第1章の結果から、クエン酸 Na はスルメイカ肉の金属プロテアーゼによるミオシン分解を強く抑制すると同時に、理由はわからなかったが、セリンプロテアーゼによる分解も抑制した。この原因としてクエン酸 Na が、プロテアーゼの基質となるミオシンに働きかけ、分解を受けないように保護している可能性を推察した。

これまで、スルメイカ肉筋原繊維の熱変性に関する研究から、魚類筋原繊維に比べ、共存する NaCl や KCl による熱変性促進作用が大きく、塩濃度を上昇させると、変性が 300-500 倍も促進されること、また、最大変性速度を引き起こす塩濃度が魚類の場合の約半分 (0.75 M 程度) であることが明らかになっている (Konno 1991b, Konno and Yuasa 1993)。塩濃度の増加によってアクチンとミオシンの結合が弱められ、結果としてアクチンによる安定化作用が失われる点については魚類と同じであるが、イカ外套膜肉では比較的低いイオン強度で容易に、アクチンの安定化作用が失われることを示している。さらに、イカ独特の性質は、 $\text{Ca}^{2+}$ 存在下では筋原繊維、ミオシンの安定化が起こることである。すなわち、 $\text{Ca}^{2+}$ 存在下、EDTA 存在下で筋原繊維を加熱したときの  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase



の失活速度を比較すると、 $\text{Ca}^{2+}$ 存在下では 1/100 程度に小さくなり、非常に安定化を受けることが知られている (Konno 1991b)。このような  $\text{Ca}^{2+}$  による安定化効果は、魚類筋原繊維では認められない (佐伯ら 1986, 1989)。

そのような状況を踏まえ、第 4 章ではイカ筋原繊維およびミオシンの変性に及ぼすクエン酸 Na 添加の影響を検討した。クエン酸 Na は、本来の変性への影響とともに、そのキレート作用により  $\text{Ca}^{2+}$  を除去し、不安定化させ変性を促進することが予想される。2 つの影響を同時に解析するのは困難であるため、先に、変性が  $\text{Ca}^{2+}$  の影響を受けない魚類 (コイ) 筋原繊維を用いて、クエン酸 Na が本来有するミオシン変性への影響を解析した。その上で、 $\text{Ca}^{2+}$  の影響を受けるイカ筋原繊維、ミオシンの変性に対する影響を検討した。

#### (1) クエン酸 Na 存在下での $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性の測定

クエン酸 Na のキレート作用は、 $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性の測定に様々な影響を与えることが予想される。まず、ATPase 活性測定のための無機リン酸の発色に対して、発色阻害があるのかを検討した。濃度既知の無機リン酸液を様々な濃度のクエン酸 Na 存在下で発色させ、吸光値への影響を調べた。その結果、 $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 反応組成に 0.25 M 以上のクエン酸 Na が存在する場合に、明らかに発色阻害が認められると判断されたが、0.1 M 以下であれば、発色阻害が起らないことを確かめた (図示せず)。本実験では、反応液に 1/10 量の筋原繊維溶液を添加して活性測定を行っているので、用いる筋原繊維溶液中のクエン酸 Na 濃度が 1.0 M 以下であれば、発色への影響はないと判断した。

次に、 $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性に対する影響を検討した。クエン酸 Na は第 2 章で明らかにしたように  $\text{Ca}^{2+}$  をキレートするので、 $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase の活性化因子としての  $\text{Ca}^{2+}$  を反応系から取り除き、活性を阻害する可能性がある。また、ミオシンには 3 種のイオン ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^{+}$ ) で活性化される ATPase が認められるが、もし、反応系に高濃度 (0.5 M 程度)

の KCl が含まれていれば、クエン酸 Na を添加することは EDTA を添加して  $\text{K}^{+}$ -ATPase を測定するのと同じように、 $\text{K}^{+}$ -ATPase の発現を誘発し、解析が非常に難しくなると予想される。そこで、0.5 M KCl あるいは NaCl を含む反応組成液に、様々な濃度のクエン酸 Na を加え、コイ筋原繊維の  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (5 mM  $\text{CaCl}_2$ ) を測定した。結果を Fig. 38 に示したが、KCl でも NaCl でも、クエン酸 Na 濃度が高くなるにつれ、 $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性は低下し、阻害が認められた。しかし、 $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase の阻害程度は、NaCl を使用した方が KCl を使用した場合よりも大きかった。もし、キレート作用による  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の減少のみが起っているのであれば、両者は同じ変化をするはずである。KCl 存在下で、見かけの  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase の阻害が小さいのは、次第に  $\text{K}^{+}$ -ATPase 活性が増大しているためと推定された。この結果から、反応組成に KCl は使用すべきでないと判断した。

さらに、 $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性の低下が  $\text{Ca}^{2+}$  のキレート作用であることを確かめるため、 $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (0.5 M NaCl, 5 mM  $\text{CaCl}_2$ ) に及ぼすクエン酸 Na と EDTA との影響を比較した。結果を Fig. 39 に示したが、 $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性は、反応液中の  $\text{CaCl}_2$  濃度と同程度の 5 mM EDTA 添加でほぼ消失した。一方、クエン酸 Na の場合はほぼ完全に阻害するために、100 mM 程度まで濃度を上昇させる必要があった。この結果は、クエン酸 Na のキレート作用が EDTA に比べてかなり低いという第 1 章の結果を支持するものであった。

次に、クエン酸 Na による  $\text{Ca}^{2+}$  キレート作用を  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度要求性への影響から、定量的に解析した。すなわち、 $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性は反応組成に含まれる遊離  $\text{Ca}^{2+}$  濃度によって決定されると想定し、クエン酸 Na が存在すると、 $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase の活性化に必要な  $\text{Ca}^{2+}$  濃度がどのように変化するか解析した。そのため、0 M, 0.05 M, 0.1 M のクエン酸 Na 存在下、 $\text{CaCl}_2$  濃度を変えて  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性を測定し、結果を Fig. 40 に示した。クエン酸 Na により  $\text{Ca}^{2+}$  がキレートされれば、同じ  $\text{CaCl}_2$  濃度の添加であっても、遊離の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が低下する

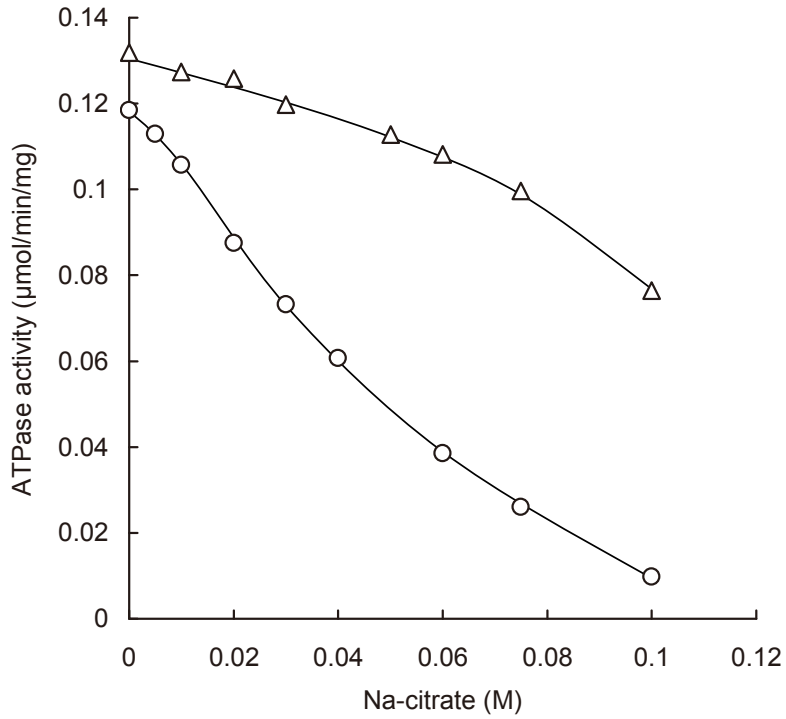


Fig. 38 Inhibitory effect of Na-citrate on the Ca-ATPase activity. Ca-ATPase of carp myofibril was assayed at 25 °C in a medium containing 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM ATP, 25 mM Tris-maleate (pH 7.5) and 0.5 M either NaCl (circles) or KCl (triangles) in the presence of various concentrations of Na-citrate.

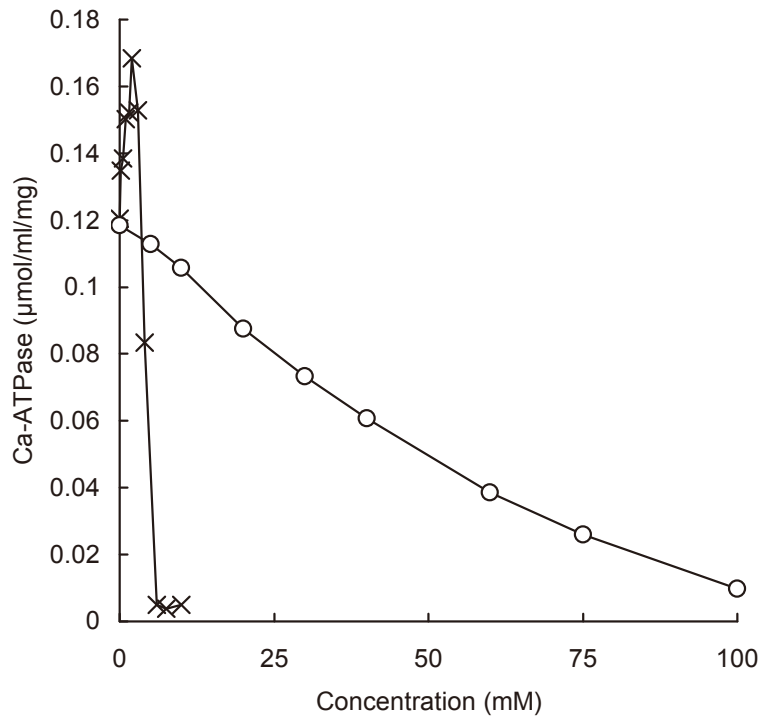


Fig. 39 Comparison of inhibitory effect of Na-citrate with EDTA on Ca-ATPase activity. The assay medium contained 0.5 M NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM ATP, 25 mM Tris-maleate (pH 7.5) together with either EDTA (cross marks) or Na-citrate (circles).

ため、活性の低下が起こるはずである。また、高濃度の  $\text{CaCl}_2$  を加えれば、それが軽減されると考えられる。すなわち、クエン酸 Na は  $\text{Ca}^{2+}$  に対して拮抗的に活性を阻害すると推定される。

Fig. 40A に示したように、クエン酸 Na 無添加では約 6 mM の  $\text{CaCl}_2$  濃度で最大活性化が起こり、50%の活性化には約 0.6 mM で十分であった。ところが、0.05 M のクエン酸 Na が存在すると、10 mM まで  $\text{CaCl}_2$  濃度を上昇させても、最大活性化は得られなかった。最大活性が同じだと仮定して 50%活性化に必要な  $\text{CaCl}_2$  濃度を求めると、4 mM であった。また、クエン酸 Na が 0.1 M になると、0.05 M の場合よりも活性化の曲線は緩やかになり、活性化にはさらに高濃度の  $\text{CaCl}_2$  を必要とした。この  $\text{Ca}^{2+}$  による活性化曲線の変化は、 $\text{Ca}^{2+}$  をミオシンとクエン酸が競争して奪い合っている典型的な拮抗阻害の図形と考えられる。

そこで、0 M および 0.05 M クエン酸 Na 存在下での  $\text{CaCl}_2$  濃度および  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性値の逆数をプロットして、最大活性化および 50%最大活性化に必要な  $\text{CaCl}_2$  濃度を算出し、結果を Fig. 40B に示した。Y 軸との交点はほぼ同じであるため、 $\text{CaCl}_2$  を無限大にしたとき得られる最大活性値は同じであった。そして、X 軸との交点から 1/2 最大活性化のために必要な  $\text{CaCl}_2$  濃度を求めると、クエン酸 Na 非存在下で 0.9 mM, 0.05 M 存在下で 6 mM と計算され、Fig. 40A で求めた結果とほぼ同じ値が得られた。

さらに、第一章で算出したクエン酸 Na と  $\text{Ca}^{2+}$  との結合定数 ( $1.94 \times 10^2$ ) を用いて、遊離  $\text{Ca}^{2+}$  を求め、Fig. 40A のクエン酸無添加および 0.05 M 添加の場合の活性値を添加  $\text{CaCl}_2$  濃度の代わりに遊離  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の関数として、Fig. 40C に示した。すると、2 つの曲線は一本とみなすことができた。これらの結果から、クエン酸 Na が  $\text{Ca}^{2+}$  とキレート化合物を形成し、結果として活性化に使用できる  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が低下したことが裏付けられた。従って、クエン酸 Na 存在下において、 $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase を測定する場合は、活性化のために  $\text{CaCl}_2$  濃度が不足することが明らかであり、添加  $\text{CaCl}_2$  濃度を 5

mM から 15 mM に上げることにした。これでも Fig. 40 の結果から共存するクエン酸 Na 濃度が変われば最大活性化が得られないことが予想された。しかし、本研究で  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性を測定する目的は、ミオシンの変性速度を求めることにあるので、加熱に伴う相対的な失活が追跡でき、それがクエン酸 Na により影響を受けなければ問題は無いと考えた。

そこで、ATPase 活性測定のための反応混液にクエン酸 Na が含まれていても、求められる失活速度が同じであるかどうかを検討した。まず、クエン酸 Na 無添加のコイ筋原繊維を  $42^\circ\text{C}$  で経時的に加熱した。その  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase の失活を解析するための反応組成液に 0.05 M クエン酸 Na を加え、それによって多少の活性阻害が起きても、失活速度が影響を受けないかどうか無添加の場合と比較した (Fig. 41)。クエン酸 Na (0.05 M) が存在すると、 $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性そのものは阻害を受け、82% まで活性は低下したが、得られた傾き (失活速度) は同じであったため、速度そのものへの影響はないと判断した。また、同じ実験を反応組成液に NaCl の代わりに KCl を使用して行った。すると、クエン酸 Na が存在すると見かけの失活速度は小さくなった。アクチンと結合したミオシンの  $\text{K}^+$ -ATPase は、活性が阻害されることが報告されているので (若目田と新井 1984)、この結果は、加熱することで、アクチンによる  $\text{K}^+$ -ATPase 阻害が小さくなり、結果として  $\text{K}^+$ -ATPase 由来の活性が次第に現れてきたものと考えられた。そのため、この理由からも、KCl は使用できないと判断した。以後の実験では、0.5 M NaCl, 15 mM  $\text{CaCl}_2$  を  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 測定の反応組成液とした。

## (2) コイ筋原繊維の熱変性に対するクエン酸 Na の影響

クエン酸 Na による筋原繊維およびミオシンの熱変性抑制作用を調べるため、最初にコイ筋原繊維を用いて検討した。所定の終濃度となるようクエン酸 Na を加えたコイ筋原繊維を  $42^\circ\text{C}$  で経時的に加熱して、 $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 失活を一次反応として解析し、その傾きから算出した変性速度を、添加し

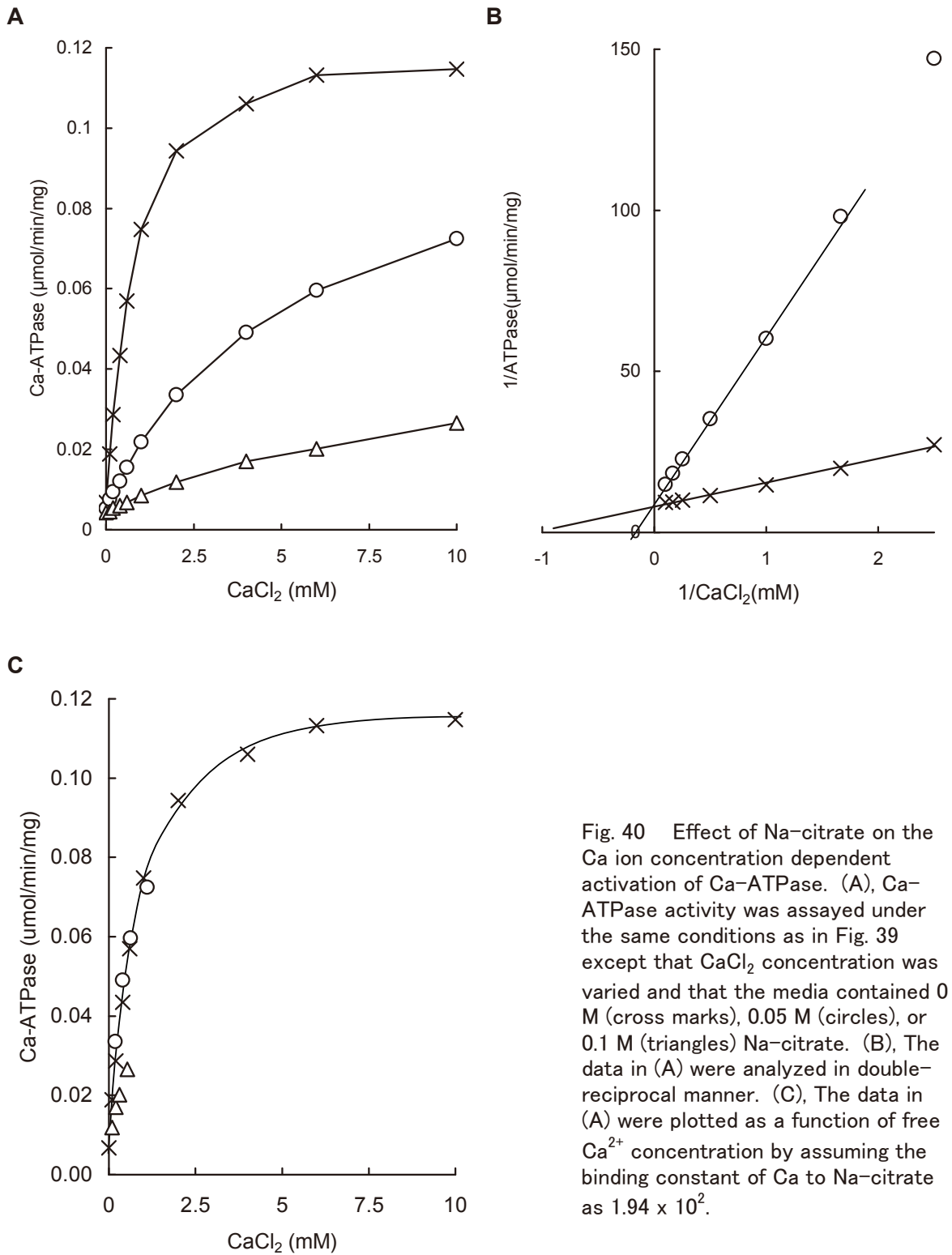


Fig. 40 Effect of Na-citrate on the Ca ion concentration dependent activation of Ca-ATPase. (A), Ca-ATPase activity was assayed under the same conditions as in Fig. 39 except that CaCl<sub>2</sub> concentration was varied and that the media contained 0 M (cross marks), 0.05 M (circles), or 0.1 M (triangles) Na-citrate. (B), The data in (A) were analyzed in double-reciprocal manner. (C), The data in (A) were plotted as a function of free Ca<sup>2+</sup> concentration by assuming the binding constant of Ca to Na-citrate as  $1.94 \times 10^2$ .

