

平成22年 3月31日現在

研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18580207
 研究課題名（和文） 海水の温暖化に伴う養殖ブリの筋肉白濁現象の発生機構の解明 - 酵素学的アプローチ-
 研究課題名（英文） Studies on mechanism of burnt meat caused by seawater warming in cultured yellowtail(Seriola quinqueradita)-enzymatic approach
 研究代表者
 原 研治 (HARA KENJI)
 長崎大学・水産学部・教授
 研究者番号：10039737

研究成果の概要：

本研究では、やけ肉発生のメカニズムをタンパク質分解の観点からアプローチした。まず、やけ肉モデル魚を作成し、やけ肉魚とコントロールの魚を用いて、魚筋肉の分解を調べた。やけ肉発生に伴い、筋形質画分ではカテプシンB活性が増大することを明らかにした。また、筋原線維タンパク質は新規の筋原線維結合型のメタロプロテアーゼ(MBMP)が働き、これを分解することが明らかとなった。MBMPは新規の酵素であり、この酵素の構造と機能を調べる必要が急務であると考えられた。

Mechanism of burnt meat in cultured yellowtail was studied from the point of view of proteolysis. The degradation of meat proteins of experimentally-modeled burnt meat were analyzed compare to control. Cathepsin B activity was increased with the development of burnt meat in sarcoplasmic fraction. On the contrary, myofibril proteins were degraded by novel myofibril-bound metallo-protease(MBMP). There is an urgent need to clarify the structure and function of MBMP.

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,900,000円	0円	1,900,000円
2007年度	900,000円	270,000円	1,170,000円
2008年度	600,000円	180,000円	780,000円
年度			
年度			
総計	3,400,000円	450,000円	3,850,000円

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：やけ肉・プロテアーゼ・筋原線維タンパク質

1. 研究開始当初の背景

夏季、日本沿岸で漁獲されるマグロなどにしばしばマグロ本体の赤い透明な色調ではなく、灰褐色で不透明な水っぽい「肉質の白濁現象」がみられることがある。このような肉質は“やけ肉”と呼ばれ、食品としての市場

価値を極めて低くしている。

最近の海洋の温暖化による水温の上昇に伴い、特に夏季の養殖ブリにおいてこの“やけ肉”と同様な現象が多発し、生産現場を困らせている。

ブリ養殖は水養殖業界の安定性や地域の発展に寄与した魚類のブランド化など水産業界でも大きなウェートを占めているため、関係業者より早急な発生メカニズム解明とその対策が望まれている。

2. 研究の目的

“やけ肉”の発生機構を解明しその予防策を提示するために、やけ肉モデル魚を作成し、やけ肉を組織化学的、生化学的、特に最新の酵素学的アプローチにより、この発生メカニズムを科学的に解明することを目的とした。

3. 研究の方法

“やけ肉”モデル魚を作成し、筋肉タンパク質の崩壊に関わるプロテアーゼを明らかにした。

養殖ブリ一年魚を15℃～30℃に至る種々の飼育水温で馴致する。その君知したブリを苦悶（苦悶時間等を変化させる）、延髄刺殺、神経抜（脊髓破壊）、温度差による致死（スラリーアイス等）など種々の致死条件で死に至らしめ多後、種々の保存温度で保存し、経時的に筋肉のやけの程度を色差計を用いてやけの程度を検討する。

上記の致死条件の異なる養殖ブリを種々の保存温度で保存し、経時的に筋肉中のATP関連化合物及びグリコーゲン、乳酸含量、pHの生化学的変化を経時的に測定し検討する。筋肉の崩壊をSDS-PAGEで調べ、プロテアーゼ阻害剤を用い崩壊に関わるプロテアーゼを推定する。

4. 研究成果（論文投稿中につき図表は省略）

(1) “やけ肉”モデル魚作成条件を検討した。その結果、やけ肉の指標であるL*が55以上は30℃苦悶死させた魚体では1時間、30℃延髄破壊死では2時間、13℃苦悶死では4時間で到達した。一方、13℃延髄破壊死では“やけ”は起こらなかった(Fig. 1)。また、4時間後の破断強度はコ

