魚肉水溶性画分のプロテアーゼ阻害活性並びに スケトウダラ冷凍すり身の戻り抑制効果

下元 哲,¹ 野村 明,¹ 北村有里,¹ 伊藤慶明^{2*}

(2004年12月6日受付, 2005年7月25日受理)

¹高知県工業技術センター, ²高知大学農学部栽培漁業学科

The inhibition to serine and cysteine type proteases and the suppression of modori in walleye pollack salt meat paste by sarcoplasmic protein from various fish meats

TETSU SHIMOMOTO,¹ AKIRA NOMURA,¹ YURI KITAMURA¹ AND YOSHIAKI ITOH^{2*}

¹Kochi Prefectural Industrial Technology Center, Nunoshida, Kochi 781-5105, ²Department of Aquaculture, Faculty of Agriculture, Kochi University, Nankoku, Kochi 783-8502, Japan

The fish (five species of surface fish and five species of bottom fish) caught off Kochi Prefecture were used for preparing the sarcoplasmic proteins. These were fractionated with ammonium sulfate. Inhibiting ability of each fraction to serine protease and cysteine protease was examined. The 50-60% saturated fraction (Sp-60) in all species showed inhibition to serine protease and that in six species to cysteine protease. In order to examine the inhibitory effect of Sp-60 on modori and protein molecular behavior around 40°C, Sp-60 was added to walleye pollack frozen surimi gels. Sp-60 from every fish species except spotted-tail grinner inhibited modori and degradation of myosin heavy chain, though the inhibiting degree varied with species. Sp-60 of bottom fish, especially of redbanded searobin and longwing searobin, was more effective than that of surface fish.

キーワード：システインプロテアーゼ, 水溶性タンパク質, セリンプロテアーゼ, プロテアーゼインヒビター, 戻り

ねり製品の原料として生鮮魚を用いる場合, その挽肉を冷水で洗浄する水晒しが一般に行われるので, 著者ら¹⁾は先に土佐湾沿岸魚の無晒肉及び晒肉の塩すり身のゲル形成特性を調べた。その結果, それらの魚種は戻りの発現形式に基づいて4グループ(I~IV型魚)に大別でき, このうちIV型魚としたグループは水晒しによって40°C付近でミオシン重鎖(HC)の分解を伴った戻りが誘発される魚種である。この戻りは魚肉の水溶性タンパク質画分(Sp-p)を添加することによって抑制され, 特にSp-pの硫安50-60%飽和画分には強い抑制効果が認められ,²⁾ HC分解抑制因子としてセリンプロテアーゼインヒビターが確認された。^{2,3)} また, 魚肉中にはセリンプロテアーゼだけでなく, システインプロテアーゼも存在することが報告されている^{4,5)}が, Sp-p中のシステインプロテアーゼインヒビターの魚種間分布はこれまで調べられていない。

そこで, 本研究ではセリンプロテアーゼインヒビター

とともにシステインプロテアーゼインヒビターの魚種間分布を知るため, 高知県沿岸魚10種についてそれぞれの魚肉からSp-pを抽出して, 硫安分画し, 各飽和画分のセリン及びシステイン両プロテアーゼに対する阻害活性を調べた。また, プロテアーゼ阻害画分の実用的な効果をさぐるため, これをスケトウダラ冷凍すり身に添加し, 戻り並びにミオシン重鎖分解に対する抑制効果を検討した。

実験方法

供試魚 表層魚としてシイラ Dolphinfin *Coryphaena hippurus*, ヤマトカマス Japanese barracuda *Sphyrna japonica*, マルソウダ Round frigate mackerel *Auxis rochei*, カツオ Skipjack tuna *Katsuwonus pelamis* 及びキハダ Yellowfin tuna *Thunnus albacares* を, 底棲魚としてマエソ Spotted-tail grinner *Saurida undosquamis*, トゲカナガシラ Longwing searobin *Lepidotrigla japonica*,

カナド Redbanded searobin *Lepidotrigla guentheri*, アカムツ Blackthroat seaperch *Doederleinia berycoides* 並びに マツバゴチ Thorny flathead *Rogadius asper* を用いた。これらの魚種はいずれも硬直初期のものを供試した。