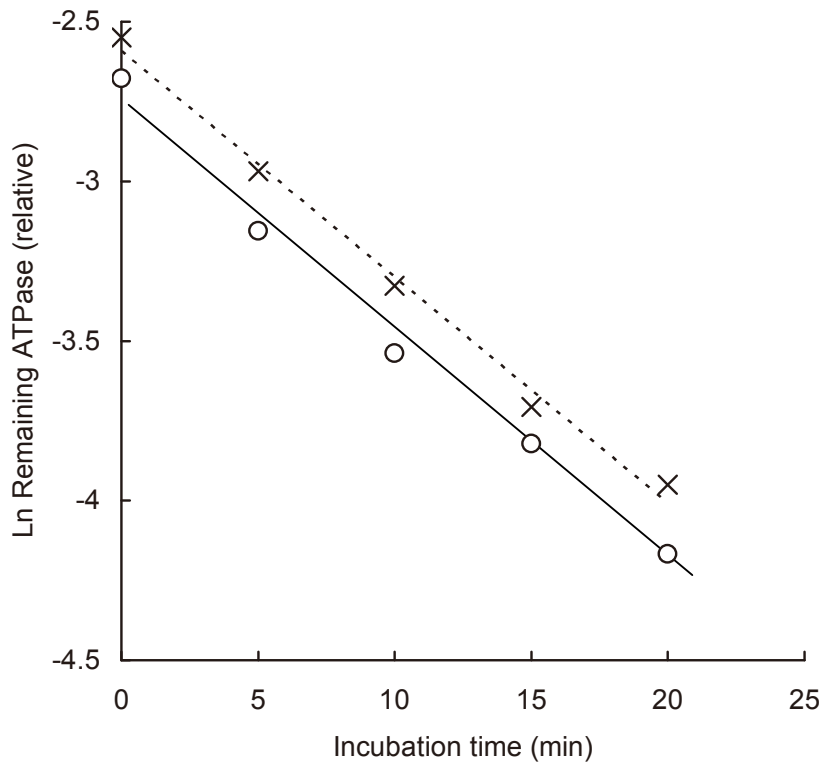


Fig. 41 Effect of Na-citrate in the assay medium on the estimation of thermal inactivation rate. Carp myofibrils in 0.1 M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) were heated at 42 °C, and their Ca-ATPase was assayed in a medium containing 15 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.5 M NaCl, 1 mM ATP with (circles) or without (cross marks) of 0.05 M Na-citrate.

たクエン酸 Na 濃度に対してプロットした (Fig. 42)。クエン酸 Na 濃度の上昇に従って、変性速度の対数値は直線的に小さくなり、クエン酸 Na に変性抑制作用があることが明らかとなった。また、これまで報告されている化合物と同様に、クエン酸 Na も定量的な解析が可能であることを示している。そこで、1 M クエン酸 Na の添加で変性速度の対数値がどのくらい小さくなるか、すなわち大泉ら (1981) の提案している E-value を算出し

た。その値は約 1.4 と計算され、1 M の添加で、約 25 倍変性が抑制されることがわかった。

### (3) クエン酸 Na によるコイ・ミオシンの熱変性抑制作用

前節の実験は筋原繊維を用いているので、ミオシンはアクチンと結合しており、アクチンによる安定化を受けている状態でのミオシンの変性に対する、クエン酸 Na の作用を見ていることになる。そこで、アクチンの安定化を受けていないミオシ

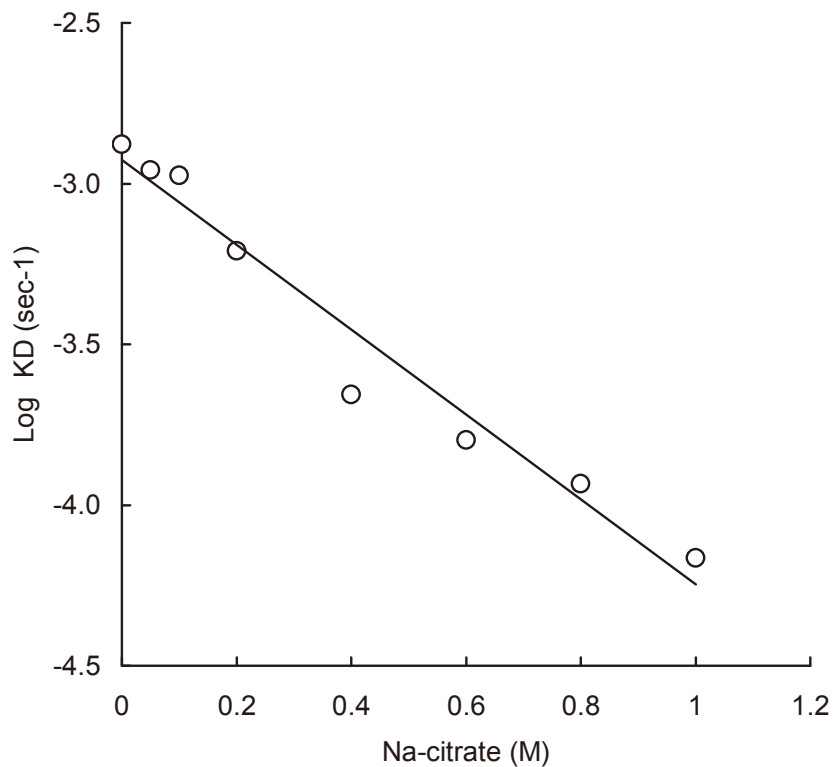


Fig. 42 Concentration dependent suppressive effect of Na-citrate on Ca-ATPase inactivation of carp myofibrils. Carp myofibrils were heated at 42 °C in the presence of various concentrations of Na-citrate. The inactivation rates were estimated from the slopes as in Fig. 41. The rates in logarithmic values were plotted against Na-citrate added to the heating media.

ンそのものの熱変性に対する、クエン酸 Na の安定化作用を検討した。この目的のため、筋原繊維を 1.5 M NaCl で 12 時間処理し、ミオシンを変性させることなく、アクチンのみを選択的に塩変性させた標品を調製した(若目田と新井 1985, 1986)。この塩処理筋原繊維をミオシンの代わりに利用して、ミオシン単独の熱変性に及ぼすクエン酸 Na の作用を解析したが、標品は既にアクチンの保護作用を失っているため、加熱温度を 35°C に下げ、Ca<sup>2+</sup>-ATPase 活性の失活速度を求めた。その結果、筋原繊維の場合と同様に、共存するクエン酸 Na

が高くなるほど ATPase の失活速度は小さくなり、ミオシンそのものの熱変性を抑制した (Fig. 43A)。クエン酸 Na 濃度と変性速度 (対数值, 相対値) との関係を図 43B に示した。この場合も直線関係が得られ、クエン酸 Na は濃度依存的に Ca<sup>2+</sup>-ATPase の失活を抑制し、ミオシンの熱変性を抑制することが明らかであった。E-value は 1.7 であり、筋原繊維で得られた結果 (Fig. 41) よりもやや高い値を示した。

このように、クエン酸 Na による安定化は、アクチンによって安定化を受けているミオシンより

も、ミオシン単独に対する場合の方が、大きいことが示された。すなわち、アクチンによる安定化は共存する塩濃度の影響を受けるので、クエン酸 Na 濃度が高くなると、アクチンによる安定化を消

失させる作用も加わることが予想され、本来の安定化と、アクチンの保護の消失との合成した効果が現れていると考えられる。すでに第2章で述べたように、クエン酸 Na には強い塩溶解作用があ

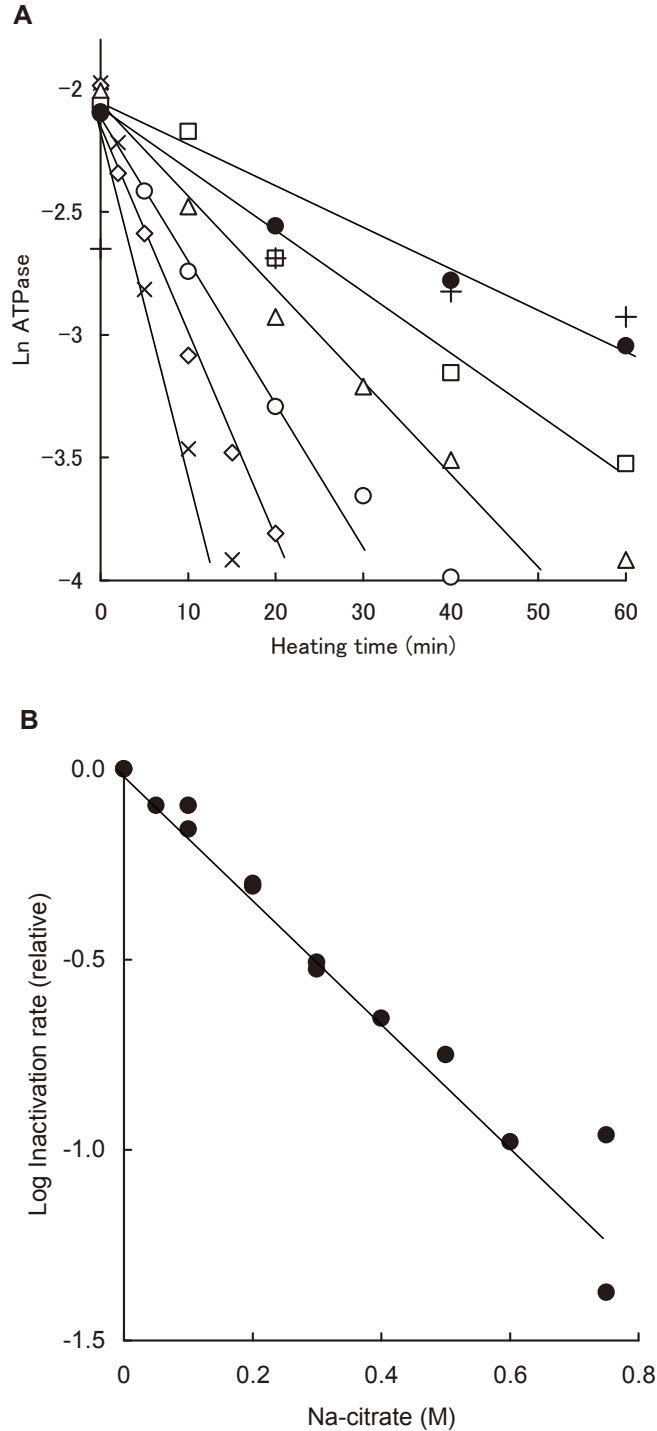


Fig. 43 Suppressive effect of Na-citrate on carp myosin denaturation. (A) Carp myofibrils treated with 1.5 M NaCl on ice overnight was used as myosin. Myosin was heated at 35 °C in the presence of 0 M (cross marks), 0.1 M (diamonds), 0.2 M (circles), 0.3 M (triangles), 0.4 M (squares), 0.6 M (closed circles) or 0.75 M (plus marks) of Na-citrate. (B) Thermal inactivation rates estimated in (A) were plotted against Na-citrate concentration.

ることから、0.1 M NaCl 下にクエン酸 Na を加えて加熱した場合、アクチンによる安定化作用を消失させる可能性がある。その結果として、見かけの変性抑制作用が小さくなったものと考えられる。同じような現象は、硫酸アンモニウムによる筋原繊維の変性抑制作用でも見出されている (Hayashi and Konno 2006)。

このクエン酸 Na のミオシンに対する安定化作用を、これまで安定化作用が広く知られている化合物 (大泉ら 1981, 1984) と比較し、Fig. 44 に示した。そのため、ここでは 1.5 M NaCl 処理した筋原繊維ではなく、硫酸分画法でコイ筋原繊維から調製したミオシンを使用した。それに対する安定

化作用を、グルタミン酸 Na、酢酸 Na およびソルビトールと比較した。様々な濃度での変性速度の対数値を添加濃度に対してプロットした。ここから得られた各化合物の E-value は、クエン酸 Na は 1.7, ソルビトールは 0.7, 酢酸 Na は 1.1, グルタミン酸 Na は 1.7 であった。クエン酸 Na は、これまで筋原繊維に対する安定化作用が最も強いといわれていたグルタミン酸 Na に匹敵する強い安定化作用を有していることが明らかとなった。この結果は、クエン酸 Na が、第 3 の機能として、非常に強いミオシンの変性抑制作用を有することを示している。

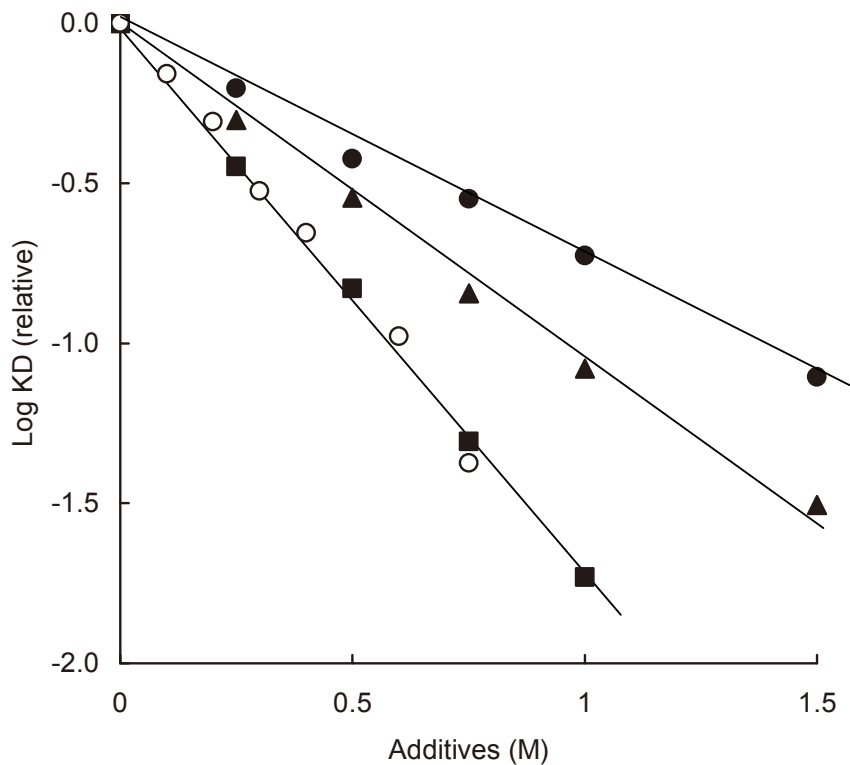


Fig. 44 Comparison of the suppressive effect of Na-citrate with other compounds. Relative inactivation rate of carp myosin in logarithmic values estimated in the presence of various concentration of Na-citrate (open circles), Na-glutamate (closed squares), sorbitol (closed triangles), and Na-acetate (closed circles) were plotted against their concentrations.



