

平成 22 年 6 月 10 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007 ～ 2009
 課題番号：19580240
 研究課題名 (和文) 酸化ストレスによる魚類筋原繊維中のミオシンの生化学的性質と食品機能特性の変化
 研究課題名 (英文) Changes in Biochemical Properties and Food Functionalities of Myosin in Fish Myofibrils Exposed to Oxidative Stresses
 研究代表者
 大泉 徹 (OOIZUMI TOORU)
 公立大学法人福井県立大学・海洋生物資源学部・教授
 研究者番号：20254245

研究成果の概要 (和文)：貯蔵・加工中に起こるタンパク質の酸化が魚肉及びその加工品の品質に及ぼす影響を明らかにするための基礎研究として、ヒドロキシラジカル、脂質酸化生成物または臭素酸カリウムでコイ筋原繊維タンパク質を処理したときに起こるミオシンの凝集と架橋形成の進行様式を比較検討した。その結果、酸化ストレスの種類によってミオシンの架橋形成と凝集の進行様式が異なることを明らかにした。また、筋原繊維タンパク質の熱変性の進行にともない、ミオシンの酸化ストレスに対する感受性が大きく増大することを示した。

研究成果の概要 (英文)：Aggregation and cross-linking pattern of myosin in carp myofibrils exposed to hydroxyl radical, oxidized lipid or potassium bromide were investigated as a fundamental study to elucidate the effect of protein oxidation on the quality changes of fish meats during storage and processing. Aggregation and cross-linking pattern of myosin was different depending on the kind of oxidative stress. Moreover, thermal denaturation of myofibrils enhanced susceptibility of myosin to oxidative stresses.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2008 年度	800,000	240,000	1,040,000
2009 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：水産食品加工学

科研費の分科・細目：水産学・水産化学

キーワード：酸化ストレス、筋原繊維、ミオシン、凝集、架橋形成

1. 研究開始当初の背景

(1) 水産動物の筋原繊維タンパク質が陸上哺乳動物のそれらに比べてきわめて不安定で変性しやすいことはよく知られている。しかも、魚肉の貯蔵・加工中に起こる筋原繊維タンパク質の変性は水産加工食品の品質と密接にかかわることから、変性のメカニズムの

解明とその制御について多数の研究が行われてきた。しかし、脂質の酸化生成物などの酸化ストレスによる筋原繊維タンパク質の構造と機能の変化については研究例が少ない。

(2) 畜産加工分野においても、食肉の貯蔵・加工中に起こる筋原繊維タンパク質の酸化

について興味もたれ、多くの研究が実施されているが、食肉の食品機能特性の主体を担っているミオシンの構造変化については十分な研究が行われていない。

(3) とくに、魚肉と畜肉のいずれについても、異なる酸化ストレスが引き起こす筋原繊維中のミオシンの生化学的性質と食品機能特性の変化については、系統的な研究がなされておらず、不明な点が多いのが現状である。

2. 研究の目的

(1) 貯蔵・加工中に起こる筋原繊維中のミオシンの変性と凝集は、水産加工食品の品質と密接にかかわっている。そこで、各種の酸化ストレスが筋原繊維中のミオシンの変性と凝集の進行に及ぼす影響を及ぼすのかを比較検討する。

