総説

産卵期サケの肉質軟化機構に関する研究^{*1}

(平成5年度日本水産学会奨励賞受賞)

山下 倫明^{*2}

中央水産研究所

産卵期サケ、いわゆるブナザケには他の魚種には見られない著しい肉質軟化現象がしばしば認められる。人工採卵のために捕獲し、成熟を待ため蓄養したサケや、沿岸で定置網で漁獲したものを加工する際に、軟弱化した魚肉、ときにペースト状のものがある。この現象には、筋肉の内在性プロテアーゼであるカテプシンLが関与することが明らかとなった。産卵期サケにおけるカテプシンの諸性質と肉質軟化への関与について解説する。

近年の種苗放流事業の発展とともに、我が国沿岸では安定したサケの漁獲が得られている。北日本の各地方では、新巻や塩びきと呼ばれる伝統的な塩乾品があるほか、サケを利用した新素材開発の努力が続けられている。しかしながら、沿岸域や河川に回帰したサケの多くは性成熟が進んでおり、産卵期の生理的变化に伴う肉質の劣化が著しく、特に高活性のプロテアーゼの存在が加工上の難点となることが最近の研究によって明らかになってきた。近年、産卵期サケが大量に加工されるようになったため、これまでの伝統的加工法では見過ごされてきた、サケ特有の問題点が顕在化してきたといえる。

1. 産卵期サケの品質

北洋産サケ、あるいは春から夏にかけて日本近海で漁獲される「トキシラズ」などの索餌期のサケと比べて産卵期のサケは一般に品質が劣る。これは、産卵成熟期に入ったサケは飢餓状態にあり、体成分をエネルギー源や生殖腺の発達に利用するためと考えられている。事実、サケの肉質劣化は成熟が進むにつれて著しい。^{1,2)} 体表は黒色化し、橙赤色の婚姻色が発現する一方、サケ筋肉の特徴である橙色色素(カロテノイド)含量が減少するため肉は白色化し、筋肉脂肪やタンパク質が消費されるため肉質は水っぽくなる。また、ブナ臭と呼ばれる生臭さが生じる。このような成熟の進んだサケは主としてフィレーや塩蔵品に加工されるが、中には肉質がペースト状に異常軟化することがあって、やっかいな問題とな

る。³⁻⁶⁾ 最近、ブナザケのすり身原料への利用が試みられているが、品質の不安定さが問題にされている。かまぼこの坐り過程でプロテアーゼが作用するため良質なゲルが得られないといわれる。また、燻製の製造過程では燻乾中に魚肉が融解するといった例が知られている。

2. 筋肉軟化現象

筆者は産卵期サケの異常軟化肉について、生化学的、原料学的視点から研究してきた。サケ筋肉の軟化現象は、産卵期の生理的变化に伴う内在性プロテアーゼ活性の増大とそれによる筋肉タンパク質の分解によるものであることが明らかとなった。⁷⁻¹⁰⁾ 産卵期サケ筋肉のプロテアーゼ活性は、酸性域で非常に強いことから、カテプシン群(細胞内酸性顆粒リソソーム由来のプロテアーゼ群)によると考えられた。⁸⁾ この活性は索餌期サケあるいは他魚種と比べ3倍から10倍程度高かった。

産卵期サケのプロテアーゼ活性は個体差がかなり大きく、異常軟化現象は同一漁獲の中でも特に高活性を示す魚体に見られ、魚の死後著しく進行することが観察された。特に凍結解凍したものでは軟化が顕著である。これは凍結保存時の組織破壊によって解凍後の軟化が促進されたためであると考えられた。軟化に伴い筋形質、筋原繊維、結合組織における種々のタンパク質の分解・低分子化が認められた。筋肉の自己消化活性がシステインプロテアーゼ阻害剤によって完全に阻害されたこと、また軟化肉の筋原繊維タンパク質分解物のSDS-PAGEパターンがカテプシンLによる筋原繊維分解パターンに類似していたことなどから、カテプシンLが軟化の主要原因酵素であると推定された。^{9,10)}

3. 産卵期サケ筋肉のプロテアーゼ

従来の研究では酸性域でのタンパク分解活性はカテプシンDによるものと考えられてきたが、サケ筋肉では酸性域(pH 3~4)での活性の約80%、魚肉の生理的に近

^{*1} Studies on the Muscle Softening Phenomenon of Chum Salmon Caught during Spawning Migration.

