

9259 魚類筋肉タンパク質のn-ブタノール処理による変性様式と脱塩凝集特性に関する研究

助成研究者:田口 武(東京水産大学 水産学部)

〔目的〕 魚肉肉糊の熱ゲル化反応は、かまぼこなど水産ねり製品の製造にとって最も重要な工程となっている。同反応は、変性様式とのかかわりが深い。従来から、有機溶媒はタンパク質の変性剤としてよく知られているので、魚肉タンパク質の熱ゲル化におよぼすn-ブタノールの添加効果を検討したところ、n-ブタノールの添加は著しくゲル化促進効果のあることを示した。同効果は、魚肉に食塩を加えて肉糊とした後、n-ブタノールを添加することによって発現することがわかった。n-ブタノール添加した肉糊に対し超音波処理を施すと、さらに熱ゲル化促進効果が観察された。本研究は、魚類筋肉タンパク質のn-ブタノールによる変性様式と、タンパク質の脱塩凝集性について調べることを目的としている。特に、ミオシンおよびそのフラグメントについてこれらの点を明らかにしたい。

〔方法〕 新鮮なカジキ、ウマツラハギ、およびテイラピアの筋肉を用いた。これらの魚類の筋肉から、それぞれ常法によって肉糊、筋原繊維、アクトミオシン、ミオシンおよびそのフラグメントを調製した。添加されるn-ブタノール(n-ブタノール:エタノール=10:1)の濃度は0.1M~1.0Mであった。超音波処理は、前回と同様に、30℃、pH6.0の条件下で行った。各種ペーストのゲル形成性は、特にくとわらない限り、30°、40°、60°、および70℃で加熱した後、プランジャー押し込み試験に供し、ゼリー強度(g,cm)で表示した。n-ブタノール存在下における加熱に伴うタンパク質組成の変化は、SDS-電気泳動図の測定によって検討した。タンパク質の溶解性は、遠心上清のタンパク質濃度を測定して比較した。タンパク質表面疎水性の測定では、蛍光プローブ(8-anilino-1-naphthalene sulfonate)が用いられた。

〔結果〕 肉糊、筋原繊維、アクトミオシン、およびミオシンの加熱ゲル形成性はn-ブタノール存在下で促進された。n-ブタノールを含む筋原繊維に対して超音波処理効果のあることを認めた。アクトミオシンおよびミオシンの溶解性は、n-ブタノールの存在によって影響を受け、n-ブタノールは脱塩凝集性を高めた。n-ブタノールは、ゲル形成性に対し促進効果だけでなく、同時に火戻りに対する抑制効果のあることを、SDS-電気泳動図から明瞭に認めることができた。結局、n-ブタノールの存在は、塩濃度によるミオシンの溶解性を減少させ、加熱に伴う表面疎水性の増加を示した。n-ブタノールによるミオシンの性状変化は、溶解性および表面疎水性においてサブフラグメント-1に著しく、ロットでは僅かであった。

9259 魚類筋肉タンパク質のn-ブタノール処理による変性様式と脱塩凝集特性に関する研究

助成研究者: 田口 武(東京水産大学 水産学部)

〔目的〕 魚肉肉糊の熱ゲル化反応は、かまぼこなど水産ねり製品の製造にとって最も重要な工程となっている。同反応は変性様式とのかかわりが深い。従来から、有機溶媒はタンパク質の変性剤としてよく知られているので、魚肉タンパク質の熱ゲル化におよぼすn-ブタノールの添加効果を検討したところ、n-ブタノールの添加は著しくゲル化促進効果のあることを示した。同効果は、魚肉に食塩を加えて肉糊とした後、n-ブタノールを添加することによって発現することがわかった。n-ブタノール添加した肉糊に対し超音波処理を施すと、さらに熱ゲル化促進効果が観察された¹⁾。本研究では、ゲル形成性として魚類筋肉タンパク質の熱ゲル化におよぼすn-ブタノールの添加効果、および変性様式として筋肉タンパク質、特にミオシンとそのフラグメントの溶解性と表面疎水性について調べることを目的とした。

〔研究方法〕 試料 本実験では新鮮なカジキ、ウマヅラハギ、およびテイラピアの背筋肉を材料として用いられた。これらは、すべて死後硬直前あるいは死後硬直中の鮮魚であった。

筋原繊維の調製 魚類の筋肉を5mm目チョツパーにて挽肉とし、10倍量の0.15 M NaCl (pH 6.8) で3回洗浄後、5倍量の0.15 M NaCl (pH 6.8) とともにホモジナイズし、ストロマをナイロン網で除去してから遠心分離した。得られた沈澱をさらに5倍量の0.15 M NaCl (pH 6.8) で2回洗浄、同様に遠心分離して得られた沈澱を供試筋原繊維 (pH 6.8~6.9, 水分含量 78~79%) とした。得られた筋原繊維をステンレス製円筒容器 (直径 2.1 cm × 高さ 1.2 cm) に充填し、超音波処理に供した。

アクトミオシンの調製 アクトミオシンの調製では、まず挽肉に対して3倍量の Weber-Edsall 溶液 (0.6 M KCl, 0.04 M NaHCO₃, 0.01 M Na₂CO₃) で12時間抽出を行った。抽出物の粘性が高ければ、0.6 M KCl 溶液を加えてナイロンガーゼで濾過し、これに2倍量の冷蒸留水を加え、遠心分離して沈澱を集めた。沈澱物に対して終濃度が 0.06 M KCl となるようにして、攪拌溶解させ、遠心分離 (15,000×g, 20 min) して上清を実験に供した。

ミオシンの調製 魚類背筋肉からのミオシンの調製法はつぎのとうりである。挽肉を 5 mM ATP, 1 mM MgCl₂ を含む 0.45 M KCl, pH 6.4 で10分間抽出し、希釈沈澱によってタ

ンパク質を得た。沈澱物に対し 0.6 M KCl, 10 mM DTT, 10 mM ATP, 5 mM MgCl₂ および 0.5 mM GETDA になるように添加して、40~55%飽和硫酸画分を遠心分離してミオシンを集めた。最終的にミオシンは 0.6 M KCl, 5 mM Tris-maleate 緩衝液 (pH 6.8) に一夜透析して用いられた。サブフラグメント-1 (S-1) およびロッドは、ミオシンの 1/130 重量のキモトリプシンによって限定分解された。これに対し終濃度で 0.2 mM の (phenylmethylsulfonyl fluoride) PMSF を加え、反応終了後、遠心分離(25,000×g, 30 分間)によって上清から S-1, 沈澱物からロッドを調製した。両者はそれぞれセファデックス G-200 によるゲル濾過に供した。

