

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月27日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22580225

研究課題名（和文） 水産筋肉タンパク質のATPによる変性抑制研究

研究課題名（英文） Study of suppressive effect of ATP on denaturation of fish muscle protein

研究代表者

木村 郁夫 (KIMURA IKUO)

鹿児島大学・水産学部・教授

研究者番号：30443344

研究成果の概要（和文）：魚類筋肉タンパク質（筋原線維タンパク質、ミオシンS-1、筋小胞体、ミオグロビン）の冷凍変性、熱変性、酸変性およびミオグロビンのメト化に対して、生理的な濃度のATPは強力な変性抑制作用を示した。ATPは、二つの機能（エネルギー物質、タンパク質の変性防止作用）を有していることが明らかとなった。筋肉中に高濃度のATPが存在した状態で凍結保蔵すると、ATPの筋肉タンパク質変性抑制作用により冷凍変性が抑制される。

研究成果の概要（英文）：ATP with physiological concentration showed strong suppressive effect on denaturation by the treatment of frozen, heat and acidic pH of fish muscle proteins which are myofibrillar protein, myosin s-1, sarcoplasmic reticulum and myoglobin. The autoxidation rate of tuna myoglobin was suppressed in the presence of ATP. The results indicate ATP has two functions, which are currency of energy and protein stabilizer. The ATP remaining in fish muscle works as a cryoprotectant during frozen storage.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産化学

キーワード：水産物・変性防止・ATP・筋肉タンパク質・筋原線維タンパク質・ミオグロビン・筋小胞体

1. 研究開始当初の背景

水産物の品質に関する食品生化学的な研究では、鮮度変化やタンパク質変性が非常に速く進行することから、これらの変化を測定する研究が精力的に行われてきた。例えば、死後の筋肉中でATPの分解で生成されるATP関連化合物の経時変化を測定したK値などの鮮度指標や筋原線維タンパク質の温度安定性に関する研究である。鮮度変化や筋原線維タンパク質の変性を測定する方法は確立されている。

一方、筋肉から調製した筋原線維タンパク質やミオシンは、生体が生きている体温で保存すると、変性が急速に進行する。また、水産加工の現場では、高鮮度状態で水産物を凍結処理すると、解凍後の品質が非常に良いことが経験されている。しかし、これらの現象を説明するメカニズムは、明らかにされていない。

筋原線維タンパク質の熱変性に関して、生体内エネルギー物質のATPが変性を抑制することが報告されているが、試験に供された

ATP 濃度は 1mM 以下での試験結果である。筋肉内の生理的な ATP 濃度は、5~10 mM であるので、ATP の変性抑制作用を明らかにするためには、1 mM 以上での検討が必要である。しかし、筋原線維は ATPase 作用を示すので、ATP 濃度を高濃度に維持した試験系の構築は難しく、1mM 以上の生理的な濃度下における研究は行われていない。また、筋肉に含まれる筋原線維タンパク質以外のタンパク質への ATP の作用に関する研究報告も非常に少ない状況にある。

2. 研究の目的

本研究では、水産物の品質に及ぼす ATP の作用について、①ATP の筋肉タンパク質の変性抑制作用機序の解明、②水産物の生き残後の ATP 残存と死後変化時のタンパク質変性との関係および凍結処理・保蔵時の筋肉タンパク質の変性抑制に及ぼす ATP の影響をタンパク質化学的な手法を用いて明らかにすることを目的とした。研究成果は、水産物の高品質な凍結保存を行うための条件設定など、新しい加工処理技術構築への応用が期待される。

3. 研究の方法

(1) 試験試料

①筋原線維タンパク質

筋原線維タンパク質の調製には、均質な魚肉タンパク質試料としてスケトウダラとグチの冷凍すり身 (FA 級) を使用した。常法に従い 0.1 M KCl (pH 7.5) 溶液でのホモジナイズ、洗浄を繰り返して筋原線維タンパク質を調製した。

②ミオシン S-1

ATP の筋原線維タンパク質のミオシン ATPase 部位への作用を測定するために、ミオシン S-1 を使用した。試料としてミナミマグロ (-60°C 保蔵) 普通筋を使用し、筋原線維タンパク質のキモトリプシン消化、ピロリン酸による解離、硫酸分画を行い、S-1 を調製した。

