

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05909

研究課題名（和文）地球温暖化で需要高まるイトヨリダイすり身の品質劣化誘発因子の同定と高品質化

研究課題名（英文）Quality improvement of the threadfin bream surimi: Identification and characterization of the major factor for its quality loss

研究代表者

吉田 朝美 (Yoshida, Asami)

長崎大学・水産・環境科学総合研究科（水産）・准教授

研究者番号：80589870

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：スケトウダラに代わるすり身原料魚として期待されるイトヨリダイすり身の高品質化及び安定供給を目指して、本研究では、その劣化現象「戻り」の誘発因子の特定及びその抑制方法について検討した。イトヨリダイの戻り現象は、本来消化に関与するSSP (sarcoplasmic serine proteinase) が、魚体の保存中に内臓から腹部筋に漏出することで誘引されることを明らかにした。SSPの酵素活性は腹部筋において生殖腺発達期に高かったが、腹部筋を除いて製造したすり身では一年通して品質は安定していた。更に、トリプシン阻害剤を含有する大豆タンパク質を添加することで、戻り抑制効果が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、イトヨリダイの戻り誘発因子の特定、大豆タンパク質のすり身高品質化技術への応用可能性を明らかにした。近年、急速に発展してきた遺伝子解析技術により、これまで謎であったイトヨリダイの戻り誘発因子を特定した。さらに、特定した戻り誘発因子の抑制因子（プロテアーゼ阻害剤）を含む大豆タンパク質（大豆油製造工程中の副産物）に着目し、すり身の高品質化技術を検討した。大豆タンパク質を水産加工品の製造へ応用することは食品廃棄物の有効利用となるため、食品ロスの低減にも寄与できる。また、魚肉ねり製品の安定供給を実現する本研究成果は、世界の食料問題のうち特に“タンパク質危機”の解決への貢献も期待される。

研究成果の概要（英文）：Threadfin bream is a promising raw material of surimi-based products instead of Alaska Pollock. In this study, for quality improvement and sustainable supply of threadfin bream surimi, the mechanism of gel weakening “modori phenomenon” was investigated and the suppression method for it was considered. We found that the main working proteinase responsible for the modori phenomenon of the threadfin bream was a sarcoplasmic serine proteinase (SSP), which may have leaked from the viscera into the belly muscle during post-harvest storage. SSP only leaked into the belly muscle and not into the normal muscle. The surimi gels prepared from only the normal muscle were very stable in quality through a whole year. Moreover, the addition of the soybean proteins including the trypsin inhibitor can suppress the modori phenomenon and improve the quality of threadfin bream surimi.

研究分野：水圏生化学

キーワード：セリンプロテアーゼ イトヨリダイ すり身 トリプシン cDNAクローニング 大豆タンパク質

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

魚肉ねり製品(かまぼこ)は、900年前から日本に存在する元祖ファストフードで、今では民族を超えて好まれる世界的な水産加工食品である。原料の冷凍すり身は魚肉を水に晒して洗浄・脱水し、冷凍変性抑制剤を添加して冷凍したもので、現在、世界で年間約80万トンが生産されている。これに食塩を加えて混合することで不溶性だった筋原線維タンパク質が溶け出し、加熱によりゲル化して独特の食感のかまぼこができる。一方、加熱工程で50~70の温度帯を緩やかに通過すると、タンパク質分解酵素(プロテアーゼ)が活性化し、30~40で一旦形成されたゲル(坐りゲル)が崩壊する品質劣化現象(戻り)が誘発される。現在、戻りに対して、すり身の洗浄工程によるプロテアーゼの除去、プロテアーゼ阻害剤を含む卵白や牛血漿を添加する等の対策がとられているが、前者はプロテアーゼ種によっては除去できない、後者は卵アレルギーや狂牛病の問題から対策は不十分である。

すり身原料魚であるイトヨリダイは、古くから戻り誘発因子について研究され、ミオシン分解能をもつプロテアーゼや戻り誘発プロテアーゼ MIP (*modori-inducing proteinase*) が報告されていたが、何れも同定には至っていなかった。近年、我々は、イトヨリダイの戻り誘発因子がトリプシンに類似の可溶性セリンプロテアーゼ SSP (*sarcoplasmic serine proteinase*) であることを発見した (Food Chemistry, 284, 198-204, 2019) が、その全一次構造や由来は未解明のままである。

### 2. 研究の目的

本研究では、遺伝子解析技術を用いて、イトヨリダイ戻り誘発因子を同定し、その構造・性状も明らかにする。さらに、得られた情報を基に、その抑制因子を含みかつ安全性の高い大豆タンパク質を用いたすり身の高品質化技術の開発を目指す。

