受賞者総説

魚肉の加熱ゲル形成に関する研究^{*1}

(平成9年度日本水産学会賞奨励賞受賞)

石 崎 松一郎^{*2}東京水産大学食品生産学科^{*3}

タンパク質のゲル化現象は、食品加工における様々な過程で認められ、食品の物性発現に密接に関係していることから、魚肉ねり製品、畜肉製品、乳製品など多くの加工食品の製造に利用されている。とくに魚肉ねり製品は、我々の重要なタンパク質源の一つとして、古くから食されてきた。魚肉ねり製品は、基本的には魚肉に2～3%の塩を加えてすり潰した後、加熱することによって作られるが、その製造工程は、魚肉タンパク質、とくにその主成分である筋原線維タンパク質の構造変化を巧みに利用した技術である。すなわち、魚肉ねり製品の質的性状は、加熱による筋原線維タンパク質のネットワーク構造を形成する能力で決定され、この能力によって塩ずりした肉糊(ゾル)は弾力性に富んだゲルに変化する。

魚肉タンパク質のゲル化現象は、その過程で起こるタンパク質の変性の問題とともに50年近くにわたって研究がなされている。¹⁻⁴⁾ 周知のように、ゲル化成分の主体は筋原線維タンパク質中のミオシンであり、⁵⁻⁷⁾ 今日まで魚肉ねり製品の研究はミオシンを対象に行われ、膨大な量の研究成果が蓄積されている。しかしながら、加熱過程で生じる変性タンパク質の構造とゲル形成性の間の定量的相関関係については充分な解析がなされているとは言い難い。著者らは、ゲル形成性がタンパク質の変性状態によって大きく左右されることに着目し、各種変性因子を用いて、魚類筋原線維タンパク質ゾルの加熱ゲル形成性とタンパク質変性の関係を明らかにしてきた。本稿では、これまでの著者らの研究を中心に、ゲル形成にとって必要な変性タンパク質の生成について概説する。

1. 加熱によるゲル形成反応

高分子電解質には加熱すると融解し、冷却すると再び凝固、ゲル化するものがある。これを熱可逆性ゲルとい

い、タンパク質の場合、ゼラチンゲルが代表例として挙げられる。これに対し、魚肉タンパク質のように加熱するとゲル化するが、冷却してもゲル化したままのものを熱不可逆性ゲルと称する。1948年、Ferry⁸⁾はタンパク質のゲル化に関する総説の中で、タンパク質のゲル形成における変性過程の重要性を指摘し、次式を提案した。

ここで、 χ はタンパク質分子(P)の数、NおよびDは未変性と変性の状態を指す。

上記の反応は、2つのステップ、すなわちタンパク質が構造変化を伴って熱変性する初期段階と、変性タンパク質が凝集する第2段階からなり、PDの生成速度(タンパク質の変性速度)に依存して進行する。タンパク質の状態がゲル化へと移行するのは、変性タンパク質分子間の凝集力と反発力の間に一定のバランスがある場合である。通常のタンパク質熱凝固物形成反応ではタンパク質の集合状態はランダムであるのに対し、ゲル化の場合には一定の規則性を持った連続的な網目構造形成が行われることになる。従って、加熱ゲル形成にとって重要な反応はタンパク質の変性過程であると言える。凝集が変性に先立ったり、比較的同時に起こる場合には良質なゲルは得られず、逆に凝集反応がタンパク質の変性より十分に遅いと、秩序性の高い緻密な網目構造が形成される。少なくとも、ゲル化反応を有利に展開するためには、凝集以前に変性タンパク質濃度を高めることが必要である。この考え方は、基本的には現在でも妥当とされているが、最近ではゲル化に先立つタンパク質分子の変性は部分的であることが大豆タンパク質など多くのタンパク質で明らかにされている。⁹⁻¹¹⁾

2. 魚肉タンパク質の紫外線処理と加熱ゲル形成性

以上述べたような観点から、著者らはまず、魚肉の加

^{*1} Studies on Thermal Gel-formation of Fish Meat Pastes.

^{*2} Shoichiro Ishizaki.

^{*3} Department of Food Science and Technology, Tokyo University of Fisheries, Konan 4, Minato, Tokyo 108-8477, Japan.

