受賞者総説

魚類筋肉コラーゲンに関する生化学的研究^{*1}

(平成6年度日本水産学会賞奨励賞受賞)

佐藤 健 司^{*2}

京都府立大学生活科学部食物学科

コラーゲンは、結合組織の主要な成分であり、異なる遺伝子由来の多くの分子種の存在が知られている。現在では、分子の少なくとも一部に三重らせん構造を持つ細胞外マトリックス構造タンパク質と定義されている。¹⁾ コラーゲンの分子種は、高等脊椎動物での発見の順にローマ数字で型が表記され、また同じ型のコラーゲンのサブユニット鎖は、アラビア数字でさらに区別される。例えば、 $[\alpha 1(I)]_2\alpha 2(I)$ は、2本の $\alpha 1(I)$ 鎖と1本の $\alpha 2(I)$ 鎖から構成されるI型コラーゲン分子を意味する。コラーゲン分子種は、大きく分けて繊維形成および非繊維コラーゲンに分類される。本報では、コラーゲン細繊維を形成する繊維形成コラーゲンを中心に述べる。哺乳動物の繊維形成コラーゲンとしては、I、II、III、V、XI型コラーゲンの存在が知られている。¹⁾ 一方、著者らが研究を開始した時点では、魚類のI、II型コラーゲンについての比較生化学的およびコラーゲンの構造に関する先駆的な研究がなされていたが、^{2,3)} その他のコラーゲン分子種についての知見は、いわゆるフカヒレ中に存在するType Eコラーゲンの存在が知られていたのみであった。⁴⁾ さらに肉質との関連が、古くより指摘されていた筋肉中のコラーゲンの含量およびその生化学的性質に関する研究は十分でなかった。このような状況下で、著者らは魚類筋肉結合組織中のコラーゲンが、肉質の魚種間差または魚肉本保蔵中の肉質の変化にどのような影響を及ぼすのかを明らかにするため、魚類筋肉中のコラーゲンに関する生化学的な研究を行ってきた。以下、この分野の最近の進歩について著者らの研究により得られた知見を中心に述べる。

1. 魚類筋肉コラーゲン含量

筋肉タンパク質を塩溶液で抽出した際の不溶性タンパク質である筋肉基質タンパク質は、結合組織の主成分で

あるコラーゲンとエラスチンから構成されると考えられていたため、筋肉中の結合組織量を推定するため、その含量が求められていた。⁵⁻⁷⁾ しかし、コイおよびマサバより調製した筋肉基質タンパク質を分画したところ、従来エラスチンであると考えられていた画分には筋原繊維タンパク質であるコネクチンが主として分布していることを見いだした。⁸⁾ そのため肉質と結合組織量の関係を考察するためには、筋肉中のコラーゲンの定量が必要となる。コラーゲンに特異的に存在するヒドロキシプロリンを定量することにより筋肉中のコラーゲン含量の推定が可能である。この方法では、コラーゲン中のヒドロキシプロリン含量にかなり魚種差があること⁹⁾に留意する必要がある。一方、薄いアルカリ(0.1 M NaOH)により筋肉中のコラーゲン以外のほとんどのタンパク質が可溶化除去され、その後、酸(0.5 M 酢酸)および熱水抽出によりコラーゲンのみを選択的に可溶化することができる。可溶化したコラーゲン量を比色定量することによりコラーゲン量を求めることができる。¹⁰⁾ これらの手法を用いて肉質の異なる魚種の筋肉コラーゲン含量を測定した結果、官能検査および物理測定による生肉の硬い魚種ほどコラーゲン含量が高いことが、複数の研究グループにより明らかにされた。^{11,12)} また、遊泳時に大きく体を屈伸させる部位の筋肉ほどコラーゲン含量が高いことも見いだされている。¹³⁾

2. コラーゲンの分子種

筋肉コラーゲンの定量のため用いた0.1 M NaOH抽出¹⁰⁾は、非コラーゲンタンパク質を非常に効率良く除去できる他、コラーゲンに有意な変化を生じさせることなく内因性のプロテアーゼによるコラーゲンの分解を抑制できることが明らかとなった。¹⁴⁾ そのため、0.1 M NaOH処理後、コラーゲンを酸抽出または限定酵素分

^{*1} Biochemical Studies on Collagen in Fish Muscle.^{*2} Kenji Sato (Department of Food Science and Nutrition, Faculty of Living Science, Kyoto Prefectural University, Shimogamo, Kyoto 606).