Sp-p の調製及び硫酸分画 普通肉挽肉 145 g に 2 倍量の 50 mM リン酸緩衝液 (pH 6.8) を添加し、ポリトロノホモジナイザー (KINEMATICA 社製) でホモジナイズ (Speed6, 1 分) した後、遠心分離し、得られた上澄液を綿ろ過して Sp-p とした。この得られた Sp-p 全量に硫酸アンモニウム (硫酸) を溶解し、30%–80% 飽和の間で 10% 間隔に分画し、各沈殿を回収した。本報告では、例えば 50–60% 飽和画分で沈殿する画分を Sp-60 のように、飽和度の高い数字をつけて呼ぶこととした。この沈殿を少量の冷蒸留水に溶解し、透析チューブ (透過分子量約 14,000, 三光純薬株式会社製) に充填したのち、蒸留水に透析して硫酸を除去し、最終容量 15 mL にあわせ各飽和画分の試料とした。

セリン及びシステインプロテアーゼ活性の測定 セリンプロテアーゼインヒビターの存在が報告³⁾されているが、今回はシステインプロテアーゼインヒビターの分布についても調べるため、セリンプロテアーゼとしてトリプシン (15900 units/mg BAEE 和光純薬工業製) を、合成基質として Benzoyl-L-arginine ethylester (BAEE; ペプチド研究所製) を使用し、Travis ら⁶⁾の方法に準じて活性を測定した。50 μ L のトリプシン溶液 (20 μ g/mL), 100 μ L の 10 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) 及び 100 μ L の試料 (各飽和画分) を混合し、37 $^{\circ}$ C で 5 分間予備加熱したのち、125 μ L の BAEE (6.66 mg/mL) を添加して反応を開始し、10 分後に 60% 酢酸 37.5 μ L を添加して反応を停止した。これを 10,800 $\times$ g で 20 分間遠心分離し、酵素反応により合成基質から遊離したエステルを高速液体クロマトグラフィー {HPLC; C8 カラム (3.9 $\times$ 150 mm), 溶出液 (0.1% トリフルオロ酢酸を含むアセトニトリル, 濃度勾配 0–63%), 流速 1.0 mL/min} を用い、波長 253 nm でモニタリングしながら測定した。各飽和画分の代わりに蒸留水を添加したものをコントロールとし、その時遊離した加水分解物のピークエリアを 100 とし、各飽和画分を添加した時の加水分解物のピークエリアの減少率から阻害率を算出した。

システインプロテアーゼについては、活性中心の近傍アミノ酸配列がいずれのシステインプロテアーゼも似ているので、代表的なパパイン (30000 USP units/mg Merck 社製) を用いた。合成基質としては Benzoyl-D,L-arginine-p-nitroanilide (BAPA; ペプチド研製) を使用し、Arnon⁷⁾の方法に準じて活性を測定した。遊離してきた p-nitroanilide をトリプシンの場合と同様に HPLC を用い 410 nm でモニタリングしながら測定

し、先と同様に阻害率を求めた。また、反応液中のトリプシン活性 (15.9 units) およびパパイン活性 (1500 units) に阻害率を掛け、添加した Sp-60 のタンパク質量で除した値を阻害比活性として units/mg で示した。

加熱ゲルの調製, ゲル強度の測定及び SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) 加熱ゲルは既報¹⁾に従った。Sp-p はすり身の水分を調整する蒸留水と同じ量 (11.25 mL) を添加した。ゲル強度の測定は志水ら⁸⁾の方法に従った。SDS-PAGE は Laemmli⁹⁾の方法に準じて行った。SDS-PAGE 像のデンストメトリーは島津二波長クロマトスキャナ CS-930 を用い、波長 640 nm で行った。

スケトウダラ冷凍すり身に内在するプロテアーゼのタイプ インヒビターそれぞれの添加量及び方法は既報⁵⁾に準じた。すなわち、Table 1 に示したプロテアーゼインヒビターを水分調整のために加える蒸留水に溶解し、C 級スケトウダラ塩すり身に添加し、40 $^{\circ}$ C で 2 時間加熱して HC 分解に対する抑制効果を調べ、すり身中の戻り誘発プロテアーゼのタイプを確認した。