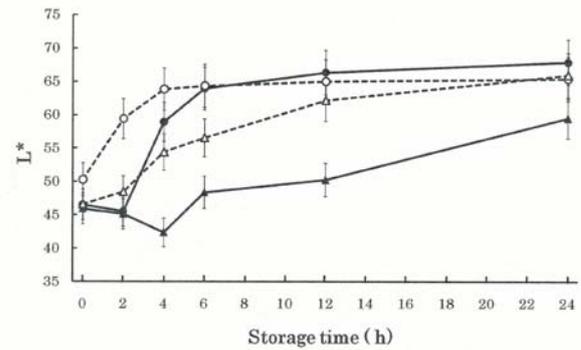


Fig. 1 Changes in lightness L* on yellowtail ordinary muscle from two temperatures and slaughter methods, during storage at 30 °C; mean ± standard deviation (SD) (n= 3), SCD 30 °C (●), SA 30 °C (○), SCD 17 °C (▲), SA 17 °C (△).

ントロールの200-400g/cm²であるのに対し、やけ肉では70g/cm²であった。2時間後の圧出水分量はコントロールの13%に対し、やけ肉では38%であった。2時間後の筋肉pHはやけ肉では乳酸量に呼応し5.6に低下した。細胞周囲の面積がコントロールの16%に比べ、やけ肉では40%と増加していた。これらの変化は脊髓破壊死に比べ苦悶死させた魚の方が大きかった。

(2) “やけ肉”モデル魚の筋肉特性を筋肉タンパク質の崩壊とそれに関わるプロテアーゼを測定した。

9月（やけ肉）と2月（コントロール）に養殖場で飼育した養殖ブリ二年魚を脊髓破壊（即殺）と苦悶死で致死させた。それらの筋肉を30℃で保存し、経時的に背部普通筋を採肉して、感覚色度、圧出水分、pHを測定し、やけ肉を判定した。それらの魚体から筋原線維タンパク質及びコラーゲンを調製しSDS-PAGEにて分解の度合いを調べた。同時にカテプシンやコラゲナーゼ活性を測定し、やけ肉へのプロテアーゼの関わりを調べた。

その結果、夏季のブリは致死方法を問わず30℃での保存期間中、4時間以内にやけ肉が発生することが明らかとなった。一方、冬期の苦悶死のブリでは6時間程度、即殺ブリでは24時間でやけ肉が発生することが分かった。つまり、や

け肉発生には養殖場の水温と致死条件が大きく関わる事が明らかとなった。

(3) 筋原線維タンパク質は、夏季即殺ブリは保存 4 時間から、苦悶ブリでは 2 時間から分解が増加した。筋原線維タンパク質の分解とやけ肉発生は呼応していた。一方、冬期ブリでは顕著な変化は認められなかった。筋原線維タンパク質の分解はカテプシンによる可能性が考えられたため、次に、これらのプロテアーゼ活性を測定した。その結果、予想に反し、夏季のやけ肉ブリのカテプシンB 及び L 活性は冬期のブリに比べ低かった。しかしながらカテプシンB 活性はカテプシンL 活性より4倍高く、ブリ筋肉ではカテプシンBが主要な酵素であることがわかった。

(4) このモデル魚とコントロール魚を用い、養殖ブリのやけ肉発生に伴う筋肉タンパク質の分解（品質低下）機構をプロテアーゼの観点から、再度アプローチした。すなわち、やけ肉モデル魚及びコントロール魚の筋肉、特に筋原線維タンパク質の分解をSDS-PAGEで解析した。その結果、やけ肉が起こったブリの筋原線維、特にミオシン重鎖がやけ肉の進行と共に分解していることがわかった。

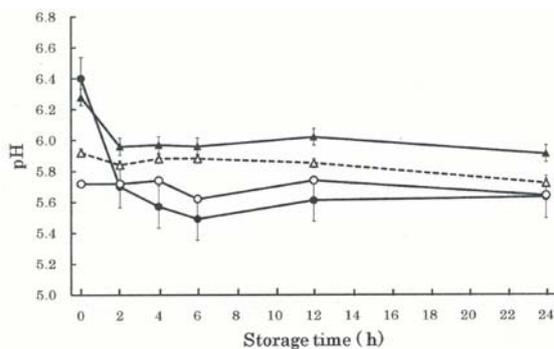


Fig. 2 Changes in pH on yellowtail ordinary muscle from two temperatures and slaughter methods, during storage at 30 °C; mean \pm standard deviation (SD) (n=3), SCD 30 °C (●), SA 30 °C (○), SCD 17 °C (▲), SA 17 °C (△).