^{*2} Michiaki Yamashita (National Research Institute of Fisheries Science, Fukuura, Kanazawa, Yokohama 236, Japan).

表1 サケ筋肉カテプシン B および L の性質

	カテプシン B	カテプシン L
分 子 量	28,000	30,000
pI	4.9	5.2
阻 害 剤		
E-64	+	+
Leupeptin	+	+
Chicken egg cystatin	+	+
N 末端アミノ酸配列のラット酵素との相溶性	71%	84%
基質特異性合成基質 (至適 pH)	Z-Arg-Arg-MCA (pH 5.7)	Z-Phe-Arg-MCA (pH 5.6)
Endopeptidase 活性	Low	High
Dipeptidylpeptidase 活性	High	No
Aminopeptidase 活性	No	No

い pH (pH 6~7) での活性のほとんどがカテプシン L の作用によるものであった。^{6,9,10)} 一方、カテプシン L と酵素的性質が類似するシステインプロテアーゼとしてカテプシン B や H の存在も認められたが、これらはペプチダーゼとしての作用が強く、タンパク分解能は低かった。^{7,10)} また、筋肉の自己消化への関与が推察されているカルパイン活性は、産卵期にサケ筋肉で特に高いといふことはなかった。^{6,11)} 産卵期に活性上昇を示すプロテアーゼとして高分子量アルカリ性プロテイナーゼが報告されているが、¹¹⁾ 筋肉の自己消化や加工時におけるタンパク分解への関与はむしろ否定的である。¹²⁾

サケ筋肉の異常軟化の主要原因酵素と考えられたカテプシン L を精製し、その酵素的性状を検討した (表 1)。^{13,14)} 単離されたカテプシン L は分子量 30,000、タンパク分解の至適 pH は 5.6 である。本酵素のアミノ酸配列は、これまでに動物組織から単離されたカテプシン L のそれに極めて類似していた。また本酵素は筋肉構造タンパク質に高い基質特異性を示し、筋原繊維タンパク質であるミオシン、コネクチン、ネブリン、アクチニン、トロポニン、また結合組織タンパク質であるコラーゲンの非ヘリックス部分を速やかに分解した。¹⁵⁾ カテプシン L と同様にシステインプロテアーゼに属するカテプシン B の酵素的性質も調べたが、カテプシン B はジペプチジルカルボキシペプチダーゼとしての特徴を示し、タンパク分解活性は弱かった。¹⁴⁾ カテプシン L は、植物ババイヤ由来のババインやジェリーミートの原因となる粘液胞子虫のプロテアーゼと同様、システインプロテアーゼに分類される酵素であり、放線菌由来のプロテアーゼインヒビターである E-64、ロイペプチンあるいは卵白や血清中のタンパク性インヒビターであるシスタチンによって活性が強く阻害された。^{9,13)} このように、カテプシン L は、基質特異性の広い酵素であり、ジェリーミートの原因となる粘液胞子虫プロテアーゼや植物由来のババインと酵素的性質が類似している。

