

塩水処理が甲殻類黒変現象に与える影響について

増田 太郎

摂南大学農学部応用生物科学科

概要 我が国は世界有数の漁業大国であるが、同時に年間 300 万トン前後の水産物を輸入する水産物輸入大国でもある。2019(令和元)年度の水産物の輸入量は、金額ベースで1兆 7,404 億円、重量ベースで 247 万トンとなっている。エビは輸入依存度が高く、金額ベースで全品目中三位、年間 1,700 億円程度のエビを海外より輸入している。エビ類は一般に冷凍品として輸入されるが、冷凍エビを解凍する際、急速に黒色のメラニンを生成し、その商品価値が著しく損なわれる。現在、黒変防止のために亜硫酸塩などの添加物が用いられているが、亜硫酸塩は人体にとってアレルゲンとなる上、副反応にて有害なホルムアルデヒドを生じることから、新たな黒変防止法の開発が求められている。本研究では、果実などの酵素的褐変防止に食塩が一般的に用いられることを踏まえ、食塩類が甲殻類黒変防止に効果を示すかについて最初に検討した。生鮮クルマエビを用いた検討の結果、塩化ナトリウム水溶液による処理では、濃度に関わらず黒変防止に対して大きな効果が認められなかった。

この凍結融解実験において、エビから染み出した体液を多量に含む融解液が著しく黒化していたため、体液中のフェノールオキシダーゼ活性の原因タンパク質について詳細な探索を行った。原因タンパク質の候補として、これまでフェノールオキシダーゼとその類縁タンパク質ヘモシアニンが挙げられている。フェノールオキシダーゼとヘモシアニンは、共に活性中心として二核銅中心を持つ「タイプ 3 銅タンパク質」に属する。フェノールオキシダーゼは、メラニン形成に寄与するが存在量が極めて少なく、ヘモシアニンは本来酵素活性を持たず酸素運搬タンパク質として機能するタンパク質で体液中の存在量が極めて多く、条件によって微弱なフェノールオキシダーゼ活性を持ち得ると考えられてきた。本研究では、申請者が最近見出した「体液性フェノールオキシダーゼ」とヘモシアニンの酵素活性について検討した。その結果、本実験条件ではヘモシアニンの酵素活性は認められず、クルマエビ黒変現象の原因酵素は体液性フェノールオキシダーゼであることが示唆された。両者は極めて構造的特徴が類似していることから、これまで互いに分離することが困難で活性の本体が誤認されてきたと考えられる。

1. 研究目的

甲殻類、特にエビ類は我が国の輸入水産物の中で極めて重要な位置を占めている。エビ類は一般に冷凍品として輸入されるが、冷凍エビを解凍する際、急速に黒色のメラニンを生成し、その商品価値が著しく損なわれる。現在、黒変防止のために亜硫酸塩などの添加物が用いられているが、亜硫酸塩は人体にとってアレルゲンとなる上、副反応にて有害なホルムアルデヒドを生じることから、新たな黒変防止法の開発が求められている⁽¹⁾。メラニン生成の

鍵酵素として、フェノールオキシダーゼ(以下 PO)が知られており、甲殻類においても本酵素に関する分子生物学的、酵素化学的な検討が加えられてきた。PO は、チロシンなどモノフェノール化合物の *o*-位へのヒドロキシル基導入による *o*-diphenol 化合物の生成と、それに続く *o*-quinone への酸化を触媒する(Fig. 1)。この反応を触媒する酵素は、細菌、真菌、哺乳類など甲殻類以外の生物では、チロシナーゼと呼ばれ、POと同様メラニン形成反応の律速段階を触媒することで、メラニン色素形成反応に寄