解により可溶化することで筋肉のようにコラーゲン含量が少ない組織からでも容易に未変性酸可溶性、または酵素可溶化コラーゲンを得ることができる。本法を用いて調製したペプシン可溶化コラーゲン画分から塩分画により、I型コラーゲン以外にV型コラーゲンを分離することができた。^{15,16)} 一方、哺乳動物および鳥類に普遍的に存在するIII型コラーゲンを検出することはできなかった。最近、Zylberbergら¹⁷⁾によりヒトの繊維形成コラーゲンのcDNAプローブを用いたノーザンブロット解析が魚類で行われているが、魚類のI、V型のmRNAは検出されているが、III型コラーゲンのプローブと反応するmRNAは検出されていない。これらの結果より、魚類にはIII型コラーゲンは分布していないと考えている。

魚類I型コラーゲンには、高等脊椎動物には認められない第3のサブユニット $\alpha 3(I)$ が存在し、そのサブユニット組成は $[\alpha 1(I)]_2$ および $\alpha 1(I)\alpha 2(I)\alpha 3(I)$ であることが、Piez¹⁸⁾および木村¹⁹⁾により報告されている。魚類のV型コラーゲン中にも哺乳動物には存在しない第4のサブユニット $\alpha 4(V)$ が存在し、そのサブユニット組成は、哺乳類の $[\alpha 1(V)]_2\alpha 2(V)$ および $\alpha 1(V)\alpha 2(V)\alpha 3(V)$ に対して、 $[\alpha 1(V)]_2\alpha 2(V)$ および $\alpha 1(V)\alpha 3(V)\alpha 4(V)$ であることを認めた。²⁰⁾ 魚類の $\alpha 4(V)$ はSDS-PAGEでは $\alpha 2(V)$ と見分けることができないため、魚類のV型コラーゲンのサブユニット組成は、哺乳動物と同じであると以前考えていたが、²¹⁾ 前述のように訂正した。

脊椎動物の進化上最も下等な円口類であるヤツメウナギでは、真皮には、I型コラーゲンに相当する分子が分布しているが、²²⁾ 筋肉には、むしろ無脊椎動物の主要コラーゲンに相当する分子種が分布している。^{16,23~25)} これまで、無脊椎動物および脊椎動物のいずれにおいても量的に主要なコラーゲン分子はI型コラーゲンであり、化学組成の差は進化の過程で生じたものであると考えられていた。²⁶⁾ しかし、同一個体に無脊椎動物と脊椎動物の主要コラーゲンに相当する分子が存在することは、I型コラーゲンが円口類において出現し、無脊椎動物のコラーゲンと脊椎動物のI型コラーゲンには、直接の連続性はないと考えたほうが自然である。円口類のこのコラーゲンは、体壁、筋肉以外に、内臓にも存在するため、円口類体幹コラーゲンと呼び、 $[\alpha 1(C-B)]_2\alpha 2(C-B)$ とサブユニット組成を表記することを提案している(C-B; Cyclostome Body)。^{27,28)} 魚類の軟骨には、高等脊椎動物と同様にII型およびXI型コラーゲンが分布していることが、木村ら²⁹⁾およびKellyら²³⁾により報告されている。そのサブユニット組成は、 $[\alpha 1(II)]_3$ および $\alpha 1(XI)\alpha 2(XI)\alpha 3(XI)$ であるとされている。魚類の非

繊維形成コラーゲンについては、FACITsコラーゲンに分類される分子¹⁾の存在がShimokomakiら³⁰⁾により報告されているが、その詳細は不明である。

3. I型およびV型コラーゲンの魚肉内分布による性状の差

コイおよびゴマサバの筋肉内結合組織を水中で磨碎し、1mm角のふるいにより分画した。ふるいの上に残った画分は主として筋隔膜、腱等の間質性結合組織から構成され、ふるいを通った画分は、主として筋肉膜等の細胞周辺結合組織から構成されと考えることができる。それぞれを間質性結合組織画分および細胞周辺結合組織画分とした、両画面からI型およびV型コラーゲンを酸抽出、限定ペプシン処理および熱抽出により順次可溶化し、その含量を求めた。その結果、両魚種とも、I、V型コラーゲンのいずれも両組織に分布していたが、細胞周辺結合組織画分中の両コラーゲンの溶解性は間質性結合組織のものよりかなり低かった。²¹⁾ また、電気泳動分析により細胞周辺結合組織画分中のV型コラーゲンのサブユニット組成は、ほとんど $[\alpha 1(V)]_2\alpha 2(V)$ から構成され、 $\alpha 1(V)\alpha 3(V)\alpha 4(V)$ 分子は間質性結合組織画分に優先的に分布していた。これらの結果より、魚肉の間質性結合組織と細胞周辺組織中のコラーゲンの生化学的な特性は、かなり異なることが明らかとなった。²¹⁾ そのため、魚肉中の間質性結合組織と細胞周辺結合組織の魚肉冷蔵および調理中の変化を考察する場合、両組織を構成するコラーゲンの性質の差を考慮すべきである。

