

魚肉たん白質の性状に関する研究 I.

誌名	日本水産學會誌
ISSN	00215392
著者	丹羽, 栄二 三宅, 正人
巻/号	37巻9号
掲載ページ	p. 877-883
発行年月	1971年9月

魚肉たん白質の性状に関する研究—I.

坐りにおけるたん白質の主鎖の動向

丹羽 栄二・三宅 正人

(1971年3月9日受理)

Physico-chemical Behavior of Fish Meat Proteins—I.

Behavior of Polypeptide Chains of Proteins during
Setting of Fish Meat Paste

Eiji NIWA and Masato MIYAKE*

The purpose of this series of our studies is to clarify the mechanisms of the setting (Suwari) and deterioration (Modori) phenomena, which take place in the course of processing of "Kamaboko".

The present paper deals with changes in the conformation of fish meat protein on setting which is induced by heat treatment of viscous fish meat containing sodium chloride at relatively low temperature (for example 38°).

Physico-chemical constants, *i. e.* X-ray diffraction pattern, infrared spectrum and optical rotation dispersion curve were measured, obtaining the following results.

- 1) It was found that the protein related to the setting was actomyosin.
- 2) No changes in the conformation of polypeptide were observed in either raw meat or ground meat.
- 3) A small disorder in the arrangement of protein molecules was detected, when meat was ground with sodium chloride, though α -helical structure was retained.
- 4) A part of the α -structure of polypeptide was transformed into a random coiled one at the advanced stage of setting.

魚肉の塩すり身の坐りの機構については、現在までいろいろな角度から検討されている¹⁻¹⁰。それらの総合結果によると、魚肉たん白質の中で主要な役割をなすアクトミオシンのイオン性基間の塩結合による一種の立体的網状構造の形成が坐りであると推論される。

このことは著者らの一人、三宅⁹⁾が近年電子顕微鏡により塩すり身の坐つたゲルを観察し、坐つたゲルは坐らないものに較べて微細な網状構造が多く認められ、そしてこの構造は、かまぼこの足の形成のための加熱の後でも、保持されることを見出したことによつて証明されたが、微細な網状構造の生成の機構は未だに判明していない。

たん白質の研究に対する機器分析法の寄与は近年目覚しく、たん白質の示すいろいろの多様性変化も分子のレベルで解明されつつあり、また同時に数多くのたん白質、酵素がその高次構造に至るまで解明されている。

本研究は魚肉の塩すり身の坐りの現象を、主として X 線回折、赤外線吸収 (以下 IR と略記) スペクトルおよび旋光分散 (以下 ORD と略記) などの機器分析法によつて検討し、坐りの過程におけるたん白質の主鎖の動向について興味ある結果を見出したので報告する。

* 三重県立大学水産学部 (Fac. of Fisheries, Pref. Univ. of Mie, Tsu. Japan)

実験方法

試料 伊勢湾産の新鮮なマアジ *Trachurus japonicus* を津市内で購入して実験に供した。

魚体から骨、皮および血合肉を除いて精肉を採り、よく水晒しした後脱水したものをミンチにかけ、適量の蒸溜水を加えて 10 分間、空ざりし、ついで生肉に対して 3% 量の塩化ナトリウムを加え、塩ざりを 15 分間行なつた。塩ざり身を径 3cm のクレハロンチューブに詰めて 38°C のふ卵器の中で坐らせた。

X線回折測定 理学電機デフラクトメーター D-3F により測定した。測定条件は次の通りである。

- 1) X線管球; フィリップス密閉式管球, 対陰極; 銅, 波長; $\text{Cu-K}\alpha$ (1.54050Å), 管球電圧; 30 KV, 管球電流; 20 mA
- 2) スリット: ソーラー・スリット; 4.9°, ダイバーゼンス・スリット; 1°, スキャッター・スリット; 1°, (ニッケルフィルター 0.02 mm), レシービング・スリット 0.1 mm
- 3) 検知器: テン軟X線計数管 (GM-134)
- 4) 記録計: 理学電機電子管自動平衡型, 計数管走査速度; 2°/min, 時定数; 2 sec, 記録紙走査速度; 5 mm/min, フルスケール; 400 c.p.s.