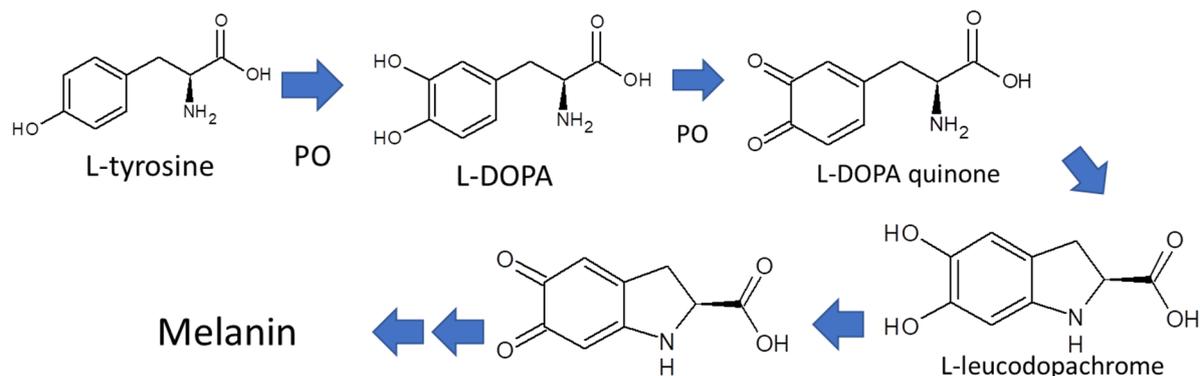


Fig. 1 A simplified reaction scheme of the melanin biosynthesis pathway from tyrosine to dopachrome

与している⁽²⁾。また、果実、野菜などの農産物でも酵素的褐変と呼ばれる変色反応が知られている。この反応は植物のポリフェノールオキシダーゼ (PPO) が植物中のポリフェノールを基質として、その酸化反応によりテアフラビン、テアルビジンなどの褐色色素を形成するものである⁽³⁾。これらの反応は、フェノール性水酸基を持つ化合物への水酸基付加、酸化反応であり、チロシナーゼ、PO、PPO とも、活性中心に二核銅を含む「タイプ 3 銅タンパク質」と呼ばれるタンパク質ファミリーに属する⁽²⁾。

甲殻類において従来から知られる PO は甲殻類血球細胞に局在するが、凍結融解に伴う黒変現象はエラ等を中心に全体で起こる。また、既知 PO は凍結融解に伴う失活が著しい。一方、PO と同じ「タイプ 3 銅タンパク質」ファミリーに属するタンパク質として、甲殻類には酸素運搬タンパク質ヘモシアニン (以下 Hc) が存在する⁽⁴⁾。Hc は甲殻類体液中に極めて高濃度で存在するが、通常は酵素活性を示さない。しかし、PO と Hc が同一タンパク質ファミリーに属する類縁タンパク質であることから、Hc が凍結融解など特定の変性条件で PO 活性を持ち得るとの報告が数多くなされている⁽⁵⁾など。

筆者らは、クルマエビから既知の PO とは大きく異なる新規フェノールオキシダーゼ (以下体液型 PO) を見出し、酵素の精製と遺伝子の単離を行った⁽⁶⁾。この酵素は、エビ肝臓で生合成される分泌タンパク質で、主として体液に分布し、従来型 PO と比較して高い比活性と凍結融解に対する安定性を有していた。この体液型 PO は、Hc と生合成・成熟過程と多量体形成能など挙動が非常に似ていることから、多量に存在する Hc と区別することが難しい。

本研究では、まず、果実などにおいて容易な褐変防止剤として用いられる食塩 (塩化ナトリウム水溶液) が、甲殻類における黒変防止剤として使用できるかについて検討した。更に、甲殻類黒変原因タンパク質にも注目し、体液型 PO と Hc の分離精製と黒変反応への寄与についても検証した。

2. 研究方法

2-1 塩化ナトリウム水溶液による黒変防止に関する検討

活けエビ (クルマエビ, *Marsupenaeus japonicus*) は、京都中央卸売市場で購入した。生鮮試料を氷上で 30 分静置した後、チャック付きビニール袋に移し、氷上にて蒸留水、0.15 M NaCl 水溶液、1.0 M NaCl 水溶液、2.0 M NaCl 水溶液、10 mM コウジ酸水溶液、10 mM アスコルビン酸ナトリウム水溶液に 30 分浸漬した。その後、 -30°C 冷凍庫にて 3 日間凍結し、室温で融解した。