4. コラーゲンの魚肉冷蔵中の変化

魚肉が冷蔵中に急速に軟化することは、経験的にも実験的にも良く知られている。また、Bremnerら³¹⁾および安藤ら^{32,33)}の一連の研究により、間質性結合組織である筋隔膜のコラーゲン繊維には、有意な変化が認められないにも係わらず、筋細胞周辺結合組織および筋隔膜と筋細胞の接統部に存在するコラーゲン細胞が魚肉冷蔵中に崩壊し、その結果それらの微細な結合組織の脆弱化、最終的には魚肉の軟化が生じてくることが報告されている。特定の結合組織中のコラーゲン繊維が特異的に崩壊する理由としては、特定のコラーゲン分子種が、特定の組織に分布しているため、特定のコラーゲン分子種に生じた変化が組織特異的なコラーゲン繊維の崩壊を引き起こしている可能性、またはコラーゲン繊維の崩壊を引き起こす要因、おそらく酵素が、組織特異的に分布しているため組織特異的なコラーゲン繊維の崩壊が生じた2つの可能性が考えられる。この点を明らかにするため、冷蔵したニジマス筋肉中のI、V型コラーゲン

の含量および溶解性を測定した。その結果、1日の冷蔵ではI型コラーゲンには有意な変化は認められなかったが、V型コラーゲンの溶解性が有意に増加した。³⁴⁾ この実験で用いたコラーゲンの調製には、他のほとんどの筋肉構成タンパク質を可溶化した後、コラーゲンの架橋結合の一部を切断する酸処理、およびコラーゲンのテロペプチドを切断するペプシン処理を用いている。そのため、V型コラーゲンの溶解性の増加はテロペプチドまたは架橋結合などの共有結合の切断を伴う変化であると考えられる。繊維性コラーゲンは、各分子の主にテロペプチド部で分子間架橋結合が生じ、繊維を安定化することが知られている。そのため、V型コラーゲンの溶解性を増加させる変化は、V型コラーゲンを含むコラーゲン繊維の崩壊を引き起こすと考えられる。つまり、V型コラーゲンに生じた変化が魚肉の軟化を引き起こしているという仮説が成り立つ。しかし、前に述べたように間質性結合組織と細胞周辺結合組織中のI型コラーゲンの性質は、かなり異なることが知られている。²¹⁾ そのため、量的には少ない細胞周辺結合組織中のI型コラーゲンが、組織特異的に変化を受けている可能性も考えられる。この点を明らかにするため、ニジマスの両結合組織中のI型およびV型コラーゲンの冷蔵中の変化を調べた。その結果、いずれの組織においてもV型コラーゲンにのみ可溶化が生じていた。³⁵⁾ この結果は、魚肉冷蔵中に見られるコラーゲン繊維の組織特異的な消失は、コラーゲン分子種に特異的な変化によると解釈できる。現在、ニジマス筋肉で見られたV型コラーゲンの変化が、魚肉の軟化の一般的な要因であるかどうかを明らかにするため、肉質の軟化程度の異なる魚種でのV型コラーゲンの魚肉冷蔵中での変化、および魚肉中でのV型コラーゲンの組織内分布を検討中である。

魚肉冷蔵中に生じたV型コラーゲンの可溶化を引き起こす原因は現段階では不明である。しかし、共有結合の切断を引き起こす点、非常に特異性が高い点、冷蔵条件下で比較的早く(1日以内)進む点を考慮すると、酵素が関与しているとしか考えられない。コラーゲンに作用する酵素として、コラーゲナーゼおよびカテプシン類が知られている。しかし、電気泳動分析によりV型コラーゲンの3重ラセン部の切断は認められないため、³⁴⁾ コラーゲンの3重ラセンを切断する酵素と定義されるコラーゲナーゼがこの変化に関与するとは考えにくい。一方、最近シロザケのブナ化にカテプシン、特にカテプシンLが関与することが報告されている。^{36,37)} カテプシンLのV型コラーゲンへの作用は不明であるが、カテプシンLはI型コラーゲンのテロペプチドを切断することが知られている。³⁷⁾ そのためI型コラーゲンに変化が認められない以上、現段階ではカテプシンLがV型コラー