やけ肉モデル魚では魚肉の pH が酸性 (pH5.5-6.0) になることから (Fig. 2)、この pH で筋肉タンパク質の自己消化に関わると考えら

れるカテプシンB及びカテプシンL活性を調べた。その結果、やけ肉中のカテプシンB活性はコントロールに比べ上昇したが、4時間後以降、徐々に減少した。この減少の原因としては、保存中に溶出するドリップ中に酵素活性が認められることから、ドリップと共に酵素も溶出していることが考えられた。一方、カテプシンL活性は、やはりカテプシンBに比べかなり低く、やけ肉とコントロールの間に差は見られなかった。

(5) 上記で述べたように、やけ肉では筋原線維タンパク質の分解、特にミオシン重鎖が分解していることから、筋原線維結合型の酵素活性をSDS-PAGEにより測定した。その結果、やけ肉筋原線維タンパク質の分解はEDTAなどのメタロプロテアーゼインヒビターで阻害された。このことより、新規の筋原線維結合型のメタロプロテアーゼ (MBMP) が存在し、このプロテアーゼがやけ肉発生に伴い筋原線維タンパク質を分解していることが明らかとなった (Fig. 3)。今後、この新規プロテアーゼ (MBMP) に関する研究が急務である。

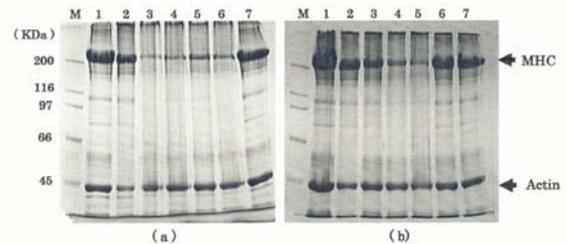


Fig. 3 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (8 % gels) analysis of the inhibitory effect of protease inhibitors on degradation of myofibrillar proteins from yellowtail in summer (a) and winter (b). Myofibrils were dissolved in 50 mM acetic acid-sodium acetate buffer (pH 5.8) and Pefabloc SC to the final concentration of 5 mM; E-64 to 0.01 mM; Pepstatin A to 0.01 mM; EDTA to 5 mM, respectively, incubated at 30 °C for 12 h. Lanes: M, high range; (1), non-incubated control; (2), incubated with distilled water; (3), control; (4), pefabloc SC; (5), E-64; (6), pepstatin A; (7), EDTA. Arrowheads indicate the positions of myosin heavy chain (MHC) and actin.

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)

[雑誌論文] (計 0 件)

(現在登校中)

[学会発表] (計 3 件)

- ① Xiao Liang, Asami Yoshida, Kiyoshi Osatomi, Kenji Hara. Studies on proteases in cultured yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) burnt meat. *The 7th International Workshop on the Oceanography and Fisheries Science of the East China Sea*, Shanghai, China (Dec. 2009)
- ② Xiao Liang, Asami Yoshida, Kiyoshi Osatomi, Kenji Hara. Studies on proteases in cultured yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) burnt meat. *The 10th Joint International Symposium between Pukyong National University and Nagasaki University*, Busan, Korea (Oct. 2009)
- ③ 梁簫, 吉田朝美, 長富潔, 原研治. 養殖ハマチヤケ肉中のプロテアーゼに関する研究. 平成 21 年度日本水産学会春季大会, 東京, 2009 年 3 月

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原 研治 (HARA KENJI)

長崎大学・水産学部・教授

10039737

(2) 研究分担者

橘 勝康 (TACHIBANA KATSUYASU)

長崎大学・水産学部・教授

20171712

長富 潔 (OSATOMI KIYOSHI)

長崎大学・水産学部・教授

40253702

濱田 友貴 (HAMADA YUKI)

長崎大学・水産学部・准教授

90380831

(3) 連携研究者