### 3. 研究の方法

#### (1) イトヨリダイ戻り誘発因子 SSP の由来の解明

イトヨリダイ腹部筋(腹身)と背部筋、肝臓の SSP 活性について、ゼラチンゼイモグラフィ法を用いて測定した。さらに、各組織における SSP 遺伝子の mRNA 発現量もリアルタイム定量 PCR 法により調べた。

#### (2) 戻り誘発因子 SSP の cDNA クローニングによる全一次構造の解明・同定

先行研究で明らかにした SSP の部分アミノ酸配列(22アミノ酸残基)の情報を基にして設計したプライマーと、イトヨリダイ肝臓から抽出した全 RNA を用いて、RT-PCR 法及び RACE 法により SSP 遺伝子を増幅した。増幅 DNA 断片を TA クローニングし、サイクルシーケンス法により SSP cDNA の全塩基配列を決定した。

#### (3) 戻り誘発因子 SSP の高発現時期の特定

周年を通してイトヨリダイを入手し、リアルタイム定量 PCR 法を用いて肝臓における SSP mRNA 発現量を測定し、腹部筋における SSP の酵素活性を蛍光合成基質 Boc-Val-Pro-Arg-MCA を用いて測定した。これらを比較することで、SSP の高発現時期を特定した。

#### (4) 大豆タンパク質添加による冷凍すり身の高品質化技術の開発

戻り誘発因子 SSP の活性が高いイトヨリダイすり身を手入れし、Kunitz 型トリプシン阻害剤を含有する大豆タンパク質(脱脂大豆粉)を添加して戻りゲルを作製した(70°C加熱)。脱脂大豆粉添加により戻りゲルの物性が向上するかを確認することで、イトヨリダイすり身に対する戻り抑制効果を検証した。

#### 4. 研究成果

##### (1) イトヨリダイ戻り誘発因子 SSP の由来の解明

各組織の SSP mRNA の発現量を調べた結果、SSP mRNA は消化器官、特に肝臓で高く発現していたが、筋肉では発現がみられなかった (図 1A)。また、SSP 酵素活性は、筋肉では 72 時間氷蔵後の腹部筋のみで認められた (図 1B)。従って、元々肝臓で合成され消化器官に分泌されてはたらく SSP は、イトヨリダイを漁獲後そのまま保存すると内臓から腹部筋中に漏出することが明らかになった。

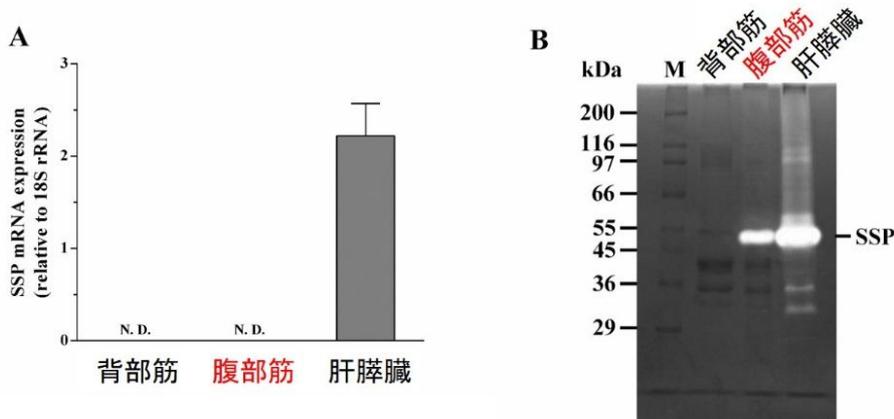


図 1 イトヨリダイ SSP の mRNA 発現量 (A) と酵素活性の組織局在 (B)