ゲンの変化に関与するとは考えにくい。しかし、酵素はpH、各種イオンが変化すれば基質特異性が変化することも考えられる。非常に重要なことであるが、実際に変化の生じている細胞周辺結合組織中のこれらの条件は全く不明である。そのため試験管内での反応条件が異なれば、異なる結果が得られる可能性もあり、現段階では前述の酵素の関与を完全に否定するものではない。生体組織は、膜によって隔離された世界であるため、これらの問題を解明するためには、酵素および基質の特異性の他、それらの分布、およびそれらがおかれた微小環境中の条件を十分に考慮すべきであろう。

謝 辞

本研究は、京都大学農学部および京都府立大学生生活科学部で行われたものです。両研究室でご指導いただきました諸先生方、また共同研究者の皆様にご心からお礼申し上げます。また、水産学会、特に魚肉タンパク質集談会で貴重なご意見をいただきましたことに対しても感謝の意を表したいと思います。

文 献

- 1) M. van der Rest and R. Garrone: Collagen family of proteins. *FASEB J.* **5**, 2814-2823 (1991).
- 2) H. Boedtker and P. Doty: The native and denatured states of soluble collagen. *J. Biol. Chem.*, **78**, 4267-4280 (1956).
- 3) Z. E. Sikorski, D. N. Scott, and D. H. Buisson: The role of collagen in the quality and processing of fish. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutri.*, **20**, 301-343 (1984).
- 4) S. Kimura, Y. Uematsu, Y. Miyauchi: Shark elastoroidin: Characterization of its collagen as $[\alpha 1(E)]_3$ homotrimers. *Comp. Biochem. Physiol.*, **84B**, 305-308 (1986).
- 5) Y. Tsuchiya and I. Takahashi: The content of connective tissue in fish muscle. *Tohoku J. Agric. Res.*, **1**, 209-213 (1950).
- 6) 志水 寛, 清水 亘: 水産動物肉に関する研究—XXVIII. 魚肉筋肉の蛋白組成, 日水誌, **26**, 806-809 (1960).
- 7) K. Hashimoto, S. Watabe, M. Kono, and K. Shiro: Muscle protein composition of sardine and mackerel. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **45**, 1435-1441 (1979).
- 8) 吉中禮二, 佐藤 守, 佐藤健司, 伊藤慶明, 藤田眞夫, 池田静徳: コイおよびマサバの筋肉基質蛋白質. 日水誌, **51**, 1163-1168 (1985).
- 9) K. Sato, R. Yoshinaka, and M. Sato: Hydroxyproline content in the acid-soluble collagen from muscle of several fishes. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **55**, 1467 (1989).
- 10) K. Sato, R. Yoshinaka, M. Sato, and S. Ikeda: A simplified method for determining collagen content in fish muscle. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **52**, 889-893 (1986).
- 11) K. Sato, R. Yoshinaka, M. Sato, and Y. Shimizu: Collagen content in the muscle of fishes in association with their swimming movement and meat texture. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **52**, 1595-1600 (1986).
- 12) 畑江敬子, 飛松聡子, 竹山まゆみ, 松本重一郎: 魚肉の物性とその魚種差に対する結合組織の寄与. 日水誌, **52**, 2001-2007 (1986).
- 13) R. Yoshinaka, K. Sato, H. Anbe, M. Sato, and Y. Shimizu: Distribution of collagen in body muscle of fishes with differ-