③筋小胞体

ミナミマグロ普通筋から、Nakamura らの方法 (1994 J. Biol. Chem 269:16015-) に準じて調製した。

④ミオグロビン

ミナミマグロ普通筋から、0.1 M KCl (pH 7.5) 溶液で抽出後、70-90%飽和硫酸分画にミオグロビンを濃縮し、落合らの方法 (日水誌 2010 76: 686-) に準じてゲル濾過を行い調製した。

(2) 性状分析

各タンパク質溶液に各濃度の ATP を添加し、凍結あるいは熱処理を行った時のタンパク質の性状を以下の方法で測定した。

①筋原線維タンパク質

Ca-ATPase 活性、塩溶解性 (0.5 M KCl) を指標とした。

②ミオシン S-1

Ca-ATPase 活性、S-1 溶液の濁度 (350 nm における吸光値) を指標とした。

③筋小胞体

Ca-ATPase 活性を指標とした。

④ミオグロビン

ミオグロビン中のメトミオグロビン生成比率をメト化率とし、尾藤法 (日水誌 1965 31:534) により測定した。また、ミオグロビン分子状態は、蛍光、分子サイズ、表面電荷を指標にした。

4. 研究成果

(1) ATP の筋原線維タンパク質の凍結変性抑制作用

①ATP を抑制した筋原線維溶液系構築

0.1 M KCl 溶液中に高濃度筋原線維を存在させ、ATP 濃度を高い状態に維持する方法を検討した。図 1 は、EDTA 存在下での Ca-ATPase 活性の KCl 濃度依存性を示した。EDTA 存在下で、0.1 M KCl における ATPase 活性が抑制されることを確認したので、本研究では EDTA 存在下で ATP の変性作用を測定した。

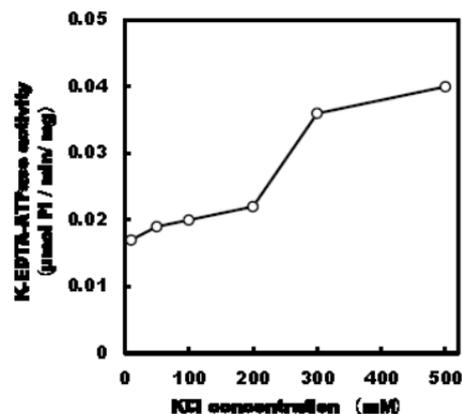


図 1 筋原線維 EDTA-ATPase の KCl 濃度依存性

②ATP の筋原線維冷凍変性抑制作用

-15 から -78°C の各凍結保存温度で各濃度の ATP を存在させて凍結保蔵したときの Ca-ATPase 活性および筋原線維の塩溶解性を測定した。図 2 はスケトウダラ筋原線維に ATP を 0 (●), 0.75 (○), 2.25 (△), 3.75 (□) および 7.5 mM (◇) 濃度で存在させて、-20°C で保存した時の Ca-ATPase 活性変化を示した。ATP が高濃度ほど、ATPase 活性の低下は抑制された。また、塩溶解性を指標にしても同様の ATP による変性抑制効果が得られた。

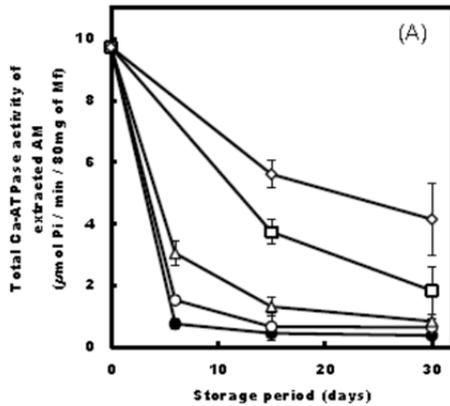


図2 各濃度ATP存在下Mf Ca-ATPase変化

スケトウダラおよびグチの筋原線維を各濃度のATP存在下、各凍結温度で保蔵した時のATPase活性の低下速度あるいは塩溶解性の低下速度 (K_D) を求めた。結果を表1に示したが、ATP濃度に従い冷凍保蔵中の塩溶解性の低下は抑制され、凍結保蔵温度が低くなる程、変性が抑制されることが確認できた。ATPが7.5 mM存在した場合、 -20°C における変性速度は、 -30°C で保存した場合と同様となる結果を示した。魚種により、 K_D の値が異なり、グチ (croaker) の方が安定である結果となったが、これは筋原線維タンパク質の安定性の違いが表れている。

