受賞者総説

魚類筋肉の死後における軟化機構に関する研究*1

(平成7年度日本水産学会賞奨励賞受賞)

安藤正史*2

近畿大学農学部水産学科

近年の流通機構の発達にともない、遠隔地からでも高鮮度の魚介類が消費者に届くようになってきている。そのため、鮮度に対する消費者の意識も変わり、より鮮度の高い魚介類が求められるようになってきた。魚類の場合、一般に鮮度低下が速く、短期間の冷蔵中に光沢、風味などに様々な変化が起こる。魚肉を生で食する場合、その品質評価の基準としては味・香りなどがあるが、これらと並んで歯ごたえ、すなわち硬さが重要な基準としてあげられる。最近よく見かけられるようになった「活け作り」に代表されるように、しめた直後の魚肉は弾力性があり、独特の歯ごたえがある。しかしながら魚肉を冷蔵しているとこの独特の歯ごたえは速やかに失われ、いわゆる「軟化」が起こる。軟化現象は魚肉の品質低下にあたるため、この原因を解明し、その対策を検討することは水産物の生産・流通面をはじめとする水産業界全体にとって非常に重要な課題である。魚肉の軟化に関する研究例は多く、様々な面からのアプローチがなされているが、魚種の多様性などの問題もあり、その機構について明確な説明はなされていなかった。本研究は、魚肉筋肉の冷蔵初期、特に死後1日以内において大きく物性が変化する軟化現象に注目し、その機構を組織学および生化学の観点から解明し、軟化現象の防止を試みることで流通魚の肉質改善をめざすものである。

1. 冷蔵中における筋肉の硬さの変化

魚肉の軟化は速いと言われるが、具体的にどの位の時間でどれほど硬さが低下するのかについては意外に知られていない。筋肉の物性の評価には官能検査を用いる場合もあるが、その場合、熟練した複数のパネラーが必要であり、実施にはかなりの準備を要する。そのため、最近ではレオメーターあるいはテクスチュロメーターなどの測定機器を用いて筋肉の物性を測定する研究例が多い。¹⁻⁹⁾ それらの結果によると、軟化の速い魚種、特にマイワシのような回遊性の魚種では、即殺後3~18時

間で硬さが大きく低下するのに対し、軟化の遅いマダイ・ヒラメなどでは死後3日間にわたってゆっくりと軟化し続ける。これらの魚種以外にも、3日間の冷蔵中に全く軟化を示さないトラフグのような魚種も認められており、魚種によって軟化の様式の違いが大きいことが明らかとなっている。

また、一般に死後硬直が筋肉の硬さに影響すると考えられており、死後硬直を起こした魚は筋肉も硬いというイメージがある。しかしながら、ティラピア、ブリをはじめとする9種類の魚種について、筋肉の硬さの変化が死後硬直の進行とは相関せず、硬直中にも筋肉の軟化が進行することが報告されている。^{3,5,7)} これに対し、解答硬直を起こした場合¹⁾や、“あらい”操作を行った際には破断強度が著しく上昇することから、¹⁰⁾ 極端に筋肉が収縮するような硬直の場合においては、筋肉の硬さに硬直の影響が現れるものと考えられる。

2. 筋原繊維タンパク質の軟化への関与

筋肉の大部分はミオシン・アクチンをはじめとする筋原繊維タンパク質によって構成されている。筋原繊維にはZ線という特徴的な構造があるが、この部分の物理的強度が冷蔵中に低下することが高橋ら¹¹⁾のニワトリ筋肉を用いた研究によってはじめて示され、これが軟化の原因であるとされた。魚肉においてもTokiwaら、¹²⁾ Tsuchiyaら、¹³⁾ 橋ら¹⁴⁾により冷蔵中のZ線の脆弱化が示されるとともに、電子顕微鏡による観察から、冷蔵中のZ線の崩壊も認められている。また、分子量約280万の巨大タンパク質である α コネクチンが、冷蔵中に低分子化して β コネクチンへと変化することから、コネクチンの軟化への関与が考えられた。¹⁵⁾ しかしながら、電気泳動用試料の作製中にプロテアーゼの作用により β 化が進むとする報告もあり、¹⁶⁾ なお検討が必要である。また、荷重をかけて弾力性を失わせた筋肉の構造を観察した場合、Z線における筋原繊維の切断は起こらな

*1 A Study on the Mechanism of Post-mortem Tenderization of Fish Muscle.