(2) 魚類のミオシンはきわめて不安定で変性しやすいことを特徴としている。したがって、各種の酸化ストレスは未変性のミオシンだけでなく、貯蔵・加工中に変性したミオシンをも酸化することが十分に考えられる。そこで、ミオシンの変性が酸化ストレスに対する感受性に及ぼす影響を及ぼすのかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) コイの筋原繊維をヒドロキシラジカル生成系 (0.1 mM アスコルビン酸、0.01 mM 塩化第 2 鉄、および 0~5 mM 過酸化水素含有)、脂質酸化生成物 (過酸化トリグリセリド、筋原繊維 1mg に対して過酸化物価として 0~15 $\times 10^{-5}$ meq)、または 0~5 mM 臭素酸カリウムで、0°C で 18 時間処理した。過酸化トリグリセリドはマイワシ油トリグリセリドを 37°C 暗所で 9 日間自動酸化させて調製した。酸化処理した筋原繊維を還元剤の存在下または非存在下で SDS-PAGE に供し、ミオシンの架橋形成の進行を追跡した。また、酸化処理した筋原繊維中のミオシンの凝集は、その 40% 飽和硫酸抽出性と塩溶解性から検討した。0.5 M NaCl-1 mM Mg-ATP 存在下、40% 飽和硫酸で抽出されるミオシンは全て単量体であり、0.5 M NaCl-1 mM ATP-Mg に溶解するミオシンは凝集度が小さいことが知られている。ミオシンの架橋形成と凝集の進行は SDS-PAGE 上のミオシン重鎖をデンストメトリーで測定し、定量的に検討した。さらにミオシンの活性中心の変化を Ca-および K-ATPase 活性から検討した。あわせて、酸化処理した筋原繊維中のミオシンのキモトリプシン消化性の変化についても検討を行った。

(2) コイの筋原繊維を 0~90°C で加熱処理した後、ヒドロキシラジカル生成系で酸化し、還元剤の存在下または非存在下の SDS-PAGE に供して、ミオシンの架橋形成の進行を追跡した。また、ヒドロキシラジカル生成系の存在下で筋原繊維を加熱処理したときに起こるミオシンの

架橋形成についても同様に検討した。

4. 研究成果

(1) ①ヒドロキシラジカル生成系 (HRGS)、過酸化トリグリセリド (P-TG)、または臭素酸カリウム (KBrO_3) で処理した筋原繊維の Ca-および K-ATPase 活性の変化を図 1 に示した。図 1 によると、いずれの酸化ストレスで筋原繊維を処理した場合にも、筋原繊維の Ca-ATPase 活性は上昇し、K-ATPase 活性が低下した。これらの変化は、SH 試薬でミオシンを処理したときの ATPase 活性の変化と類似しており、ミオシンの酵素活性付近に存在する SH 基が修飾されたことが示唆された。このような ATPase 活性の変化は酸化ストレスの種類にかかわらず、見られることから、筋原繊維の Ca-および K-ATPase 活性は筋原繊維タンパク質の酸化の指標として有用であると考えられた。

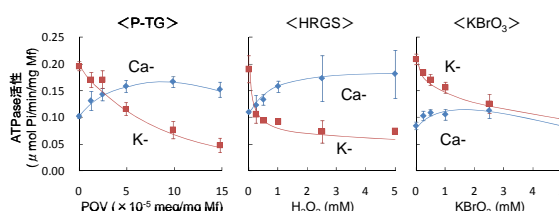


図1 酸化処理によるATPase活性の変化

②HRGS 処理した筋原繊維中のミオシンの架橋形成と凝集の進行を検討した結果を図 2 に示した。その結果、HRGS 処理した筋原繊維では、還元剤非存在下 (ME-) の SDS-PAGE でミオシン重鎖 (MHC) が大きく減少し、ジスルフィド結合によりミオシンが架橋形成することが示されたが、還元剤存在下 (ME+) では MHC に変化は見られず、共有結合タイプの架橋は形成されなかった。また、単量体ミオシンの量を反映する 40% 飽和硫酸抽出性 (AS) や凝集規模の増大により低下する塩溶解性 (SS) の低下度合いは、ジスルフィド結合による架橋体の生成量よりも小さいことから、ジスルフィド結合による架橋体には分子内架橋したミオシンや凝集規模の小さいミオシンが含まれることが示唆された。