4. 産卵期サケ筋肉の軟化機構

カテプシン L の筋肉組織における局在性を免疫組織化学的に調べた結果、本酵素は筋細胞間に分布するマクロファージ様食細胞に局在していた。¹⁶⁾ マクロファージは生体内の異物を食作用によって除去する免疫系細胞で、カテプシンを高レベルにもつことが知られている。¹⁷⁾ 筋肉組織における食細胞の著増は、哺乳類の筋ジストロフィー症での筋細胞崩壊時¹⁷⁾や、オタマジャクシの変態に伴う尾筋の退縮時に報告されている。¹⁸⁾ 産卵回遊終期のサケでは、筋肉成分の極度の消耗と性成熟に伴う著しい生理的変化によって起きた障害筋細胞を除去・再生するために、これら食細胞が動員されたと考えられる。高カテプシン活性を示す個体では多くの食細胞が観察され、崩壊した筋細胞周辺には特に濃密に分布していた。産卵期サケ筋肉におけるカテプシン活性の上昇はカテプシンレベルの高い食細胞が筋細胞間に誘導された結果であると考えられる。以上の結果から、ブナザケ筋肉の軟化現象は、高カテプシン活性をもつ魚体の漁獲後、死後の貯蔵中に筋細胞周辺の食細胞から遊離したカテプシン L の作用によって筋肉構造タンパク質が分解された結果であると結論づけられた。特に、魚体の凍結時の氷結晶生成によって筋細胞の構造が破壊され、食細胞も破壊され、それに局在するカテプシンが組織内に遊離した結果、解凍後の軟化が著しく促進されるものと考えられる。¹⁶⁾

実際、サケの加工工場では、凍結貯蔵した魚を随時解凍してフィレーなどの製品に加工しており、解凍時の温度条件によって、異常軟化肉が出現することが指摘されている。低温では酵素活性が低いため軟化肉の出現頻度は比較的低いが、30~40℃ でのカテプシン L の作用は強い。酵素作用を抑制するため、加工工程では、できるだけ低温に品温を維持することが重要である。

5. システインプロテアーゼインヒビター

異常軟化肉の原因となるカテプシンLは、パパイインやジェリーミートの原因プロテアーゼと同様、システインプロテアーゼに分類される酵素であるが、最近、多くの種類の動植物にタンパク性インヒビターの存在が見いだされ、このインヒビター群は、シスタチンスーパーファミリーと呼ばれるようになった。¹⁹⁾ 筆者がサケの各組織におけるシステインプロテアーゼインヒビターの分布を調べたところ、阻害活性は血清で非常に強く、また、プロテアーゼ活性の非常に高い肝臓や腎臓も強い阻害活性を示した。²⁰⁾

興味深いことに、精巣や卵巣、体表にも比較的高い活性が認められた。このインヒビターは、分子量が約10,000、80℃、20分間の加熱に対しても失活しない、非常に安定なタンパク質である。また、サケの組織からはシスタチン型インヒビターのほかにも、成熟卵から新しいタイプのシステインプロテアーゼインヒビターが単離されている。²¹⁾ 現在、さらに、筆者は魚類細胞を研究材料に用いて、これらシステインプロテアーゼインヒビターの構造と遺伝子発現調節機構、生理作用に関する研究を進めている。これまでの研究では、シスタチン型インヒビターは、動物細胞の細胞質に局在するタイプや唾液、血液、初乳などの体液性のもの、またニワトリの卵白、ヘビ毒など種々の分子種が報告されており、¹⁹⁾ 細胞内のプロテオリシスの制御あるいは細菌、ウイルス、寄生虫等病原微生物に対する生体防御などの生理的機能が考えられる。

これらのシステインプロテアーゼインヒビターは安定性が高く、酵素との結合が強固であることから、食品加工におけるプロテアーゼ作用を抑制する目的に適するものと考えられる。ニワトリ卵白や動物の血清は、魚肉・