試料は付属のアルミニウム製の試料保持板 (35×50 mm²) の中央にある試料孔 (8×13 mm²) にはめこんだ。すなわちゾル状の試料はアルミニウム板をガラス板の上に重ねて孔に試料を押しつけて付着したものを、またゲル状の試料ではかみそりの刃で試料を厚さ 2 mm 位に切りとり、孔にはめこんだものを、それぞれゴニオメーター中央部の試料保持台上に常法通りセットし、測定した。

IR スペクトル: よく除湿された室内で試料約 2 mg を沓紙ではさみ、水分をぬぐいとり、これをあらかじめ冷却したメノウ乳針ですりつぶし (この操作の間にほとんどの水分は揮散する)。これに 200 mg の臭化カリウムを加え、さらにすりつぶす。これを錠剤成型器で錠剤として、ただちに日本分光 IR-S スペクトロフォトメーターにより常法通り測定した。

ORD 測定 溶液を 1 cm セルに入れ日本分光自記旋光分散計 ORD/UV-5 を用いて常法通り測定した。

実験結果および考察

空ざり身および塩ざり身のX線回折図

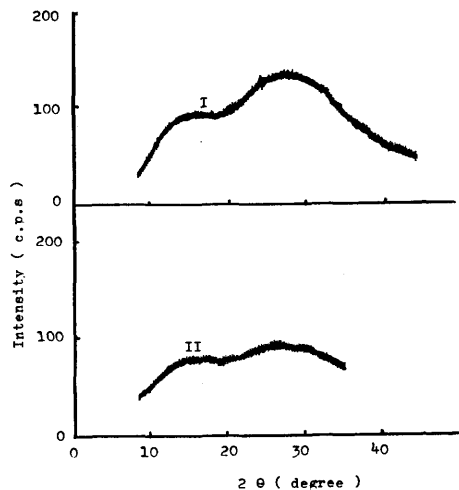


Fig. 1. X-ray diffraction pattern of fish meat ground for 10 min (I) and of the viscous paste ground successively with NaCl for 15 min (II).

生肉に対し 15% の蒸溜水を加えて得た空ざり身、およびこれに 3% 量の塩化ナトリウムを加えて得た塩ざり身について、 $2\theta = 5^\circ$ から 45° (ただし θ は回折角) まで測定した回折図を Fig. 1 に示した。空ざり身は $2\theta = 13 \sim 16^\circ$ および 28.5° 付近に極大値をもち、それぞれ面間隔 $6.80 \sim 5.53\text{Å}$ および 3.13Å に相当し、前者は α -ヘリックスの 1 ピッチの長さ (ほぼ 5.6Å) に、また後者はペプチド中の i 番目のアミノ酸のアミド結合中のイミノ基と $i+3.6$ 番目のアミド結合中のカルボニル基との水素結合の距離 (ほぼ 3Å) に一致する¹¹⁾。

塩ざり身では X線回折強度は空ざり身に比べて減少しており、たん白質の配列、すなわち三次構造以上の高次構造がいちじるしく乱れたか、あるいは二次構造自体が崩壊したことを意味する。

坐りのゲルのX線回折図 Fig. 2 に塩ざり身を 38°C に放置し、経時的に X線回折を測定した結果を示した。これにより明らかなように、塩ざり身は坐らせることにより X線回折強度が増加し、約 30 分

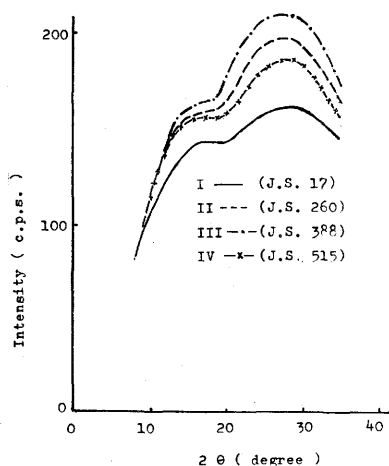


Fig. 2. Variations in X-ray diffraction patterns and jelly strength of fish meat pastes which were obtained by grinding meat of jack mackerel with NaCl (I), and incubating for 15 min (II), 30 min (III) and 60 min (IV) at 38°C.