表1 ATP各濃度における筋原線維 K_D

ATP (mM)	Alaska pollack $K_D \times 10^4$ (day $^{-1}$)			
	-15°C	-20°C	-30°C	-78°C
0	3479 (± 108.48)	2429 (± 186.08)	311 (± 30.63)	123 (± 3.09)
0.75	2630 (± 74.64)	1300 (± 50.51)	154 (± 6.48)	123 (± 4.32)
2.25	1288 (± 22.65)	1146 (± 54.57)	136 (± 4.08)	101 (± 7.26)
3.75	791 (± 39.20)	472 (± 34.32)	95 (± 4.99)	79 (± 5.10)
7.50	456 (± 21.75)	299 (± 17.75)	55 (± 1.41)	42 (± 4.24)
ATP (mM)	Croaker $K_D \times 10^4$ (day $^{-1}$)			
	-15°C	-20°C	-30°C	
0	969 (± 30.40)	533 (± 17.45)	140 (± 6.94)	
0.75	774 (± 17.25)	419 (± 18.24)	115 (± 4.64)	
2.25	531 (± 3.27)	282 (± 8.26)	91 (± 12.68)	
3.75	406 (± 19.70)	180 (± 8.34)	61 (± 5.73)	
7.50	57 (± 2.94)	27 (± 0.94)	14 (± 2.16)	

(2) ATPによるミオシンS-1熱変性抑制

ミナミマグロミオシンS-1に対するATPの熱変性抑制効果について、0.1 M KCl溶液でpH(5.5~7.5)、ATP濃度0~7.5 mMの条件下、 30°C でのCa-ATPase活性の低下および濁度の変化を測定した。図3に濁度変化を示した。

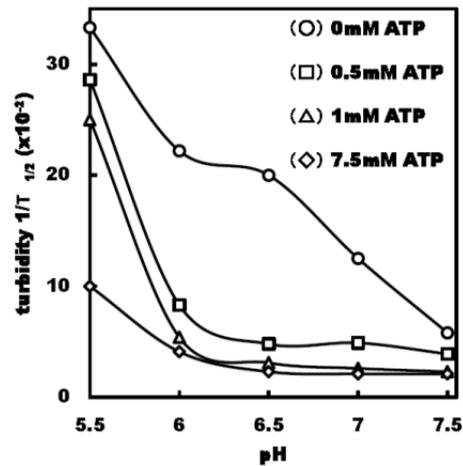


図3 ATPのS-1濁度変化に及ぼす影響

S-1の濁度増加速度は、pHが低い程速く、また、ATPが存在すると濁度増加は抑制された。この傾向は、ATPase活性変化でも確認された。

以上の筋原繊維およびミオシンS-1の冷凍変性および熱変性に対してATPは、生理的な濃度で強力な抑制作用を示すことが明らかとなった。

(3) ATPの筋小胞体Ca-ATPase熱変性抑制

筋小胞体は、筋収縮に関わるCaイオンの蓄積と遊離を担う重要なタンパク質である。筋小胞体の熱変性に及ぼすATPの作用を筋小胞体Ca-ATPase活性を指標に測定した。

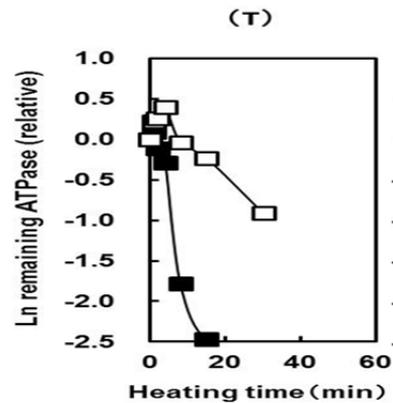


図4 ATPのマグロ筋小胞体Ca-ATPase変性抑制 (ATP 0:■、2 mM:□)

図4には、ミナミマグロ筋小胞体を 30°C で加熱処理した時のCa-ATPase活性の低下におよぼすATPの作用を示した。ATPが2 mM存在するとCa-ATPase活性の低下が抑制される結果を示した。結果は示さないが、アトランティックサーモンやカンパチの筋小胞体でも同様に、ATPによる筋小胞体Ca-ATPaseの熱変性の抑制が確認された。