畜肉加工品の製造工程で結着剤・増量剤としての目的で添加されることがあるが、これらにはシスタチンやトリプシンインヒビターなどのプロテアーゼインヒビターが多量に含まれているので、プロテアーゼの阻害作用が期待できる。カテプシンLが軟化の原因となる産卵期サケ以外にも、粘液胞子虫プロテアーゼによるジェリーミートや、トリプシン様酵素によるかまぼこ戻り現象などプロテアーゼの作用によるかまぼこゲルの分解・劣化が知られており、それぞれの酵素に対して有効なプロテアーゼインヒビターの検索がいくつかの研究室で進められている。^{20, 23)} 近年のスケトウダラすり身の不足を補う新しいすり身原料として、肉質の悪い産卵期サケの利用が試みられている。強力なプロテアーゼ活性を示す魚肉を利用するため、タンパク性インヒビターの食品加工への応用が期待される。

6. あとがき

どの魚種でも、死後貯蔵中に肉質が軟弱化することが知られており、魚肉の自己消化へのプロテアーゼの関与は水産利用加工研究の課題として古くから議論されてきた。²⁴⁾ 産卵期サケの肉質軟化現象の解明によって、魚肉の軟化の原因プロテアーゼ、カテプシンLが同定され、筋肉中に誘導・活性化されたマクロファージ様食細胞が軟化に深く関与することが明らかとなった。

産卵期サケと同様に、アユの筋肉でもカテプシン活性の上昇が産卵期に認められ、²⁵⁾ この現象にも食細胞の関与が確認された。²⁶⁾ また、ヒラメの異常軟化肉、いわゆるフクロビラメ（あるいはノリ）でも強いカテプシンL活性が検出されている。²⁷⁾ ヒラメの場合も産卵期の初夏に、この異常肉が発生する。このように、魚の肉質は、魚体の生理状態、特に成熟に伴って著しく変化するものであり、内在性プロテアーゼの作用が主要な要因であると考えられる。

謝 辞

本研究は、水産庁中央水産研究所において行われた。研究を進めるに当たり、終始ご指導いただいた小長谷史郎博士に深く感謝する。

文 献

- 1) 波多野六男：ブナ化と成分変化、「秋サケの資源と利用」（座間宏一・高橋裕哉編）、恒星社厚生閣、東京、1985、pp. 68-83.
- 2) 安藤清一、波多野六男：秋サケ筋肉の劣化と婚姻色の発現。化学と生物、24、792-798 (1986).
- 3) 小長谷史郎：異常性状の魚肉：ジェリーミートとヤケ肉。日本食工誌 29、379-388 (1982).
- 4) 小長谷史郎：産卵回帰シロサケ筋肉中の高プロテアーゼ活性と肉の軟化融解現象。東海水産報、109、41-55 (1983).