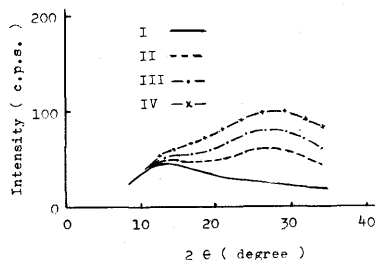


Fig. 3. Variations in X-ray diffraction patterns of fish meat pastes which were obtained by grinding meat of jack mackerel with NaCl and sucrose (I), and incubating for 60 min (II), 120 min (III) and 240 min (IV) at 38°C.

れるが), ついで坐らせることによつて α -ヘリックスが再生されるということである。

これに類似したことは多糖類のゾル-ゲル転移にも見られる。たとえば海藻 *Eucheuma spinosum* から抽出される κ および ι -カラゲナンは溶液状態ではランダム・コイルとして存在するが, これを加熱すればゲル状になる。この時, ランダム・コイルは二重のヘリックスに転移することが最近 X線回折法により証明された¹³⁾。一方, あるたん白質については濃厚塩類の存在下では α -ヘリックスが変形すること, またあるたん白質については, 尿素変性の際, 低温よりもむしろ, 比較的高い温度でヘリックスが安定であることなどが, 知られているので¹⁴⁾, この可能性は妥当性を持つと考えられる。

第二の可能性は, 空ずりの状態ではたん白質分子相互の配列の方向性はそのまま保持されているが, 塩ずりによつて α -ヘリックスは保持されたまま, 方向性だけが乱れ, これが坐りによるゲル化とともに, ふたたび以前と同様に規則正しく配列することであつて, 三次構造以上の高次構造の変化に基づく考え方である。

この現象は電子顕微鏡によつて, 空ずりだけでは筋原繊維ははぐされないので, ミオフィラメントの方向性

後に最大となり, それより以後では減少する。しかし, 回折強度は最大に達した時においても, もとの空ずり身の強度よりは低い。

なお 38°C で坐せさせた場合の, 同試料について坐りのゲル強度の経時的变化を簡易プランジャー法¹²⁾で測定した結果を Fig. 2 に併記した。

加糖塩ずり身の坐りにおける X線回折図 生肉に対して 10% 程度のしよ糖を添加した塩ずり身は 0~40°C の中間温度に放置しても, 坐りにくいことが知られている¹⁰⁾。したがつて, 加糖塩ずり身の X線回折図に変化が生ずると考えられるので, これについて検討した。生肉に対し 15% 量の蒸溜水, 3% 量の塩化ナトリウムおよび 10% のしよ糖を添加して塩ずり身を作り, 38°C に放置して経時的に, その X線回折図を得た。

Fig. 3 にそれらの結果を示したが, これにより明らかのように, 加糖塩ずり身では, 無糖のもの (Fig. 1) にくらべて, X線回折強度は全体に低下し, また, これを中間温度におくと無糖のものでは最初, 急速に増加するが (Fig. 2), 加糖のものでは増加の程度は緩慢であり, 回折強度が最大に達する時間が遅延されることが明らかとなり, 坐りに達する抑制作用が認められる。

アクトミオシンの ORD 曲線 X線回折はたん白質分子の結晶状態, すなわち分子構造の規則性の程度をあらわすものであり, Fig. 1~5 に示した結果について考察した場合, 魚肉の塩ずり身の坐りの機構について, 二つの可能性を考えることができる。

その一つは, 魚肉たん白質分子は空ずりの場合は α -ヘリックスはそのまま保持されているが, 塩ずりによつて α -ヘリックスのトランスコンフォメーションが起り (おそらくランダム・コイル化と思わ