実験結果

Sp-p の硫酸各種飽和画分のトリプシン及びパパインに対する阻害 10 魚種から調製した Sp-p の各硫酸飽和画分のトリプシン及びパパインに対する阻害活性を Fig. 1 に示した。トリプシンに対してマイナスの阻害活性として表されている 30–40% 飽和画分には、トリプシン活性が認められることを示している。阻害活性は全ての魚種の 50% 飽和以上の画分に認められ、特に 50–60% 飽和沈殿画分 (Sp-60) で強く認められた。一方、パパインを用いた解析ではマイナスの阻害活性、すなわちパパイン活性が広い範囲で認められた。全般にパパインに対する阻害活性はトリプシンに対するものより小さかったが、マルソウダ、キハダ、ヤマトカマス、シイラ、カツオ、トゲカナガシラ、カナド、マツバゴチで認められた。しかし、マエソ、アカムツではいずれの飽和画分にも認められなかった。また、阻害が認められる硫酸飽和濃度は魚種によって異なっていた。マルソウダ、キハダ、ヤマトカマス、シイラ、トゲカナガシラ、カナドでは Sp-60 にトリプシン及びパパイン両プロテアーゼの阻害が認められた。

Sp-60 画分はトリプシンに対しては全ての魚種で強い阻害が認められ、パパインに対しても 10 魚種中 6 魚種で認められたので、阻害の強さを、タンパク質 1 mg 当たりの阻害比活性として求め、Fig. 2 に示した。カツオ、アカムツ、マツバゴチのトリプシン阻害比活性は 3.1–3.8 units/mg で他の魚種に比べて高かったが、パパインに対しての阻害は認められなかった。マルソウダ、キハダ、ヤマトカマス、シイラ、トゲカナガシラ及

Fig. 1 Inhibiting ratio of the fractions separated by ammonium sulfate from sarcoplasmic protein of various fish to serine protease and cysteine protease. Sarcoplasmic protein was extracted with 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.8). Each precipitate of ammonium sulfate fractionation was solubilized with distilled water and dialyzed against distilled water overnight and adjusted to 15 ml in volume. Serine protease inhibiting activity was estimated through the inhibition against trypsin activity to Bz-Arg-OEt (pH 8.0). Cysteine protease inhibiting activity was estimated through the inhibition against papain activity to Bz-DL-Arg-pNA (pH 7.5).

Fig. 2 Inhibiting specific activity of the precipitation of 60% saturation fraction of ammonium sulfate of sarcoplasmic protein (Sp-60) prepared from 10 fish species against serine protease and cysteine protease. Inhibiting specific activity of serine protease inhibitor (units/mg) was obtained by the equation: $15.9 \text{ units (Trypsin activity in reaction mixture)} \times \text{serine protease inhibiting ratio/protein amount (mg)}$. Inhibiting specific activity of cysteine protease inhibitor (units/mg) was obtained by the equation: $1500 \text{ units (Papain activity in reaction mixture)} \times \text{cysteine protease inhibiting ratio/protein amount (mg)}$. ①, round frigate mackerel; ②, yellowfin tuna; ③, Japanese barracuda; ④, dolphinfish; ⑤, skipjack tuna; ⑥, longwing searobin; ⑦, spotted-tail grinner; ⑧, redbanded searobin; ⑨, blackthroat seaperch; ⑩, thorny flathead.