超音波処理 超音波処理は、超音波工業 (株) USH-20Z20S型を用い、振動子 (直径 6.0 mm)、20 KHz の超音波を20Wの出力で、10mM phosphate buffer (pH 7.2~4.7)100ml のなかでステンレスケースに肉詰めした上面 5 cm から照射した。処理温度は 30°C、処理時間は、10 分, 20 分, 40 分であった。また、加熱処理は、とくにことわらない限り、30°, 40°, 60°, および 70°Cにおいて10分、30分、60分間行い、ジェリー強度測定に付した。ジェリー強度の測定 ジェリー強度は、レオメーター (サン科学 (株)、R-UDJ 型) を用いて、直径0.5 mm 球状プランジャー、試料台上昇速度 3 cm/min, チャート速度 30 cm/min で破断強度(g)および歪み(cm)を測定した。

タンパク質の溶解性 アクトミオシンおよびミオシンの溶解性は、遠心上清 (8,000×g, 10分) におけるタンパク質濃度をビュレット法によって測定し、はじめの濃度に対する相対量で表示した。

8-anilino-1-naphthalenesulfonate (ANS) による蛍光強度の測定²⁾ 4°Cの低温室内で 10 ml タンパク質溶液と 1 ml (8-anilino-1-naphthalenesulfonate) ANS (0.04% W/V) 溶液を試験管に加え、10 分間放置した。この反応混液を室温に 15 分間放置した後、日本分光、FR-770 型蛍光光度計 (励起波長 365 nm) で 465nm における蛍光強度を測定した。また、加熱したタンパク質溶液を検討する場合には、10 ml のタンパク質溶液を試験管内であらかじめ所定の温度で加熱した後、15 分間 4°C の水で冷却して ANS 溶液を加えた。

[研究結果と考察]

n-ブタノール存在下における魚筋肉タンパク質のゲル形成性

魚筋肉タンパク質、特にミオシンのゲル形成性におよぼすn-ブタノールの添加効果を Fig.1 に示す。加熱によるテラピアおよびウマヅラハギ・ミオシンのゲル形成性は、n-ブタノールの添加量と共に増大し、破断強度および歪みは 0.6 M 付近で最も高い値

を示した。すでに報告してきたように、n-ブタノールの添加は、キハダ筋原繊維のゲル形成性においても同様な効果を示した¹⁾。これらは、魚筋肉タンパク質のゲル化反応は、タンパク質変性と深いかかわり合いを示すものであつて、n-ブタノールによる変性様式を明らかにすることが緊急の課題となつた。Fig.2では、ウマヅラハギ筋原繊維ペーストの熱ゲル化時間曲線におよぼすn-ブタノールの添加効果を示している。n-ブタノールによるウマヅラハギ筋原繊維ペーストのゲル形成促進効果は、加熱温度 30°、40°、60°、および 70°C の温度においてすべて観察された。また同時に、60°C における火もどり(ゲルの劣化現象)を効果的に抑制することが認められた。火戻りはプロテアーゼの分解によって発現することが報告されているので²⁾、60°C におけるタンパク質組成の変化を SDS-電気泳動図で調べた(Fig.3)。その結果、電気泳動図では、n-ブタノールが存在しないとき、経過時間と共にミオシン・ヘビーチェーンの分解が認められ、ヘビーチェーンは 60分後にほとんど消失した。これに対し 0.6 M n-ブタノールが存在すると、ミオシン・ヘビーチェーンの分解は、ほぼ完全に抑制された。ゲル形成タンパク質に対する n-ブタノールの作用は、溶媒を介してタンパク質構造に影響を与えると解されるが、火戻りに対する抑制は、n-ブタノールによる筋肉タンパク質自体の構造変化によるのか、あるいはプロテアーゼの不活性化によるのかは、今後の課題である。

n-ブタノールによる魚筋肉タンパク質の変性

n-ブタノールの存在下におけるウマヅラハギ・アクトミオシンの溶解性におよぼす KCl濃度の影響を Fig.4 に示す。アクトミオシンの溶解性は、pH によって影響を受ける。n-ブタノールの存在は、各 KCl 濃度においてアクトミオシンの溶解性を減少させ、すなわち、アクトミオシンの凝集化を促進した。各 pH 値におけるn-ブタノールの効果は、pH 7.1>pH 5.9 であつた。これはアクトミオシンの凝集性に対する低いpH効果と n-ブタノールによる効果との混合効果として現われたためかも知れない。Fig.5 には、ウマヅラハギ・アクトミオシンのANS-蛍光強度におよぼす n-ブタノールの添加効果を示している。加熱すればアクトミオシンは、ANS による蛍光強度の増大を示す。これはアクトミオシンの表面疎水性基の増大を意味している。Fig.5 からわかるように、アクトミオシンを30°C および35°C で加熱すると、表面疎水性基の増大が見られるが、この場合 n-ブタノールの存在は、加熱に伴う表面疎水性基を著しく増大させることが認められた。これらのことから、アクトミオシン(0.6 M KCl, pH 7.0)の表面疎水性基は、n-ブタノールによって影響を受けやすく、n-ブタノールの作用は、タンパク質内側向きの疎水域を表面に露出させることによってタンパク質のゲル化を一層有利に展開できたものと推察した。

アクトミオシンの溶解性は、主に構成ミオシンに由来している、Fig.6 は、カジキ・ミオシンの溶解性におよぼすn-ブタノールの添加効果を示している。カジキ・ミオ

シンの塩濃度に対するの溶解性は、n-ブタノールの存在下で著しく影響した。 n-ブタノールの存在は、ミオシンの溶解性を著しく減少させた。 この傾向は、低塩濃度において特に顕著であった。 また、S-1 は n-ブタノール 感受性が高く、溶解性の著しい減少を引き起こした。 一方、ロッドは n-ブタノールによって溶解性の減少を示したが、n-ブタノール感受性の点では、S-1 > ロッドであった。 Fig.7 では、テラピア・ミオシンの溶解性におよぼす n-ブタノール効果を示す。 テラピア・ミオシンもカジキ・ミオシンの場合と同様な傾向を示した、n-ブタノールは、低塩濃度におけるミオシンの溶解性を著しく減少させた。 テラピア・S-1 と ロッドの n-ブタノール感受性も、また、S-1 > ロッドであった。 これらのことから、カジキおよびテラピア・ミオシンの溶解性に対するn-ブタノール感受性は S-1 が担っていると判断された。 タンパク質の溶解性が減少したことは、タンパク質溶媒間の相互作用に変化があったからであり、タンパク質分子表面の疎水性基が深くかかっていると思像した。