#### (4) クエン酸 Na がコイ・アクチンの塩変性に及ぼす影響

クエン酸 Na は濃度依存的に、ミオシン、あるいは、アクチンに結合しているミオシンの熱変性を抑制することが明らかとなった。一部の研究では、筋原繊維を用いてミオシンの変性速度を簡便に求めるために、高濃度の NaCl で処理した筋原繊維を用いた。クエン酸 Na は、同濃度の NaCl と比較すると、5 倍のイオン強度を示し、その結果、第 2 章で示したように、かなり低濃度で筋原繊維を溶解させた。このことから、クエン酸 Na 処理は筋原繊維中のアクチンの塩変性を引き起こすことが十分に考えられた (若目田と新井 1984, 1985, Hayashi and Konno 2006)。まず、アクチンの塩変性を確認するため、コイ筋原繊維懸濁液に

0.5 または 1.5 M となるよう NaCl を加え、氷水中で塩処理した。その後、NaCl が 0.5 M となるよう希釈して、35°C で加熱変性様式の変化を調べた。すなわち、筋原繊維中のアクチンに変性が起これば、ミオシンはアクチンによる保護作用を失い、ミオシン単独の示す大きな変性速度が得られるはずである (Yasui ら 1968, 山下ら 1978)。

まず、0.5 M NaCl で処理しても、未処理筋原繊維と同じように熱失活は緩やかに進行し、アクチンによる安定化を受けたままであることがわかった。一方、1.5 M の NaCl で処理した場合は、予想通り急激な熱失活が起こり、選択的なアクチン変性 (若目田と新井 1984, 1985) が確認された (Fig. 45)。

次に、クエン酸 Na がアクチン変性を起こすか

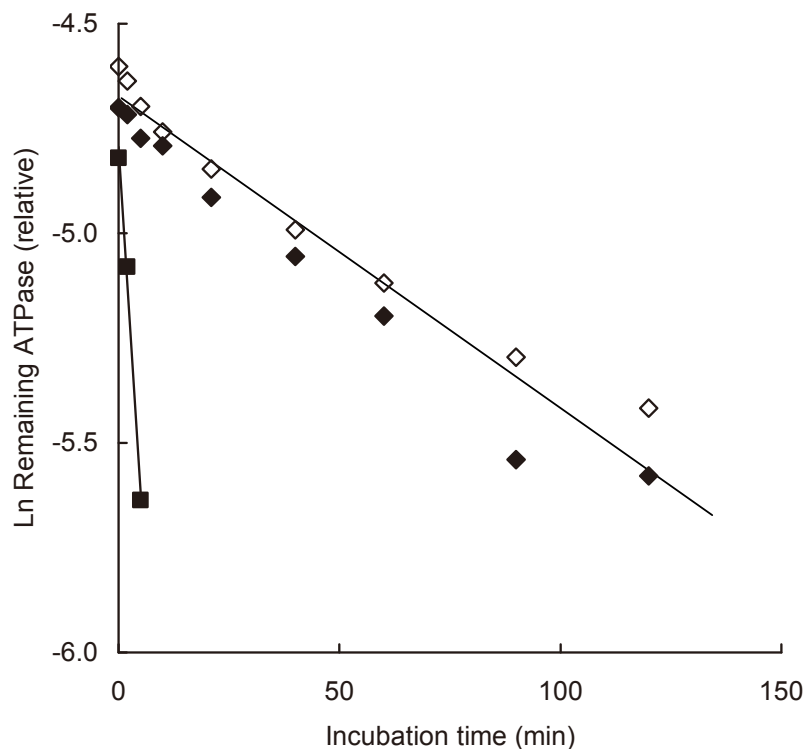


Fig. 45 Selective actin denaturation by salt treatment of carp myofibrils. Carp myofibrils were treated with either 0.5 M NaCl (closed diamonds) or 1.5 M NaCl (closed squares) on ice overnight. NaCl concentration was adjusted to be 0.5 M, and heated at 35 °C to analyze ATPase inactivation profile. Myofibrils without treatment (open diamonds) was also used as control.

どうかを確かめるため、以下の実験を行った。すなわち、コイ筋原繊維に様々な濃度のクエン酸 Na を加えて氷水中で処理したのち、3 倍に希釈した。その際、すべての系の NaCl 濃度を 0.5 M になるように調節した。また対照として、氷水中で 0.1 M NaCl のまま保存しておいた無処理の筋原繊維に対して、同じ最終濃度になるようクエン酸 Na, NaCl を加えたものを作成し、35°C で加熱変性させた。その結果を Fig. 46 に示した。最終的なクエン

酸 Na 濃度が異なるため、存在するクエン酸 Na 濃度が高いほど変性速度は小さくなった。しかし、一晚塩処理したものと、添加して直ちに加熱したもので差は認められなかった。すなわち、クエン酸 Na による選択的なアクチン変性が確認できなかった。イオン強度の上昇から判断すると、クエン酸 Na はかなり強い塩とみなすことができるが、1.0 M クエン酸 Na 下で一晚処理しても、アクチン変性を引き起こさないことが明らかとなった。

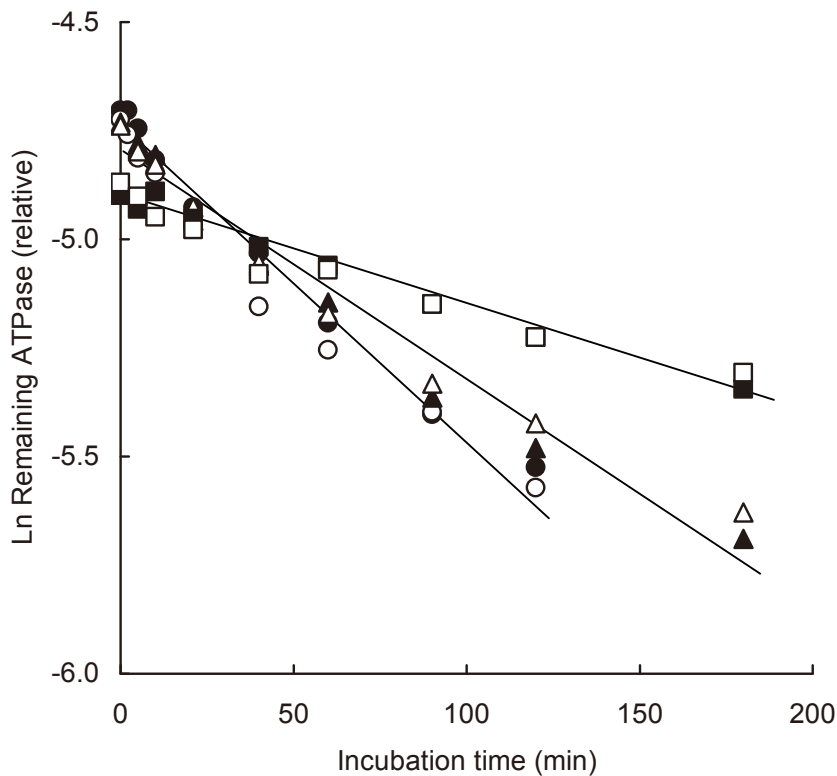


Fig. 46 Effect of Na-citrate on the actin denaturation in carp myofibrils. Carp myofibrils were incubated with 0.1 M NaCl together with 0.25 M (circles), 0.5 M (triangles), and 1 M (squares) Na-citrate on ice overnight. ATPase inactivation profile of the treated samples (closed symbols) after reducing the NaCl concentration to 0.5 M was compared with those without treatment (open symbols).

クエン酸 Na は、ミオシンの変性抑制作用ばかりでなく、アクチンに対しても変性抑制作用を発揮する可能性が出てきた。次に、高濃度の NaCl 処理によるコイ筋原繊維中でのアクチンの塩変性を、クエン酸 Na が抑制するかどうか検討した。

コイ筋原繊維を 1 M NaCl で処理する際に、クエン酸 Na を 0.67 M まで添加し、アクチンの変性程度に差が出るか検討した。塩処理後、いずれも NaCl が 0.5 M となるよう希釈し、35°C で加熱した時の  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase の失活を解析し、Fig. 47 に示した。対

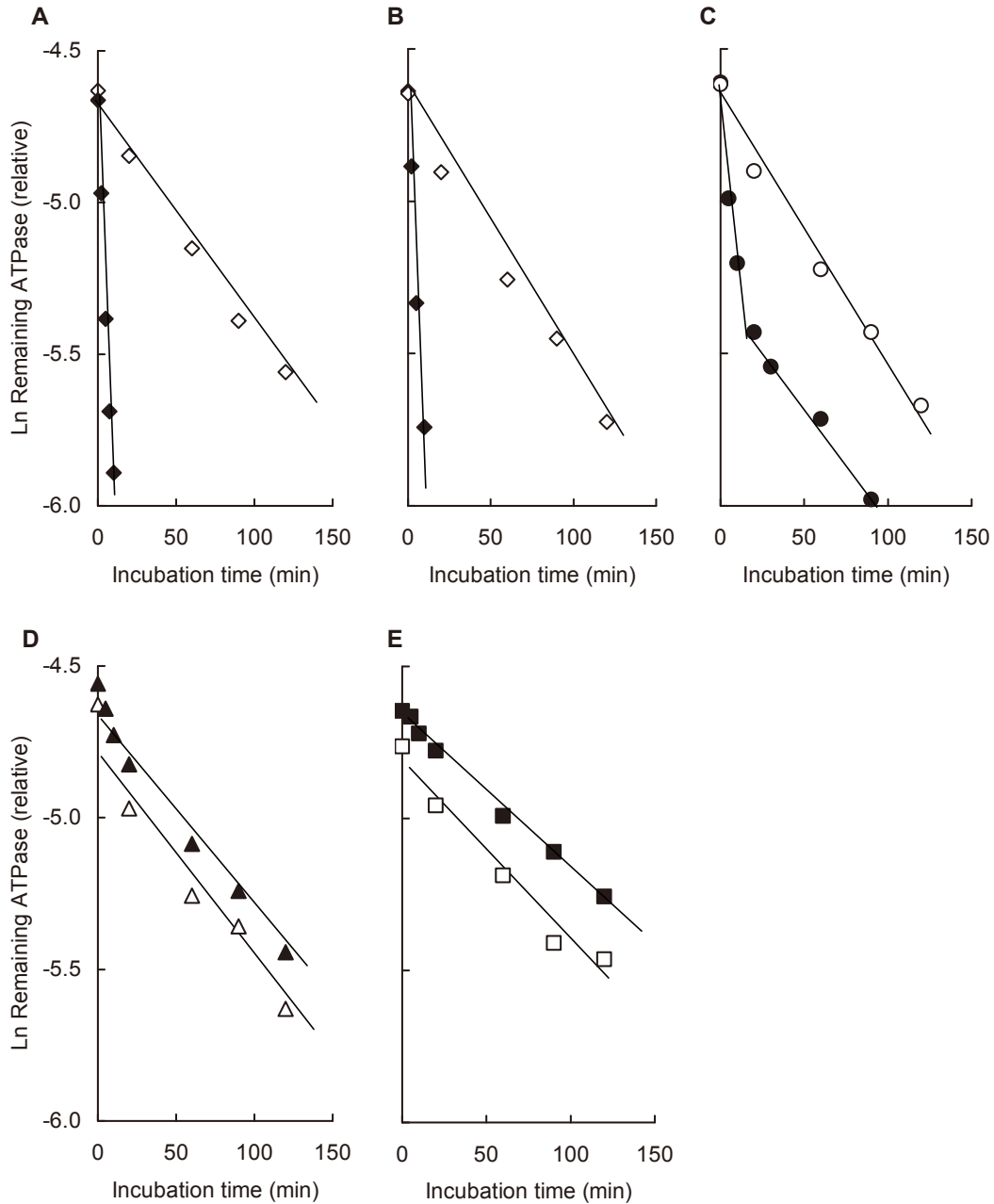


Fig. 47 Suppressive effect of Na-citrate on the NaCl-induced actin deanturation in carp myofibrils. Carp myofibrils were incubated with 1 M NaCl together with 0 M (A), 0.1 M (B), 0.2 M (C), 0.4 M (D), and 0.67 M (E) Na-citrate on ice (closed symbols). ATPase inactivation profiles were compared. The samples without treatment but containing the respective concentrations of Na-citrate and NaCl (open symbols) were also analyzed.

照としたクエン酸 Na 無添加の場合は, Fig. 46 と同様に 1 M NaCl によりアクチンの塩変性が認められ, 急激な変性を示した。0.1 M のクエン酸 Na を加えても, 対照とあまり差が認められず, アクチン変性が認められた。0.2 M のクエン酸 Na では, 変性様式に変化が起こり, 反応初期の急激な失活に続いて緩やかな失活が認められるようになった。この変性様式のうち, 加熱後半の緩やかな変性は, まだアクチンと結合して安定化されているミオシンが存在すること, すなわち, この濃度のクエン酸 Na はアクチンの塩変性を部分的に抑制していると判断した。さらに, クエン酸 Na が 0.4 M および 0.67 M では, 初期の急激な変性が消失し, 後半の緩やかな変性のみが検出されるようになった。これらの結果から, クエン酸 Na は濃度依存的に, 高濃度の NaCl によるアクチンの塩変性を抑制すると結論した。

ソルビトールは広く知られているミオシンの変

性抑制剤である。そこで, ソルビトールもアクチンの塩変性を抑制する能力があるのかどうかを検証することにした。Fig. 47 と同様の方法で, クエン酸 Na の代わりにソルビトールを加え, 1 M の NaCl でコイ筋原繊維を塩処理した。ソルビトールの濃度は, Fig. 44 の結果から約 0.35 M クエン酸 Na と同等のミオシンの安定化作用を示した濃度であり, 十分なアクチン変性抑制作用が認められる可能性がある 0.8 M とした。ソルビトール存在下, 非存在下で 1 M NaCl で塩処理した筋原繊維懸濁液を 0.5 M NaCl に希釈し, 35°C での変性様式を Fig. 48 に示した。ソルビトール無添加の場合は, Fig. 48A に示したように, NaCl 処理した場合の急激な変性が認められた。NaCl 処理する際に約 0.8 M のソルビトールを共存させた場合を Fig. 48B に示した。NaCl 処理時にソルビトールが存在しても, 変性様式は Fig. 48A と同様であり, この濃度のソルビトールには, クエン酸 Na とは異なり, アク

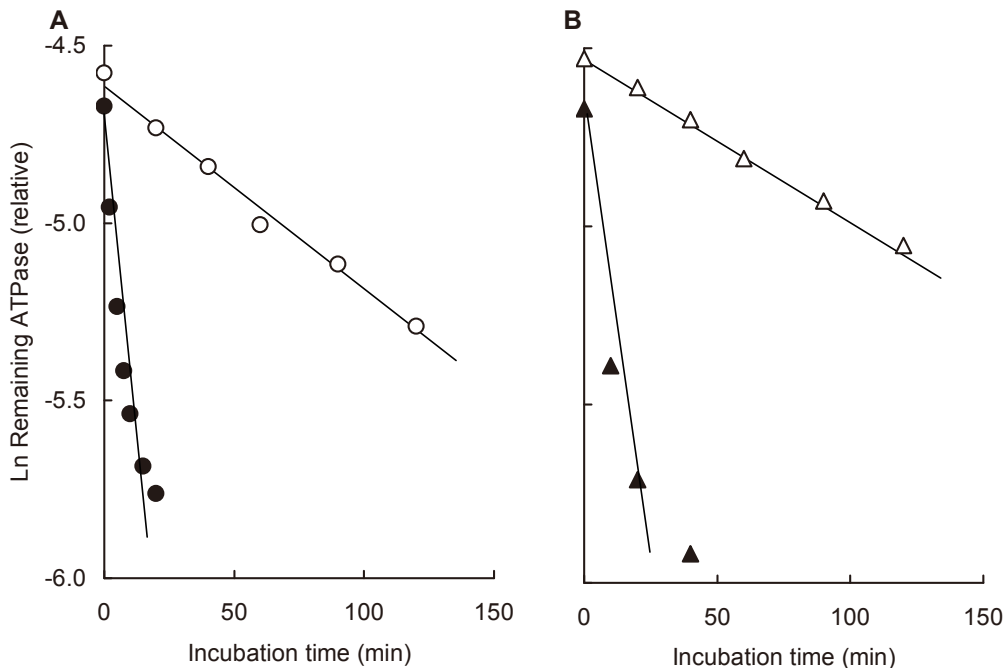


Fig. 48 Effect of sorbitol on the NaCl-induced actin denaturation in carp myofibrils. Carp myofibrils were treated with 1 M NaCl together with either 0 M (A) or 0.82 M (B) sorbitol. ATPase inactivation profiles for the treated samples were studied after reduction to 0.5 M for heating (closed symbols). Inactivation profiles for myofibrils without salt treatment (open symbols) were also analyzed as control after adjusting sorbitol concentration.