2-2 エビ試料と体液の調製

体液の抽出は、注射針 21G を用いて行い、抽出後の体液は、凝固防止緩衝液 (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.45 M NaCl, 10 mM KCl, and 10 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)) と即座に混合し、氷上に保った。クルマエビ体液より血球細胞を取り除くため、 $500\times g$ にて 30 分間遠心分離を行い、得られた上清を続いて $10,000\times g$ で 15 分間遠心分離した^(5,6)。この上清試料を粗体液とした。粗体液からヘモシアニンを精製する方法は、定法に従った⁽⁵⁾など。簡潔には、体液画分を超遠心分離機により $200,000\times g$ で 3 時間遠心分離し、主としてヘモシアニンから成る沈殿を得た。この沈殿を再溶解し、Superdex200pg 16/60 カラム (GE Healthcare) を用いたゲルろ過クロマトグラフィーにより精製した。

より精製度の高い Hc を得るため、以下の精製も行った。まず、粗体液に 50%飽和となるように硫酸アンモニウムを加え、15,000×g で 20 分間遠心分離を行った。続いて、上清をブチルトヨパール樹脂(東ソー)による疎水性相互作用クロマトグラフィーにより精製し、高純度 Hc 試料とした。体液型 PO の精製は Masuda らの方法に従った⁶⁾。各精製段階のタンパク質濃度は、バイオラッドプロテインアッセイにより求めた。

2-3 SDS-PAGE とウェスタンブロットティング

各精製段階のタンパク質は定法に従い SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)とウェスタンブロットティングにより行った。ウェスタンブロットティングには、一次抗体として体液型 PO 特異的なウサギ抗血清⁶⁾を用い、二次抗体として西洋ワサビペルオキシダーゼ結合抗ウサギ IgG 抗体(Promega)を用いた。化学発光によるシグナルは、LiCOR 社の Odyssey Fc を用いて検出した。

2-4 酵素活性の測定

酵素活性は、Fig. 1 に示した di-PO 活性を指標とし、L-DOPA を基質としてドーパクロムの生成を 492 nm の経時吸光度変化により検出した。酵素反応時の基質-緩衝液は、以下の組成とした(10 mM Tris-HCl(pH 7.7), 0.15 M NaCl, 0.1% SDS, and 5 mM L-DOPA)。PO 比活性は、ドーパクロム生成の初速度(A492 min⁻¹ ml⁻¹)をタンパク質量 mg/ml)で除することにより求めた。酵素活性は、5 反復

の実験値を 1 セットとして評価し、統計処理には R (version 4.0.3) を用いた。

3. 研究結果

3-1 クルマエビ凍結融解時の黒変に対する塩水処理の影響

各処理区の凍結融解後の変化を Fig. 2 に示す。チロシナーゼ活性の阻害剤であるコウジ酸は、クルマエビ黒変減少の抑止にも効果が認められた。また、酸化防止剤であるアスコルビン酸ナトリウムも同様の効果が認められた一方、0.15 M 塩化ナトリウム水溶液による処理では蒸留水処理区と比較して黒変防止効果が認められなかった。塩化ナトリウム濃度を高濃度にした場合も同様の結果であった(データ示さず)。この凍結融解実験において、エビから染み出した体液を多量に含む融解液が著しく黒化していたため、体液中のフェノールオキシダーゼ活性の原因タンパク質について詳細な探索を行った。

3-2 Hc と体液型 PO の精製

クルマエビ体液における PO 活性の本体を明らかにするため、Hc と体液型 PO の精製を行った。クルマエビ粗体液 Hc に PO 活性を認めた研究例で共通して採用されてきた精製法である超遠心分離とゲルろ過クロマトグラフィーを組み合わせた方法と、硫酸アンモニウムによる塩析と疎水カラムクロマトグラフィーを組み合わせた方法により精製した試料の各段階の SDS-PAGE, CBB 染色の結果を Fig. 3A に示す。