Fig.8 および Fig.9 には、カジキおよびテラピア・ミオシン (S-1,ロッド) の ANS-蛍光強度におよぼす n-ブタノールの添加効果を示す。 加熱による両ミオシンの疎水性基は、n-ブタノールの存在下で著しく増大した。 S-1 およびロッドに対する n-ブタノールの効果は、S-1 に著しくロッドでは極く僅かであった。 Fig.10 は、加熱によるカジキの S-1 およびロッドの ANS-蛍光強度におよぼす n-ブタノール効果を示している。 n-ブタノール存在下で S-1 の蛍光強度は、加熱に伴い急激に増大したが、一方、ロッドはほとんど変化を示さなかった。

ANS-蛍光強度の増加は、タンパク質分子における疎水性基の表面化を示しているの、加熱に伴うミオシンの疎水性基の増大は S-1 に由来していると言える。 以上のように、魚類アクトミオシンおよびミオシンの n-ブタノール変性を溶解性および ANS による蛍光強度から見ると、n-ブタノールによる変性の受けやすさは、S-1 であって、魚筋肉タンパク質のゲル形成性において S-1 の重要な役割が示唆されたことになる。

文献

- 1) Lo, J.R., Lin, W.L., Nagashima, Y., Tanaka, M., Taguchi, T., and Amano, K. 1993. Effect of n-butanol addition and ultrasonication on the thermal gelation of yellowfin tuna myofibrillar proteins. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*. 40:205.
- 2) 丹羽栄二. 1975. 魚肉のゲル化と疎水結合について. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 41:907.
- 3) Toyohara, H., Sakata, T., Yamashita, K., Kinoshita, M., and Shimizu, Y. 1990.

Degradation of oval-filefish meat gel caused by myofibrillar proteinase(s).
J. Food Sci. 55:364.

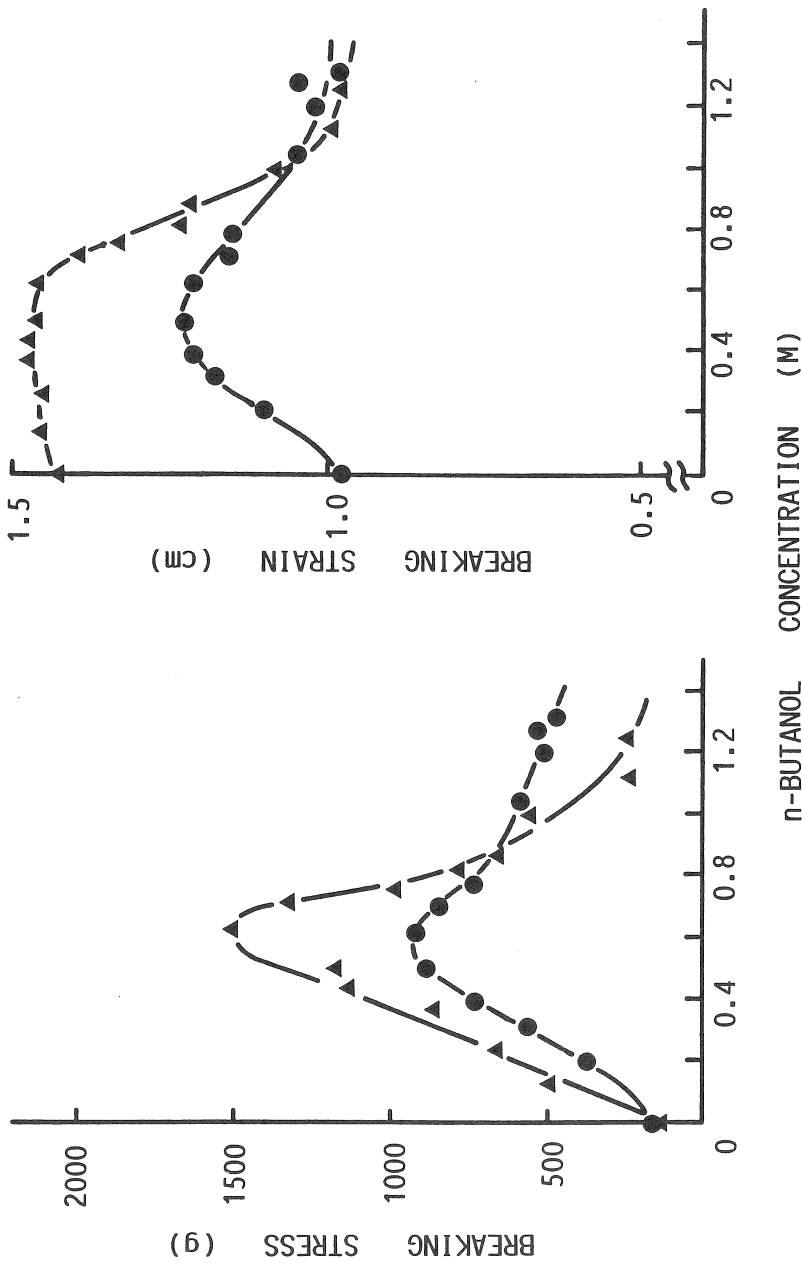


Fig. 1 Effect of added n-butanol on the thermal jelly-strength of tilapia and oval filefish myosins.

Tilapia and oval filefish myosin pastes (moisture content : 89% for tilapia, 87% for oval filefish) were heated at 70°C for 10 min.

▲: Tilapia myosin ●: Oval filefish myosin.