- ent swimming movement. *Comp. Biochem. Physiol.*, **89B**, 147-151 (1988).
- 14) K. Sato, R. Yoshinaka, M. Sato, and Y. Shimizu: Isolation of native acid-soluble collagen from fish muscle. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **53**, 1431-1436 (1987).
- 15) K. Sato, R. Yoshinaka, M. Sato, Y. Ito, and Y. Shimizu: Isolation of type I and V collagens from carp muscle. *Comp. Biochem. Physiol.*, **90B**, 155-158 (1988).
- 16) K. Sato, R. Yoshinaka, Y. Ito, and M. Sato: Molecular species of collagen in the intramuscular connective tissue of fish. *Comp. Biochem. Physiol.*, **92B**, 87-91 (1989).
- 17) L. Zylberberg, J. Bonaventure, L. Cohen-Solal, D. J. Hartmann, and J. Bereiterhahn: Organization and characterization of fibrillar collagens in fish scales *in situ* and *in vivo*. *J. Cell Sci.*, **103**, 273-285 (1992).
- 18) K. Piez: Characterization of a collagen from codfish skin containing three chromatographically different α chains. *Biochemistry*, **4**, 2590-2596 (1965).
- 19) S. Kimura: Wide distribution of the skin type I collagen $\alpha 3$ chain in bony fish. *Comp. Biochem. Physiol.*, **102B**, 255-260 (1992).
- 20) K. Sato, A. Sakuma, K. Ohtsuki, and M. Kawabata: Subunit composition of eel type V collagen: Evidence for existence of a novel fourth $\alpha 4(V)$ chain. *J. Agric. Food Chem.*, **42**, 675-678 (1994).
- 21) K. Sato, R. Yoshinaka, M. Sato, and J. Tomita: Biochemical characterization of collagen in myocommata and endomysium fractions of carp and spotted mackerel muscle. *J. Food Sci.*, **54**, 1511-1514 (1989).
- 22) S. Kimura, T. Kamimura, Y. Takema, and M. Kubota: Lower vertebrate collagen: Evidence for type I-like collagen in the skin of lamprey and shark. *Biochim. Biophys. Acta*, **669**, 251-257 (1981).
- 23) J. Kelly, S. Tanakam T. Hardt, E. F. Eikenberry, and B. Brodsky: Fibril-forming collagens in lamprey. *J. Biol. Chem.*, **263**, 980-987 (1988).
- 24) R. Matsui, M. Ishida, and S. Kimura: Characterization of two genetically distinct type I-like collagens from lamprey. *Comp. Biochem. Physiol.*, **95B**, 669-675 (1990).
- 25) S. Kimura and R. Matsui: Characterization of two genetically distinct type I-like collagens from hagfish. *Comp. Biochem. Physiol.*, **95B**, 137-143 (1990).
- 26) 木村 茂: コラーゲンの分子種. *皮革化学*, **29**, 55-72 (1983).
- 27) K. Sato: Comparative biochemistry of molecular species of fish and mammalian collagens. *Trends Comp. Biochem. Physiol.*, **1**, 557-567 (1993).
- 28) 佐藤健司: 魚類コラーゲン分子種の生化学とその将来の利用. *マリンバイオテクノロジー研究会会報*, **6**, 23-32 (1993).
- 29) S. Kimura and T. Kamimura: The characterization of lamprey notochord collagen with special reference to its skin collagen. *Comp. Biochem. Physiol.*, **73B**, 335-339 (1982).
- 30) S. Shimokomaki, L. C. Silva, S. Miyamoto, and E. Kubota: Presence of new disulfide-bonded collagens in shark muscle. *Comp. Biochem. Physiol.*, **106B**, 337-339 (1993).
- 31) I. C. Hallett and A. Bremner: Fine structure of the myocommata-muscle fibre junction in hoki. *J. Sci. Agric. Food Chem.*, **44**, 245-264 (1988).
- 32) M. Ando, H. Toyohara, and M. Sakaguchi: Post-mortem tenderization of rainbow trout muscle caused by the disintegration of collagen fibers in the pericellular connective tissue. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **58**, 567-570 (1992).
- 33) M. Ando, H. Toyohara, Y. Shimizu, and M. Sakaguchi: Post-mortem tenderization of fish muscle due to weakening of pericellular connective tissue. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **59**, 1073-1076 (1993).
- 34) K. Sato, C. Ohashi, K. Ohtsuki, and M. Kawabata: Type V collagen in trout muscle and its solubility change during chilled storage of muscle. *J. Agric. Food Chem.*, **39**, 1222-1225 (1991).
- 35) K. Sato, A. Koike, R. Yoshinaka, M. Sato, and Y. Shimizu: Post-mortem changes in type I and V collagens in myocommata and endomysial fractions of rainbow trout muscle. *J. Aquat. Food Product Technol.*, **3**, 5-11 (1994).
- 36) M. Yamashita and S. Konagaya: Hydrolytic action of salmon cathepsin B and L to muscle structural proteins in respect of muscle softening. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **57**, 1917-1922 (1991).
- 37) 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).