図1 産卵期サケ筋肉の軟化現象

- 5) S. Konagaya: Enhanced protease activity of chum salmon *Oncorhynchus keta* during spawning migration. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **48**, 1503 (1982).
- 6) 小長谷史郎: 産卵回帰シロザケにみられる軟化・融解肉の原因プロテアーゼ, 東海水研報, **116**, 39-47 (1985).
- 7) M. Yamashita and S. Konagaya: High activities of cathepsins B, D, H, and L in the white muscle of chum salmon in spawning migration. *Comp. Biochem. Physiol.*, **95B**, 149-152 (1990).
- 8) M. Yamashita and S. Konagaya: Differentiation and localization of catheptic proteases for extensive autolysis of mature chum salmon muscle (*Oncorhynchus keta*). *Comp. Biochem. Physiol.*, **103B**, 999-1003 (1992).
- 9) M. Yamashita and S. Konagaya: Participation of cathepsin L into extensive softening of the muscle of chum salmon caught during spawning migration. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **56**, 1271-1277 (1990).
- 10) M. Yamashita and S. Konagaya: Proteolysis of muscle proteins in the extensively softened muscle of chum salmon caught during spawning migration. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **57**, 2163 (1991).
- 11) 野俣 洋, 豊原治彦, 牧之段保夫, 池田静徳: シロザケ筋肉における各種プロテイナーゼの存在と産卵期におけるその活性. 日水誌, **51**, 1799-1804 (1985).
- 12) M. Kinoshita, H. Toyohara, and M. Sakaguchi: Purification and properties of a novel latent proteinase showing myosin heavy chain-degrading activity from threadfin-bream. *J. Biochem.*, **107**, 587-591 (1990).
- 13) M. Yamashita and S. Konagaya: Purification and characterization of cathepsin L from the white muscle of chum salmon, *Oncorhynchus keta*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **96B**, 247-252 (1990).
- 14) M. Yamashita and S. Konagaya: Purification and characterization of cathepsin B from the white muscle of chum salmon, *Oncorhynchus keta*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **96B**, 733-737 (1990).
- 15) M. Yamashita and S. Konagaya: Hydrolytic action of salmon cathepsins B and L to muscle structural proteins in respect of muscle softening. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **57**, 1917-1922 (1991).
- 16) M. Yamashita and S. Konagaya: Immunohistochemical localization of cathepsins B and L in the white muscle of chum salmon (*Oncorhynchus keta*) in spawning migration: Probable participation of phagocytes rich in cathepsins in extensive muscle softening of the mature salmon. *J. Agric. Food Chem.*, **39**, 1402-1405 (1991).
- 17) K. Ii, K. Hizawa, I. Nonaka, H. Sugita, E. Kominami, and N. Katunuma: Abnormal increases of lysosomal cysteine proteinases in rimmed vacuoles in the skeletal muscle. *Am. J. Pathol.*, **122**, 193-198 (1986).
- 18) R. Weber: Tissue involution and lysosomal enzymes during anuran metamorphosis, in "Lysosomes in Biology and Pathology 2" (ed. by J. T. Dingle and H. B. Fell), Elsevier, New York, 1969, pp. 437-461.
- 19) A. J. Barrett, N. D. Rawlings, M. E. Davies, W. Macleod, G. Salvesen, and V. Turk: Cysteine protease inhibitors of the cystatin superfamily, in "Proteinase inhibitors" (ed. by A. J. Barrett and G. Salvesen), Elsevier, Amsterdam, 1986, pp. 515-569.
- 20) M. Yamashita and S. Konagaya: A comparison of cystatin activity in the various tissues of chum salmon between feeding and spawning migration. *Comp. Biochem. Physiol.*, **100A**, 749-751 (1991).
- 21) M. Yamashita and S. Konagaya: Cysteine protease inhibitor in egg of chum salmon. *J. Biochem.*, **100**, 762-765 (1991).
- 22) M. Yamashita and S. Konagaya: An enzyme-inhibitor complex of cathepsin L in the white muscle of chum salmon (*Oncorhynchus keta*) in spawning migration. *Comp. Biochem. Physiol.*, **103B**, 1005-1010 (1992).
- 23) H. Toyohara, M. Kinoshita, K. Sasaki, S. Yamaguchi, Y. Shimizu, and M. Sakaguchi: Occurrence of a *modori* inhibitor in spinach leaves. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **58**, 1705-1710 (1992).
- 24) 牧之段保夫: 魚類筋肉プロテアーゼ, 「魚介類の微量成分」(池田静徳編), 恒星社厚生閣, 東京, 1981, pp. 81-142.
- 25) M. Yamashita, H. Nakano, and S. Konagaya: The elevation of catheptic activity in muscle and liver of ayu *Plecoglossus altivelis* during maturation. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **56**, 1157 (1990).
- 26) 山下由美子: 二倍体および三倍体アユの成長および成熟に伴う筋肉組織の変化. 日水誌, **59**, 1151-1154 (1993).
- 27) H. Toyohara, M. Kinoshita, M. Ando, M. Yamashita, S. Konagaya, and M. Sakaguchi: Elevated activity of cathepsin L-like protease in the jellied meat of Japanese flounder. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **59**, 1909-1914 (1993).