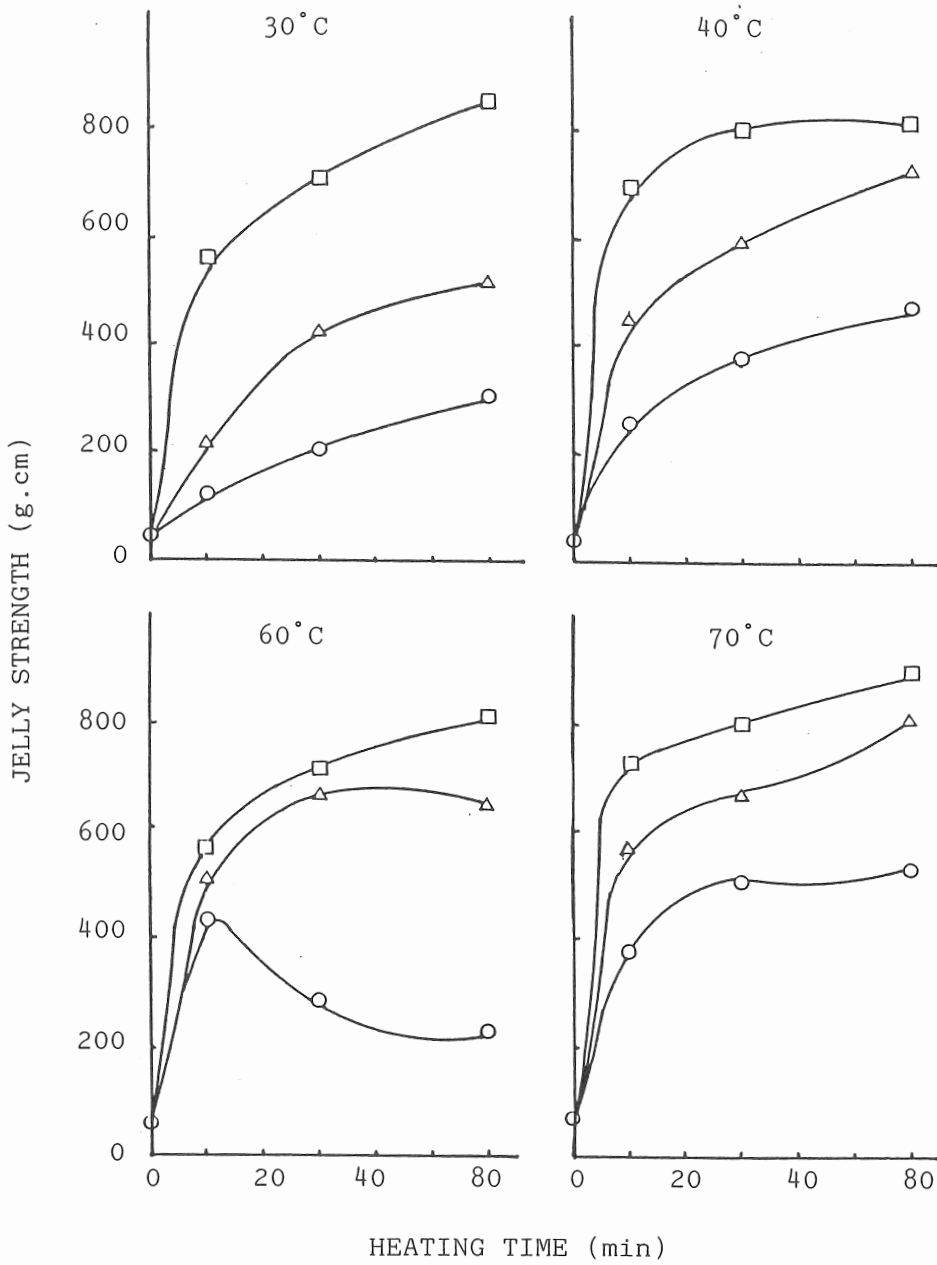


Fig. 2 Effect of added n-butanol on the thermal gelation of oval filefish myofibrillar paste.

- : Without n-butanol
- △ : With 0.3 M n-butanol
- : With 0.6 M n-butanol

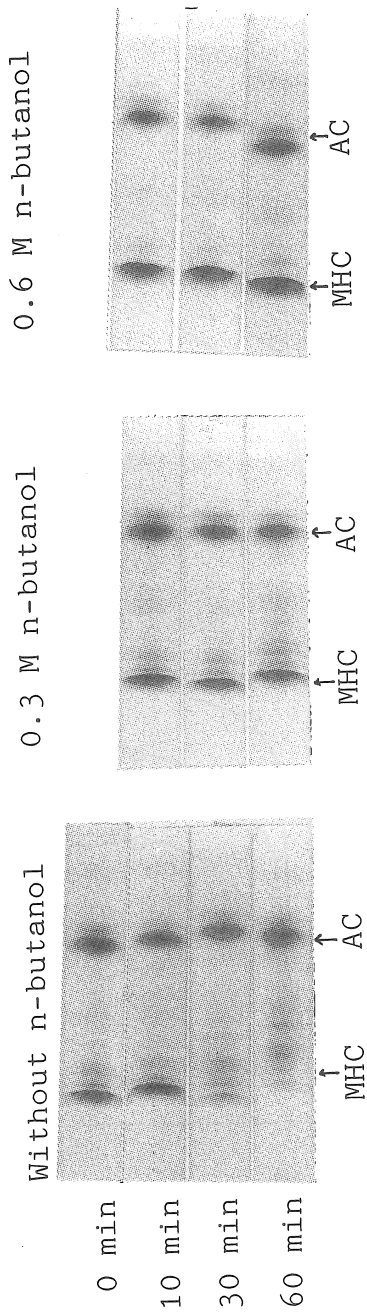


Fig. 3 SDS-polyacrylamide gel electrophoretograms of oval filefish myofibrillar gels.

Oval filefish myofibrillar pastes in the presence of 0.3 M and 0.6 M n-butanol.