びカナダが両プロテアーゼを阻害し、中でもシイラ、トゲカナガシラ、カナダのパパイン阻害比活性は 64~84 units/g で他の魚種に比べて強かった。

スケトウダラ冷凍すり身中の HC 分解に関与するプロテアーゼのタイプ スケトウダラ冷凍すり身中のプロテアーゼの存在については劉ら^{10,11)}が、セリン及びシステイン両プロテアーゼインヒビターを同時に添加すると、それぞれを単独で添加するよりも HC の分解を抑制することから、HC の分解に両プロテアーゼが関与していることを認めている。そこで今回供試したスケトウダラ冷凍すり身中の HC 分解に関与するプロテアーゼのタイプを再確認するため、セリンプロテアーゼインヒビターである大豆トリプシンインヒビター (STI)、システインプロテアーゼインヒビターである N-エチルマレイミド (NEM) 並びに L-trans-エポキシスクリニルロイシルアミド-4-グアニジドブタン (E-64)、両プロテアーゼインヒビターであるアンチパイン (AP)、ロイプチン (LP)、及び金属プロテアーゼインヒビターであるエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) を Table 1 に示した割合で添加して塩すり身を調製し、40℃ 2 時間加熱したのち SDS-PAGE により解析を行なった。各インヒビターを添加した 40℃ 2 時間加熱ゲルの SDS-PAGE のデンストメトリーの結果から HC 量を求め、未加熱の HC 量を 100% として、それに対する 2 時間加熱の残存 HC 量比を HC 分解抑制効果として表した。その結果、Fig. 3 に示したようにインヒビター無添加の加熱ゲルは

Table 1 Protease Inhibitors and their amounts used in the experiment

Inhibitors	Type of protease inhibitors	Amount (per g of meat)
STI	Serine	800 μg (0.04 μM)
AP	Serine and cysteine	800 μg (1.32 μM)
LP	Serine and cysteine	800 μg (1.68 μM)
NEM	Cysteine	5 mg (39.9 μM)
E-64	Cysteine	14 mg (39.2 μM)
EDTA	Metal	3.6 mg (12.3 μM)

STI, Soybean trypsin inhibitor (Nacalai Tesque, Inc.); AP, Antipain (Peptide Institute, Inc.); LP, Leupeptin (Peptide Institute, Inc.); NEM, N-ethylmaleimide (Sigma Chemical Co.); E-64, L-trans-epoxysuccinyl-leucylamido-(4-guanidino butane) (Peptide Institute, Inc.); EDTA, dl-Sodium dihydrogen ethylenediamine tetraacetate dihydrate (Nacalai Tesque, Inc.)

未加熱ゲルの 50% 程度にまで HC が減少したのに対し、STI, NEM, E-64 を添加した場合は、残存量は約 70% まで上昇した。AP 及び LP を添加すると、STI, NEM, E-64 の場合よりも HC の分解が抑制され、90% 以上残存した。EDTA にはその効果はなかった。

以上のことから、供試 C 級スケトウダラ冷凍すり身の 40℃ 付近では、劉ら^{10,11)}の報告と同様にセリン及びシステイン両プロテアーゼが作用していることが確認された。

Sp-60 飽和画分の戻り抑制効果 Fig. 1 に示したように、トリプシンに対してはいずれの魚種も Sp-60 に強

Fig. 3 Effect of various types of protease inhibitors of degradation of myosin heavy chain in walleye pollack frozen surimi gels prepared at 40°C. Heated gels were prepared by grinding walleye pollack frozen surimi with 3% NaCl and protease inhibitors listed in Table 1 respectively and heating at 40°C for 2 h. 0.5 g of meat paste or heated gels was solubilized with 10 mL of 8 M urea-2 % SDS-0.05 M sodium phosphate buffer (pH 6.8) using a hand homogenizer, and then mixed with 0.5 mL of 2-mercaptoethanol. 10 μ L of these solutions were applied onto 5% polyacrylamide gels and SDS-PAGE based on the Laemmli⁹⁾ method. Densitometry of SDS-PAGE was carried out. Then the area of myosin heavy chain (HC) was measured. The rate of myosin heavy chain (%) remaining was obtained by the equation: {Area of HC_{2h} (presence of inhibitors)}/{Area of HC_{UH} (absence of inhibitors)} $\times$ 100 ①, control, no additives; (unheated gel); ②, control (heated gel); ③, STI; ④, AP; ⑤, LP; ⑥, NEM; ⑦, E-64; ⑧, EDTA