##### (2) 戻り誘発因子 SSP の cDNA クローニングによる全一次構造の解明・同定

イトヨリダイ肝臓より全 RNA を抽出精製して SSP の cDNA クローニングを行い、全塩基配列 (859 bp) を決定した。SSP cDNA の ORF は 726 bp であり、241 アミノ酸残基がコードされていた (図 2)。SSP cDNA の推定アミノ酸配列は、精製酵素の N 末端配列 22 残基と完全に一致し、BLASTp 解析において、魚類トリプシノーゲンと 75~87% の高い相同性を示した。精製酵素の性状解析によりホモダイマーであることが明らかになっていることから、イトヨリダイ SSP は新規のトリプシンであることがわかった。

```

1      GATCGACAGGATCACTCAGCAACCATGAGGTGTCTGGTCTTTCGTTCTGCTCATCGGAGCTGCCTTTGCCTTTGAC
1      M R C L V F V L L I G A A F A F D
76     GACGACAAGATCGTCCGAGGGTATGAGTGCCAGCCCTACTCTCAGGCCATCAGGTGTCTCTGAAGTCTGGTTAC
18     D D K I V G G Y E C Q P Y S Q A H Q V S L N S G Y
151    CACTTCTGTGGAGGCTCCCTGGTCAACGAGAAGTGGTGTGTCTGCTGCTCACTGCTACAAGTCCCGTGTGAG
43     H F C G G S L V N E N W V V S A A H C Y K S R V E
226    GTGCGTCTCGGAGAGCAGCAGATCTCTTACAGGGAGGGTAACGAGCAGTTCATCTCCTCTGAGCGCGTCAATCCGT
68     V R L G E H D I S Y R E G N E Q F I S S E R V I R
301    TACCCCTATTACGACTCCTGGAACATCGACAATGACATCATGTGATCAAGCTGAGCAAGCCCGACCTCAAC
93     Y P Y Y D S W N I D N D I M L I K L S K P A T L *
376    CAGTACGTTAAGGCCGTGGCTCTGCCCACCAGCTGTGCCCCCGCTGGCACCATGTGCTTAGTCTCTGGCTGGGGC
118    Q Y V K A V A L P T S C A P A G T M C L V S G W G
451    AACACCATGAGCTCTGTGACGGTGACAGGCTGCAGTGCCTGGACCTCCCATCTGTCCGACAGGGATTGTCAG
143    N T M S S V S G D R L Q C L D L P I L S D R D C Q
526    AACGCCTACCCCGCATGATCACCGAGTCCATGTTCTGCGCTGGATACCTGGAGGGAGGCAAGGATTCTTGCCAG
168    N A Y P G M I T E S M F C A G Y L E G G K D S C Q
601    GGTGACTCTGGTGGCCCGTCTGTGCAACGGTGAGCTGCAGGGTGTGTGTCTGGGGATACGGATGTGCTGAG
193    G D S G G P V V C N G E L Q G V V S W G Y G C A E
676    AGGGACCACCTGGTGTCTACGCCAAGGTCTGCCTCTCAACCAGTGGCTGACTGAGACCATGGCCAGTATTA
218    R D H P G V Y A K V C L F N Q W L T E T M A S Y *
751    GTGATTCAAACAACAGTCTGTCAAGCAGCTCAACACCATTTGCGTTTATTCCATCTTCTACTGGACAGTGT
826    GATGAATAAACCATTTAGAGCAAAAAAAAAAAAAA

```

図 2 イトヨリダイ SSP cDNA の全塩基配列 (上段) と推定アミノ酸配列 (下段) 下線: シグナルペプチド, 破線: 活性化配列, 黒色背景・白色文字: 精製酵素の N 末端アミノ酸配列, 囲み文字: 活性化基

(3) 戻り誘発因子 SSP の高発現時期の特定

イトヨリダイの戻り誘発因子 SSP の mRNA 量及び酵素活性の周年変化を調べた。その結果、肝臓における mRNA 量は周年で変動しなかったのに対して、腹部筋において生殖腺発達期である 3 月～5 月に高い活性が検出された (図 3)。よって、生殖腺発達期における魚体保存中の SSP の腹部筋への漏出は、摂餌量の増加による消化管体積及び生殖腺体積の増加、消化酵素としての SSP の活性化亢進に起因することが推察された。一方、腹部筋を除いた冷凍すり身のゲル形成能は一年を通して安定していたことから、腹部筋の除去により、高品質のイトヨリダイ冷凍すり身が周年生産可能であることがわかった。