Myosin heavy chain: HC, Actin: AC

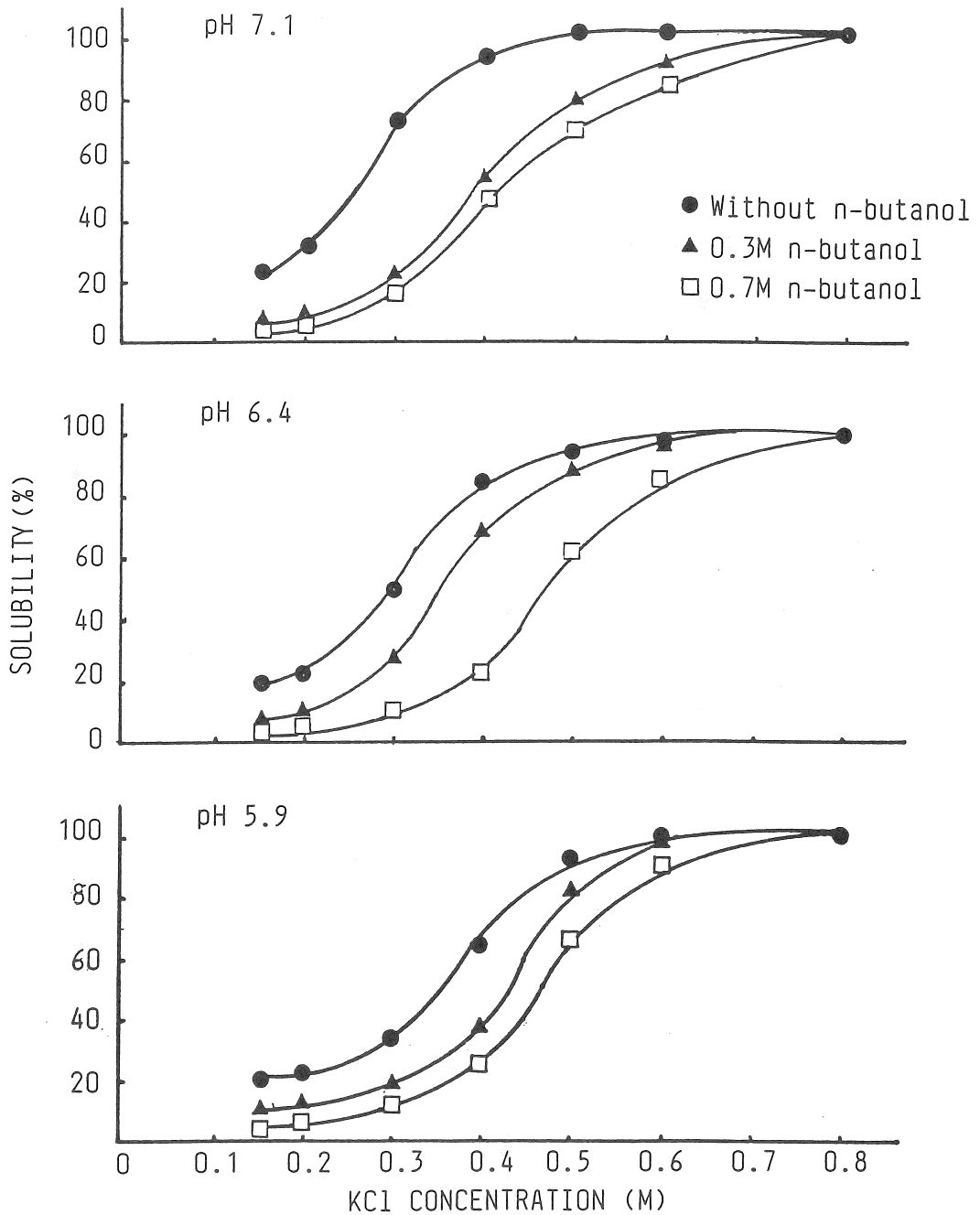


Fig.4 Effect of KCl concentration on the solubility of oval filefish actomyosin in the presence of n-butanol.

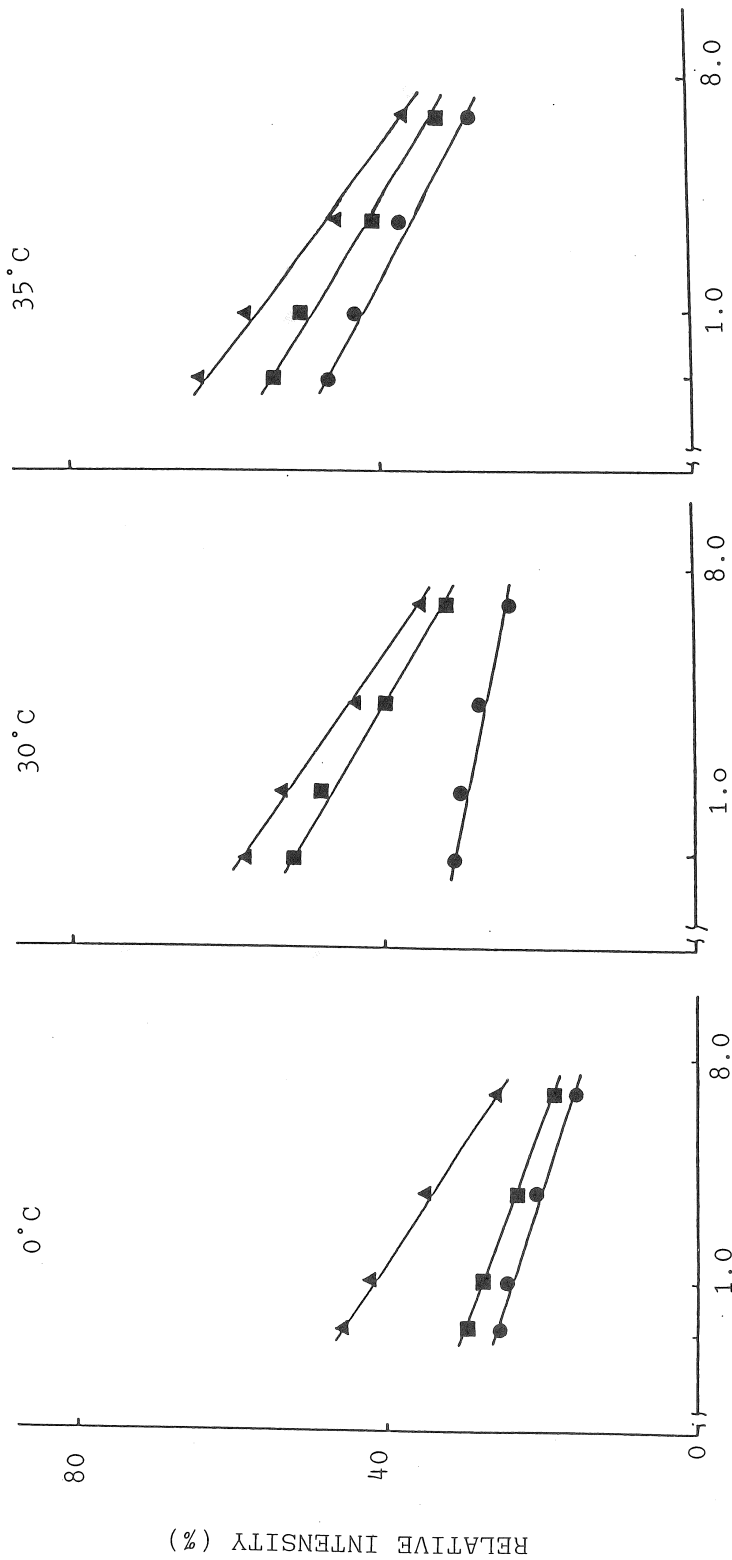


Fig.5 Effect of n-butanol on ANS-fluorescence intensity of oval filefish actomyosin. ●: Without n-butanol, ■: With 0.3 M n-butanol, ▲: With 0.6 M n-butanol. The fluorescence intensity of actomyosin by ANS was measured in the absence of n-butanol(●), or the presence of 0.3 M n-butanol(■), 0.6 M n-butanol(▲).