い阻害が認められたのに対し、同画分のパパイニンに対する阻害はマルソウダ、キハダ、ヤマトカマス、シイラ、トゲカナガシラ、カナドと 10 魚種中 6 魚種でのみ認められた。そこで、このような阻害活性を持つ Sp-60 を用いてスケトウダラ冷凍すり身 (C 級) の戻り抑制効果を検討した。供試 10 魚種より調製した Sp-60 をスケトウダラ冷凍すり身に添加した加熱ゲルの強度を Table 2 に示した。Sp-60 のかわりに蒸留水を加えた加熱ゲルは 40°C で 2 時間加熱すると、ゲル強度が測定できないほどに泥状に崩壊した。しかし、マエソ以外の魚種の Sp-60 を添加すると加熱ゲルの劣化が抑制され、2 時間加熱した場合でもゲル強度が測定できる程の弾力のあるゲルが得られた。Sp-60 を添加した 40°C 20 分間加熱ゲルのゲル強度が Sp-60 の魚種によって異なるので、Sp-p の戻り抑制効果の魚種間比較をするのは難しいと考えられるが、参考までに 20 分加熱ゲルに対する 2 時間加熱ゲルのゲル強度を比較することによって戻り抑制効果をみてみた。その結果、カナド (0.69) > トゲカナガシラ (0.47) > カツオ (0.42) > シイラ (0.33) $\geq$ アカムツ (0.33) > マルソウダ (0.2) > ヤマトカマス (0.18) > キハダ (0.14) の順となった。なお、また結果は示していないが、Sp-60 を添加した塩すり身を、50°C 及び 60°C で加熱したゲルについても戻り抑制効果を検討したが、効果は認められなかった。

Sp-60 飽和画分の HC 分解抑制効果 船津ら¹²⁾は HC と A 間の成分を X₁、A 以下の成分を X₂ とし、スケト

Table 2 Gel strength of walleye pollack frozen surimi gels containing Sp-60 from various fish species

Fish Species	Heating Time		Ratio of gel strength
	20 min (a)	2 h (b)	b/a
Round frigate mackerel	198	41	0.20
Yellowfin tuna	518	71	0.14
Japanese barracuda	476	86	0.18
Dolphinfish	651	216	0.33
Skipjack tuna	417	174	0.42
Longwing searobin	89	42	0.47
Spotted-tail grinner	341	0	0
Redbanded searobin	121	83	0.69
Blackthroat seaperch	589	192	0.33
Thorny flathead	—	89	—

—, sample was not prepared (g/cm²)

Heated gels were prepared by grinding walleye pollack frozen surimi with 3% NaCl and Sp-60, followed by heating at 40°C for 20 min and 2 h. The gel strength was evaluated by tensile test¹⁾ at room temperature. Sp-60, sarcoplasmic proteins fractionated by 60%-saturated ammonium sulfate. Gel strength of control gel (without Sp-60 heated at 40°C for 2 h) could not be measured.

ウダラ冷凍すり身の塩すり身を 25°C で坐らせた際の X₁、X₂ の変化を報告している。それによると HC の減少に伴い X₁ は顕著に増加しているのに対し X₂ は変化がないことから X₁ は HC の分解の指標に適切であると考え、ここでは HC と A 間の成分を D として用いた。各

Fig. 4 Inhibition rate of degradation of myosin heavy chain heated gels prepared in the presence of Sp-60 from various fish species, heated at 40°C for 2 h. Densitometry of SDS-polyacrylamide gel was carried out. Then the area of myosin heavy chain (HC) and actin (A), between HC and A (D) was measured. Inhibition rate of degradation of myosin heavy chain (%) was obtained by the equation: $100 - \{\text{Area of X (presence of Sp-60)}\} / \{\text{Area of X (absence of Sp-60)}\} \times 100$. X = $\{\text{Area of D/A, heated for 2 h}\} / \{\text{Area of D/A, unheated}\} \times 100$. ①, round frigate mackerel; ②, yellowfin tuna; ③, Japanese barracuda; ④, dolphinfish; ⑤, skipjack tuna; ⑥, longwing searobin; ⑦, spotted-tail grinner; ⑧, redbanded searobin; ⑨, blackthroat seaperch; ⑩, thorny flathead.