*2 Masashi Ando (Department of Fisheries, Faculty of Agriculture, Kinki University, Nakamachi 3327-204, Nara 631, Japan).

いことから、⁸⁾ 冷蔵の初期における急激な軟化現象に対してはZ線の関与は小さいと考えられる。

3. 筋内膜の脆弱化による魚肉の軟化

筋肉にはその主体となる筋細胞の他に、結合組織が存在し、筋細胞間をつなぐ機能をもっている。結合組織は数種類のタンパク質より形成されるが、その大部分を占めるのがコラーゲンである。コラーゲンの含量は筋肉の硬さと密接な関係があり、その量が多いほど硬い筋肉になるとされている。¹⁷⁻²⁰⁾ これらの報告例から考えると、何らかの形でコラーゲンは軟化現象にも影響していると思われるが、そのような研究例は少ない。これは、コラーゲンが非常に難溶性のタンパク質であるため、生化学的な解析が困難であったためである。そこで我々は組織学的な手法によるアプローチを試みた。まず、ニジマス筋肉について光学顕微鏡による観察を行ったところ、通常の方法で試料を作製した場合、冷蔵3日後の筋肉でも構造的な変化は認められなかった。しかしながら、軟化した筋肉に対して一定の荷重を加えて変形させた場合、結合組織の中でも筋内膜にのみ崩壊が認められ、筋細胞間に間隙が生じた。²¹⁾ この結果は、筋内膜の物理的強度が冷蔵中に低下したことを意味しており、同様の結果がブリ・マダイ・ヒラメについても得られた。²²⁾ 一方、軟化を起こさないトラフグの場合、筋内膜の脆弱化は全く認められなかったことから、²²⁾ 筋内膜の脆弱化が軟化の原因であると考えられた。次に、筋内膜の脆弱化の原因となる構造的変化を調べるため、透過型電子顕微鏡によりさらに微細な構造を観察したところ、軟化にともない結合組織中のコラーゲン繊維の構造が断片化あるいは消失していることが明らかとなった。²³⁾ また筋肉をアルカリ処理することで筋細胞を溶出させ、残った結合組織を走査型電子顕微鏡によって観察する方法によっても、筋内膜の構造変化が確認された。²⁴⁾ 同様な構造変化がタラの貯蔵中における「身割れ」においても認められており、²⁵⁾ これらの結果から考えるに、冷蔵中に起こるコラーゲン繊維の崩壊が筋内膜の物理的強度を低下させ、結果的に軟化につながるものと思われた。

4. コラーゲンの死後変化に関する生化学的解析

コラーゲンは遺伝的に異なる分子が19種発見されているが、そのうち魚類筋肉のコラーゲンにおいてはI型とV型の存在が確認されている。²⁶⁾ 大部分はI型であり、コラーゲンの97%前後を占める一方、V型は2—3%にすぎない。²⁷⁾ しかしながら、佐藤ら^{8,28)}はこの量的に少ない部分であるV型コラーゲンの溶解性の変化が、ニジマス・マイワシ筋肉の軟化と相関することを示した。さらに、軟化しないトラフグではIおよびV型コ

ラーゲンのいずれにも溶解性の変化は認められないことが明らかとなった。²⁹⁾ コラーゲンは各種の分子間架橋により安定化していることから、これらの結果は、V型コラーゲンにおいて分子間架橋の崩壊、あるいは架橋の存在する部位の分解が起こっていることを示すものである。

山下と小長谷^{30,31)}はサケの産卵期における肉質の低下が、筋細胞の周辺に存在する食細胞様の細胞のカテプシンLによる作用が原因であることを報告している。この場合、カテプシンLの作用によりコラーゲン分子がわずかに低分子化することから、カテプシンLの作用によりコラーゲンの非らせん部分に分解が起こっているものと考えられている。ところが、魚肉の冷蔵中に認められるコラーゲン繊維の崩壊の場合、壊れるコラーゲン繊維の周辺には食細胞は認められない。²³⁾ つまり、冷蔵中のコラーゲンの分解には、サケの場合とは異なる機構が作用していると思われる。