ATPは、筋小胞体Ca-ATPaseに対しても筋原線維タンパク質と同様に、生理的な濃度下

で強力な変性抑制効果を示した。

(4) ATP によるミオグロビンのメト化抑制
ミオグロビンのヘム鉄が3価に酸化したメトミオグロビンが生成すると、肉色は褐色となり、刺身等での商品価値を失う。ミオグロビンのメト化を防止する方法としては超低温保蔵しかないが、コストが高く、マグロ等での流通でしか採用されていない。低コストでメト化を抑制する技術の開発が、水産業界から望まれている。

①ATP はミオグロビンのメト化を抑制

ミオグロビンのメト化は pH により影響を受け、酸性下でのメト化速度は大きいことが多数報告されている。本研究で、ミオグロビンのメト化は、生理的な濃度の ATP が存在すると抑制されることが初めて明らかにされた。図 5 はミナミマグロミオグロビンを pH (6.0(○), 6.5(●), 7.0(□), 7.5(■)) 溶液で各濃度の ATP を存在させて、25°C で処理した時のメト化速度を測定した結果を示した。ATP が存在するとミオグロビンのメト化が抑制され、特に、酸性 pH 下での抑制効果が大きいことが確認された。

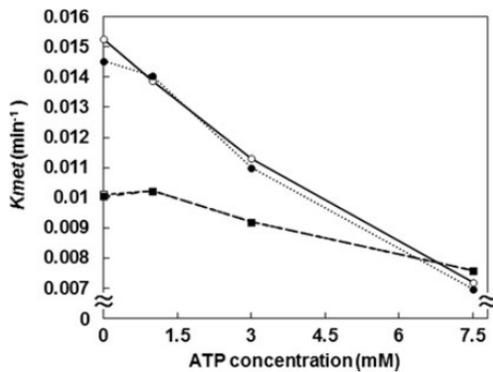


図 5 ミオグロビンのメト化に及ぼす ATP と pH の影響

②ミオグロビンに対する ATP の作用

ミオグロビンのメト化が ATP により抑制されることについて、ATP のミオグロビン分子への作用について検討を行った。図 6 はミオグロビンの soret 帯 (409 nm) 吸収値に対する ATP の影響を示した。ATP 濃度に従って、soret 帯の吸光値が変化した。

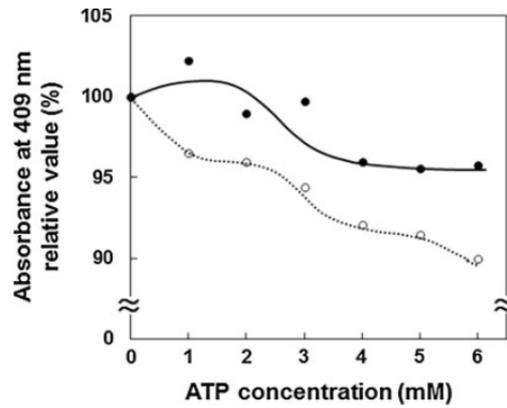


図 6 ATP のミオグロビン Soret 帯吸光値に及ぼす影響 (pH 6.5:○、7.5:●)

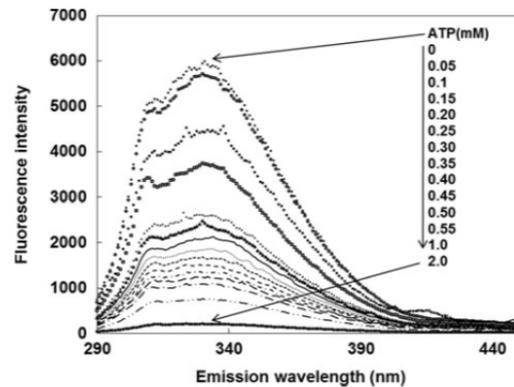


図 7 各濃度の ATP 存在下におけるミオグロビンの蛍光エミッション (ex.:285 nm)