供試魚の 40°C 2 時間加熱ゲルの SDS-PAGE のデンストメトリーの結果から求めた A の量及び D の量から分解の指標として D/A を求め、未加熱試料 (UH) の D/A に対する 2 時間加熱ゲル (2 h) の D/A の値を D の増加率 X (%) とした。すなわち、

$$D \text{ の増加率 } (\%) X = (D/A)_{2h} / (D/A)_{UH} \times 100$$

次に、蒸留水 (DW) を添加した 2 時間加熱ゲルの X に対する各供試魚の Sp-60 を添加して調製した 2 時間加熱ゲルの X の値を求め、それを 100 から引いたものを HC 分解抑制率とした。

$$HC \text{ 分解抑制率 } (\%) = 100 - (X_{Sp-60} / X_{DW})$$

その結果、Fig. 4 に示したように供試 10 魚種のうち表層魚よりも底棲魚に HC 分解抑制率が高い傾向が認められ、カナド (75.4%) > トゲカナガシラ (59.5%) > マツバゴチ (55.6%) > アカムツ (50.0%) > ヤマトカマス (44.8%) > シイラ (42.3%) > カツオ (31.0%) > キハダ (25%) > マルソウダ (19.4%) > マエソ (6.9%) の順であった。

考 察

魚種の普通肉中のセリンプロテアーゼ及びシステインプロテアーゼに対するインヒビターの存在を調べるため、水溶性画分を硫酸分画して両阻害活性を測定した。その結果、セリンプロテアーゼに対する阻害活性は供試魚全てで認められ、特に Sp-60 に強いセリンプロテアーゼインヒビターの存在が前報³⁾と同様に確認された。また、システインプロテアーゼに対する阻害は、そ

の強さが魚種によって異なっているものの、マエソとアカムツ以外の魚種のいずれかの飽和画分で認められた。したがって、それらの Sp-p 中にはセリンプロテアーゼインヒビターだけでなく、システインプロテアーゼインヒビターも存在することが示された。なお、阻害活性がマイナスになっている画分にはインヒビターの活性を上回る活性のプロテアーゼが存在していることを示しているが、セリンプロテアーゼは特に 30~40% 飽和画分に、システインプロテアーゼは広い範囲の飽和画分に存在していた。このように、水溶性画分にはプロテアーゼとプロテアーゼインヒビターの両者が存在していることから、水溶性画分を硫酸分画することにより、セリンプロテアーゼの影響はほぼ完全に除去することができたが、システインプロテアーゼに対しては、それほど有効ではないことが示唆された。

すり身中のプロテアーゼに対する阻害活性を比較するのに、HC の残存量を指標とすると、トランスグルタミナーゼの作用による HC の高分子化による HC 減少も考慮する必要があるため、本研究では HC と A との間の成分量 D を指標として阻害活性を比較することにした。ただし、本研究で用いたすり身にロイペプチンを加え、セリンプロテアーゼおよびシステインプロテアーゼの活性を阻害した条件で 40°C、2 時間加熱しても HC の高分子化はほとんど認められず架橋による HC の変化は無視できる程度であると判断した。

Sp-60 の HC 分解抑制効果をみて見ると、底棲魚にその効果が高い傾向がみられたが、実際のゲル特性におけ

る戻り抑制効果とは完全には一致しなかった。しかし、底棲魚のなかでは HC 分解抑制効果と戻り抑制効果の順序が一致していた。一方、表層魚については HC 分解抑制効果の低いカツオが戻り抑制効果が高いなど、必ずしも効果の順番が一致していなかった。これは特に加熱ゲルのゲル強度に影響を与える要因のひとつに Sp-60 自身の水溶性タンパク質の影響が考えられ、¹³⁾ そのため HC 分解に関係なくゲル強度が高くなったことも考えられる。また、マエソは他の底棲魚とは異なり Sp-60 を加えても加熱ゲルは泥状に崩壊し、ここには示していないが、SDS-PAGE 像から HC はその存在が認められないほど分解され、HC と A 間の成分も減少していることから、さらに低分子成分に分解されたものと考えられた。添加したマエソの Sp-60 にはシステインプロテアーゼ活性が存在していること (Fig. 1) がその原因と思われる。マツバゴチ、アカムツ、カツオの Sp-60 もシステインプロテアーゼに対する阻害活性が認められず、逆にシステインプロテアーゼ活性が存在していたが、ゲルの崩壊を抑制した。このことは、同画分に認められるセリンプロテアーゼインヒビターの効果と推察した。また、ゲル強度に影響を与える要因にミオシンの架橋結合に関係するトランスグルタミナーゼがあるが、プロテアーゼ活性が残るような場合は HC の高分子物が生成しても、プロテアーゼにより分解されてしまうことが予想される。本すり身では HC の高分子化はほとんど認められなかったため、このことを考慮する必要がほとんど無いと考えられる。