チンの塩変性を抑制する作用は全く認められなかった。クエン酸 Na は、ソルビトールを超える非常に優れた変性抑制剤と思われる。これまで、ミオシン変性に対する化合物の影響は広く調べられているが、アクチンに対する研究は少なく、アクチン変性を強く抑制する化合物が存在するという報告はこれが初めてである。

#### (5) Ca, EDTA 存在下でのスルメイカ筋原繊維の熱変性に対するクエン酸 Na の影響

前節では、スルメイカに比べると単純な魚類(コイ)筋原繊維を使用して、クエン酸 Na の有する特徴的な変性抑制作用を見出した。次に、スルメ

イカ筋原繊維の熱変性に対する影響を解析した。それに先立ち、 $\text{Ca}^{2+}$ の有無がスルメイカ筋原繊維の変性速度に及ぼす影響を確認するため、1 mM の  $\text{CaCl}_2$  または EDTA を加えたイカ筋原繊維懸濁液を  $35^\circ\text{C}$  で加熱し、 $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase の失活速度を比較した (Fig. 49)。 $\text{Ca}^{2+}$  を加えて加熱すると、ATPase の消失は著しくゆっくりと進行した。一方、 $\text{Ca}^{2+}$  の代わりに EDTA を添加すると、急激な活性低下が起こり、 $\text{Ca}^{2+}$  はスルメイカ筋原繊維中のミオシンを非常に安定化させることを確認した (Konno 1991b)。

そこで、1 mM  $\text{Ca}^{2+}$  および EDTA 存在下に、様々

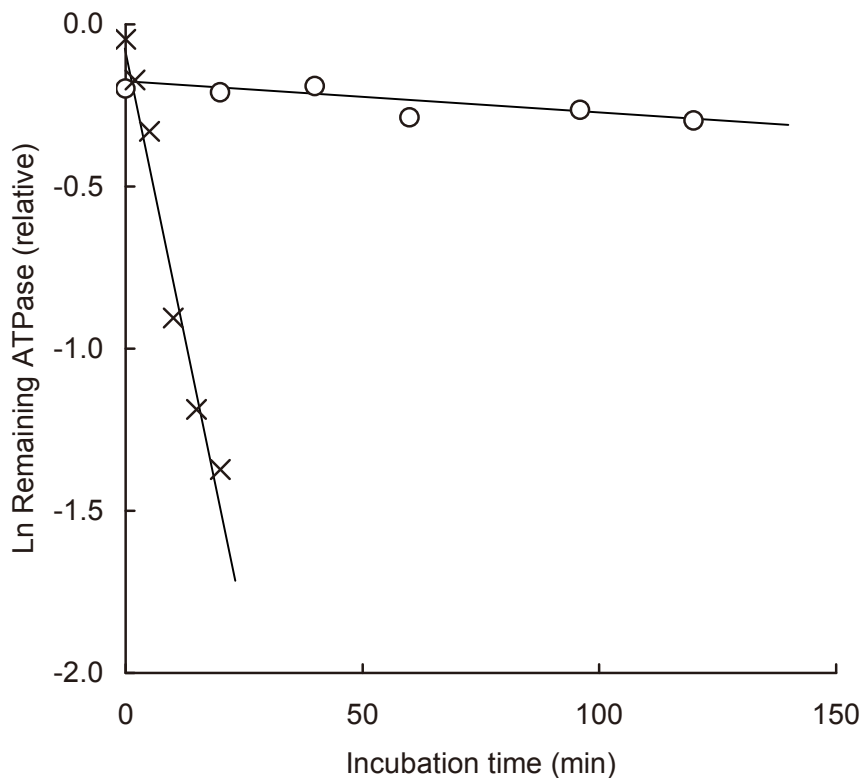


Fig. 49 Stabilizing effect of calcium ion on the thermal inactivation of Ca-ATPase of squid myofibrils. Squid myofibrils in 0.1 M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.0) were heated at  $35^\circ\text{C}$  in the presence of 1 mM either  $\text{CaCl}_2$  (circles) or EDTA (cross marks).

な濃度のクエン酸 Na を添加し、35°Cにおける熱失活の経時変化を追跡した。予想通り、添加効果は複雑な様相を呈した。Ca<sup>2+</sup>中の変性速度 (Fig. 50A) は、クエン酸 Na 濃度を上昇させると、0.2 M までは、かえって変性速度は大きくなり、変性が促進された。これは、クエン酸 Na 添加による加

熱筋原繊維から Ca<sup>2+</sup>が除かれたためと考えられた。0.2 M 以上では、クエン酸 Na 濃度が高くなるほど、変性は緩やかになり、クエン酸 Na による抑制作用が検出されるようになった。一方、EDTA 存在下の失活 (Fig. 50B) は、添加するクエン酸 Na 濃度の上昇とともに、緩やかになった。

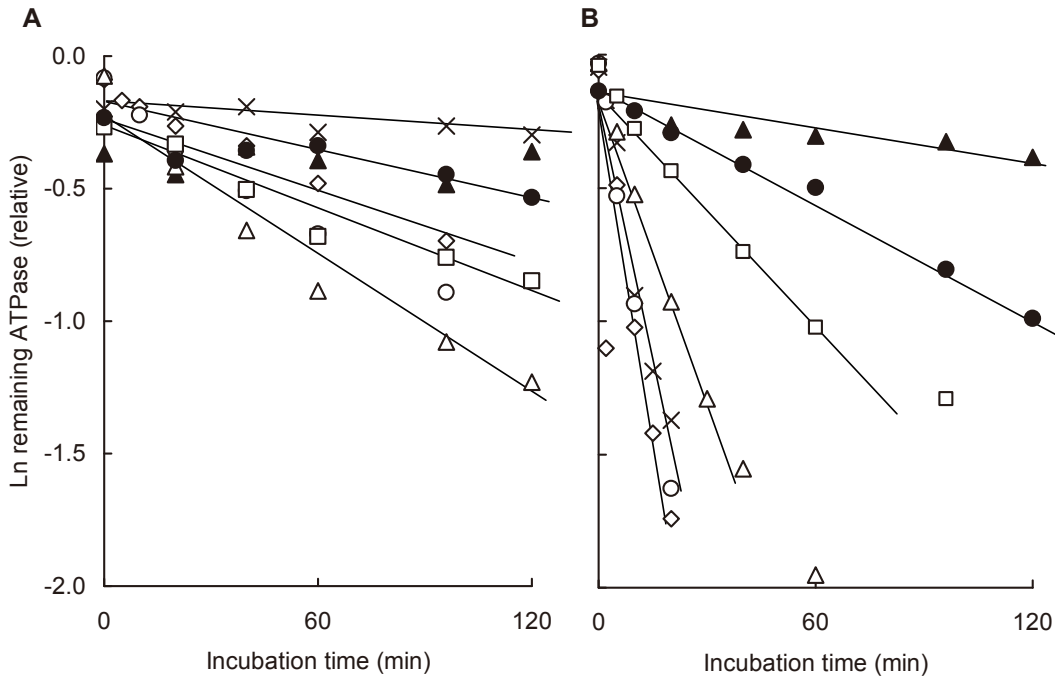


Fig. 50 Effect of Na-citrate on the inactivation rate of squid myofibrils in the presence of either Ca<sup>2+</sup> or EDTA. Squid myofibrils were heated at 35 °C together with 0 M (cross marks), 0.05 M (diamonds), 0.1 M (circles), 0.2 M (triangles), 0.3 M (squares), 0.4 M (closed circles), or 0.6 M (closed triangles) of Na-citrate. (A) and (B) are the media containing 1 mM CaCl<sub>2</sub>, and EDTA, respectively.

Fig. 50 で得られた  $\text{Ca}^{2+}$  あるいは EDTA 存在下での失活速度の対数値をクエン酸 Na 濃度に対してプロットした (Fig. 51)。 $\text{Ca}^{2+}$  存在下では 0.15 M, EDTA 存在下では 0.05 M クエン酸 Na 付近で、変性促進が認められた。このような現象はコイ筋原繊維を用いた場合は認められなかったため、イカ筋原繊維に特有の現象であろうと判断した。恐らく、イカ筋原繊維の場合は魚類筋原繊維に比べ、低濃度の NaCl でアクチンの安定化が失われるこ

と、また、その変性促進程度が著しく大きいことに由来する現象と思われる。 $\text{Ca}^{2+}$  存在下での変性速度の上昇は、安定化のために添加した 1 mM の  $\text{Ca}^{2+}$  がクエン酸によりキレートされ、安定化作用が消失したことが主原因と考えられる。キレート作用に加え、十分に高い濃度のクエン酸 Na を加えた場合は、EDTA 中での変性抑制作用と同等の変性抑制作用が発揮されると考えられ、高濃度側の変性速度の低下がそれに対応している。

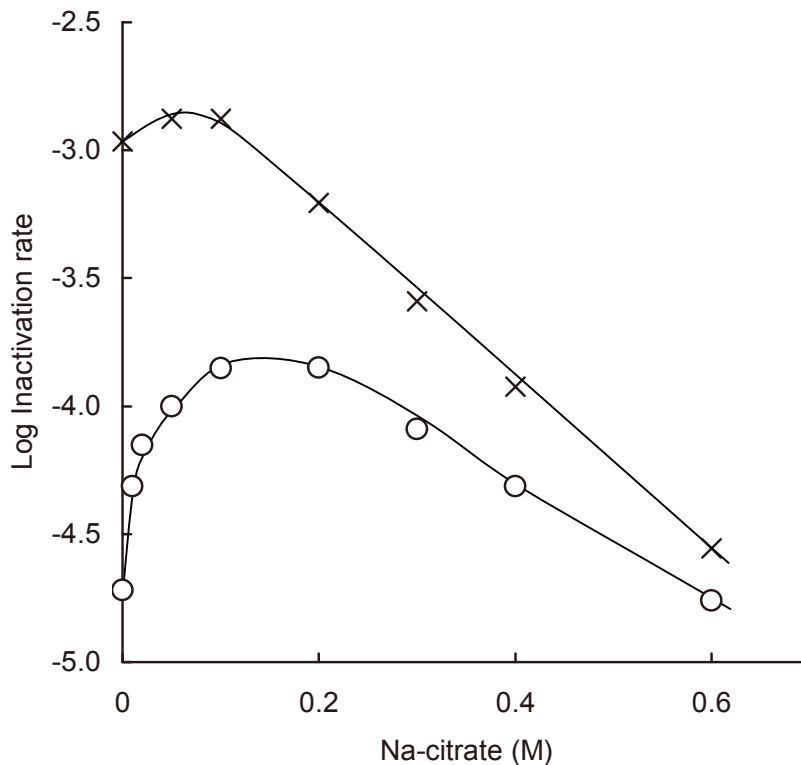


Fig. 51 Na-citrate concentration dependent thermal inactivation rate of squid myofibrillar Ca-ATPase. The inactivation rates in the presence of either 1 mM  $\text{CaCl}_2$  (circles) or EDTA (cross marks) were estimated from the slopes obtained in Fig. 50.

(6) Ca, EDTA 存在下でのスルメイカ・ミオシンの安定性に対するクエン酸 Na の影響

アクチンにより安定化を受けた筋原繊維を使用した場合、予想通りクエン酸 Na は  $\text{Ca}^{2+}$ , EDTA 中で加熱したときに、複雑な作用を示すことが明らかとなった。そこで、アクチンの影響を取り除いたイカミオシンの変性に対する安定化作用を調べることにした。そのため、イカ筋原繊維を 1.5 M NaCl 下で塩処理し、アクチンを完全に変性させた。それに対して 1 mM の  $\text{CaCl}_2$  あるいは EDTA を加

えて、30°Cで加熱し、 $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase の失活を追跡した結果を Fig. 52 に示した。筋原繊維では 35°Cとした加熱温度をミオシンの場合は、30°Cまで低下させる必要があった。それでも、10 分間で急激な失活が認められた。

筋原繊維の場合と異なり、ミオシン単独での熱変性は  $\text{Ca}^{2+}$ による安定化の程度は小さく、EDTAを加えた場合よりも、 $\text{Ca}^{2+}$ を加えた方が数倍安定になる程度であった (Konno 1991a)。次に、塩変性処理してアクチンの保護を失わせたミオシンに、

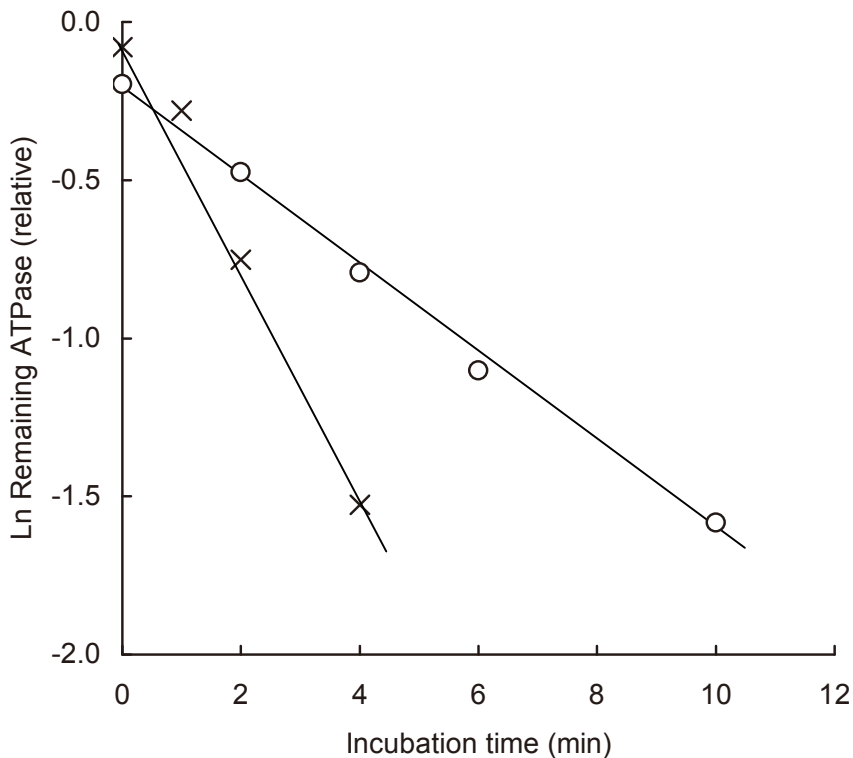


Fig. 52 Thermal inactivation profiles of squid myosin Ca-ATPase. Squid myofibrils were treated with 1.5 M NaCl on ice overnight for a selective deactination of actin. The system was used for studying the myosin denaturation. Myosin was heated at 30 °C with 1 mM either  $\text{CaCl}_2$  (circles) or EDTA (cross marks).



さまざまな濃度のクエン酸 Na を添加し、 $\text{Ca}^{2+}$  および EDTA 存在下で加熱し、 $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase の失活の様子を Fig. 53 に示した。いずれの条件でも (Fig. 53A, B), 添加したクエン酸 Na 濃度の上昇とともに、失活の抑制が認められ、傾きが濃度上昇に対応して小さくなった。

ここで得られた直線の傾きから変性速度を算出し、添加したクエン酸 Na 濃度に対してプロットした (Fig. 54)。両条件とも、筋原繊維で認められたような変性速度の上昇は認められず、単純な直線関係が得られた。このことは、筋原繊維で得られた複雑な変化は、クエン酸 Na によるアクチンの保

護効果への影響が大きいこと、および、 $\text{Ca}^{2+}$  による安定化作用が大きいためキレート作用の影響が大きかったことによる現象と推定した。しかし、直線の傾きは同じではなく、 $\text{Ca}^{2+}$  存在下での傾きが EDTA 中よりやや小さかった。これは  $\text{Ca}^{2+}$  を含むミオシン溶液にクエン酸 Na を加えると、キレート作用により  $\text{Ca}^{2+}$  が奪われ、変性が促進されたものと考えられた。ここで得られた傾きから E-value を計算すると、 $\text{Ca}^{2+}$  および EDTA 中それぞれ、3.4 および 3.8 と計算され、EDTA 中で加熱した筋原繊維の場合に、高濃度のクエン酸 Na 領域で得られた結果から算出した値 (3.68) とほぼ同じであった。

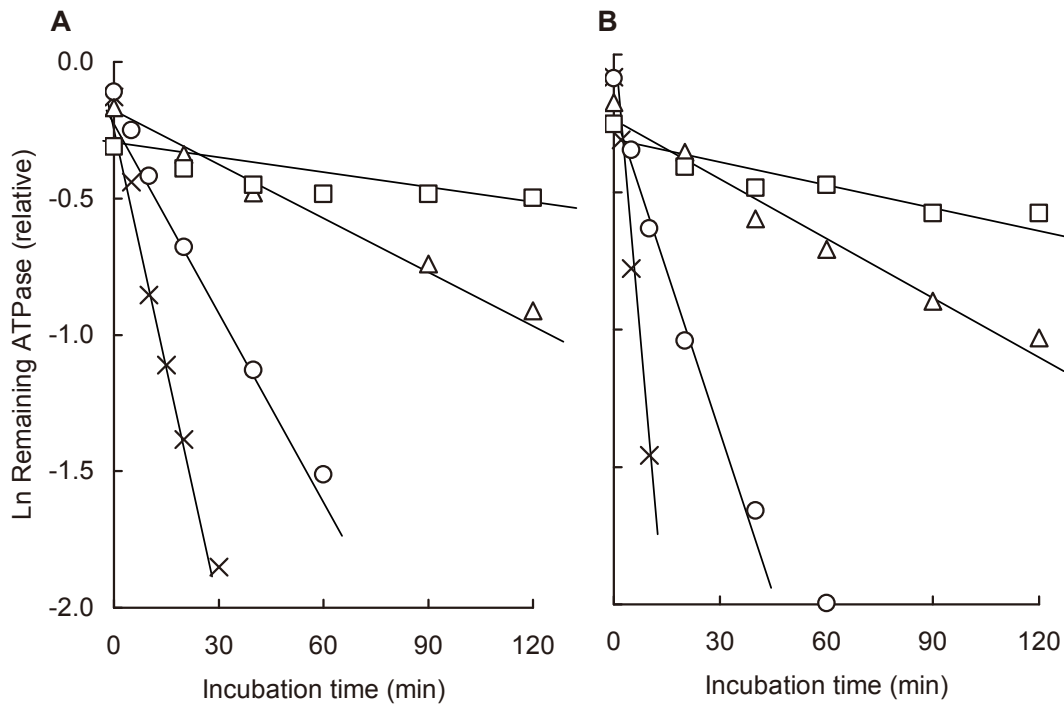


Fig. 53 Suppressive effect of Na-citrate on squid myosin denaturation. Squid myofibrils were treated with 1 M NaCl as in Fig. 52. Thus treated myofibrils were used as myosin. Myosin was heated in the presence of 1 mM either  $\text{CaCl}_2$  (A) or EDTA (B). The heating medium contained 0.1 M (cross marks), 0.2 M (circles), 0.4 M (triangles), or 0.6 M (squares) Na-citrate.