また、コラーゲン分子の分解の指標となる、エキス中のヒドロキシプロリン(Hyp)量を測定した結果、7魚種において、軟化した後もHyp量の増加は認められなかった(未発表)。Hypはコラーゲンに特異的に存在するアミノ酸であり、コラーゲン分子のらせん部分の安定化に関与している。つまり、Hyp量の増加が認められないのは、コラーゲンの分解がらせん部分以外の部位で生じていることを示している。一方、代表的な分子間架橋成分のひとつであるピリジノリン(Pyr)の、エキス中の含有量を調べたところ、軟化した筋肉において増加が認められた。³²⁾ HypとPyrの実験結果から考えると、冷蔵中のコラーゲンの分解はHypが含まれず、かつPyrが含まれるような部位で生じていると考えられる。冷蔵中にはコラーゲン分子に大きな低分子化が起こらないことから、²⁸⁾ このような部位はコラーゲン分子の非らせん部分が有力であり、コラーゲンは魚肉の冷蔵中にかなり限定的な酵素作用を受けているようである。

5. 筋内膜を構成するコラーゲンの分子種

魚類コラーゲンの死後変化はV型コラーゲンに特異的であることが佐藤ら^{8,28)}により報告されている。また、組織学的には筋内膜のコラーゲン繊維のみに構造破壊が生じ、筋隔膜には変化が起こらない。²³⁾ ところで、コラーゲン分子は、分子種によって生体における局在部位が異なることが報告されている。^{33,34)} これらの結果より、構造変化が起こる筋内膜のコラーゲン繊維はV型コラーゲンにより構成されている可能性が考えられる。そこで、ニジマス筋肉のI型およびV型コラーゲンに対するポリクローナル抗体を用い、免疫組織学的にそれぞれの局在部位を調べたところ、筋隔膜はI型コラーゲンによ

り構成されているのに対し、筋内膜はV型により構成されていることが明らかとなった。³⁵⁾ これにより、V型コラーゲンに特異的に生じた変化が筋内膜の脆弱化を引き起こし、結果的に筋肉の軟化につながるものと考えられた。

6. 血抜きによる軟化防止効果

活魚を即殺する際には、「血抜き」が行われる。この操作は魚肉の鮮度の良さを持続させる効果があるとされているが、具体的な効果についての研究例は無い。そこで、マダイ・ブリをはじめとする代表的な養殖魚6種について、脱血による軟化の防止効果について検討した。^{36,37)} 回遊性の魚種であるブリ・マアジ・シマアジについては軟化が遅延する効果が認められ、これと並行してコラーゲン繊維の崩壊が遅れることも明らかとなった。一方、底生性の魚種であるマダイ・ヒラメ・メジナにおいては軟化の遅延効果は認められなかった。回遊魚において比較的多量の血液が回収されること、また回遊魚は比較軟化が速いことから、回遊魚の血液中にコラーゲン繊維の崩壊を引き起こす何らかの物質が含まれている可能性がある。この物質の正体は現在のところ不明であり、今後それらを明らかにしていくことが必要である。

7. 絶食飼育による肉質の改善

魚の出荷前に、一部の業者において肉質の改善のため一定期間の絶食期間を置くことがある。そこで絶食飼育の具体的な効果をニジマスおよびマダイについて調べたところ、脂質含量が低下するとともに、筋肉の硬さが増加した。^{38,39)} この原因を調べた結果、筋細胞が絶食により細くなることで、逆に一定面積あたりの結合組織量が増加したことに起因することが明らかとなった。この際、遊離態のHypが絶食後に減少していたことから、コラーゲンの分解活性が低下していたと考えられる。このことは、死後におけるコラーゲンの分解にも影響を与える可能性がある。

8. まとめ

以上の結果より、魚肉の冷蔵初期における軟化現象にはコラーゲンが大きく関わっている。現在のところ、何が原因となってコラーゲンに変化が生ずるのかは不明であるが、恐らく酵素作用によるものであり、回遊魚の軟化が速いことや、血抜きにより軟化が遅れるという現象は大きなヒントになると思われる。そこに作用する酵素が精製・同定されれば、新たな鮮度保持剤の開発なども期待できる。また血抜きや絶食飼育の例に見られたように、魚肉の肉質は外部からの調節がある程度可能であ

り、養殖魚の品質改善にも応用可能と思われる。畜肉の軟化に関する研究においてもコラーゲンの関与は報告されているが、^{40,41)} 畜肉では筋原繊維の変化が結合組織の変化よりも速く生じるため、⁴²⁾ 魚肉とはかなり異なる軟化機構の存在が考えられる。今後、魚肉の軟化に対するコラーゲンの関与についてさらに詳しく検討を行うことで、畜肉の軟化機構の解明にもつながり得るものと思われる。