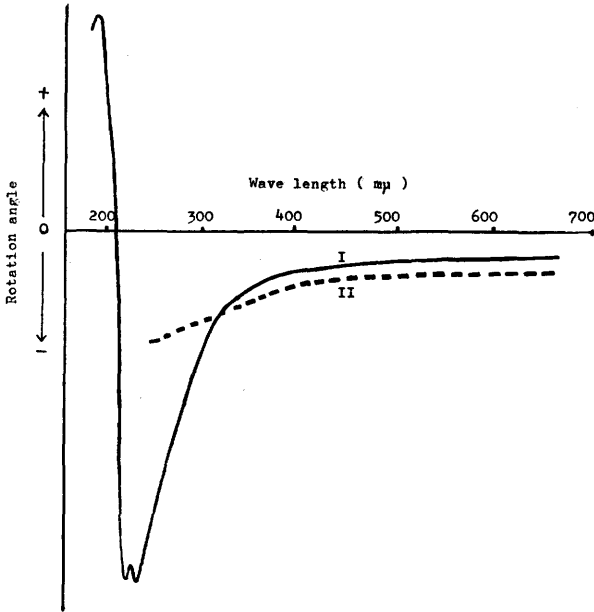


Fig. 4. ORD-Curves of actomyosin (I) and denatured actomyosin (II) in 3% NaCl solutions. Actomyosin (I) was obtained from meat of flat fish by the method of Arai *et al.*¹⁶⁾ and the latter (II) was obtained by incubating the former solution for 30 min at 38°C.

リックスとしての代表的な負の複合コットン効果曲線を示す。

これに対して、38°Cに30分間放置したアクトミオシン溶液ではD線にあたる589 m μ 近傍では前者にくらべて左旋性を増し、逆に230 m μ 近傍では右旋性を増し、全体として230 m μ 以上の波長では負の単分散曲線を示すことから、ランダム・コイルに転移していることがわかる^{11,14)}。

したがって、ミオシンの α -ヘリックスは3%塩化ナトリウム溶液中ではトランスコンフォーメーションは起さないが、中間温度に放置することによって、始めてこれが起ることが明らかとなった。もちろん、たん白質分子の挙動はその濃度によっても異なるが、塩ずり身中ではミオシンあるいはアクトミオシンの α -ヘリックスはそのまま保持されていることがこの実験によつて確められ、また中間温度に放置した場合、会合して沈澱する部分もあるが、沈澱しないで溶解もしくは懸濁している部分についてはランダム・コイルに転移しており、すり身の中でも α -ヘリックスのランダム・コイルへの転移はあるにせよ、その逆のランダムコイルから α -ヘリックスへの転移の可能性はまったくないと言える。

この結果から上にあげた二つの仮定のうち、第二の可能性が正しいことが明らかとなった。

塩ずり身中の水分量がX線回折図におよぼす影響 生肉に対して水分添加量をより多くした場合は、たん白質分子相互の間隔が大きくなり、分子の配向性がそれにしたがつて失なわれると考えられる。そして水分量がある臨界量をこえたような場合は、分子間相互の会合あるいは干渉といった現象はほとんど失われ、このような状態でX線回折図を検討した場合、回折図の挙動はたん白質の分子間相互ではなくて、むしろ分子内の要因に基づくものと思われる。このことについて検討するため、種々の水分量を添加して調製した塩ずり身と、それらのおのおのを坐らせたものについてX線回折を測定し、その結果をTable 1に示した。

これにより明らかなように、水の添加量が生肉に対して30%をこえると、塩ずり身を38°Cに放置しても

も保たれているが、塩ずりによつてミオフィラメントは筋原繊維から脱離し、分散の程度が増加して方向性を失うことが観察されているので¹⁵⁾、塩ずりによつて回折強度が低下することは、十分考えられることである。