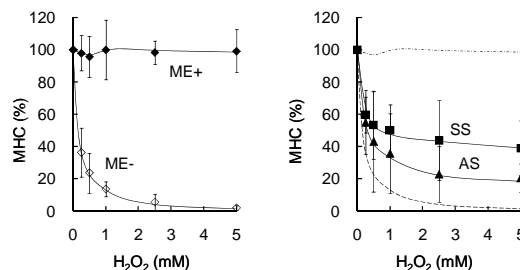


図2 HRGS処理によるミオシンの架橋形成と凝集の進行

言い換えると、HRGS 処理した筋原繊維では、ミオシンの分子内にジスルフィド架橋が形成され、酸化の進行とともに、分子間架橋や非共有結合によるミオシンの凝集が進行するものと考えられる。これらの結果は、ニワトリ筋原繊維を用いて行われた従来の研究結果と類似していた。

③P-TG 処理した筋原繊維中のミオシンの凝集と架橋形成の進行を検討した結果を図3に示した。図3によると、P-TG 処理した筋原繊維ではME-だけでなくME+における SDS-PAGE 上のMHCの減少もみられることから、HRGS 処理した場合は異なり、ジスルフィド結合とともに共有結合に匹敵する強い結合によってミオシンが架橋することが示された。また、P-TG 処理した筋原繊維ではジスルフィド結合による架橋体の生成とともに、AS や SS も大きく低下することから、ミオシンの凝集も著しく進行した。これらの結果から、P-TG 処理した筋原繊維では、ジスルフィド架橋の形成や非共有結合による凝集の進行の結果、ミオシン分子間に強い絡まりあいが生じ、SDS でも開裂しにくくなることが推察された。

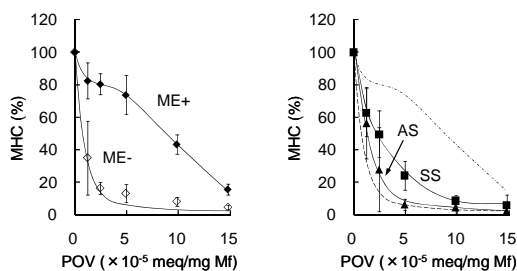


図3 P-TG処理によるミオシンの架橋形成と凝集の進行

④図4に示したように、KBrO₃ 処理した筋原繊維では、ME-の SDS-PAGE でMHCの減少が見られたが、ME+では、MHCに変化が見られないので、形成される架橋は、ジスルフィド架橋のみであることが明らかとなった。この場合には、HRGS 処理やP-TG 処理の場合とは異なり、ジスルフィド結合によるMHC架橋体の生成量よりも、AS や SS の低下度合いが大きいことから、ジスルフィド架橋の形成に先行して、非共有結合によるミオシンの凝集が進行することが示唆された。

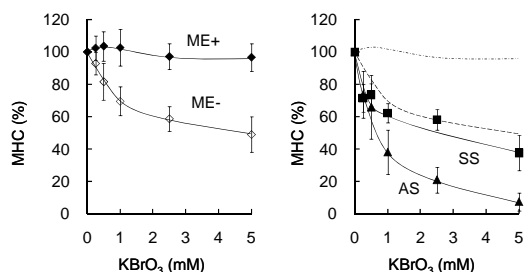


図4 KBrO₃処理によるミオシンの架橋形成と凝集の進行

⑤これら3種の酸化ストレスで酸化処理した筋原繊維のキモトリプシン消化性を検討した。キモトリプシン消化は0.1 M KCl、EDTA

存在下で行った。この条件では、未変性のミオシンはS-1とrodに切断されることが知られている。酸化処理した筋原繊維では酸化ストレスの種類にかかわらず、S-1の生成量にはほとんど変化が見られなかったが、rodの生成量は酸化処理とともに減少し、rodにキモトリプシンによって認識される構造変化が起こったことが推察された。(結果は図示しない)

