

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：81101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07464

研究課題名(和文) シジミの低温応答を応用した新たな冷凍技術の開発

研究課題名(英文) Development of a new rfreezing technology utilizing low temperature response in brackish-water bivalve.

研究代表者

内沢 秀光 (UCHISAWA, Hidemitsu)

地方独立行政法人青森県産業技術センター・工業部門・室長

研究者番号：10505572

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、シジミを冷凍するとオルニチンが増加することを見出した。そのメカニズムについては全く分かっていなかったが、1モルのアコルピン(β -Ala-Orn-Orn)が分解されて2モルのオルニチンと1モルの β -アラニンが生成することを明らかにした。また、その逆反応も起こり、オルニチンと β -アラニンを基質として、シジミから調製した酵素を作用させたところアコルピンが合成された。このことから、シジミの冷凍によるオルニチンの生成及びその逆反応には酵素が関与していることが分かった。本研究は、シジミの低温応答メカニズムを解明することが、新たな冷凍技術の開発につながるのではないかと考えて実施したものである。

研究成果の概要(英文)：The ornithine content of an extract of the brackish-water bivalve, *Corbicula japonica*, increased when the bivalve was frozen. But that mechanism was completely unknown. A novel ornithine-containing tripeptide, named acorbine(β -Ala-Orn-Orn), commonly found in *C. japonica*, which is believed to be the source of increased free ornithine. The total amount of β -alanine and ornithine in the extract remained constant regardless of the temperature at which the bivalve was processed. The amount of free β -alanine and ornithine increased significantly when the bivalve was frozen, with a corresponding decrease in peptidic β -alanine and ornithine. The results suggest that changing the growth conditions triggers tripeptide proteolysis within the bivalve, which ultimately manifests in increased free β -alanine and ornithine. Now, we are studying the low-temperature response mechanism of the bivalve in order to develop a new freezing technology.

研究分野：食品科学

キーワード：シジミ 冷凍 アコルピン オルニチン

1. 研究開始当初の背景

研究代表者らは、シジミを冷凍するとオルニチン(以下Ornと略す。)が増加することを見出した。しかし、そのメカニズムについては全く分かっていなかった。一方、Ornが多く含まれている食品にシジミが挙げられるが、同じ貝類でもホタテ、アサリ、ハマグリには、ほとんど含まれていない。なぜシジミにOrnが多いのか、シジミにおけるOrnの生理的役割に関する研究は見られない。Ornには、アンモニアの代謝促進やストレス軽減作用が期待され、機能性食品素材として様々な健康志向の加工食品に用いられている。ヒトに対するOrnの機能性に関する研究は、各方面で取り組まれているものの、シジミそのものにおけるOrnの生理的役割は分かっていない。冷凍におけるOrnの生成の意味やそのメカニズムを解明することでシジミにおけるOrnの生理的役割を明らかにすることができれば、新たな冷凍技術の開発につながる可能性があるのではないかと考えて、本研究に取り組んだ。

2. 研究の目的

シジミを冷凍するとOrnが増えるが、シジミが凍りついて死ぬぎりぎりの温度である-4℃で顕著に増加する。この現象は、極限の低温環境におけるシジミの応答であり、何らかの生理的意義があると考えられる。さらに研究代表者らは、シジミにOrn含有新規トリペプチド(acorbine, -Ala-Orn-Orn)を見出し、シジミを冷凍するとacorbineが分解されてOrnと-Ala(以下-Alaと略す。)が生成することを明らかにした。本研究は、冷凍時におけるシジミの低温応答メカニズムを応用することで、鮮度保持や付加価値を高める新たな冷凍技術の開発につなげることができるのではないかと考えて実施したものである。

3. 研究の方法

本研究では、シジミの冷凍によるOrn増加メカニズムの解明に向けて、まずアコルピンの合成と分解に係る酵素について検討することとした。これまで、シジミから抽出した粗酵素溶液を用いてOrnと-Alaからアコルピンが合成されることを見出している。そこで、まずアコルピン合成酵素について分離精製及び酵素特性について検討した。また、シジミの種類において、冷凍処理による成分変化に違いがあるかどうかについても検討を試みた。