図 7 にはミオグロビン分子の蛍光を測定した結果を示した。ATP 濃度に従い、蛍光クエンチングが認められた。

さらに、ATP 存在下におけるミオグロビン分子径および表面電荷を測定した結果を表 2 に示したが、ATP 存在下においてミオグロビン分子径は小さくなり、また、表面電荷も変化する事が認められた。

表 2 ATP のミオグロビン分子径、表面電荷に及ぼす影響

ATP concentration (mM)	Molecular weight (kDa)	Zeta potential (mV) as a globular protein
0	15.5	-4.50
5	11.3	1.32

(分子量：球状タンパク質と仮定して分子径から分子量を算出)

以上の結果は、ATP はミオグロビンの分子状態に作用することを示しており、その結果、ミオグロビンのメト化が抑制されると考えられる。ミオグロビンに対する ATP の作用を明らかにしたのは本研究が初めてであり、ミオグロビンの生体内での存在状態は生理的

な機能に影響するので、ATP はミオグロビンの生体内機能に重要な影響を及ぼしていると推察している。

本研究において、魚類筋肉タンパク質の筋原線維タンパク質、ミオシン S-1、筋小胞体の冷凍変性、熱変性、酸変性およびミオグロビンのメト化に対して、生理的な濃度の ATP は強力な変性抑制作用を示すことが明らかにされた。ATP は、エネルギー物質であること以外にタンパク質の変性防止作用という重要な機能を有していることが明らかとなった。筋肉中に高濃度の ATP が存在した状態で凍結保蔵すると、ATP の筋肉タンパク質変性抑制作用により冷凍変性が抑制されるなど、本研究で得られた成果は、水産物の加工流通において、水産物の品質を高く維持することに利用されることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

- ① Kota Inohara, Ikuo Kimura, Chunhong Yuan, Suppressive effect of ATP on autoxidation of tuna oxymyoglobin to metmyoglobin, *Fishery Science*, 査読有、79, 2013, 503-511
DOI: 10.1007/s12562-013-0622-9
- ② 緒方由美、進藤 穰、木村郁夫、ATP による魚類筋原線維タンパク質の冷凍変性抑制、*日本水産学会誌*、査読有、78、2012、461-467

〔学会発表〕(計 16 件)

- ① 井ノ原康太、魚類ミオグロビンの分子状態に及ぼす ATP の影響、平成 25 年度日本水産学会春季大会、2013 年 3 月 27 日、東京海洋大学
- ② 井ノ原康太、魚類ミオグロビンの ATP によるメト化抑制、平成 24 年度日本水産学会九州支部大会、平成 2013 年 1 月 26 日、九州大学中央図書館視聴覚ホール
- ③ 袁 春紅、ミナマガロ筋小胞体の生化学的性質および ATP による変性抑制効果、平成 24 年度日本水産学会春季大会、2012 年 3 月 27 日、東京海洋大学
- ④ 緒方由美、ATP によるマグロミオシン S-1 の熱変性抑制、平成 24 年度日本水産学会春季大会、2012 年 3 月 27 日、東京海洋大学

〔産業財産権〕

- 出願状況 (計 1 件)

名称：魚血合肉の褐変抑制方法

発明者：木村郁夫・井ノ原康太・濱田三喜夫

権利者：鹿児島大学・有限会社敬天水産

種類：特許

番号：特願 2011-062769

出願年月日：2011 年 3 月 22 日

国内外の別：国内

〔その他〕

KITEC Information No266 2013 SPRING

(一般財団法人九州産業技術センター情報誌) 木村郁夫 私の研究室(水産物の高品質保蔵技術の研究-生体内エネルギー物質 ATP による変性抑制-) pp 7-9

<http://www.kitec.or.jp/archives/001/201304/KITEC266.pdf>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 郁夫 (KIMURA IKUO)

鹿児島大学・水産学部・教授

研究者番号：30443344

(2) 研究分担者

進藤 穰 (SHINDO JYO)

鹿児島大学・水産学部・准教授

研究者番号：30271141

(3) 連携研究者

袁 春紅 (YUAN CHUNHONG)

鹿児島大学・水産学部・准教授

研究者番号：80431336

(4) 研究協力者

緒方 由美 (OGATA YUMI)

鹿児島大学・水産学部・特任研究員

井ノ原康太 (INOHARA KOTA)

鹿児島大学大学院連合農学研究科博士課程 1 年