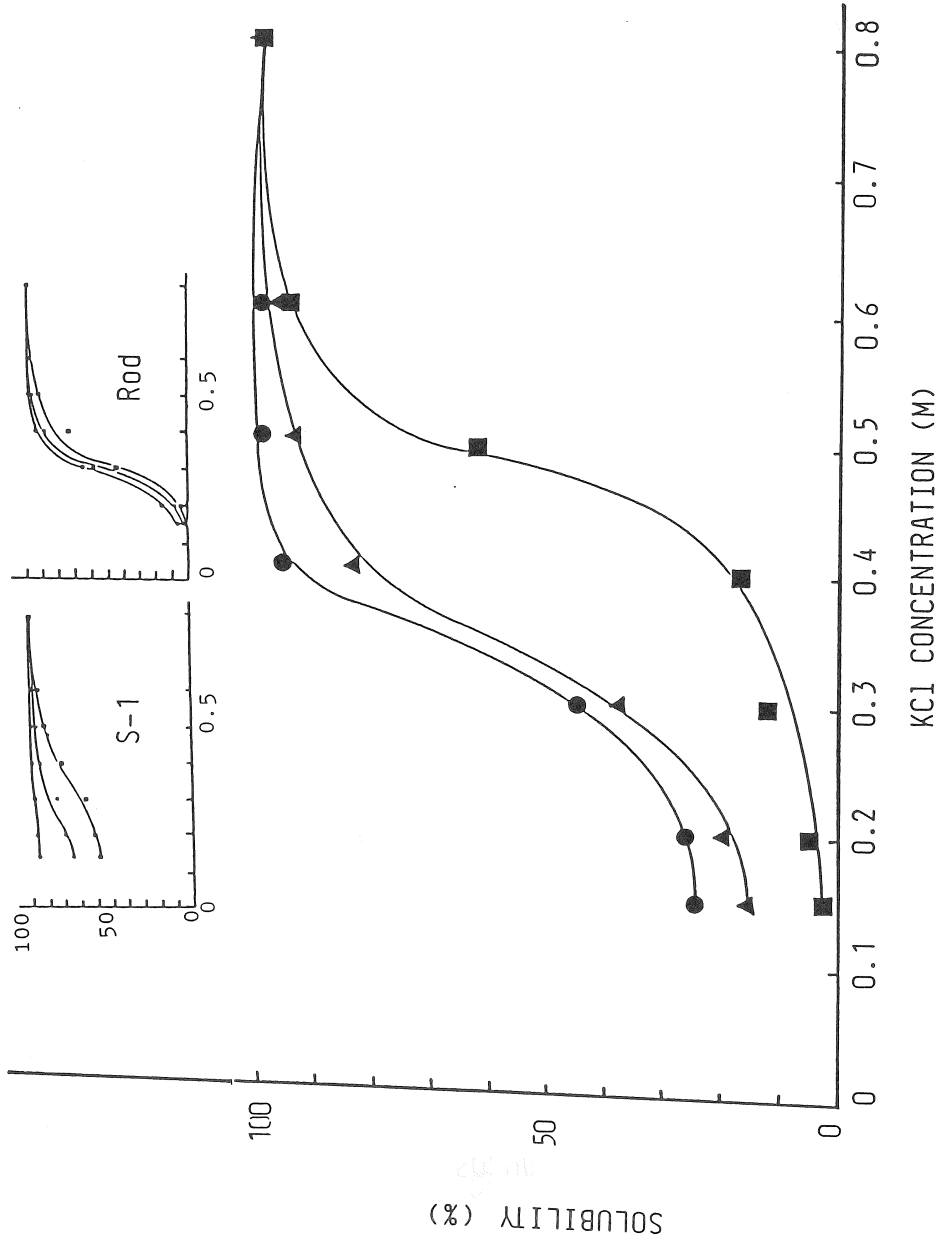


Fig.6 Effect of n-butanol on the solubility of black marlin muscle myosin. The solubility tests of myosin, (inset) S-1 and Rod were carried out at pH 6.5. ● : Without n-butanol, ▲ : With 0.3M n-butanol, ■ : With 0.6M n-butanol.

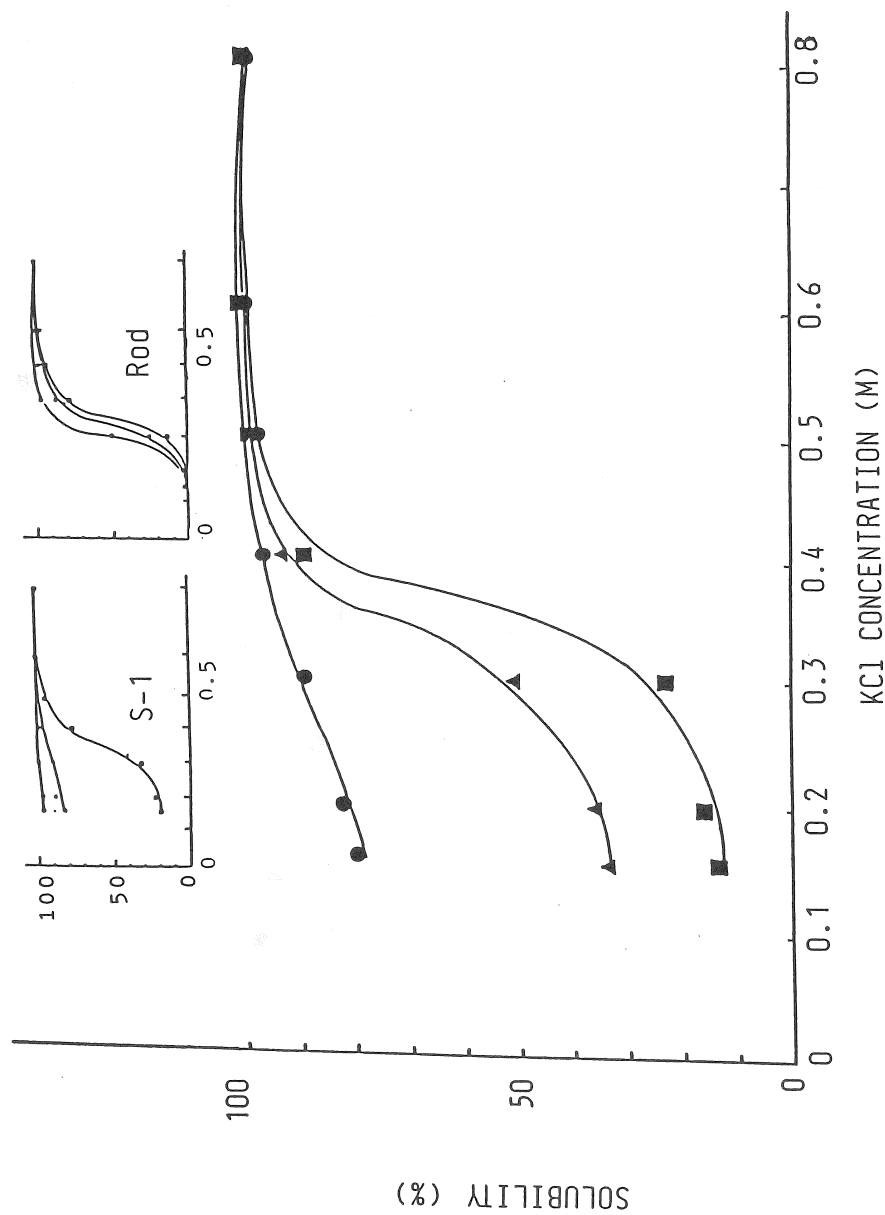


Fig.7 Effect of n-butanol on the solubility of tilapia muscle myosin.
 The solubility tests of myosin (insert) S-1 and Rod were carried out at pH 6.5.