謝 辞

本研究は京都大学農学部および近畿大学農学部において行われたものであり、京都大学の志水 寛先生、坂口 守彦先生、豊原治彦先生、俣笠隆彦先生、近畿大学の牧之段保夫先生、中川孝之先生をはじめとする諸先生方、共同研究者の皆様に心からお礼申し上げます。

文 献

- 1) H. Yamanaka, T. Nakagawa, T. Kikuchi, and K. Amano: Studies on the contraction of carp muscle-I. Remarkable differences between rigor mortis and thaw rigor. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **44**, 1123-1126 (1978).
- 2) K. Hatae, S. Tamari, K. Miyahara, and J. J. Matsumoto: Species difference and changes in the physical properties of fish muscle as freshness decreases. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **51**, 1155-1161 (1985).
- 3) H. Toyohara and Y. Shimizu: Relation of the rigor mortis of fish body and the texture of the muscle. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **54**, 1795-1798 (1988).
- 4) K. Hatae, K. H. Lee, T. Tsuchiya, and A. Shimada: Textural properties of cultured and wild fish meat. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **55**, 363-368 (1989).
- 5) H. Oka, K. Ohno, and J. Ninomiya: Changes in texture during cold storage of cultured yellowtail meat prepared by different killing methods. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **56**, 1673-1678 (1990).
- 6) T. Nakayama, T. Kimata, and A. Ooi: Texture of raw and cooked fish muscles investigated by sensory and instrumental evaluations. *Nippon Syokuhin Kogyo Gakkaishi*, **37**, 988-996 (1990).
- 7) M. Ando, H. Toyohara, Y. Shimizu, and M. Sakaguchi: Post-mortem tenderization of fish muscle proceeds independently of resolution of rigor mortis. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **57**, 1165-1169 (1991).
- 8) 佐藤健司, 安藤正史, 川瀬博士, 豊原治彦, 折笠恭子, 大槻耕三, 河端 信: 冷蔵中におけるマイワシ肉の軟化とコラーゲンの性状変化. 平成4年度日本水産学会春季大会講演要旨集, p. 344.
- 9) S. Mochizuki and A. Sato: Effects of various killing procedures and storage temperatures on post-mortem changes in the muscle of horse mackerel. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **60**, 125-130 (1994).
- 10) K. Hatae, S. Watabe, Y. Okajima, M. Shirai, A. Shimada, and H. Yamanaka: Differences in the ultrastructure of carp muscle slices due to varying "Arai" treatment: An electron microscopic observation. *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 1593-1600 (1991).
- 11) K. Takahashi, T. Fukuzawa, and T. Yasui: Formation of myofibrillar fragments and reversible contraction of sarco-