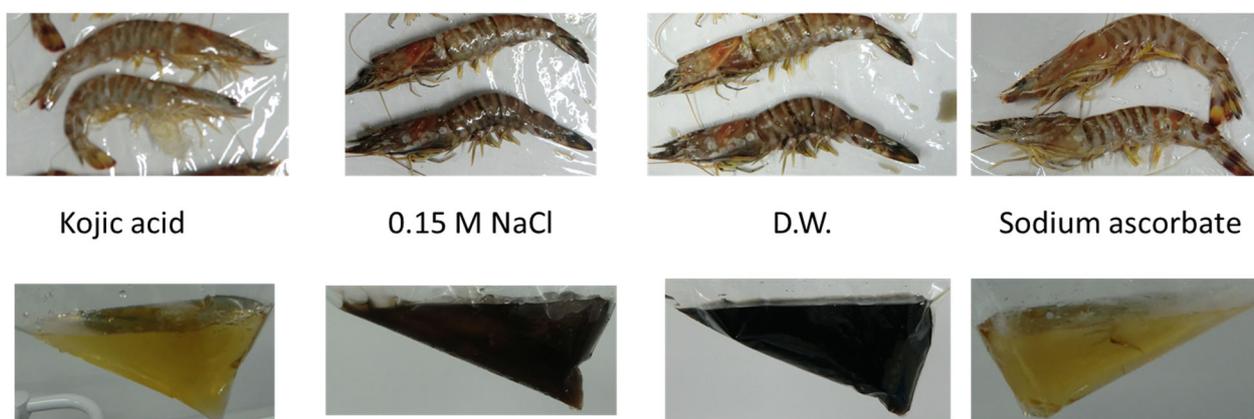


Fig. 2 Images of shrimps (upper) and generated drip (lower) after freeze and thaw process in the presence of various chemicals.

Hc は極端に存在量が多いタンパク質であり、SDS-PAGE 後の CBB 染色では粗体液においても純度が高く、各精製段階の試料と比較して大きな差は認められない。しかし、体液型 PO に対する抗体を用いたウェスタンブロットリングでは、定法で精製した Hc には体液型 PO の混入が認められた (Fig. 3B)。他方、硫酸分画と疎水性相互作用クロマトグラフィーを組み合わせた方法で精製した Hc 試料には体液型 PO の混入が見られなかった (Fig. 3B, lane 4 and 5)。

3-3 各精製段階の PO 活性

各精製段階試料の PO 比活性を Fig. 4 に示す。定法による Hc の精製では、粗体液 (Crude)、超遠心分離沈殿 (UCF)、超遠心分離後ゲルろ過 (UCF_SEC) の全てにおいて、PO 活性が確認された (Fig. 4A)。一方、硫酸分画と疎水性相互作用クロマトグラフィーで分離精製した試料からは、PO 活性が検出されなかった (Fig. 4B, 50%S, Butyl)。

3-4 ゲル濾過クロマトグラフィーの分離能

定法を用いた場合、精製試料に体液型 PO が混入することが結果 3-2 より明らかになった。定法の最終精製段階で用いるゲル濾過クロマトグラフィーの分離能を調べるため、Hc と体液型 PO の精製試料を同じ条件でゲル濾過クロマトグラフィーに供し、その溶出時間を比較した (Fig. 5)。Fig. 5 の実線が Hc、点線が体液型 PO の溶出プロファイルを示すが、両者のピーク時間は異なるものの、溶出時間が類似しておりこの方法で両者を完全に分離するのは困難であることが示唆された。

4. 考察

酵素的褐変反応は野菜、果実などでも幅広く観察される現象である⁽³⁾。茶葉の熟成などはこの反応を利用したものであるが、果実、野菜、ジュースなどで意図せず起こる褐変はエビの黒変反応と同様、好ましからぬ反応と捉えられる。植物の褐変原因タンパク質はポリフェノールオキシダーゼ (PPO) である⁽³⁾。PPO も本報告の主題である PO と類似した二核銅を持つ活性中心を有している。塩水による植物 PPO の活性阻害については、(1) 塩化物イオンが PPO 活性阻害部位へ結合、(2) 特に酸性 pH において、本来 PPO のヒスチジン側鎖 (以下、His) と活性中心の銅原子の間で形成されている配位結合に対して、塩化物イオンが競合、することが原因であると考察されている⁽⁷⁾。本研

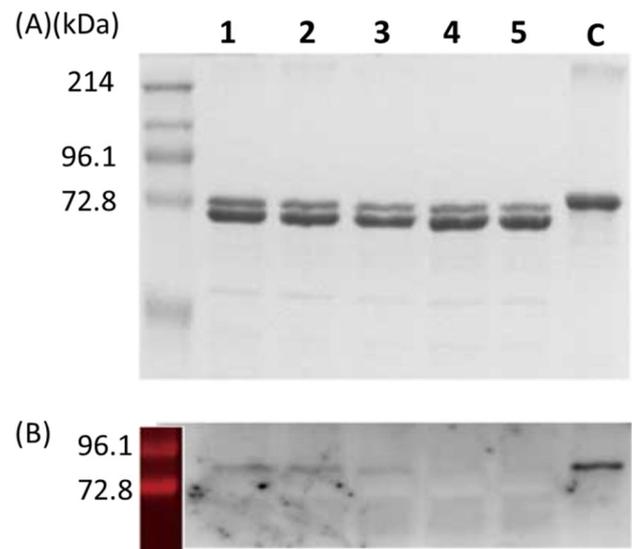


Fig. 3

(A) Purity of Hc in each purification stage and purified hemolymph-type PO.