熱ゲル形成性におけるタンパク質変性の寄与を明らかにするために、変性因子として紫外線を取り上げ、マイワシ、スケトウダラ、トビウオなど魚肉ゾルの加熱ゲル物性に対する紫外線照射の効果を調べた。その結果、魚肉ゾルの加熱ゲル形成性が、紫外線照射に伴って上昇することを見出した。^{12,13)} さらに、得られた加熱ゲルにつき、走査型電子顕微鏡によるゲル微細構造の観察を行ったところ、紫外線照射したゲルにおいてタンパク質の凝集物と思われる粒子の形成を認めた。¹⁴⁾ これらの結果は、魚肉タンパク質が紫外線照射によってある種の変性を受け、熱ゲル化反応を促進させたことを示唆している。

タンパク質の高次構造の形成、保持には種々の化学結合が関与しているが、魚肉タンパク質のゲル形成に重要なのは疎水的相互作用、¹⁵⁻¹⁷⁾ 静電的相互作用、¹⁾ 水素結合、^{1,18)} ジスルフィド (S-S) 結合、^{19,20)} さらに魚肉特有の坐りを発現させるトランスグルタミナーゼ (TGase) による酵素架橋^{21,22)} などである。そこでまず、8-Anilino-1-naphthalene sulfonate (ANS) を疎水領域の探索指標として、スケトウダラ、マイワシおよびトビウオから調製したアクトミオシンにつき、表面疎水性に及ぼす紫外線照射の影響を検討した。その結果、紫外線照射は疎水性アミノ酸残基のタンパク質分子表面への露出を促し、その傾向は紫外線強度が大きいくほど顕著であることを明らかにした。²³⁾

次に、魚肉アクトミオシンの SH 基の挙動について調べた。紫外線照射は、アクトミオシン分子内部の SH 基を表面に露出させると同時に酸化を促進させ、アクトミオシン分子全体の SH 基量を著しく減少させることが確認された。²³⁾ この結果は、紫外線照射によって SH 基が酸化され、S-S 結合が増大したことを意味しており、タンパク質分子間に構造変化が生じていると推測される。丹羽ら¹⁹⁾ は、加熱によってタンパク質分子内の疎水性アミノ酸残基は表面に露出すること、また伊藤ら¹⁹⁾ は、加熱によって分子内 SH 基が表面に露出し S-S 結合が形成されることを報告している。紫外線照射によって生じた構造変化がアクトミオシンの熱変性にどのように作用するのか調べたところ、あらかじめ紫外線照射した場合には、加熱による表面疎水性の増大は比較的抑えられる傾向にあり、²³⁾ おそらく、紫外線照射によってある程度疎水性アミノ酸残基が表面に露出し相互作用しているため、加熱による影響が小さかったものと考えられる。一方、SH 基に関しては、加熱することで分子内部に残っていた SH 基の分子表面へ露出がさらに促進されるとともに著しい酸化反応によってその含量が急激に減少する傾向を示した。²³⁾

アクトミオシンは、ミオシンとアクチンの複合体であ

り、ゲル形成の主体はミオシン分子であることから、次に、ミオシンの紫外線照射による変性をその頭部サブフラグメント-1 (S1) と尾部ロッドに分けて検討した。²⁴⁾ ミオシンの溶解性は、紫外線照射によって減少したが、この減少は S1 およびロッドの両者に依存していることが示された。ミオシン分子の二次構造である α -ヘリックスは、紫外線照射によって部分的に崩壊することが認められたが、その傾向は S1 に比べて、ロッドで著しかった。表面疎水性においても、同様にロッドが紫外線照射に対して感受性が高いことを明らかにした。したがって、紫外線照射に伴うミオシン分子の構造変化は主としてロッド部分に依存していると推察された。最近、加熱に伴う表面疎水性の増大が主として S1 の変化に起因していることが、ウサギ・ミオシンで明らかにされており、²⁵⁾ 紫外線変性は、この点で加熱変性とは異なる性状変化を与えるものと思われる。

以上、紫外線照射による加熱ゲル形成性の上昇は、主として α -ヘリックス構造の部分的崩壊、システインの SH の酸化および表面疎水性基の変動によって部分変性した (特にロッド部分が影響を与えた) ミオシンの生成とその規則的構造が、結果的に加熱ゲル形成反応を有利に展開させると考えられた。