- meres in chicken pectoral muscle. *J. Food Sci.*, **32**, 409-413 (1967).
- 12) T. Tokiwa and H. Matsumiya: Fragmentation of fish myofibril. Effect of storage condition and muscle cathepsin. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **35**, 1099-1109 (1969).
 - 13) H. Tsuchiya, S. Kita, and N. Seki: Postmortem changes in α -actinin and connectin in carp and rainbow trout muscles. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **58**, 793-798 (1992).
 - 14) K. Tachibana, T. Mishima, and M. Tsuchimoto: Changes of ultrastructure of cytochemical Mg^{2+} ATPase activity in ordinary muscle of cultured and wild red sea bream during storage in ice. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **59**, 721-727 (1993).
 - 15) Y. Kumano and N. Seki: Changes in α -connectin content during storage of iced, frozen, and thawed fish muscle. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **59**, 559-564 (1993).
 - 16) S. Kubota, K. Sato, K. Ohtsuki, and M. Kawabata: Degradation of carp α -connectin by endogenous protease in SDS-urea solution. *Fisheries Sci.*, **60**, 627-628 (1994).
 - 17) Y. Ochiai, Y. Kariya, S. Watabe, and K. Hashimoto: Heat-induced tendering of turban shell (*Batillus cornutus*) muscle. *J. Food Sci.*, **50**, 981-984 (1985).
 - 18) K. Sato, R. Yoshinaga, 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).
 - 19) K. Hatae, A. Tobimatsu, M. Takeyama, and J. J. Matsumoto: Contribution of connective tissues on the texture difference of various fish species. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **52**, 2001-2007 (1986).
 - 20) R. P. Olachea, H. Ushio, S. Watabe, K. Takada, and K. Hatae: Toughness and collagen content of abalone muscles. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**, 6-11 (1993).
 - 21) M. Ando, H. Toyohara, Y. Shimizu, and M. Sakaguchi: Post-mortem tenderization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) muscle caused by gradual disintegration of the extracellular matrix structure. *J. Sci. Food Agric.*, **55**, 589-597 (1991).
 - 22) 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).
 - 23) 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).
 - 24) M. Ando, Y. Yoshimoto, K. Inabu, T. Nakagawa, and Y. Makinodan: Post-mortem change of three-dimensional structure of collagen fibrillar network in fish muscle pericellular connective tissue corresponding to post-mortem tenderization. *Fisheries Sci.*, **61**, 327-330 (1995).
 - 25) I. C. Hallet and H. A. Bremner: Fine structure of the myocommata-muscle fiber junction in hoki (*Macrurus novaezelandiae*). *J. Sci. Food Agric.*, **37**, 1011-1018 (1986).
 - 26) K. Sato, R. Yoshinaka, M. Sato, Y. Itoh, and Y. Shimizu: Isolation of types I and V collagens from carp muscle. *Comp. Biochem. Physiol.*, **90B**, 155-158 (1988).
 - 27) 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).
 - 28) K. Sato, C. Ohashi, K. Ohtsuki, and M. Kawabata: Type V collagen in trout (*Salmo gairdneri*) muscle and its solubility change during chilled storage of muscle. *J. Agric. Food Chem.*, **39**, 1222-1225 (1991).
 - 29) 佐藤健司, 安藤正史, 久保田 賢, 川瀬博士, 豊原治彦, 坂口守彦, 大槻耕三, 河端 信: トラフグ冷蔵中に生じる筋肉コラーゲンの性状変化. 平成4年度日本水産学会春季大会講演要旨集, 1992, p. 182.
 - 30) M. Yamashita, and S. Konagaya: Hydrolytic of salmon cathepsins B and L to muscle structural proteins in respect of muscle softening. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **57**, 1917-1922 (1991).
 - 31) 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).
 - 32) 安藤正史, 中川孝之, 牧之段保夫: 魚類筋肉コラーゲンにおけるピリジノリンの定量. 平成7年度日本水産学会秋季大会講演要旨集, 1995, p. 133.
 - 33) V. C. Duance, D. J. Restall, H. Beard, F. J. Bourne, and A. J. Bailey: The location of three collagen types in skeletal muscle. *FEBS Lett.*, **79**, 248-252 (1977).
 - 34) S. Mizuta, R. Yoshinaka, M. Sato, T. Suzuki, and M. Sakaguchi: Immunohistochemical localization of genetically distinct types of collagen in muscle of kuruma prawn *penaeus japonicus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **103B**, 917-922 (1992).
 - 35) 安藤正史, 佐藤健司, 大槻耕三, 河端 信, 豊原治彦, 坂口守彦, 中川孝之, 牧之段保夫: 魚類I型およびV型コラーゲン分布の免疫組織学的検討. 平成5年度日本水産学会春季大会講演要旨集, 1993, p. 212.
 - 36) 安藤正史, 西蔵篤司, 鎌形明緒, 伊藤久美子, 中川孝之, 牧之段保夫: 脱血による魚肉の鮮度保持機構—I. 血液による筋組織の構造と物性への影響. 平成6年度日本水産学会秋季大会講演要旨集, 1994, p. 178.
 - 37) 安藤正史, 西蔵篤司, 鎌形明緒, 伊藤久美子, 中川孝之, 牧之段保夫: 脱血による魚肉の鮮度保持機構—II. 肉質の軟化防止効果における魚種特性. 平成7年度日本水産学会春季大会講演要旨集, 1995, p. 295.
 - 38) 安藤正史: 絶食飼育による養殖魚の肉質改善の試み. 養殖, 69-71, 1994年1月号.
 - 39) 安藤正史, 滝井健二, 熊井英水, 川田智司, 牧之段保夫: 絶食飼育による養殖魚の肉質改善—II. 絶食によるマダイ筋肉の物性変化について. 平成6年度日本水産学会春季大会講演要旨集, 1994, p. 48.
 - 40) T. Nishimura, A. Hattori, and K. Takahashi: Structural weakening of intramuscular connective tissue during conditioning of beef. *Meat Sci.*, **39**, 127-133 (1994).
 - 41) A. Liu, T. Nishimura, and K. Takahashi: Structural weakening of intramuscular connective tissue during post mortem ageing of chicken semitendinosus muscle. *Meat Sci.*, **39**, 135-142 (1994).
 - 42) 高橋興成: 熟成に伴う食肉の軟化. 畜産の研究, **46**, 1063-1070 (1992).