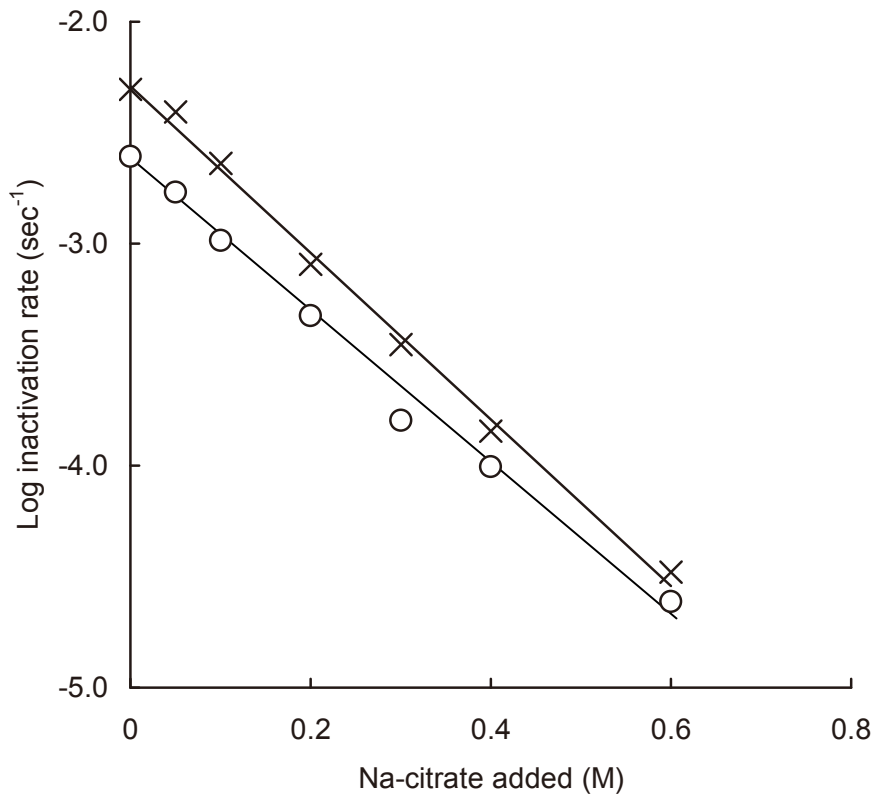


Fig. 54 Suppressive effect of Na-citrate on squid myosin denaturation. The inactivation rates with 1 mM CaCl<sub>2</sub> (circles) and EDTA (cross marks) in the presence of various concentrations of Na-citrate were estimated from the slopes in Fig. 53.

クエン酸Naの変性抑制作用が、基本的にイカの筋原繊維とミオシンで同様に確認できるという結果は、魚類筋原繊維とミオシンを使用して得られた結論と同じであった。しかし、イカのミオシンで得られたE-valueは、コイの筋原繊維やミオシンで得られた値の2倍程度であった。一般的に、ある化合物の抑制作用は化合物に固有であり、魚種に

よって変動することはないと考えられるが、イカの場合は例外のように思われる。すなわち、ソルビトールのイカに対するE-valueも、魚類に対する場合より大きいことが報告されているからである (Konno 1991b)。原因は不明であるが、イカのミオシンは変性抑制剤による変性抑制が効率的に発揮されると考えられる。

(7) クエン酸 Na がスルメイカ・アクチンの塩変性に及ぼす影響

まず、高濃度の NaCl によるスルメイカ筋原繊維中のアクチン変性を確認した。すなわち、イカ筋原繊維に対して NaCl を 0.1 M から 1.5 M となるよう添加して塩処理し、アクチン変性を促した。その後、NaCl が 0.2 M となるようにすべての試料を希釈して、30 °C で加熱し、そのときの Ca<sup>2+</sup>-ATPase 活性失活の経時変化を追跡した (Fig.

55A)。また、得られた直線の傾きから変性速度を求め、Fig. 55B に示した。

Fig. 55A によると、イカ筋原繊維を氷水下で処理する際の NaCl 濃度が 0.1 および 0.5 M ではほとんど失活様式に違いは見られなかったが、それ以上の濃度になると、急激な変性が認められるようになり、1-1.5 M でほぼ最大の失活速度が得られた。すなわち、この濃度の NaCl 処理により、アクチンの完全な塩変性が成し遂げられたと判断した。

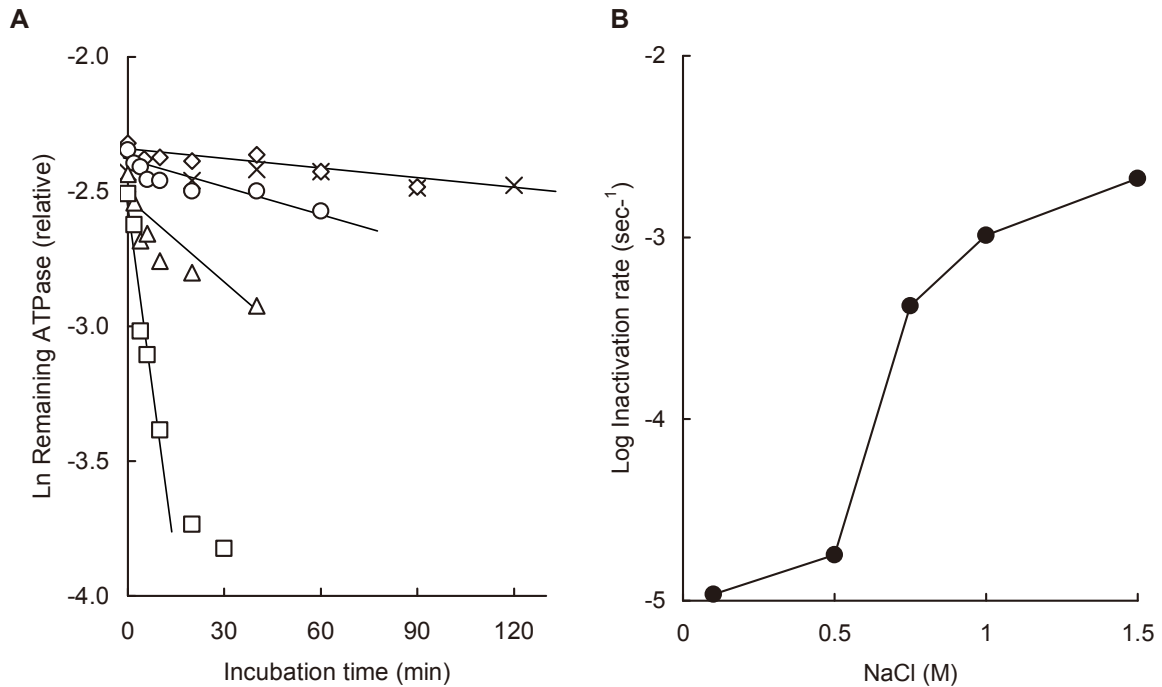


Fig. 55 Actin denaturation in squid myofibrils by NaCl treatment. (A), Squid myofibrils were treated with 0.1 M (cross marks), 0.5 M (diamonds), 0.75 M (circles), 1.0 M (triangles), and 1.5 M (squares) NaCl on ice overnight. After adjusting the NaCl concentration to 0.2 M, ATPase inactivation profiles were compared. (B), The inactivation rates estimated in (A) were plotted against NaCl concentrations.

この結果は、スルメイカ筋原繊維においても、魚類筋原繊維と同様であり、全く同じ NaCl 濃度でアクチンの塩変性が引き起こされることを示している。しかし、このアクチン変性に対する NaCl 濃度依存性は、加熱変性速度に対する NaCl 濃度依存性と異なり、加熱変性で最大変性速度を与える NaCl 濃度は 0.75 M であり、アクチンの塩変性に必要な濃度の約 1/2 であった。すなわち、加熱時のアクチンの保護作用に対する NaCl 濃度の影響はより大きくなり、低濃度でも十分なミオシンの保護ができなくなっていることが推定された。この結果を受けて、イカの場合、アクチンによる十分な保護作用を検出するためには、加熱時の

NaCl 濃度を 0.2 M まで低下させる必要があることを、別の実験から確認した。

そこで、スルメイカ筋原繊維中のアクチン変性に対するクエン酸 Na の抑制作用を調べるため、筋原繊維を 1.5 M の NaCl で処理する際に、さらに様々な濃度のクエン酸 Na を共存させた。氷冷後、NaCl およびクエン酸 Na 濃度がいずれも 0.2 M になるよう希釈し、30°Cでの加熱変性様式を比較した (Fig. 56)。すると、NaCl 処理時にクエン酸 Na を含まない場合は、Fig. 55 の結果のように、ごく短時間で活性は低下し、アクチンの保護を失っていることを再確認した。共存するクエン酸 Na 濃度が高くなるにつれ、失活は緩やかとなり、0.4 M

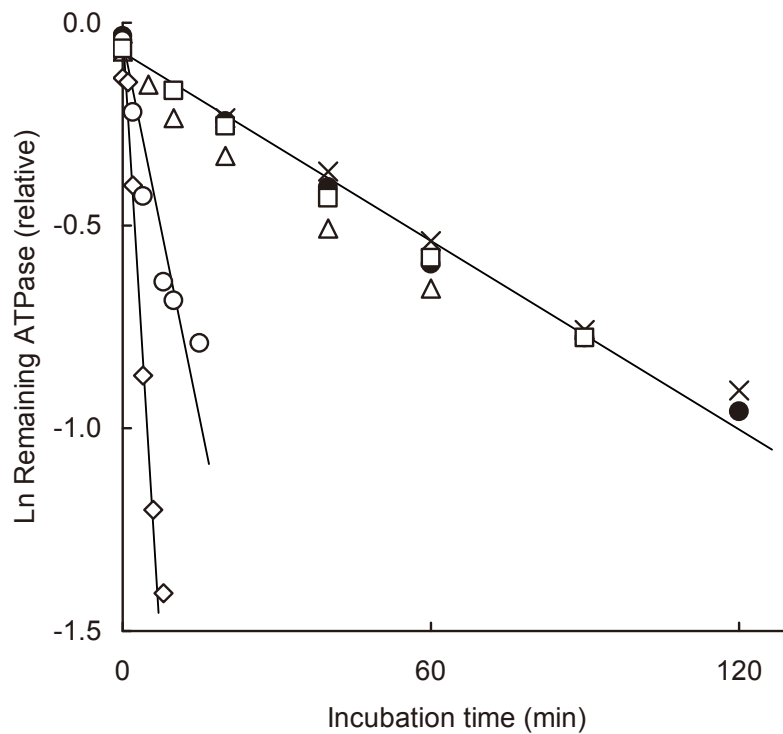


Fig. 56 Suppressive effect of Na-citrate on the NaCl-induced actin denaturation in squid myofibrils. Squid myofibrils were incubated with 1 M NaCl together with 0 M (diamond), 0.1 M (open circles), 0.2 M (triangles), 0.4 M (squares), and 0.6 M (closed circles) Na-citrate on ice overnight. The treated myofibrils were heated at 30 °C in the presence of 1 mM EDTA after reducing the NaCl concentration to 0.2 M. Untreated myofibrils (cross marks) were also used as control.

以上のクエン酸Naを添加すれば対照のNaCl未処理と同じ傾きとなった。すなわち、この濃度のクエン酸Naが存在すれば、アクチン変性をほぼ完全に抑制すると判断した。この濃度は、コイ筋原繊維を用いて得られた結果とまったく同じであった。さらに、クエン酸Naのアクチン変性抑制作用を確かめるため、0.6 Mのクエン酸Na存在下、NaCl濃度を0.1-1.5 Mとなるよう調整したイカ筋原繊維を氷水下で処理した。NaClを0.2 Mとなる

よう希釈して30°Cで加熱した。いずれのNaCl濃度でもアクチン変性が起きていないことを確認した (Fig. 57)。

クエン酸Naは筋原繊維の溶解に対しては強い塩として作用するものの、アクチンの変性を引き起こさないどころか、逆に高濃度のNaClによる塩変性を抑制し、筋原繊維を安定化させるという、これまで報告されていない新規な機能が見出された。

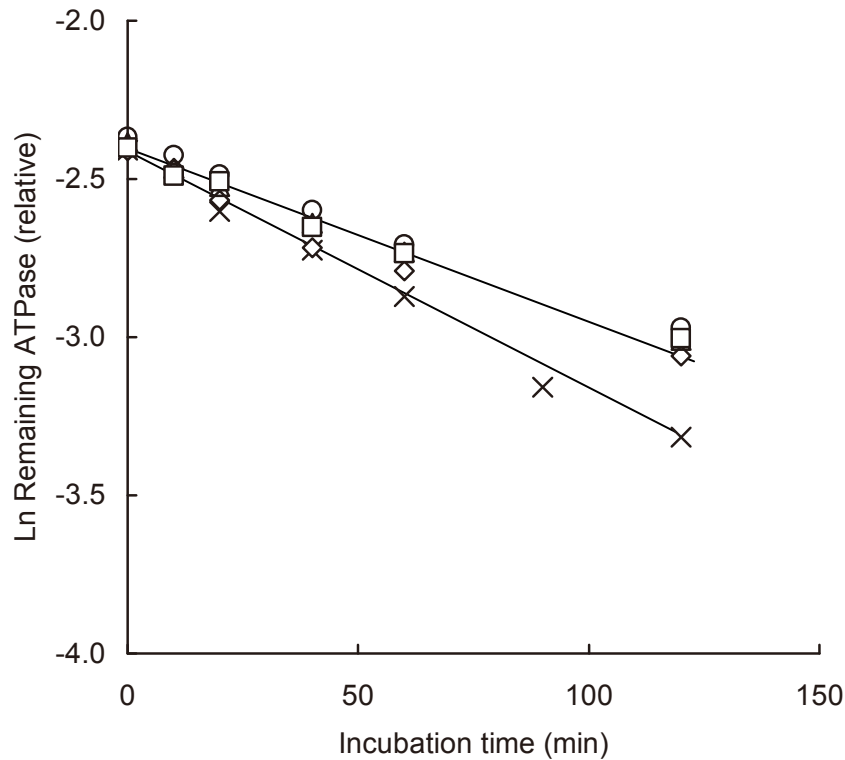


Fig. 57 Suppressive effect of Na-citrate on actin denaturation in squid myofibrils by NaCl-treatment. Squid myofibrils were treated with 0.1 M (cross marks), 0.5 M (diamonds), 0.75 M (circles), 1 M (triangles), and 1.5 M (squares) NaCl together with 0.6 M Na-citrate. Thermal inactivation profiles of Ca-ATPase at 30 °C after adjusting NaCl concentrations to 0.2 M was compared.