3. *n*-ブタノール添加と加熱ゲル形成性

n-ブタノールは、強力なタンパク質変性効果を有することで知られている。そこで、*n*-ブタノールを用いて魚肉の加熱ゲル形成性とミオシン変性の関係を調べた。各種魚肉ゾルに種々濃度の *n*-ブタノールを添加して得られた加熱ゲルの物性は、添加濃度が 0.6 M (終濃度) で最大に達した。同様の結果が筋原線維ならびにミオシンにおいても確認されたことから、^{26,27)} *n*-ブタノール添加は筋原線維タンパク質の熱ゲル化を促進させることが明らかとなった。

この加熱ゲル形成性の増大は、筋原線維タンパク質の変性状態に密接に関係していると予想されたため、次に、*n*-ブタノール存在下における筋原線維タンパク質の溶解性および表面疎水性を調べた。まず、アクトミオシンにつき、*n*-ブタノール存在下における溶解性と塩濃度の関係を調べたところ、塩濃度 (KCl 濃度) を低下させるとアクトミオシンの溶解性は顕著に減少するが、この減少は *n*-ブタノール添加によってさらに大きくなることが示された。²⁶⁾ この溶解性の減少は、疎水的相互作用に依存していると考えられたので、表面疎水性への影響を検討したところ、*n*-ブタノール添加によって、アクトミオシンの表面疎水性が著しく増大し、さらにこの増大はアクトミオシン濃度に依存していることが認められた。したがって、*n*-ブタノール添加によるゲル形成

性の増加に、アクトミオシンの表面疎水性領域が重要な役割を担っていると考えられる。ミオシンにおいても、やはり *n*-ブタノール添加による溶解性の減少と表面疎水性の増大が認められたので、²⁷⁾ これらの変化を S1 およびロッドの性状変化からさらに追跡したところ、0.6 M *n*-ブタノール存在下において、S1 の溶解性が低 KCl 濃度 (<0.5 M) で急激に減少することが認められた。しかしながら、ロッドでは *n*-ブタノールの影響は認められないことから、ミオシン分子中の S1 部分が、*n*-ブタノールに対する感受性を有していることが示唆された。魚類ミオシンの表面疎水性基は加熱によって容易に変動することが知られているが、¹⁵⁾ *n*-ブタノールの存在は、おもに S1 領域の構造変化を引き起こしながらこの加熱変動を著しく促進させることが明らかとなった。²⁷⁾

以上の結果から、*n*-ブタノール添加による魚肉ミオシンの加熱ゲル形成性の増大に、ミオシン分子中の S1 部分が重要な役割を担っていると推察した。S1 部位の変化に由来した事象が見出されたことは、ミオシンのゲル化機構を理解する上で極めて興味深いと思われる。ミオシンの加熱ゲル形成の初期段階では、表面疎水性の変化が効果的に進行すること²⁸⁾ およびミオシンの頭部が癒着し、しだいに凝集体が形成されていくこと^{29,30)} が魚肉およびウサギ・ミオシンでそれぞれ報告されており、魚肉ミオシンの変性過程での頭部領域の表面疎水性の変化が引き金となって、ゲル形成が進行する可能性が考えられた。

4. 高圧処理と加熱ゲル形成性

近年、圧力を食品加工に利用する試みが精力的に行われている。³¹⁾ 魚肉タンパク質においても例外でなく、高圧処理によってゲルが形成されること、^{32,33)} さらに、圧力処理の後低温貯蔵³⁴⁾あるいは加熱³²⁾することによって、そのゲル形成性が増大することが報告されている。しかしながら、得られたゲルの組織は、加熱ゲルの場合とはかなり異なると言われている。言い換えれば、魚肉タンパク質は高圧処理によって変性するが、この変性は必ずしも加熱変性とは同一ではないものと考えられる。そこで、クロカワカジキおよびマアジ・ミオシンにつき、高圧処理に伴う性状変化を溶解性、 α -ヘリックス含量および表面疎水性基の挙動から検討した。³⁵⁾ 高圧処理によって、ミオシンの溶解性は減少したが、断片化成分であるロッドの溶解性は大きな影響を受けなかったのに対し、S1 のそれは著しい影響を受け、2,000 atm 付近の圧力から溶解性が減少することを明らかにした。さらに、S1 の溶解性の減少はイオン強度によって左右され、0.6 M KCl 存在下の S1 は 0.1 M KCl 存在下の S1 に比べ圧力に対してより安定であることを見出した。高

圧処理に伴う α -ヘリックス構造の変化においても、ロッドには大きな変化が見られず、S1 において α -ヘリックス含量の減少が観察された。この場合でも S1 の安定性にはイオン強度による差があり、0.6 M KCl 存在下の S1 において α -ヘリックス含量の減少傾向がより小さかった。表面疎水性の変化においても、やはり高圧処理に伴うミオシンおよび S1 の表面疎水性基の著しい増大が観察され、ロッドでは変化が見られなかった。