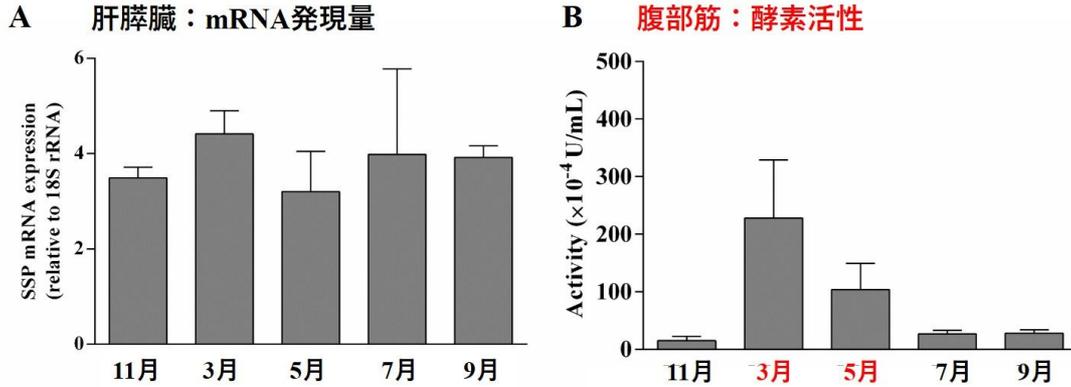


図 3 イトヨリダイ肝臓における SSP mRNA 発現量 (A) 及び腹部筋における SSP 酵素活性 (B) の周年変化

(4) 大豆タンパク質添加による冷凍すり身の高品質化技術の開発

高濃度の脱脂大豆粉の添加では白度の低下が見られた。一方、低濃度の脱脂大豆粉 (すり身 1 kg に対して 1 g) を添加した場合、白度の低下は見られず、物性は向上した (図 4)。以上の結果より、脱脂大豆粉は 1 g/ kg から添加効果があり、イトヨリダイ冷凍すり身の品質向上のための添加剤として適当であることが示唆された。

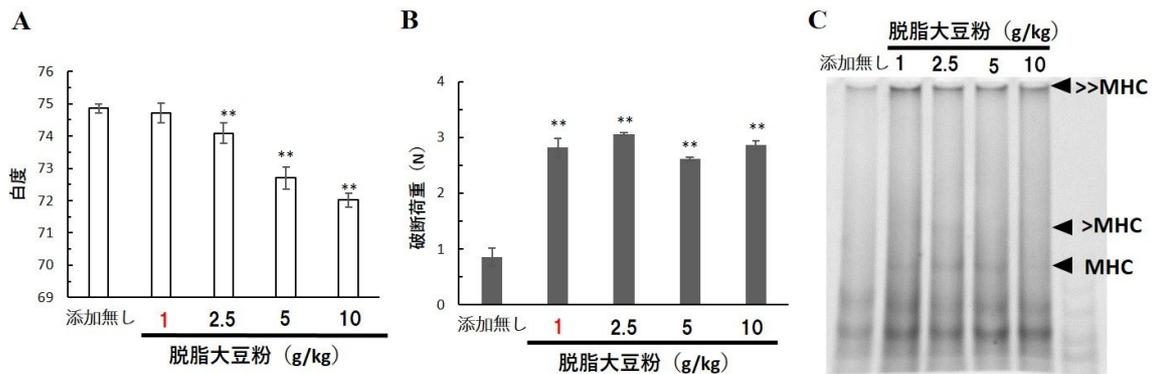


図 4 イトヨリダイ冷凍すり身の戻りゲルに及ぼす脱脂大豆粉の添加効果の検証  
A: 加熱ゲルの白度, B: 加熱ゲルの破断荷重, C: 加熱ゲルの SDS-PAGE パターン.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Jin-Yang Liu, Asami Yoshida, Yi-Li Gao, Kazuya Shirota, Yasuhiko Shiina, Kiyoshi Osatomi	4. 巻 330
2. 論文標題 Identification of a modori-inducing proteinase in the threadfin bream: Molecular cloning, tissue distribution and proteinase leakage from viscera during ice storage.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Food Chemistry	6. 最初と最後の頁 127246
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.foodchem.2020.127246	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Jin-Yang Liu, Asami Yoshida, Yi-Li Gao, Kazuya Shirota, Yasuhiko Shiina, Kiyoshi Osatomi	4. 巻 86
2. 論文標題 Degradation of myofibrillar proteins in the belly muscle of the threadfin bream is caused by the possible leaking of soluble serine proteinase from the viscera during storage.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Fisheries Science	6. 最初と最後の頁 407-414
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12562-019-01398-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yi-Li Gao, Asami Yoshida, Shinnosuke Maeda, Jin-Yang Liu, Yan-Rong Jiang, Xiao-Mi Sun, Chao-Ping Chen, Yajun Wang, Tetsuhiko Okajima and Kiyoshi Osatomi
2. 発表標題 The quality improvement of threadfin bream ( <i>Nemipterus virgatus</i> ) surimi-gel with soy protein as a natural food additive.
3. 学会等名 EAFTA 2021（国際学会）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	長富 潔  (Osatomi Kiyoshi)  (40253702)	長崎大学・水産・環境科学総合研究科（水産）・教授    (17301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------