(8) クエン酸 Na によるコイ筋原繊維の凍結変性抑制作用

これまでの結果から、クエン酸 Na は非常に優れた変性抑制作用を有する化合物であることが明らかになった。次に、筋原繊維の凍結変性抑制作用について検討した。糖類やグルタミン酸 Na は加熱変性および凍結変性を強く抑制するが、硫酸イオンは、ミオシンあるいは筋原繊維の加熱変性に対しては非常に強い抑制作用が認められるにもかかわらず、筋原繊維の凍結変性に対しては、濃度によっては促進的に作用し、ほとんど抑制効果を示さないことが報告されている (Torigai and

Konno 1996, Konno 1998, Hayashi and Konno 2006)。クエン酸 Na も非常に強いイオン化合物であるため、加熱変性には強い抑制作用が認められたが、凍結変性抑制作用が認められない可能性もある。

そこで、コイ筋原繊維を用い、クエン酸 Na が凍結変性を抑制するか、これまで抑制作用があるといわれているソルビトール、グルタミン酸 Na および酢酸 Na (大泉ら 1984, 松本ら 1985) の凍結変性抑制作用と比較した。コイ筋原繊維懸濁液に様々な濃度の各化合物を加えて $-20^{\circ}\text{C}$ で1ヶ月間凍結保存した。この期間中の凍結変性を残存 $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性から測定し、Fig. 58 に示した。

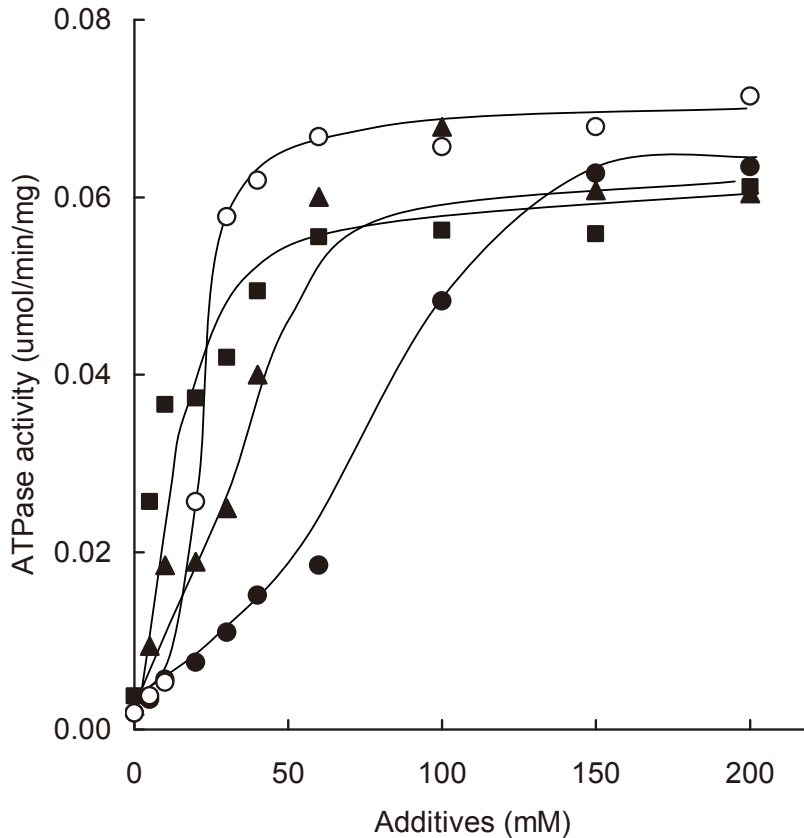


Fig. 58 Suppressive effect of Na-citrate on the freeze denaturation of carp myofibrils. Carp myofibrils (0.1 M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5)) containing various compounds at various concentrations were frozen stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  for 30 days. The compounds used were Na-citrate (open circles), Na-glutamate (closed squares), sorbitol (closed triangles), and Na-acetate (closed circles). Remaining  $\text{Ca}$ -ATPase activities were plotted against the concentrations added.

すでに、加熱の場合に比べて凍結では、変性抑制に必要な濃度が著しく低下することが知られているので、使用した濃度は最大で0.2 Mとした。無添加の筋原繊維のCa<sup>2+</sup>-ATPase活性はほとんど消失しており、この期間の凍結により著しいミオシンの変性が起きていることが明らかであった。これに対して、各種化合物を添加すると、いずれも添加量が増加するにつれて、残存Ca<sup>2+</sup>-ATPase活性は高い値を示し、試験に用いたいずれの化合物も凍結変性抑制作用があることを認めた。

すなわち、クエン酸Naは硫酸イオンのような凍結変性促進作用を示さないことを見出した。高い残存活性を維持するための化合物の濃度を比較すると、より高濃度の添加が必要なのは、酢酸Na、次いでソルビトールであり、クエン酸Naとグルタミン酸Naの両者は、非常に低濃度で強い凍結変性抑制作用を示した。これ以上の、定量的な研究を行わなかったが、クエン酸Naの凍結変性抑制作用はソルビトールに比べ明らかに大きく、イカや魚肉の凍結保存に対しても変性抑制作用のある優れた添加物であることが明らかとなった。

### 小考察

筋原繊維タンパク質中のミオシン変性は、アクチン結合の影響を考慮する必要があるため、解析が複雑になる。すなわち、ミオシンはアクチンと結合することで非常に安定した状態に保たれている (Hayashi and Konno 2006)。このアクチンの保護作用を失わせる簡単な方法が、高濃度での塩処理である。1.5-2 M程度のNaClで処理すると、低温でも容易にアクチンの変性が起きる (若目田と新井 1984)。この方法を使うことで、ミオシンを単離することなしに、ミオシンの変性を解析でき

る。魚類筋原繊維およびミオシンに対する変性抑制作用の解析から、クエン酸Naは広く変性抑制剤として利用されているソルビトールよりも強い変性抑制作用を示すことを明らかにした。

一方、Ca<sup>2+</sup>によっても安定化を受けるスルメイカ筋原繊維に対してクエン酸Naは、そのキレート作用のため、低濃度での変性促進が認められた。しかし、たとえCa<sup>2+</sup>による安定化作用が失われても、根本的に非常に強い変性抑制作用を有するため、イカの場合も十分な抑制作用が認められた。第2章で述べたようにクエン酸Naは、NaClよりもはるかに強い筋原繊維の溶解作用を有する化合物であるにも関わらず、アクチンの塩変性を起こさないどころか、アクチンを保護し、高濃度のNaClによる塩変性を抑制する作用を示した。この現象は、コイおよびイカの両方で認められたため、普遍的にミオシン、アクチンの両方を安定化させる作用を有する化合物であると結論した。

これまで、アクチン変性に対する添加物の影響を詳細に研究した例はないが、ソルビトールには、アクチンの塩変性抑制作用が認められなかったのでクエン酸Naはこれまで明らかにされていない変性抑制作用を有している優れた添加物であると判断した。

また、クエン酸Naは魚類ミオシンの熱および凍結変性、さらにアクチンの塩変性を抑制したので、スルメイカに限らず、自己消化の問題を持っていない魚類への応用も考えられる。クエン酸Naによる凍結変性抑制は、3%程度で認められ、ねり製品の原料となる冷凍すり身への利用など、甘さを有さない新たな添加物としての応用も十分考えられる。

## 総合考察

定置網漁業でスルメイカが漁獲される際、網の中でスルメイカ同士が噛み合いを起こすことによって、外套膜などに傷が付いた個体が多数発生し、多い場合は5割にも達する（平均して3割ほど）。関係者からは、高鮮度であるにも関わらず、その外観から鮮魚としての価値が極端に低くなるこれら、「傷イカ」の価値向上を目指した食材の開発が期待されている。イカを原料とした水産加工食品は、塩辛、するめ、さきいか、いか燻、いか飯など多種類に及び、それぞれの地位を確立している。しかしながら、この中にはねり製品は含まれていない。高鮮度でありながら低価格であるスルメイカの利点を生かす有効活用法の一つとして、原料の外観を無視できるねり製品への利用が考えられる。イカは日本人に好まれている水産物であり、イカのおいしさ、あるいは風味をそのまま活用した新たなねり製品が開発できれば、「傷イカ」の利用ばかりでなく、低価格の輸入冷凍イカなどの利用範囲も広がると考えられる（Konnoら2003）。

イカ肉からのねり製品製造を困難にしているのが、スルメイカ肉に存在し、ミオシン分子をその中央付近（HMM/LMM）で、特異的に分解するエンド型の金属プロテアーゼ（ミオシナーゼと称される）の関与である。この金属プロテアーゼは、構造的に強固なアクチンは当然としても、プロテアーゼ感受性が非常に高いトロポニンなど他の筋原繊維構成タンパク質を全く分解せず、ミオシンだけを分解するという非常に基質特異性の高い酵素であることが明らかにされている（Okamotoら1993）。この酵素によるミオシンの分解は、ミオシンがフィラメントを形成して切断部位が保護された状態よりも、溶解して単量体化したミオシンの方が活発に起こるため（Konno and Fukazawa 1993）、加熱ゲルを製造する際の第一段階である塩ずり工程（肉糊の形成）は、イカ肉の場合はタンパク質の分解を促進する過程となる（Fig. 21）。さらに、この分解は5-35℃の低温下でも起こるので（Figures 2, 11, 21）、ねり製品製造で導入されて

いる予備加熱工程は、ミオシンの分解を進行させる過程となる。

これまでのミオシンによる熱ゲル形成に関する膨大な研究成果から、熱ゲル形成には細長い形状のミオシン分子が、加熱により凝集し、しなやかなネットワーク構造を形成することが重要であるといわれているが、ミオシン分子が中央で切断されれば、「細長い分子」としてのミオシンの構造が失われてしまうので、結果として、ミオシンによるネットワーク構造が形成しなくなることが想像される。試験管内実験から、この金属プロテアーゼは、キレート剤であるEDTAなどを加えると、阻害できる（江原ら1992）ことが報告されている。しかし、EDTAはねり製品に添加することは許可されていないので、現実的な解決策ではない。多くの研究がありながら、現在までに、スルメイカ筋肉からのゲル化製品の開発に成功していないのが実情である。

魚肉ねり製品製造においても、プロテアーゼがかかわる品質劣化現象として、「戻り」現象がよく知られている。しかし、魚肉で起こる「戻り」現象は、50℃や60℃など比較的高温で活性を發揮するプロテアーゼによるものであり（Caoら1999）、ミオシンの分解パターン、活性化する温度帯、プロテアーゼのタイプの点から、イカ肉のプロテアーゼの問題とは本質的に異なる現象である。

本研究では、スルメイカ筋肉に存在するプロテアーゼの特性を考慮し、ねり製品に添加可能な食品添加物の中から、金属キレート作用を有する有機酸塩に着目し、スルメイカ肉の自己消化を抑制できないか、第1章で検討した。その結果、試験した有機酸塩（クエン酸Na、コハク酸Na、酒石酸Na、グルコン酸Na）には、程度の差はあるが、いずれもイカ肉における自己消化を抑制する作用を有していることを明らかにし、食品添加物によってイカの自己消化を制御できることを初めて示した。様々な条件で自己消化抑制作用を比較したところ、クエン酸Naが最も強い自己消化抑制作用を示すことをモデル実験で明らかにした。3価のカルボン酸であるクエン酸Naに、キレート作



用があることはよく知られているので (Francis ら 1992), この事実は合理的な説明ができる結果である。実際にクエン酸 Na のもつ  $\text{Ca}^{2+}$  に対するキレート作用を EDTA と比較すると, その結合の強さは 10 分の 1 以下であることを, 各種測定から確認した。それゆえ, 自己消化の抑制のためには EDTA の場合は 5-10 mM で十分であったが, クエン酸 Na ではその 10 倍以上の濃度 (0.1-0.25 M) を必要とした。しかし, クエン酸 Na には EDTA にはない予想外の作用があることを見出した。すなわち, 低温では金属プロテアーゼのみが顕著に検出され, EDTA もクエン酸 Na も同じように自己消化を抑制した。比較的高温 (35°C) になると, 金属プロテアーゼに加えセリンプロテアーゼも活性化されるが, EDTA はこれを全く阻害しなかった。これに対してクエン酸 Na は, セリンプロテアーゼによるミオシンの分解をも抑制した。

肉糊の熱ゲル化過程では, どうしてもこの温度帯を通過するので, セリンプロテアーゼによるミオシン分解も克服しなければならない問題である。このセリンプロテアーゼはミオシン分子を頭部と尾部に切断するので, 分解されれば, ゲル化のための頭部での凝集と尾部での凝集が分離されることになる。ゲル化に, ミオシン頭部, 尾部両部位での凝集が必要であれば, ゲル物性に悪い影響を与えることが想像される。セリンプロテアーゼは EDTA によって阻害されないことから, キレート作用以外のクエン酸 Na の機能が, この阻害作用を引き起こしているのは確実である (第 1 章)。プロテアーゼへの作用ばかりでなく, 切断されるミオシン側に対する作用も検討する必要があると考えられる。この阻害機構についてはこれ以上の検討を行なわなかったが, 実用的には非常に重要な知見であるこの阻害機構の解明は今後の課題であると考えている。

第 2 章では, ミオシン分解の阻害に必要な濃度 (0.1-0.25 M) のクエン酸 Na は, 筋原繊維を溶解させることを見出した。その溶解作用を NaCl と比較すると, 明らかに低濃度で起こった。ミオシンのフィラメント形成とその溶解機構には, ミオ

シン尾部表面に規則的に分布する正と負の電荷が関与しており, 静電結合がミオシン間で起これば, フィラメント形成が起こり, 加えた塩由来の正と負のイオンとの間で起これば, ミオシンの溶解となる。クエン酸 Na が溶解すると, 3 価の負イオンであるクエン酸イオンと正の Na イオンを生成するが, 得られるイオン強度は NaCl の 5 倍程度である。それが, NaCl 以上に強い筋原繊維の溶解作用をクエン酸 Na が示す理由であると推定された。そして, その溶解作用は, NaCl と協同的に作用した (Fig. 19)。クエン酸 Na だけでも, 筋原繊維の溶解は可能であるが, 食品として呈味の観点から食塩を添加する場合は, 必要なクエン酸 Na 濃度を低下させることができる。また, 第 1 章で, NaCl の添加は自己消化を促進することを示したが, 最も自己消化が促進される濃度の NaCl が存在していても, 同様に自己消化抑制作用が見出されたので, クエン酸 Na は温度や食塩といった水産加工で常に考慮しなければならない因子に関わりなく, 自己消化を抑制する優れた添加物であると結論した。

当初の目的は, クエン酸 Na 添加による自己消化の抑制であったが, 想定していなかった筋原繊維の溶解作用が見出されたので, 食塩を添加しない肉糊の調製が可能であろうと考えるに至った。そこで, 第 3 章では, 実際に NaCl の代わりにクエン酸 Na を添加した肉糊から, 直接加熱ゲルを調製した。まず, 魚肉に準じて調製した NaCl 添加肉糊を直接高温で加熱しても, 温度上昇中にゲル中のミオシンが分解されることを確認した。これが, 直接加熱ゲルの製造方法を採用しても, イカ肉から高品質のねり製品が製造できない理由であると思われた。また, ミオシンの分解は EDTA 添加肉糊でも認められたので, 金属プロテアーゼだけの阻害では不十分であることも確認した。一方, クエン酸 Na で調製した肉糊の場合は, セリン, 金属両プロテアーゼの阻害剤を添加した場合と同程度までミオシン分解が抑制されていた。このことは, モデル実験の結果が, 実際のねり製品の中でも十分に再現できたことを示すものであり,

クエン酸 Na によるセリンプロテアーゼ阻害機構は不明であるが、重要な機能であることを再確認した。そして、Fig. 26 に示したように、クエン酸 Na 添加により、通常の NaCl を利用して調製した加熱ゲルはもちろん、EDTA 添加加熱ゲルの物性をしのぐ優れた物性のゲルが調製できた。また、この物性向上効果は、加熱ゲル中のミオシンの分解がクエン酸 Na によって抑制されたためであることを、加熱ゲルの SDS-PAGE パターンの解析から確認した。

なお、本研究では冷凍保存しておいたスルメイカを水晒しすること無しに実験に供した。この理由は、これまでのイカ筋肉タンパク質の研究から、イカ挽き肉を水洗浄すると、筋原繊維は膨潤し、遠心分離で回収されなくなり、筋原繊維タンパク質の流出が危惧されたこと、水晒し肉は膨潤するため、タンパク質濃度の著しい低下を引き起こし、熱ゲル形成には不利であること、また、水晒しをしても、自己消化酵素の完全な除去は難しいこと (Konno and Fukazawa 1993) を総合的に判断したためである。さらに、イカの味を加熱ゲルに残すためには、水晒しを行わない方が良いと思われ、自己消化抑制のために使用したクエン酸 Na 濃度であれば、ほとんど無味であったので、イカの味に対する悪影響は認められず、イカ本来の風味を保持した「塩辛くないイカねり製品」が開発できると考えた。