●: Without n-butanol, ▲: With 0.3M n-butanol, ■: With 0.6M n-butanol.

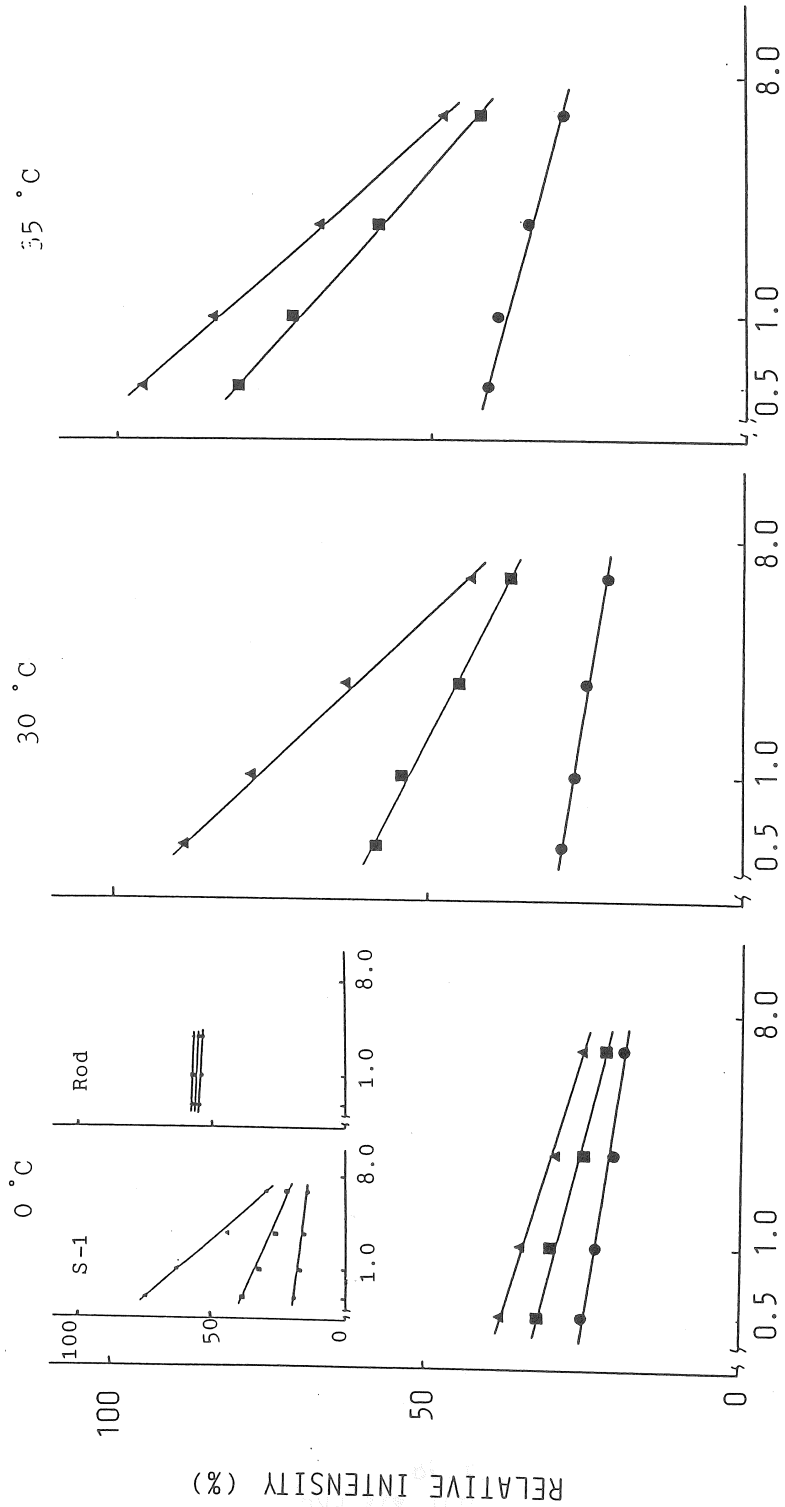


Fig.8 Effect of n-butanol on the changes of ANS-fluorescence intensity of black marlin myosin by heating.
 ● : Without n-butanol, ■ : With 0.3 M n-butanol, ▲ : With 0.6 M butanol.