以上のように、3種の酸化ストレスで処理した筋原繊維中のミオシンのATPase活性とキモトリプシン消化性の変化は類似していたが、ミオシンの架橋形成と凝集の進行様式は大きく異なっていた。従来、魚肉タンパク質の酸化については、ジスルフィド結合の形成のみが注目され、魚肉の食品機能の主体をなすミオシンの構造と機能全体の変化を捉えようとした研究はほとんど見られなかった。本研究の結果は、酸化ストレスの種類によってミオシンに異なる変化が起こることを初めて明らかにしたものである。これらの結果は、魚肉の貯蔵・加工中に起こる酸化による加工適性の変化のメカニズムを解明し、その制御を図るうえで、きわめて重要と考えられる。

(2) ①ミオシンの変性が酸化ストレスに対する感受性にいかなる影響を及ぼすのかを明らかにするために、加熱処理した筋原繊維をHRGSで酸化し、架橋形成の進行を検討した。コイの筋原繊維を0~90℃で1時間加熱した後、HRGSで酸化させてME-におけるSDS-PAGEに供し、MHCの染色強度を定量した。図6に示したように、コイの筋原繊維を40℃以上で加熱すると、Ca-ATPase活性が著しく低下し、加熱変性が進行した。このように加熱処理した筋原繊維をHRGSで酸化すると、筋原繊維の変性の進行とともにジスルフィド結合によるミオシンの架橋形成が著しく促進されることが示された。(図7)

②さらに、図8にはHRGS共存下で筋原繊維を加熱し、ジスルフィド結合による架橋形成の進行を検討した結果を示した。図8によると、HRGS共存下における筋原繊維の加熱処理によりMHCの架橋形成が著しく促進された。しかし、図9に示したように、HRGS存在下、40℃で筋原繊維を加熱した場合でも還元剤存在下におけるSDS-PAGEではMHCの減少は見られず、共有結合に匹敵する強度の結合による架橋は形成されないことが確かめられた。

③このような筋原繊維の加熱による酸化ストレスに対する感受性の増大はHRGS以外の酸化ストレスで処理した場合にも認められた。図10には、P-TGやKBrO₃によるミオシンのジスルフィド架橋形成も筋原繊維の加熱により促進されることが示されている。な