魚肉のねり製品製造では、高温で加熱する前に、比較的低温で予備加熱する「坐り」と呼ばれる工程が導入されている。長年の間、この機構が不明のまま、ゲル物性向上に効果的な方法であるとして現場で利用されてきた。1990 年から1991年にかけて、予備加熱中の酵素反応 (TGase) によって、ミオシンの重合が引き起こされることが見出された (関ら1990, Kimuraら1991)。この酵素はCa<sup>2+</sup>を要求することが、基礎研究から明らかにされている。現場では、魚肉の水晒しに使用する水は、硬水の方が優れていると言われているが、それには、水晒し後の脱水のしやすさに加え、予備加熱中のTGaseによるミオシンの多量化反応を促進す

るためのCa<sup>2+</sup>が含まれている方がよいということ、経験的に判断した結果であると思われる。しかし、スルメイカ外套膜筋 (Nozawaら2001, Parkら2003) も含め、魚肉中のTGaseの活性化に必要なCa<sup>2+</sup>は、クエン酸Naにキレートされるので、その添加はゲル物性の増強に対しては好ましくない影響を示すことが予想される。

一方、放線菌 (Streptovorticillium属) から見出されたTGase (MTGase) は、活性化にCa<sup>2+</sup>要求性を示さない (Andoら1989)。すなわち、Ca<sup>2+</sup>が無くても活性化されるという内在性TGaseとは異なる特性を有している。食品添加物として認可されているMTGaseは、様々な食品に利用されている。魚肉ねり製品では内在性TGaseの不足を補うため、あるいは、タンパク質食品では肉の結着のためなどに用いられている。すなわち、これまでの利用は、MTGase のCa<sup>2+</sup>非要求性という特性は活用されていないことになる。このMTGaseを用いれば、クエン酸Naを加えてCa<sup>2+</sup>を除去した条件でも、活性発現が期待でき、予備加熱することでミオシンの架橋反応の進行と、その結果としての「坐り」効果の発現も期待され、MTGaseならではの特性を応用した利用法と言える。

酵素製剤であるMTGaseの添加効果を最大限に引き出すには、使用量、温度、時間など、反応の進行に大きく影響を与える因子を把握しておく必要がある。これまでの研究から、あまり高濃度の使用は、かえって加熱ゲルの物性からしなやかさを奪い、硬いだけの脆い異質のゲルを作ってしまうという使用例も報告されている (Asagamiら1995)。そのような知見を背景として、MTGaseの使用条件を詳細に検討した。その結果、0.25 Mクエン酸Naで調製したスルメイカ肉糊に対して、比較的少量のMTGase (1 unit/g) を添加し、比較的低温 (35°C) で、適度な時間 (2時間) 予備加熱することで、適度なミオシンの多量化反応を引き起こし、坐り作用が発現する条件を見出すことができた。その結果、クエン酸Naのデメリットを克服したゲル物性の優れた二段加熱ゲルを製造する技術が確立できた (第3章)。

また、0.25 Mクエン酸Na存在下での35°Cの2時間は、第4章の研究結果から、ミオシンの変性がかなり抑制された条件であることが推定される。すなわち、イカ筋肉には数mMのMg<sup>2+</sup>が含まれているので、Ca<sup>2+</sup>が存在している筋原繊維にクエン酸Naを加えた加熱条件に近似していると考えられる。それに、0.25 Mのクエン酸Naを添加し、35°Cで加熱したとすれば、Fig. 50およびFig. 51の結果から、2時間の加熱で50%程度のATPase失活しか起こらないと計算される。今野と今村（2000）は、スケトウダラ肉糊を25°Cで予備加熱したときのミオシン変性と架橋反応を追跡し、これらは1時間程度の加熱で、比較的速やかに進行していることを報告している。それゆえ、本研究の予備加熱条件は、緩やかなミオシン変性が起こりながら、ミオシンの架橋反応が起こっている条件であると判断できる。

ここまで、スルメイカ外套膜筋肉を使用したねり製品製造方法を開発することができた。本研究では塩ずりのために、真空下で処理できるステファン製の高速カッターを使用した。この高速カッターを使用すれば、イカの凍結粉碎肉から、イカ肉由来の塩だけで、NaCl無添加の加熱ゲルを製造できることが報告されている（石川 1999）。これは第3章でも確認した。しかし、現場で広く使われている石臼やサイレントカッターを用いた製造が可能になれば、技術がさらに広がる可能性がある。石臼を使ってイカ挽き肉から肉糊を調製しようとすると、容易に均一にすることができない。そのため、必然的に均一な肉糊を調製しようとして、NaClを添加してから長時間塩ずりを続けることになるが、第1章で述べたように、NaClはミオシンの分解を促進する。さらにNaClは、アクチンによるミオシンの安定化作用を消失させ、ミオシンの変性を促進する。魚肉からの肉糊製造で使用する3%程度のNaClの添加は、魚肉（スケトウダラ）の場合、数倍程度のミオシン変性速度の上昇しか引き起こさないが、イカの場合は、同じ濃度のNaClで変性速度は300倍程度上昇する。これらの現象は、ゲル物性を劣化させる因子と考

えられる。

塩ずりのための攪拌時間を短くする目的で開発されたのが、凍結状態でイカ肉を微細化した「凍結粉碎肉」である。また、前述したNaCl無添加の加熱ゲルも2つの問題を克服する方法として採用されている。いずれもが、特殊な機器を必要とする技術で、一般的な方法とは言いがたい。もし、クエン酸Naを加えて、溶解した肉糊に相当する中間素材を開発できれば、塩ずりに高速カッターを必要とせず、容易に加熱ゲルを製造することが可能となる。これが可能かどうかは、イカ肉にクエン酸Naを添加した肉糊の保存性次第である。すなわち、クエン酸Na添加により、ミオシンの変性が進行するようであれば、そのような中間素材の開発は不可能となる。

そこで第4章では、ミオシン変性に対するクエン酸Naの影響をモデル系で検討した。スルメイカの筋原繊維、ミオシンはCa<sup>2+</sup>によって安定化を受けるという特殊な性質があるため、クエン酸Naの添加はCa<sup>2+</sup>による安定化作用を失わせ、ミオシンの不安定化を引き起こすことが予想される。そこで、先にCa<sup>2+</sup>による安定化作用が認められない魚類（コイ）の筋原繊維とミオシンを用いて、クエン酸Naの作用を検討した。また、クエン酸Naを魚肉に利用することを想定すれば、魚肉に対する影響も明らかにしておいた方がよいと判断した。これまで、魚肉タンパク質の変性抑制剤としては、冷凍すり身に用いられる糖類や糖アルコール類がよく知られているので（大泉ら 1984）、それらと比較した。さらに、グルタミン酸Naや有機酸塩（酢酸Na、グルコン酸Naなど）による変性抑制作用が報告されているので（竹下ら 1999）、クエン酸Naにも変性抑制作用が期待された。

定量的に検討したところ、クエン酸Naは広く利用されているソルビトールよりも強い変性抑制作用を示し、これまで報告されている中で最も強い変性抑制作用を示すグルタミン酸Na（大泉ら 1984）に匹敵する効果を有することがわかった（Fig. 44）。この結果から、クエン酸Naは魚肉のミオシンを変性から防御する作用を有することが

明らかとなった。すでに述べたように、0.1-0.25 M 付近のクエン酸 Na 添加は、筋原繊維の溶解を引き起こすが、そのような状態変化にかかわらず、ミオシンの変性を抑制することが明らかとなった。

次に、スルメイカ筋原繊維を使って、 $\text{Ca}^{2+}$ による安定化を受けている場合と、EDTA を加え  $\text{Ca}^{2+}$ による安定化作用を失わせた場合との2つの条件に分けて解析した。まず、EDTA を加え  $\text{Ca}^{2+}$ による安定化作用を失わせた場合は、コイ筋原繊維と同じように、クエン酸 Na 濃度の上昇に伴い、変性速度が小さくなり、強い変性抑制が認められた。この抑制作用はコイ筋原繊維に対する場合より大きく、変性抑制作用は化合物固有であるというこれまでの結果と異なるものであった。しかし、ソルビトールの変性抑制作用もイカ筋原繊維を用いて測定した場合はやはり大きいので、イカは魚類とは異なった特性を示すようである。この理由は不明である。

一方、 $\text{Ca}^{2+}$ による安定化を受けている場合 (1 mM  $\text{CaCl}_2$  存在下) は、徐々にクエン酸 Na 濃度を上昇させると、0.2 M 程度までは、変性を促進するように作用した。これは、クエン酸 Na によるキレート作用により、系から  $\text{Ca}^{2+}$ が除かれ、 $\text{Ca}^{2+}$ による安定化が次第に消失していくステップを見ていると考えられた。それ以上の濃度では EDTA 中の加熱と類似した傾きで、添加濃度の上昇とともに変性抑制作用が認められた。しかし、クエン酸 Na 無添加時の  $\text{Ca}^{2+}$ による安定化作用は約 100 倍と非常に大きく、 $\text{Ca}^{2+}$ 存在下、EDTA 存在下で 0.6 M クエン酸 Na を加えた場合の変性速度は、 $\text{Ca}^{2+}$ 存在下のクエン酸 Na 無添加で加熱したときの値と類似した。なお、イカ・ミオシンで検討すれば、 $\text{Ca}^{2+}$ による安定化程度が小さいので、 $\text{Ca}^{2+}$ によらず、大きな変性抑制作用が認められたので、クエン酸 Na 本来の変性抑制作用はイカに対しても非常に大きいものである。

第2章の結果から、クエン酸 Na は強い塩として作用したため、NaCl や KCl のように筋原繊維中のアクチンを選択的に変性させ (若目田と新井 1984)、その結果、間接的にミオシンの変性を促進

することも考えられた。しかし、上記の結果から、魚類筋原繊維の加熱変性において、クエン酸 Na の添加がミオシン変性を促進するような現象は認められなかったため、その可能性は低いと推察した。実際に、イカ、コイいずれの筋原繊維を用いた実験でも、5 M NaCl に相当するイオン強度を示す 1 M クエン酸 Na を添加しても、アクチンの塩変性は全く検出されなかった。驚いたことに、クエン酸 Na が共存すると、高濃度の NaCl によるアクチン変性が完全に阻止されることを見出した。すなわち、クエン酸 Na はミオシンばかりでなく、アクチンの塩変性抑制作用も兼ね備えていることを見出した。これまで、各種化合物のアクチンの塩変性に対する抑制作用を検討した例もなければ、アクチン変性抑制作用を示す化合物の報告もないので、アクチンの塩変性抑制に関する最初の報告である。

ミオシンの変性抑制作用を有する化合物であれば、普遍的にアクチンの塩変性抑制作用が認められる可能性もある。そこで、優れた変性抑制剤として知られているソルビトールを使って検証したところ、全くアクチンの塩変性抑制作用は認められなかった。ソルビトール以外の添加物では実験を行わなかったため、他の化合物の作用については、さらに検討する必要があるが、クエン酸 Na は非常に優れた変性抑制作用を有する化合物であることが明らかとなった。さらに、このクエン酸 Na を加えた肉糊 (0.25 M クエン酸 Na 程度の添加では肉糊状態になると予想される) を凍結保存できるか、すなわち、筋原繊維を溶解した状態で凍結流通、貯蔵が可能かどうかを検証するため、クエン酸 Na がミオシンの凍結変性を抑制するかどうかを検討した。ミオシンの加熱変性に対して非常に強い抑制作用を示す硫酸イオンは、凍結変性を全く抑制しないことが報告されている (Konno 1998)。同じく強い塩としての作用を示すクエン酸 Na も硫酸イオンのように、凍結変性抑制の目的で使用できない可能性が想定されたからである。そこで、コイ筋原繊維をモデルとして、クエン酸 Na による凍結変性抑制作用を糖類、ア

ミノ酸などと比較した。無添加では ATPase 活性がほぼ完全失活するような凍結条件でも、クエン酸 Na を添加すると、失活は完全に抑制された。抑制に必要な濃度は加熱変性と同じように、ソルビトールよりも低濃度で十分であり、グルタミン酸 Na と同等であった。この結果から、クエン酸 Na は溶解した筋原繊維中のミオシンを凍結変性から強く保護することが明らかとなった。すなわち、冷凍すり身のような中間素材の製造、流通が可能であると判断した。

第3章と第4章で示したように、このクエン酸 Na による肉糊調製および加熱ゲル化は魚肉にも応用できることを確認したので、食塩非含有魚肉ねり製品の製造など、応用の幅は広いと考えられた。なお、本研究で用いたクエン酸塩は Na 塩であり、Na そのものが制限されている場合には、Na 塩の代わりに K 塩を使用すればよい。K 塩にもほとんど同じような作用が認められているが、溶解度が低いのが難点である。もちろん、呈味の観点から食塩が必要であれば最小限添加すればよいし、それ以外の調味料を使い、好みに合わせた調味も可能である。第4章で述べたように、クエン酸 Na を用いると、貯蔵のための糖類の添加も必要がなくなることから、「塩辛さ」と「甘さ」というねり製品が持っている不可避の性質を同時に取り除いた画期的な製品が製造できるであろう。

以上の結果を総合すると、クエン酸 Na はスルメイカからのねり製品製造に適した複数の機能を兼ね備えており、ねり製品に適していないとされてきたスルメイカからのねり製品化を可能にする化合物である。また、筋原繊維の溶解作用、加熱および凍結変性抑制作用のみを取り上げても、イカ肉だけでなく魚肉ねり製品にも応用できる化合物である。確かに、キレート作用により、日本のねり製品業界で評価されている二段加熱による「坐り」作用は期待できなくなるが、いわゆる「大阪かまぼこ」ではあえて二段加熱を導入していないので、問題なく使用できる。また、海外では逆に「小田原かまぼこ」タイプのゴムのような弾力

性が嫌われると言われているので、必ずしも不利な点とは言えない場合もある。仮に、坐り作用を必要とするのであれば、MTGase を併用すればよい。何よりも、クエン酸 Na を利用する最大の利点は、食塩および糖類を添加する必要がないので、「塩辛さ」および「甘さ」がないことであり、イカ肉あるいは魚肉本来の味を強調した製品を開発する際の利点となるであろう。

クエン酸 Na は広く利用されている食品添加物であり、新規の化合物ではないことも有利な点である。すなわち、安全性を検討する必要もなく、直ちに利用できる化合物であり、価格的にはねり製品に十分添加しうるレベルである。本論文では、このような身近な化合物に、複数の優れた機能が備わっていることを初めて明らかにした。このことは、産業上画期的な発見であり、ねり製品以外の筋肉タンパク質を利用した製品にも応用されていくと考えられる。

## 謝 辞

本研究を行うにあたり、終始ご指導およびご助言をいただきました北海道大学水産科学研究院・今野久仁彦教授に深く感謝申し上げます。

また、論文をまとめるに際し、ご助言とご指導をいただいた北海道大学水産科学研究院・川合祐史教授、佐伯宏樹教授に心より感謝申し上げます。

本研究は、長崎県総合水産試験場水産加工開発指導センターの皆様のご協力のもとに行うことができました。関係者各位に深く感謝いたします。また、東京海洋大学・大迫一史准教授には、適切なご助言をいただきました。厚くお礼申し上げます。