坐りの機構については、以上述べた二つの可能性のうち、いずれか一方でなければならぬが、これについて決定するため、魚肉たん白質の主要成分であるアクトミオシンの3%塩化ナトリウム溶液のORDおよびこの溶液を38°Cに30分間加熱一すなわち坐りと同様の状態においたと仮定一した後、12000 r.p.m. 20分間遠心分離を行ない、生じた沈澱を除いた上澄液のORDをそれぞれ測定した。なおアクトミオシンは新井¹⁶⁾らの方法に準じて、活イシガレイ (*Kareius bicoloratus*) から調製した。

Fig. 4にそれぞれのORD曲線を示したが、これより明らかなように、アクトミオシン溶液のORD曲線は236 m μ および220 m μ に負の極小値を、195 m μ に正の極大値を持ち、全体として α -ヘ

Table 1. Variations in intensity of X-ray diffraction at $2\theta=28.5^\circ$ of fish meat pastes which were obtained by grinding meat of jack mackerel with NaCl and various amount of water.

Water /Meat (%)	Intensity of diffracton at $2\theta=28.5^\circ$ of fish meat paste before incubation (A) (c.p.s.)	Intensity of diffracton at $2\theta=28.5^\circ$ of fish meat paste after incubation for 30 min at 38°C (B) (c.p.s.)	B/A
0	91	112	1.23
10	76	108	1.42
20	74	92	1.24
30	70	74	1.06
40	66	64	0.97
50	63	35	0.56
60	53	28	0.53

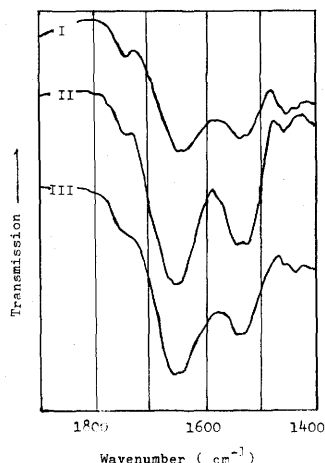


Fig. 5. IR-Spectra of ground fish meat (jack mackerel) (I), the meat paste ground with NaCl (II), and the meat paste incubated at 38°C for 30 min (III).

坐りに関与するたん白質 今までの実験では ORD の測定を除いて試料としてマアジ精肉の水晒したものを使用して検討して来たが、魚肉たん白質中にはミオシン区たん白質の他、コラーゲン、エラスチンなども含まれており、これらについて、それぞれ分画した上で、坐りに関与するたん白質を検討する必要がある。

このために、活イシガレイから Fig. 6 にしたがってミオシン区 (アクトミオシン), 0.1N 水酸化ナトリウム可溶区 (水溶性たん白質およびミオシン区たん白質の変性したと考えられる区分), およびそれらに不溶性たん白質区分 (コラーゲンおよびエラスチンが主成分と思われる) に分画した。またミオシン区たん白質は多量の水を含んでいるので、水分と肉の割合が約 3:1 になるまで凍結乾燥した。得られたこれらの 3 分

回折強度は増加しなくなり、さらに添加量が 40% をこえると、回折強度は逆に減少することがわかる。

塩すり身を中間温度に放置した場合、たん白質分子は分散するよりも、むしろ配列する傾向にあることがこれまでの実験によつてわかっているの、40% 以上の水分を添加した場合の X 線回折図の減少する理由は α -ヘリックスが加熱によつて崩壊することに基づくものと思われる。

すり身および坐りによるゲルの IR-スペクトル

たん白質分子の二次構造解明の手段の一つとして IR-スペクトルによる検討はよく行なわれる方法である。この方法の特徴は試料が液体、固体のいずれを問わず測定が可能であることで、この点、液状でなくては測定できない ORD とは異なり、坐りの過程の追求のように、試料が固体である場合には有利と考えられるので、空すり身、塩すり身および坐らせたゲルについての IR を測定した。測定に際して、アミド I 吸収帯には 1665 cm^{-1} の水による吸収が現われるので、この影響を除くため、水晒しの際には重水を用い、また空ずりの際には 15% の蒸溜水を加える代り重水を加えた。なおアミド II 吸収帯を測定する場合には通常の方法ですり身を調製した。