Each sample was separated on a 10% SDS polyacrylamide gel followed by CBB staining. 10 mg of protein was loaded on each lane. Lane 1, Hemolymph supernatant of kuruma prawn; lane 2, after ultracentrifugation; lane 3, SEC separation after UCF precipitation; lane 4, supernatant of 50%-saturated ammonium sulfate; lane 5, after subsequent purification with hydrophobic chromatography; lane C, purified hemolymph-type PO from kuruma prawn.

(B) Western blot analysis of each preparation in (A). After SDS-PAGE separation with 10% gel, the proteins were electroblotted onto a PVDF membrane. Proteins on the membrane were probed with anti-hemolymph-type PO antiserum.

究では、塩化ナトリウム水溶液による甲殻類黒変現象の阻害は認められなかった。本研究の対象である甲殻類 PO は、植物 PPO と一次構造の相同性はほとんど認められないものの、両者は同様の活性中心を有している。しかし、甲殻類 PO において、調節部位の存在は確認されていない。また、活性中心の His-Cu 配位結合は、筆者らの研究で詳細な構造を明らかにしているが、酸性 pH で塩化物イオン濃度が高い状態においても安定に保持されている^(8, 9)。したがって、活性中心の His-Cu 配位結合を塩化物イオンが競合的に破壊するか否かについては、さらなる検証が必要と考えられる。

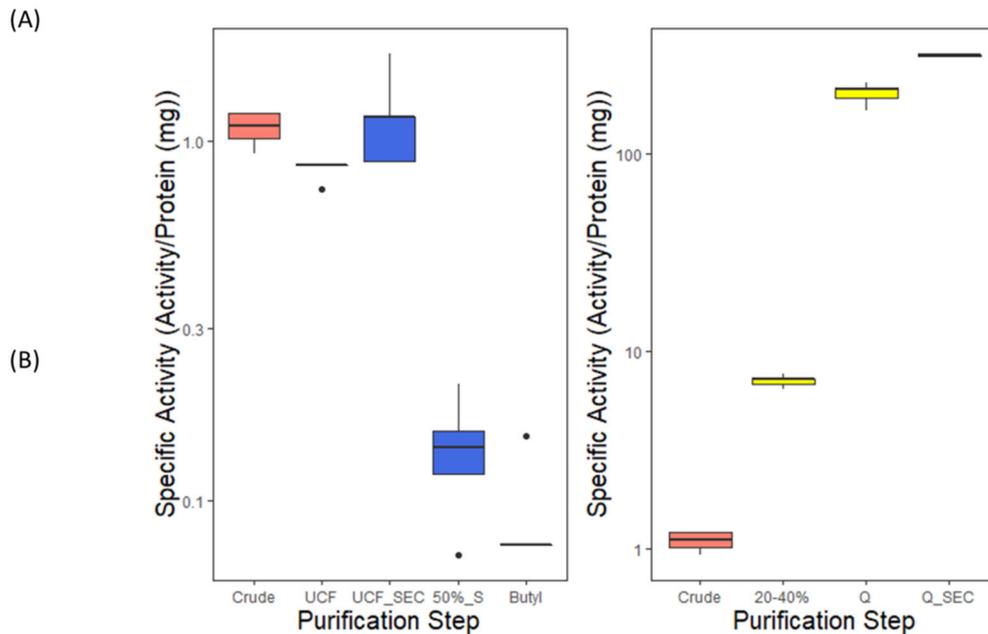


Fig. 4

Transition of specific PO activity of Hc (A) and hemolymph-type PO (B) during the purification.