MTGase は味の素株式会社、グルコン酸 Na は藤沢薬品工業株式会社からご供与いただきました。ここに感謝の意を表します。

皆様のご協力のもとに遂行できた本研究が、水産加工業の発展に寄与することを切に望みます。

## 文 献

- Ando H, Adachi M, Umeda K, Matsuura A, Nonaka M, Uchio R, Tanaka H, Motoki M. Purification and characteristics of a novel transglutaminase derived from microorganisms. *Agric. Biol. Chem.*, 1989; 53: 2613-2617.
- 新井健一, 高橋英明, 齋藤恒行. 魚類筋肉構成たんぱく質に関する研究-III. コイ筋肉アクトミオシンの凍結貯蔵における Sorbitol および Sucrose の変性防止について. 日本水産学会誌, 1970; 36: 232-236.
- Asagami T, Ogiwara M, Wakameda A, Noguchi SF. Effect of microbial transglutaminase on the quality of frozen surimi made from various kinds of fish species. *Fish. Sci.* 1995; 61: 267-272.
- Aynesa MG, Montero MP, Borderias AJ, Hurtado JL. Influence of some protease inhibitors on gelation of squid muscle. *J. Food Sci.*, 2002; 67: 1636-1641.
- Cao MJ, Hara K, Osatomi K, Tachibana K, Izumi T, Ishihara T. Myofibril-bound serine proteinase (MBP) and its degradation of myofibrillar proteins. *J. Food Sci.*, 1999; 64: 644-647.
- 江原 司, 田宮 徹, 土屋隆英. イカ類筋肉のミオシンヘビーチェーン分解酵素の検索. 日本水産学会誌 1992; 58: 2379-2382.
- 江原 司, 田宮 徹, 土屋隆英. イカ類筋肉のミオシンヘビーチェーン分解酵素. 日本水産学会誌 1994; 60: 527-528.
- Francis B, Seebart C, Kaiser II. Citrate is an endogenous inhibitor of snake venom enzymes by metal-ion chelation. *Toxicon* 1992; 30: 1239-1246
- 船津保浩, 細川 一, 南部正一, 新井健一. スケトウダラ肉糊のゲル形成能とミオシン重鎖の多量化に及ぼすソルビトールの影響. 日本水産学会誌 1993; 59: 1599-1607.
- Gomez-Guiller M, Hurtado J, Montero P. Autolysis and protease inhibition effects on dynamic viscoelastic properties during gelation of squid muscle. *J. Food Sci.*, 2002; 67: 2491-2496.
- Gomez-Guillen M C, Martinez-Alvarez O, Montero P. Functional and thermal gelation properties of squid mantle proteins affected by chilled and frozen storage. *J. Food Sci.*, 2003; 68: 1962-1967.
- Gornall AG, Bardawill CJ, David MM. Determination of serum proteins by means of biuret reaction. *J. Biol Chem*, 1949; 177: 751-766.
- Hayashi K, Konno K. Stabilization of myosin by ionic compounds as affected by F-actin. *Fish. Sci.* 2006; 72: 1306-1312.
- Hernandez-Andrez A, Gomez-Guillen G, Montero P, Perez-Mateos M. Partial characterization of protease activity in squid (*Todaropsis eblanae*) mantle: modification by high-pressure treatment. *J Food Sci.*, 2005; 70: 239-245.
- 今井千春, 塚正泰之, 杉山雅昭, 峰岸 裕, 志水 寛. マイワシおよびスケトウダラ坐り肉中の  $\epsilon$ -( $\gamma$ -glutamyl)lysine 架橋量と破断強度との関係に及ぼす坐り温度の影響. 日本水産学会誌 1996; 62: 104-111.
- 石川 哲. イカ中間素材の利用技術開発. 平成 9 年度青森県水産物加工研究所研究報告, 青森. 1999: 34-37.
- 加藤 登, 野崎 恒, 小松一宮, 新井健一. スケトウダラ冷凍すり身の一品質判定法 冷凍すり身の筋原繊維 ATPase 活性とかまぼこ形成能の関係. 日本水産学会誌, 1979; 45: 1027-1032.
- Katsumi S, Matsumoto JJ. Studies on the water-soluble proteins of the squid muscle-I. A comparative study of the mantle and the arm muscle proteins. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1969; 35: 685-689.
- Kawakami H, Morita J, Takahashi K, Yasui T. Thermal denaturation of myosin, heavy meromyosin and subfragment-1. *J. Biochem.*, 1971; 70: 635-640.
- 川島孝省, 新井健一, 齋藤恒行. 魚類筋肉構成たんぱく質に関する研究-IV. スケトウダラ冷凍すり身中のアクトミオシン定量条件の検討. 日本水産学会誌, 1973a; 39: 207-214.
- 川島孝省, 新井健一, 齋藤恒行. 魚類筋肉構成たんぱく質に関する研究-X スケトウダラ冷凍す

- り身中のアクトミオシン含量について. 日本水産学会誌, 1973b; 39: 525-532.
- 川島孝省, 大場明子, 新井健一. 魚類筋肉構成たんぱく質に関する研究-XIII スケトウタラ冷凍すり身中のアクトミオシン量とかまぼこの品質の関係. 日本水産学会誌, 1973c; 39: 1201-1209.
- 木村郁夫, 吉富文司, 今野久仁彦, 新井健一. スルメイカ外套膜筋肉から高純度ミオシンの調製. 日本水産学会誌 1980; 46: 885-892.
- Kimura I, Sugimoto M, Toyoda K, Seki N, Arai K, Fujita T. A study on the cross-linking reaction of myosin in Kamaboko "Suwari" gels. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1991; 57: 1389-1396.
- 今野久仁彦, 上田陽一. 加熱に伴うコイ筋原繊維 Mg-ATPase 活性の上昇. 日本水産学会誌 1989; 55: 1457-1462.
- Konno K. Complex formation between regulatory and essential light chain on squid mantle myosin subfragment-1 revealed by thermal denaturation method. *J. Biochem.*, 1991a; 109: 816-821.
- Konno K. Thermal denaturation of squid myofibrils: Effects of calcium ion and EDTA. *Nippon Suisan Gakkaishi*. 1991b; 57: 2145-2149.
- Konno K, Fukazawa C. Autolysis of mantle muscle protein as affected by storage conditions and inhibitors. *J. Food Sci.* 1993; 58: 1198-1202.
- Konno K, Yuasa M. Comparative aspect of thermal stability of squid myofibrils. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1993; 105A: 427-430.
- Konno K, Yamanodera K, Kiuchi H. Solubilization of fish muscle myosin by sorbitol. *J. Food Sci.* 1997; 62: 980-984.
- Konno K. Suppressive effect of sulfate on fish myosin denaturation. *Fish. Sci.* 1998; 64: 848-849.
- 今野久仁彦, 今村浩二. スケトウダラ肉糊の加温中に生成する 150 および 70 kDa 成分の同定とその存在状態. 日本水産学会誌, 2000; 66: 869-875.
- Konno K, Nakajima A, Koseki H, Sakai T. Effects of sorbitol on the autolysis profile of squid mantle muscle. *Fish. Sci.* 2002; 68: 215-221.
- Konno K, Young-Je C, Yoshioka T, Shinho P, Seki N. Thermal denaturation and autolysis profiles of myofibrillar proteins of mantle muscle of jumbo squid *Docidicus gigas*. *Fish. Sci.* 2003; 69: 204-209.
- Koseki S, Nomura K, Konno K. Development of myofibrillar ATPase assay system on pH stat. *Fish. Sci.* 2005a; 71: 380-387.
- Koseki S, Ootake R, Katoh N, Konno K. Quality evaluation of frozen surimi by using pH stat for ATPase assay. *Fish. Sci.* 2005b; 71: 388-396.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-685.
- 松本行司, 大泉 徹, 新井健一. コイ筋原繊維たんぱく質の冷凍変性に及ぼす糖の保護効果. 日本水産学会誌 1985; 51: 833-839.
- 松浦 基, 大泉 徹, 新井健一. コイミオシンの熱変性に対する糖の保護効果. 日本水産学会誌 1984; 50: 521-529.
- Nagashima Y, Ebina H, Nagai T, Tanaka M, Taguchi T. Proteolysis affects thermal gelation of squid mantle muscle. *J. Food Sci.* 1992; 57: 916-922.
- 日本薬学会編. 衛生試験法・注解, 東京, 1995 50-52.
- 西岡不二男. 新しい冷凍すり身品質検査基準と解説. 魚肉ソーセージ 1993; 226: 1-11.
- Noguchi S, Matsumoto J J. Studies on the control of the denaturation of fish muscle proteins during the frozen storage I. Preventive effect of Na-glutamate. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1970; 36: 1078-1087.
- Noguchi S, Matsumoto J J. Studies on the control of the denaturation of fish muscle proteins during the frozen storage II. Preventive effect of amino acids and related compounds. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1971; 37: 1115-1122.
- 野村 明, 伊藤慶明, 宗圓貴仁, 小島 渥. 土佐湾産魚種の戻り発現に及ぼす水晒しの影響. 日本水産学会誌 1993; 59: 857-864.
- 農林水産省統計部. 平成17年度水産物流通統計年

- 報, 東京, 2006; 49-50, 74-76, 355-358, 364.
- Nowsad A K, Katoh E, Kanoh S, Niwa E. Contribution of transglutaminase to the setting of fish paste at various temperatures. *Fish.Sci.* 1996; 62: 94-97.
- Nozawa H, Mamegoshi S, Seki N. Partial purification and characterization of six transglutaminases from ordinary muscles of various fishes and marine invertebrates. *Comp. Biochem. & Physiol. B-Biochem. & Mol. Biol.*, 1997; 118(2): 313-317.
- Nozawa H, Cho S Y, Seki N. Purification and characterization of transglutaminase from squid gill. *Fish.Sci.* 2001; 67: 912-919.
- 沼倉忠弘, 関 信夫, 木村郁夫, 豊田恭平, 藤田孝夫, 高間浩造, 新井健一. 坐りによる肉糊のゲル形成とミオシンの交差結合反応. 日本水産学会誌 1985; 51: 1559-1565.
- 沼倉忠弘, 関 信夫, 木村郁夫, 豊田恭平, 藤田孝夫, 高間浩造, 新井健一. 坐りに伴うミオシン重鎖の交差結合に及ぼす冷凍すり身の品質の影響. 日本水産学会誌 1987a; 53: 633-639.
- 沼倉忠弘, 関 信夫, 木村郁夫, 豊田恭平, 藤田孝夫, 高間浩造, 新井健一. 坐りに伴う塩すり肉たんぱく質の SDS-ゲルろ過図の変化. 日本水産学会誌 1987b; 53: 2045-2049.
- 沼倉忠弘, 溝口 竜, 木村郁夫, 豊田恭平, 藤田孝夫, 関 信夫, 新井健一. 加熱により変質したスケトウダラすり身の坐りゲル形成能とミオシン重鎖の交差結合能. 日本水産学会誌 1989; 55: 1083-1090.
- 沼倉忠弘, 木村郁夫, 豊田恭平, 藤田孝夫. スケトウダラ肉糊の坐りに伴うゲル強度とミオシン重鎖の変化の温度依存性. 日本水産学会誌 1990; 56: 2035-2043.
- Okamoto Y, Otsuka H, Horiuchi S, Tamiya T, Matsumoto J-J, Tsuchiya T. Purification and characterization of two metalloproteinases from squid mantle muscle, myosinase I and myosinase II. *Biochim Biophys Acta.* 1993; 1161: 97-104.
- 大泉 徹, 橋本浩二, 小倉潤子, 新井健一. 魚類筋原繊維の加熱変性に対する糖および糖アルコールの保護効果の定量的考察. 日本水産学会誌 1981; 47: 901-908.
- 大泉 徹, 山村寛仁, 新井健一. サバ筋原繊維の加熱変性に対するアミノ酸類および糖類の協同保護効果. 日本水産学会誌 1982; 48: 219-226.
- 大泉 徹, 奈良泰信, 新井健一. サバ筋原繊維の熱変性に対するカルボン酸, ソルビトール及びグルタミン酸ナトリウムの保護効果. 日本水産学会誌 1984; 50: 875-882.
- Park S, Cho S, Yoshioka T, Kimura M, Nozawa H, Seki N. Influence of endogenous proteases and transglutaminase on thermal gelation of salted squid muscle paste. *J.Food Sci.* 2003; 68: 2473-2478.
- Park S, Cho S, Kimura M, Nozawa H, Seki N. Effects of microbial transglutaminase and starch on the thermal gelation of salted squid muscle paste. *Fish. Sci.* 2005; 71: 896-903.
- Perez-Mateos M, Montero P, Gomez-Guillen M C. Addition of microbial transglutaminase and protease inhibitors to improve gel properties of frozen squid muscle. *European Food Research & Technology*, 2002; 214(5): 377-381.
- 佐伯宏樹, 若目田 篤, 尾崎弘忠, 野中道夫, 新井健一. スケトウダラ筋原繊維の保水能と温度安定性に及ぼす塩化カルシウムの影響. 日本水産学会誌 1986; 52: 1771-1777.
- 佐伯宏樹, 尾崎弘忠, 野中道夫, 新井健一. 高塩濃度下におけるスケトウダラ筋原繊維タンパク質の  $\text{CaCl}_2$  による変性. 日本水産学会誌 1989; 55: 173-178.
- Samejima K, Hashimoto Y, Yasui T, Fukazawa T. Heat gelling properties of myosin, actin, actomyosin, and myosin subunits in a saline model system. *J. Food Sci.*, 1969; 34: 242-245.
- Samejima K, Ishioroshi M, Yasui T. Relative roles of the head and tail portions of the molecule in heat-induced gelation of myosin. *J. Food Sci.*, 1981; 46: 1412-1418.
- 関 信夫, 宇野秀樹, 李 南赫, 木村郁夫, 豊田恭平, 藤田孝夫, 新井健一. スケトウダラ筋肉お



- よびすり身中のトランスグルタミナーゼ活性とミオシンBとの反応. 日本水産学会誌 1990; 56: 125-132.
- 志水 寛. 魚肉すり身ゲル形成能の魚種特異性. 日本水産学会誌 1974; 40: 175-179.
- 志水 寛, 町田 律, 竹並誠一. 魚肉肉糊のゲル形成特性に見られる魚種特異性. 日本水産学会誌 1981; 47: 95-104.
- 下元 哲, 野村 明, 北村有里, 伊藤慶明. 魚肉水溶性画分のプロテアーゼ阻害活性並びにスケトウダラ冷凍すり身の戻り抑制効果. 日本水産学会誌 2006; 72: 58-64.
- Tajima T, Tamori J, Kanzawa N, Tamiya T, Tsuchiya T. Distribution of myosinase I and myosinase II in tissues of coleoidea. *Fish.Sci.* 1998; 64: 808-811.
- 高士令二, 新井健一, 齋藤恒行. 魚類筋肉構成たんぱく質に関する研究-I. コイ筋肉からのミオシンの調製について. 日本水産学会誌 1970; 36: 165-168.
- 高士令二. 魚類筋肉構成たんぱく質に関する研究-VIII. コイおよびティラピア背筋肉ミオシンとウサギ骨格筋ミオシンの比較. 日本水産学会誌 1973; 39: 197-205.
- 竹下瑞恵, 大泉 徹, 赤羽義章, 竹縄誠之. コイ筋原繊維の熱変性と溶解に及ぼすグルコン酸ナトリウムの影響. 日本水産学会誌 1999; 65: 886-891.
- Torigai M, Konno K. Pyrophosphate-accelerated actin denaturation mechanism in myofibril. *Fish.Sci.* 1996; 62: 307-311.
- Tsuchiya T, Fukuhara H, Matsumoto JJ. Physico-chemical properties of squid paramyosin. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1980; 46: 197-200.
- 塚正泰之, 志水 寛. マイワシ肉とマサバ肉の坐り特性. 日本水産学会誌 1990; 56: 1105-1112.
- 塚正泰之, 志水 寛. トランスグルタミナーゼによる坐りに関与するいくつかの要因. 日本水産学会誌 1991; 57: 535-540.
- 塚正泰之, 三宅康賀, 安藤正史, 牧之段保夫. 熱変性したコイのアクトミオシンに対する内在性トランスグルタミナーゼの影響. 日本水産学会誌 2000a; 66: 469-474.
- 塚正泰之, 三宅康賀, 安藤正史, 牧之段保夫. 内在性エンドペプチダーゼ (EP) およびトランスグルタミナーゼ (TGase) の制御がコイ肉の坐り特性に及ぼす影響. 日本水産学会誌 2000b; 66: 719-725.
- 若目田 篤, 野澤誠子, 新井健一. 魚類筋原繊維Ca-ATPaseの加熱変性に及ぼす中性塩の影響. 日本水産学会誌 1983; 49: 237-243.
- 若目田 篤, 新井健一. 魚類ミオシンBの粘性に及ぼす中性塩の影響. 日本水産学会誌 1983; 49: 643-650.
- 若目田 篤, 新井健一. 高濃度の塩存在下におけるコイのミオシンBの変性機構. 日本水産学会誌 1984; 50: 635-643.
- 若目田 篤, 新井健一. 魚類ミオシンBより中性塩の存在下で解離するアクチンの定量. 日本水産学会誌 1985; 51: 497-502.
- 若目田 篤, 新井健一. 高濃度の塩存在下で起るコイミオシンBのアクチンとミオシンへの解離. 日本水産学会誌 1986; 52: 293-300.
- Wan J, Kimura I, Satake M, Seki N. Effect of calcium ion concentration on the gelling properties and transglutaminase activity of walleye pollack surimi paste. *Fish.Sci.* 1994; 60: 107-113.
- Weed AG, Pope B. Studies on the chymotryptic digestion of myosin: Effect of divalent cation on proteolytic susceptibility. *J.Mol.Biol.* 1977; 111: 129-157.
- 山日達道. 凍結粉碎肉を利用したイカ肉の加工. 冷凍 2006; 81: 208-212.
- 山下敬子, 新井健一, 西田清義. 魚類, ホタテガイ, ウサギ筋肉のミオシンとアクチンから合成したアクトミオシンの温度安定性. 日本水産学会誌 1978; 44: 485-489.
- Yasui T, Kawakami H, Morita F. Thermal inactivation of myosin A adenosine triphosphate in the presence of F-actin. *Agrc. Biol. Chem.* 1968; 32: 225-233.
- Yasui T, Ishioroshi M, Samejima K. Heat-induced

- gelation of myosin in the presence of actin. *J. Food Biochem.*, 1980; 4: 61-78.
- Yoshioka T, Kinoshita Y, Kato S, Cho Y-J, Konno K. Prepartaion of heavy meromyosin from the autolyzed squid mantle muscle homogenate. *Fish.Sci.* 2005; 71: 213-219.
- 吉富文司, 今野久仁彦. スルメイカミオシン ATPase の酵素的特性. 日本水産学会誌 1982; 48: 581-586.