(1)アコルピン合成酵素活性の測定方法及び反応条件の検討

青森県十三湖産ヤマトシジミを、水道水を用いて砂抜き後軟体部を取り出し、液体窒素で凍結した。その後-80℃で保存し酵素抽出試料とした。試料を液体窒素中で粉碎し、20mM Tris-HCl 緩衝液(pH 7.5)を加えて氷冷しながら攪拌し、酵素を抽出した。遠心分

離(10,000×g, 30 min, 4℃)により得られた上清を0.22µmフィルターでろ過し、ろ液をさらに分画分子量10,000の限外ろ過膜を用いて濃縮し、粗酵素溶液とした。AlaとOrnを基質としATP及びMg²⁺存在下、得られた粗酵素溶液を用いてアコルピンの合成を試み、HPLCを用いて検出し、合成されることを確認した。酵素反応条件について、ATP及びMg²⁺要求性、基質特異性について検討した。

[HPLC条件]

カラム: Mightysil RP-18 GP (5mm), 150 mm × 4.6 mm (Kanto Chemical)

ポンプ: L-6200 Intelligent Pump (HITACHI)

移動相: 50mM sodium acetate buffer (pH 5.0) : methanol:tetrahydrofuran =35:58:7

流速: 1.0 ml/min

検出: Fluorescence (Ex 340 nm, Em 455 nm)

(2)アコルピン合成酵素の分離精製

上記により調製した粗酵素溶液をDEAE-Sephacel イオン交換クロマトグラフィーに供しNaCl濃度勾配により溶出し、アコルピン合成活性をもとに酵素溶出画分を集め、さらにSephacryl S-300ゲルクロマトグラフィーに供し、各フラクションのアコルピン合成酵素活性を調べた。

[イオン交換クロマトグラフィー条件]

カラム: DEAE-Sephacel ion-exchange column (2×25 cm)

溶出: linear gradient of 0 to 0.5M of NaCl in a 20mM phosphate buffer (pH 7.2)、30ml/h、4℃

5ml ずつ試験管に集め280nmでの吸光度とアコルピン合成酵素活性を調べた。

[ゲルクロマトグラフィー条件]

カラム: Sephacryl S-300 column (2.3×118 cm)

溶出: 0.1M NaCl、15ml/h、4℃

5ml ずつ試験管に集めローリー法(750nm)で検出した。分子量は、分子量既知のデキストラン標品(MW 689kDa, MW 362kDa, MW 206kDa, MW 177kDa)との比較から求めた。

(3)SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

アコルピン合成酵素のSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動は、常法に従い10-15%グラジエントゲルを用いて行いCBBで染色した。分子量マーカーには、phosphorylase B (97.2 kDa)、BSA (66.4 kDa)、ovalbumin (45.0)、carbonic anhydrase (29.0)、trypsin Inhibitor (20.1) 及び lysozyme (14.3)を用いた。

(4)セタシジミにおける冷凍前後の成分変化

汽水域に生息するヤマトシジミと比較するために、淡水域に生息するセタシジミについて、冷凍前後における成分変化を比較した。

4. 研究成果

(1) アコルビン合成酵素活性の測定方法及び反応条件の検討

アコルビン合成酵素活性の測定方法を種々検討した結果、ATP 及び Mg^{2+} 存在下で -Ala と Orn を基質とし、シジミから得られた粗酵素溶液を用いてアコルビンが合成されることを、HPLC を用いて確認した。上記条件下粗酵素溶液を添加し 24 時間で反応させ、1 時間後から 4 時間後の反応液を HPLC に供した結果を図 1 に示した。時間の経過とともにアコルビン含量が増加しており、アコルビンの合成が確認された。なお、加熱処理した粗酵素溶液では同様の反応が認められなかったことから、本反応は酵素的に行われていることが分かった。