The PO activity was calculated from the changes in absorbance at 492 nm in the first 1 min ($A_{492} \text{ min}^{-1} \text{ ml}^{-1}$). Specific activity indicates activity per mg protein. The lower (Q1) and upper (Q3) quartiles represent observations outside the 9–91 percentile range. The diagram also shows the median shown in bold for the specific PO activity ($n=5$). Data falling outside the Q1–Q3 range are plotted as outliers of the data (black spot).

クルマエビ体液中のPO活性本体について、これまで一般に採用されてきたHcの精製方法では体液型POの混入が避けられないことが示唆された。これは、両者の単量体の分子量が類似している(Hc 約75 kD, 体液型PO 約78 kDa)だけでなく、実際に甲殻類体液中で存在する会合状態も共に6量体であることから、分子量と会合状態の差異による分離法である超遠心分離とゲルろ過クロマトグラフィーでは両者が分離できないためと考えられる^(8,9)。

甲殻類Hcが賦活化されてPO活性を持ち得るかを明らかにするためには、純粋なHcを調製する必要があるが、これまでに用いられてきた定法はこの要件を満たしていない。筆者らが明らかにしてきた甲殻類HcとPOの立体構造解析から、両者は極めて類似した活性中心を有していることが確認されている^(8,9)。また、甲殻類においても、Hcを高純度に調製した系でHcのPO活性化が認められている^(10, 11)。したがって、Hcが凍結融解など食品流通時の特定条件においてPO賦活化される可能性は十分あると考えられ、Hcの黒変現象への寄与の有無は体液型POを含まない純粋な試料を用いて個別にかつ詳細に検証される

必要がある。本研究で示した簡便且つ効果の高い精製法など、両者の分離が可能な方法で引き続き詳細な検討が行われることが望まれる。

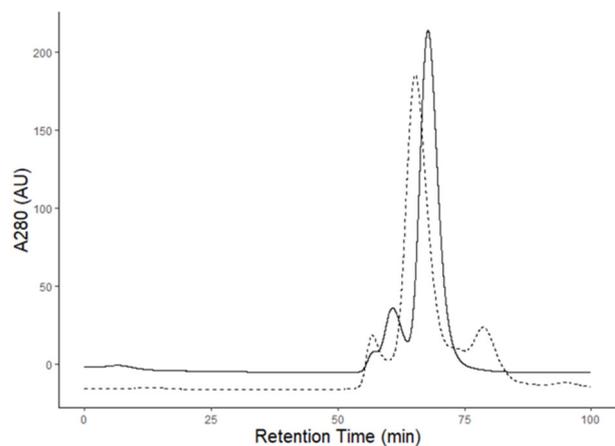


Fig. 5

The elution profiles of Hc (solid line) and hemolymph-type PO (dashed line).

The absorbance at 280 nm was measured to be an arbitrary unit (A.U.) using a UV detector immediately after elution from the SEC column. For direct comparison of their elution times, the protein concentrations were adjusted before separation.

5. 今後の課題

甲殻類黒変現象に対し、本研究の条件では塩水処理は効果を示さなかった。しかし、植物 PPO と甲殻類 PO は活性部位の構造に着目すると共通点も多い。今後さらに詳細な条件で、塩水処理、pH 条件などによる甲殻類黒変現象の阻害可否について検討する必要がある。

また、Hc は甲殻類体液中の全タンパク質の圧倒的な部分を占めるため、僅かな PO 賦活化であっても全体の黒変現象への寄与は大きくなる。人体への悪影響の少ない黒変防止法の開発には、活性の本体を明らかにすることが不可欠である。通常の凍結融解においては体液型 PO が体液中の主たる PO 活性源となるが、特定条件における Hc の活性化の有無は今後も詳細に検証される必要がある。

6. 文献

- (1) 山中 英明, 菊池 武昭, 天野 慶之(1977) 亜硫酸塩処理エビ中の二酸化イオウ残存とホルムアルデヒド生成に関する研究, 日本水産学会誌 43(1) p. 115-120
- (2) Solomon, E. I., Sundaram, U. M., & Machonkin, T. E. (1996) Multicopper Oxidases and Oxygenases. *Chem Rev*, 96(7), p. 2563–2606.
- (3) 村田 容常 (2007) 酵素的褐変とその制御, 化学と生物 45(6) p. 403-410
- (4) Markl J.(2013) Evolution of molluscan hemocyanin structures. *Biochim Biophys Acta*. 20131834(9):1840-1852.
- (5) Adachi, K., Hirata, T., Nagai, K., & Sakaguchi, M. (2001) Hemocyanin a most likely inducer of black spots in kuruma prawn *Penaeus japonicus* during storage. *Journal of Food Science*, 66(8), 1130–1136
- (6) Masuda, T., Otomo, R., Kuyama, H., Momoji, K., Tonomoto, M., Sakai, S., Nishimura, O., Sugawara, T., & Hirata, T. (2012) A novel type of prophenoloxidase