Fig. 5 に空すり身、塩すり身およびこれを 38°C に 30 分間放置してゲル化したものについての IR スペクトルを図示した。アミド I 吸収帯はいずれもほぼ 1650 cm^{-1} に、またアミド II 吸収帯は $1550\sim 1530\text{ cm}^{-1}$ に存在し、空すり身、塩すり身、および坐つたゲルのたん白質は大部分の α -ヘリックスと一部のランダム・コイルから成立していることを示し、それぞれの正確な比率については IR-スペクトルからは明らかではない。

先の実験ではアクトミオシンのヘリックスは加熱によつてランダム・コイル化する傾向にあることが示されたが、実際のすり身の中ではこの傾向はさほど大きくないことが明らかである。

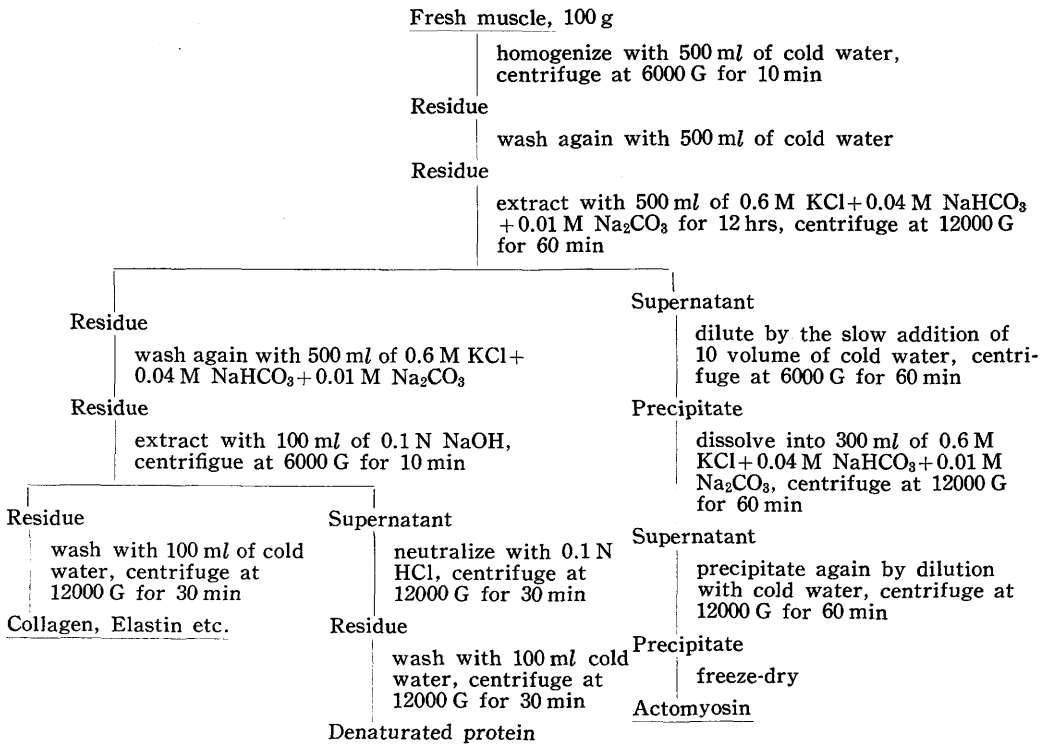


Fig. 6. Schematic diagram of fractionation of proteins.