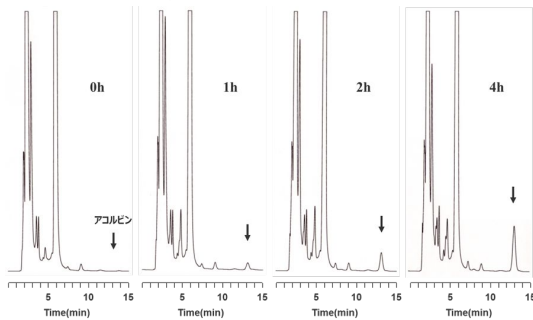


図 1 酵素によるアコルビンの合成

Conditions of HPLC

Column : Mightysil RP-18 GP (5mm) 150 mm × 4.6 mm (Kanto Chemical)

Pump : L-6200 Intelligent Pump (HITACHI)

Mobile phase : 50mM sodium acetate buffer (pH 5.0):methanol:tetrahydrofuran =35:58:7

Flow rate : 1.0 ml/min

Detection : Fluorescence (Ex 340 nm, Em 455 nm)

また、シジミ由来アコルビン合成酵素の反応条件について、ATP 及び Mg^{2+} の要求性を調べた結果、酵素反応にこれらが必須であることが分かった (表 1)。-Ala に替えて -アミノ酸を、Orn の代わりにヒスチジン及びアルギニンを基質として試みたが、合成は認められなかった。また、 Mg^{2+} を Ca^{2+} に替えたところ、反応は進まなかった。本酵素反応はシジミの冷凍処理に関係していることから、酵素反応における至適温度は低温領域にあるのではないかと考えられたが、0 °C ではアコルビンの合成は認められなかった。

表 1 シジミ由来アコルビン合成酵素の反応条件

	区分 I	区分 II	区分 III
β -Ala (20 μ mol/ml)	10 μ l	10 μ l	10 μ l
Orn (20 μ mol/ml)	10 μ l	10 μ l	10 μ l
ATP (20 μ mol/ml)	10 μ l	10 μ l	-
MgCl ₂ (20 μ mol/ml)	10 μ l	-	10 μ l
H ₂ O	-	10 μ l	10 μ l
粗酵素溶液	10 μ l	10 μ l	10 μ l
緩衝液 (pH 7.2)	50 μ l	50 μ l	50 μ l
アコルビン合成 (25°C)	有	無	無

(2) アコルビン合成酵素の分離精製

シジミから調製した粗酵素溶液を DEAE-Sephacel イオン交換クロマトグラフィーに供し、NaCl 濃度勾配により溶出した結果を図 2 に示した。その結果、0.32M NaCl 濃度 (Fr.No.116) にアコルビン合成酵素が溶出した。

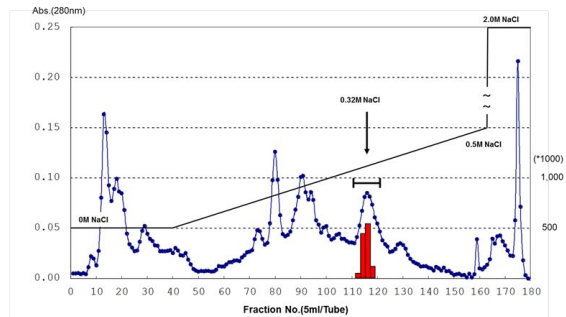


図 2 シジミ由来酵素溶液の DEAE-Sephacel イオン交換クロマトグラフィー

DEAE-Sephacel ion-exchange column (2 × 25 cm) was performed. Elution was carried out with a linear gradient of 0 to 0.5M of NaCl in a 20mM phosphate buffer (pH 7.2) at a flow rate of 30ml/h at 4 °C. Fractions of 5ml were collected. - ● -, 280nm; ■, fraction of acorbine synthesis

DEAE-Sephacel イオン交換クロマトグラフィーにより得られたアコルビン合成酵素活性画分 (Fr.No.116) を、さらに Sephacryl S-300 ゲルクロマトグラフィーに供し、各フラクションのアコルビン合成酵素活性を調べた。その結果、Fr.No.49 にアコルビン合成酵素が溶出することが分かった (図 3)。また、分子量既知の標品の溶出位置 (図 4) から作成した検量線から、分子量は約 190000 と計算された。