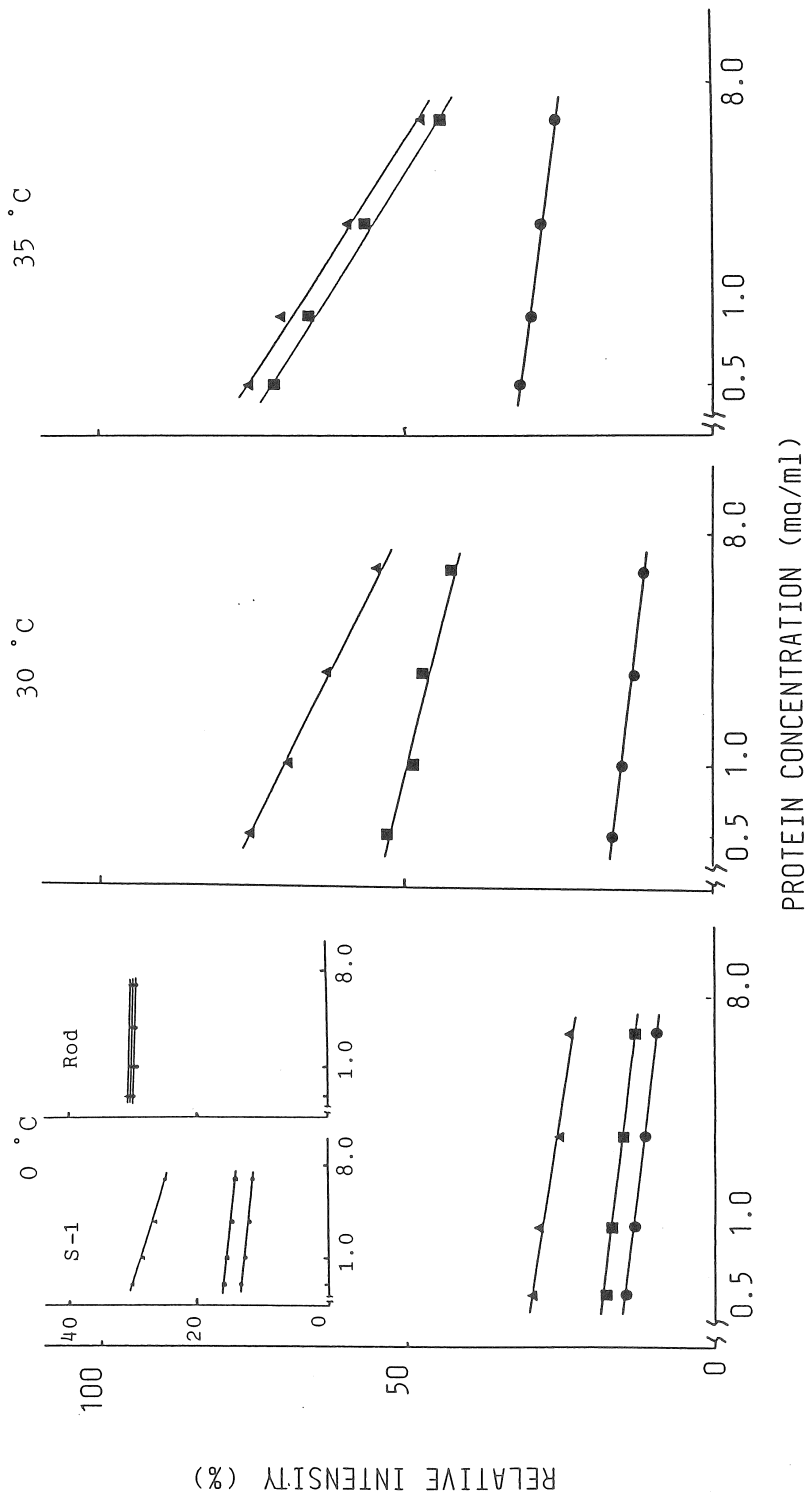


Fig.9 Effect of n-butanol on the changes of ANS-fluorescence intensity of tilapia myosin by heating.

● : Without n-butanol, ■ : With 0.3 M n-butanol, ▲ : With 0.6 M n-butanol.

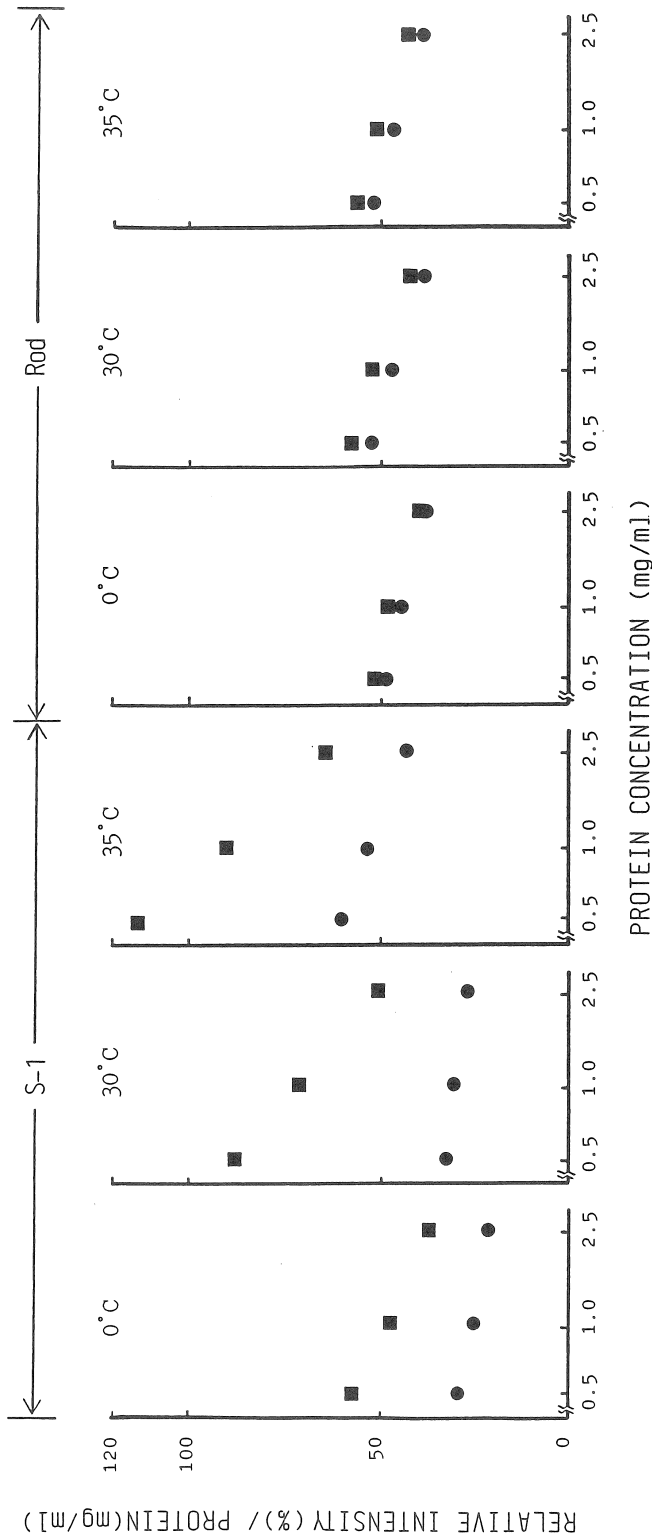


Fig.10 Effect of n-butanol on the changes of ANS-fluorescence intensity of black marlin S-1 and Rod by heating.

● : Without n-butanol, ■ : With 0.3 M n-butanol.

Studies on n-Butanol Denaturation of Fish Muscle Proteins and Their
Desalting-Aggregation

Takeshi Taguchi

(Tokyo University of Fisheries, 4-5-7 Konan, Minato-ku, Tokyo 108)

The denaturation of black marlin, oval filefish, and tilapia actomyosins, myosins, and fragments by n-butanol, and their desalting aggregation were examined in connection with thermal gel-formation. The thermal gel-formation of myofibrillar pastes and myosin sols was greatly enhanced by the addition of 0.3~0.8M n-butanol. When the pastes were ultrasonicated, the effect of added n-butanol on the gel-strength was heightened (data not shown). During ultrasonication, a rapid desalting from the paste occurred (data not shown). KCl concentration-solubility curves revealed that after n-butanol addition a marked decrease in the solubility was observed for oval filefish actomyosin, myosins, and subfragment-1s (S-1s), whereas there was a slight decrease for rods. The fluorescence intensity of myosins-ANS in the presence of n-butanol increased markedly by heating at 30° and 35° C. A similar increase in the fluorescence intensity occurred in all S-1s-ANS, but not in rods.