お、P-TG 処理では共有結合タイプの結合による架橋形成も筋原繊維の加熱により促進されることが示された。

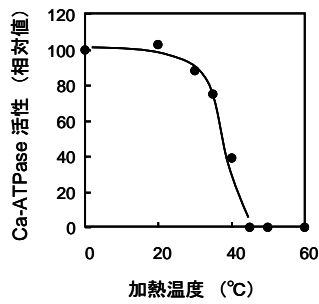


図6 加熱処理によるCa-ATPase活性の変化

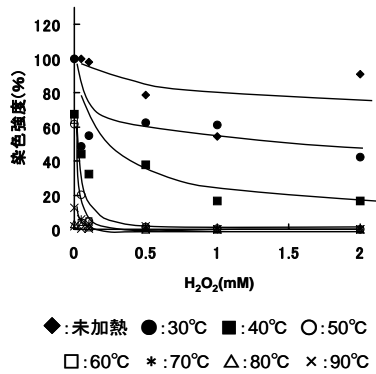


図7 種々の温度で加熱した筋原繊維のHRGS処理によるジスルフィド架橋の形成

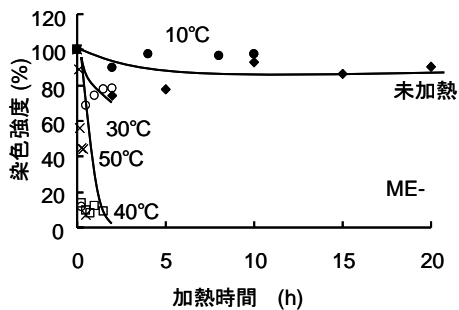


図8 HRGS 存在下で加熱処理した筋原繊維中のミオシンのジスルフィド結合による架橋形成

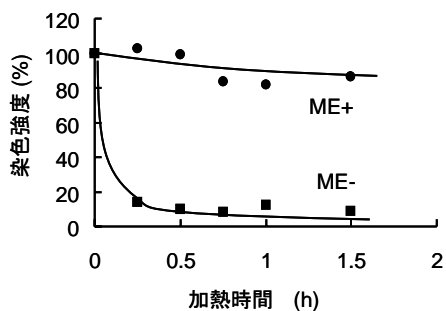


図9 HRGS 存在下で40°Cで加熱処理した筋原繊維中のミオシンの架橋形成

以上のように筋原繊維を加熱することによって、酸化によるミオシンの架橋形成が促進される原因としては、ミオシンが加熱凝集して、ポリペプチド鎖間の距離が接近しジスルフィド結合が形成されやすくなることが推定された。

これらの結果は、魚肉の加工過程におけるたんぱく質の酸化と魚肉加工品の品質との関連を明らかにするための基礎的知見としてきわめて重要であると考えられる。

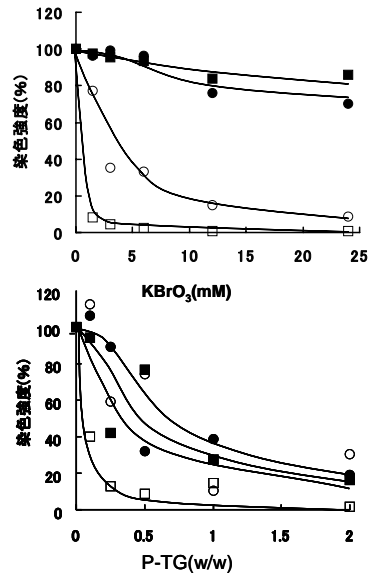


図10 異なる酸化剤による加熱筋原繊維中のミオシンの架橋形成
●○:0°C ■□:40°C ●■:ME+ ○□:ME-

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計6件)

(1) T. Ooizumi, K. Usuda, Y. Akahane, and Y. L. Xiong. Variation in cross-linking and aggregation process of myosin in carp myofibrils exposed to three different oxidizing systems. Institute of Food Technologists Annual Meeting. 2010年7月19日. Chicago, USA. (査読あり)

(2) 臼田浩紀・大泉 徹他. 各種酸化ストレスで処理したコイ筋原繊維中のミオシンのキモトリプシン消化性. 平成22年度日本水産学会春季大会. 2010年3月27日. 日本大学藤沢キャンパス(神奈川県藤沢市).

(3) 臼田浩紀・大泉 徹他. 各種酸化ストレスによるコイ筋原繊維中のミオシンの架橋形成と凝集の進行様式の比較. 平成21年度日本水産学会秋季大会. 2009年10月2日. いわて県民情報交流センター・アイーナ(岩手県盛岡市).

(4) T. Ooizumi, S. Ohshima, T. Sekiya, Y. Akahane,

and Y.L. Xiong. Cross-linking of myosin heavy chains in carp myofibrils as affected by the progress of protein denaturation in hydroxyl radical- oxidizing environment. Institute of Food Technologists Annual Meeting. 2008年6月30日 New Orleans, USA. (査読あり)

(5) 大泉 徹他. ヒドロキシラジカルによるミオシンの架橋形成に及ぼす筋原繊維タンパク質の加熱変性の影響. 平成 20 年度日本水産学会春季大会. 2008年3月28日. 東海大学海洋学部 (静岡県清水市).

(6) T.Ooizumi. Biochemical changes in myofibrillar protein exposed to various oxidizing Systems. 98th American Oil Chemists' Society Annual Meeting and Expo. 2007年5月14日. Quebec City, Canada. (招待)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大泉 徹 (OOIZUMI TOORU)

公立大学法人福井県立大学・

海洋生物資源学部・教授

研究者番号：20254245

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：

(4) 研究協力者

YOULING L. XIONG

University of Kentucky

Department of Food and Animal Sciences

Professor