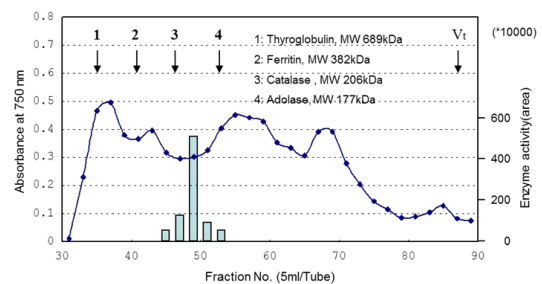


図 3 DEAE-Sephacel イオン交換クロマトグラフィー 酵素活性画分 (Fr.No.116) の Sephacryl S-300 ゲルクロマトグラフィー

Sephacryl S-300 column (2.3 × 118 cm) equilibrated with 0.1M NaCl was performed at 4 °C and eluted with the same solution at a flow rate of 15ml/h at 4 °C. Fractions of 5ml were collected. Column was calibrated with authentic dextrans: 1, MW 689kDa; 2, MW 362kDa; 3, MW 206kDa; 4, MW 177kDa. - ● -, 750nm; ■, fraction of acorbine synthesis

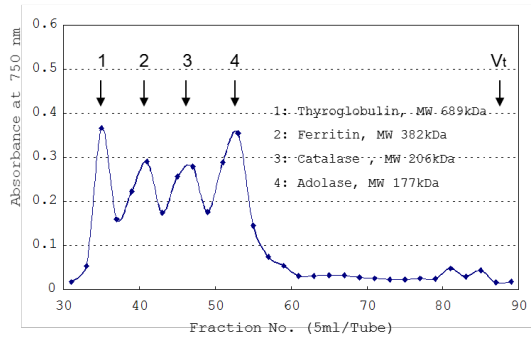


図4 分子量既知標品の Sephacryl S-300 ゲルクロマトグラフィー

(3)SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

Sephacryl S-300 ゲルクロマトグラフィーにおいてアコルビン合成酵素活性が認められた Fr.No.49 を、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供した。その結果、45kD にバンドが観察された(図5)。Sephacryl S-300 ゲルクロマトグラフィーの結果と合わせて考えると、アコルビン合成酵素は分子量約45000 の4 量体と推察された。

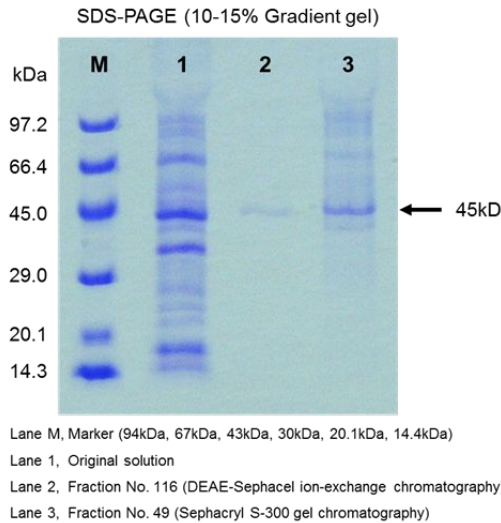


図5 シジミ由来アコルビン合成酵素の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

(4)セタシジミにおける冷凍前後の成分変化

シジミで観察された冷凍による Orn 含量の変化は、ホタテ、アサリ、ハマグリ及びカキには認められなかった。このことから、この現象はシジミに特徴的と考えられた。しかし、今回の試験には汽水域に生息するヤマトシジミを用いたが、ヤマトシジミ以外に淡水に生息するセタシジミが知られている。そこで、セタシジミについて、冷凍前後の成分変化を検討した。その結果、ヤマトシジミに見られた Orn 及び β -Ala の増加がセタシジミには見られなかった(表2)。このことから、アコルビンの分解は、冷凍以外に塩濃度の変化でも起こるのではないかと考えられた。今後、アコルビンの分解と塩濃度との関連について検討していく予定である。