from the kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus* contributes to the melanization of plasma in crustaceans. *Fish & Shellfish Immunology*, 32(1), 61–68.

- (7) Giselle Grace Fernando Lim, Yuki Imura & Etsuro Yoshimura (2012) Substrate Inhibition Competes with Halide Inhibition in Polyphenol Oxidase. *The Protein Journal*, 31, 609–614
- (8) Masuda, T., Momoji, K., Hirata, T., & Mikami, B. (2014) The crystal structure of a crustacean prophenoloxidase provides a clue to understanding the functionality of the type-3 copper proteins. *FEBS Journal* 281(11), 2659–2673.
- (9) Masuda, T., Baba, S., Matsuo, K., Ito, S., & Mikami, B. (2020) The high-resolution crystal structure of lobster hemocyanin shows its enzymatic capability as a phenoloxidase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 688.
- (10) Zlateva, T., Di Muro, P., Salvato, B., & Beltramini, M. (1996) The o-diphenol oxidase activity of arthropod hemocyanin. *FEBS Lett*, 384(3), 251–254.
- (11) Fujieda, N, Yakiyama, A., & Itoh, S. (2010) Catalytic oxygenation of phenols by arthropod hemocyanin, an oxygen carrier protein, from *Portunus trituberculatus*. *Dalton Trans*, 39(12), 3083–3092.

7. 謝辞

本研究は、公益財団法人ソルト・サイエンス研究財団 2020 年度研究助成により実施いたしました。研究を進めるにあたり、多大なご支援を賜りましたことに厚く御礼申し上げます。

Effect of Salt-Water Treatment on Black-Spot Formation of Shrimp

Taro Masuda

Division of Applied Biological Science, Faculty of Agriculture,
Setsunan University

Summary

Melanization in crustaceans is a critical problem in the preservation and processing of shrimp and crabs. It causes the deterioration of food value by forming black spots on the body after harvest and food distribution. Generally, melanization in crustacean is mainly caused by the oxidation reaction by phenoloxidase (PO). Crustacean PO is classified as type 3 copper proteins. PO catalyzes the oxidation of mono- and di-phenol compounds, which is the rate-limiting step of melanization. Similarly, food browning is also a crucial problem on food preservation of vegetables and fruits. The reaction is catalyzed by polyphenoloxidase (PPO) that is also copper-containing protein of which catalytic center has similar structure to that of crustacean PO. To prevent the browning on a section of fruit, salt water treatment is generally used. In this study, the author attempted to prevent melanization of crustacean by pre-treating shrimps with various concentrations of salt-water. However, the treatment was not effective on prevention of melanization in freeze-thaw process of shrimp.

The melanization was especially severe in drip from the thawed shrimp. Thus, the author investigated the main source of PO activity in hemolymph of the shrimp. In hemolymph of crustacean, there is an abundant protein hemocyanin (Hc) that generally functions as a dioxygen-transporting protein. To date, many studies have shown PO activity in Hc. Hence, the author re-examined the source of PO activity in hemolymph by focusing on the purification method of Hc and hemolymph-type PO. The conventional procedure for the preparation of arthropod Hc, which includes precipitation of Hc by ultracentrifugation and subsequent purification by size exclusion chromatography, was not able to remove hemolymph-type PO from Hc, completely. In contrast, fractionation with 50% saturation of ammonium sulfate and subsequent hydrophobic chromatography yielded sufficiently pure Hc, which contained no detectable PO. The Hc preparation without PO had no detectable PO enzymatic activity under the experimental conditions employed in this study. These results indicate that the main source of PO activity in the hemolymph of kuruma prawn is hemolymph-type PO and that the conventional purification method of Hc is insufficient for evaluating the PO activity of Hc..