画のたん白質に、それぞれ3%量の塩化ナトリウムを加えて15分間らい潰したものを38°Cに放置して坐らせ、その外観、および官能検査により、坐りの程度を検討した。ミオシン区たん白質については弾性、光沢から坐つたと判定されたが、0.1N水酸化ナトリウム可溶性たん白質は中間温度に放置するとポロポロの、あたかも“もどりかまぼこ”と同様なものに変つた。また塩類および0.1N水酸化ナトリウムに不溶性のたん白質についても、やはりポロポロの塊状の物質となつた。したがつて、坐りに関与するたん白質はミオシン区たん白質(アクトミオシン)であることが明らかとなつた。なおミオシン区たん白質のIR-スペクトル、X線回折図は今まで述べて来たマアジ精肉とまったく同様のパターンを示した。

坐りと魚肉たん白質の高次構造について 以上の一連の実験事実によつて、坐りによるゲル生成機構をまとめれば次のようになる。すなわち、精肉の状態およびこれを空ざりした状態では魚肉たん白質の主要成分であるミオシン区たん白質の高次構造における分子の配列状態はほとんど変化しないが、塩ざりによつて配列状態は乱れてきてX線回折強度は低下して来る。しかし、この場合でも二次構造が保持されていることは、アクトミオシンの塩化ナトリウム溶液のORD曲線が典型的な α -ヘリックスのパターンを示していることから明らかである。

塩ざり身を中間温度に放置すると、すなわち坐らせるとそれまで乱れていた配列状態は再配列によつて規則正しくなつて来ると同時に、二次構造自体は崩壊しはじめる。前者については坐りの初期にX線回折強度が増加することから明らかである、後者については38°Cに放置したアクトミオシン溶液が完全にランダム・コイル化したこと、水分の添加量の多い塩ざり身を加熱した場合にX線回折強度がかえつて減少する傾向にあることから容易に推定できる。

したがつて、全体を通じてX線回折強度の変化を考察すれば α -ヘリックスの崩壊—すなわちランダム・コイル化と同時に、たん白質分子の再配列が起るためにX線回折強度が坐りの過程において最大値を示すこ

とがよく理解される。しかし IR-スペクトル的にはランダム・コイルの生成は明確には認められないゆえ、この転移は非常にわずかなものであると考えられる。

最後に、たん白質分子の再配列については、相当する分子間引力が作用するはずであり、このことはたん白質分子相互にある種の結合が生じたことも考えられるが、これらの検討については次報にゆずりたい。

X線回折測定に際して御便宜を計つて下さつた三重大学農学部 滝 基次教授、ORD、IR 測定に御協力下さつた同学部 熊沢善三郎教授、入江僚三博士、および愛知県食品工業試験所 井川房欣技師に深謝します。

文 献

- 1) 平野 弘: 本誌, **8**, 29~40 (1939).
- 2) 清水 亘: 同誌, **12**, 165~172 (1944).
- 3) 右田正男・岡田 稔: 同誌, **18**, 117~123 (1952).
- 4) 右田正男・岡田 稔: 同誌, **18**, 159~170 (1952).
- 5) 右田正男・岡田 稔: 同誌, **19**, 589~594 (1953).
- 6) 右田正男・岡田 稔: 同誌, **20**, 213~223 (1954).
- 7) 梅本 滋・岡田 稔・右田正男: 同誌, **20**, 313~318 (1954).
- 8) 田元 馨・福見 徹: 北海区水研報 No. 24 402~211 (1962).
- 9) 三宅正人・上住南八男: 三重県立大学水産学部紀要 **6**, 313~316 (1965).
- 10) 清水 亘: 水産ねり製品, p. 192~195, 光琳書院 (1966).
- 11) R. E. DICKERSON: in "The Protein" (H. NEURATH ed.), Vol. 2, p. 603~778, Academic Press, New York (1964).
- 12) 三宅正人, 田中明子: 本誌, **35**, 311~315 (1969).
- 13) N. S. ANDERSON, J. W. C. CAMPBELL, M. M. HARDING, D. A. REES, and J. W. SAMUELL: *J. Mol. Biol.*, **45**, 85~98 (1969).
- 14) たとえば 浜口浩三: タン白質の立体構造 p. 144, 共立出版 (1967).
- 15) 三宅正人: 本誌, **31**, 464~470 (1965).
- 16) 新井健一・高橋英明・斎藤恒行: 同誌, **36**, 232~236 (1970).
- 17) たとえば 今堀和友: 旋光性, p. 90~126, 東京化学同人 (1967).