なお、Sp-60 を添加したゲルの 40°C 20 分加熱ゲルの強度が異なる理由としても、上で述べたように Sp-60 自身のタンパク質の影響以外に、Sp-60 添加による HC 分解の抑制とこれに伴うトランスグルタミナーゼによる架橋形成の促進も考えられるが、今回用いた C 級すり身では、無視できたので、同画分に混入してくるプロテアーゼによる分解の影響の差によることが全原因と考えられる。

本実験で用いたスケトウダラ冷凍すり身のように、セリンプロテアーゼ及びシステインプロテアーゼの両者によって 40°C 付近の戻りが誘発される魚種を利用する場合には、HC の分解を防ぎ坐りの効果を上げるうえで、セリンプロテアーゼ阻害活性だけでなくシステインプロテアーゼに対する阻害活性を有する Sp-p を添加するこ

とは有効であると思われる。本実験で用いた 10 魚種のうちで底棲魚特にカナド及びトゲカナガシラなどの Sp-60 は利用できると判断した。また、Sp-60 を添加したすり身の 50°C 以上の加熱では HC 分解抑制には効果がなかったことから、Sp-60 中のインヒビターは 50°C 以上では熱に不安定であり、この利用の限界も明らかになった。

なお、実用的には硫酸飽和 60% 以上の画分にセリンプロテアーゼインヒビター及びシステインプロテアーゼインヒビターの両活性がより多く含まれることから、50%-80% 飽和画分を利用するのが適当と考えられる。

引用文献

- 1) 野村 明, 伊藤慶明, 宗岡貴仁, 小島 渥. 土佐湾産魚種の戻り発現におよぼす水晒しの影響. 日本誌 1993; **59**: 857-864.
- 2) 野村 明, 伊藤慶明, 逢坂良昭, 北村有里, 宮崎裕規, 小島 渥. 水溶性タンパク質画分中のミオシン重鎖分解抑制因子の存在. 日本誌 1998; **64**: 878-884.
- 3) 野村 明, 伊藤慶明, 八幡光一, 谷脇成幸, 小島 渥. 魚肉水溶性タンパク質画分中のミオシン重鎖分解抑制因子の性質並びに単離精製. 日本誌 2000; **66**: 731-736.
- 4) 岡田 稔: かまぼこの足に対する水晒しの影響. 日本誌 1964; **30**: 255-261.
- 5) Suwansakornkul P, Itoh Y, Hara S, Obatake A. Identification of proteolytic activities of gel-degrading factors in three lizard species. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1993; **59**: 1039-1045.
- 6) Travis J, Johnson D. Human α 1-proteinase Inhibitor. In: Lorand L (ed) *Methods in Enzymology* Vol. 80. Academic Press, New York. 1981; 754-765.
- 7) Arnon R. Papain. In: Perlmann GE, Lorand L (eds) *Methods in Enzymology* Vol. 19. Academic Press, New York. 1970; 226-244.
- 8) 志水 寛, 町田 律, 竹並誠一. 魚肉肉糊のゲル形成特性に見られる魚種特異性. 日本誌 1981; **47**: 95-104.
- 9) Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; **227**: 680-685.
- 10) 劉 達嘉, 加納 哲, 丹羽栄二. スケトウダラ塩すり身の坐りに及ぼすシステインプロテアーゼ阻害剤の影響. 日本誌 1996; **62**: 275-279.
- 11) 劉 達嘉, 加納 哲, 丹羽栄二. スケトウダラ塩すり身の坐りに及ぼすセリンプロテアーゼ阻害剤の影響. 日本誌 1996; **62**: 791-795.
- 12) 船津保浩, 新井健一. スケトウダラすり身の酸処理による肉糊のゲル形成能とミオシン重鎖の変化. 日本誌 1992; **58**: 349-357.
- 13) 森岡克司, 志水 寛. 魚肉ゲル形成に対する筋筋質タンパク質の寄与. 日本誌 1990; **56**: 929-933.