表2 ヤマトシジミ及びセタシジミの冷凍前後におけるアミノ酸組成の変化

アミノ酸	ヤマトシジミ		セタシジミ	
	対照	冷凍処理	対照	冷凍処理
アスパラギン酸	5.0	4.8	3.9	3.4
スレオニン	6.3	6.8	3.7	4.2
セリン	3.9	4.5	3.2	3.5
グルタミン酸	34.6	32.1	15.2	13.7
グリシン	5.1	6.7	7.2	8.5
アラニン	145.6	135.7	47.2	43.5
バリン	5.3	6.1	5.5	5.8
イソロイシン	2.6	3.2	4.7	4.7
ロイシン	3.9	5.2	6.4	7.0
チロシン	1.3	2.0	2.7	3.2
β -アラニン	8.9	31.5	13.5	13.2
フェニルアラニン	1.5	2.4	2.8	3.5
オルニチン	13.3	54.0	25.0	26.5
リジン	2.7	3.4	5.6	5.8
アルギニン	4.7	4.5	8.0	6.7

(nmol/mg of the extract powder)

まとめ

シジミの各保存温度における 20 時間後の生存率を比較検討したところ 4 及び 2 が 100%、0、-2 及び 4 が 93%、90%及び 83%、-6 以下では 0%であった。また-4 保存におけるシジミの生存率においては、12 時間後は 100%、24 時間後は 13%、36 時間以降は 0%であった。一方 24 時間以降は Orn の増加は見られなかった。このことから、冷凍によりシジミが死した後は、Orn は増加せず、生きている状態で生成されるものと推察された。また冷凍によりシジミが死ぬ限界の温度を境にして顕著な Orn の増減が見られ、これはアコルビンの合成と分解が関与していると推察される。本研究において、アコルビン関連酵素に関する基礎的な知見が得られたが、今後は酵素反応がどのようにコントロールされているのか等についてさらに研究を進め、シジミの低温応答メカニズムを解明し、この現象のシジミにおける生理的意味を明らかにすることで、新たな冷凍技術の開発につなげていきたいと考えている(図6)。

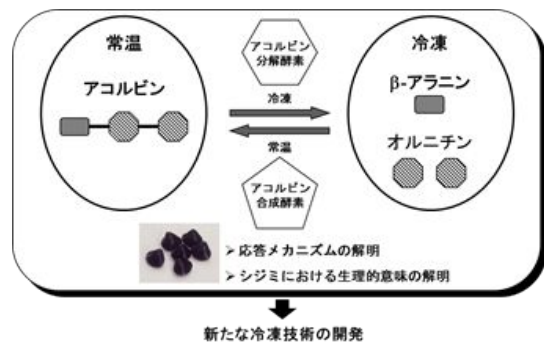


図6 新たな冷凍技術の開発に向けた概念図

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計4件)

- (1) 工藤謙一、温度操作を利用した高付加価値商品の開発、日本食品科学工学会産学官連携シンポジウム、沖縄県宮古合同庁舎講堂、宮古島市、沖縄県、2017年7月19日
- (2) 内沢秀光、工藤謙一、シジミの冷凍によるオルニチン含量の変化、第16回産総研・産技連LS-BT合同研究発表会、産業技術総合研究所つくばセンター、つくば市、茨城県、2017年1月31日
- (3) 工藤謙一、内沢秀光、高橋 匡、竹内 萌、松原 久、温度操作を利用した農水産物の高機能化、日本熱物性シンポジウム2016、岡山大学、岡山市、岡山県、2016年11月29日
- (4) 内沢秀光、工藤謙一、シジミの冷凍とオルニチン含量の変化、2016年度日本冷凍空調学会年次大会、神戸大学、神戸市、兵庫県、2016年9月9日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内沢 秀光 (UCHISAWA, Hidemitsu)
地方独立行政法人青森県産業技術センター・工業部門・室長
研究者番号：10505572

(2) 研究分担者

工藤 謙一 (KUDOH, Ken-ichi)
地方独立行政法人青森県産業技術センター・工業部門・所長
研究者番号：90250232