以上の結果から、高圧処理によって、ミオシンの α -ヘリックス構造が部分的に崩壊することならびに表面疎水性基の著しい変動が生じていることが明らかとなった。さらに、これらの構造変化は、S1 部分の体積変化に由来し、この体積変化に対する安定性は静電相互作用に依存することを見出した。結果的に、S1 構造の柔軟性が魚種によって相違する可能性が示唆された。

5. おわりに

以上の結果より、魚肉タンパク質の加熱ゲル形成過程において、部分変性したタンパク質（変性中間体）の生成とその規則的な構造が最終ゲル化製品の物性に顕著な影響を与えることが明らかとなった。今回紹介した知見以外にも、著者らは界面変性や静電パルス処理によって同様の結果を得ており、^{36,37)} 変性タンパク質の重要性が確認された。近年、魚肉の坐りの発現には TGase によるミオシン重鎖間の架橋重合体の形成が必須であることが認識されるようになったが、^{38,39)} 魚種間での坐りやすさの相違という観点から見れば、著者らが指摘したような加熱によって生じる部分変性ミオシンの規則的分子配向が魚種間で異なり、その優劣が TGase による架橋重合反応の進行を決定していると言えるのではないだろうか。

このような変性タンパク質の構造形成を理解するためには、古典的な変性の二状態説のみでは不十分である。最近、N 状態と D 状態の間に、中間状態（モルテングロビュール状態）が存在することが卵白アルブミン⁴⁰⁾や β -ラクトグロブリン⁴¹⁾など多くのタンパク質の変性過程で示されており、今後、魚肉タンパク質の加熱ゲル形成性を解析する上で、この中間状態を考慮しながら、変性タンパク質量の正確な測定と詳細な構造解明を行うことが重要であると思われる。この目的のためには、動的光散乱や断熱型示差熱分析などが有効な手段となるであろう。

謝 辞

本稿で紹介させていただいた著者らの研究は、東京水産大学食品生産学科および水産大学校製造学科（現食品化学科）において行ったものである。本研究の遂行に当

たり、ご指導ご鞭撻を賜った東京水産大学名誉教授田口武先生、同教授田中宗彦先生、水産大学校教授浜田盛承先生に心からお礼申し上げます。また、様々な面でご協力を賜った多くの共同研究者の皆様ならびに東京大学農学部教授渡部終五先生、東京水産大学教授木村 茂先生をはじめ、日本水産学会、とくに魚肉タンパク質集談会で貴重なご意見をいただいた多くの方々に深く感謝する。

文 献

- 岡田 稔：水産ねり製品の品質，特に弾力に関する研究。東海水研報，No. 36, 21-126 (1963)。
- 「魚肉ねり製品—研究と技術」(志水 寛編)，恒星社厚生閣，東京，1984，pp. 1-134。
- 「水産加工とタンパク質の変性制御」(新井健一編)，恒星社厚生閣，東京，1991，pp. 1-104。
- A. P. Stone and D. W. Stanley: Mechanisms of fish muscle gelation. *Food Research International*, **25**, 117-123 (1992)。
- T. Yasui, M. Ishioroshi, H. Nakano, and K. Samejima: Changes in shear modulus, ultrastructure and spin-spin relaxation times of water associated with heat-induced gelation of myosin. *J. Food Sci.*, **44**, 1201-1204 & 1211 (1979)。
- E. Niwa, K. Koshiba, M. Matsuzaki, T. Nakayama, and I. Hamada: Species-specificities of myosin heavy chain in setting and returing. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **46**, 1497-1500 (1980)。
- 西岡不二男，町田 律，志水 寛：シイラ・ミオシンのかまぼこ形成能。日水誌，**49**, 1233-1238 (1983)。
- J. D. Ferry: Protein gels. *Adv. Prot. Chem.*, **3**, 1-78 (1948)。
- T. Nakamura, S. Usami, and T. Mori: Network structure formation in thermally induced gelation of glycinin. *J. Agric. Food Chem.*, **32**, 349-352 (1984)。
- T. Koseki, N. Kitabatake, and E. Doi: Irreversible thermal denaturation and formation of linear aggregates of ovalbumin. *Food Hydrocoll.*, **3**, 123-134 (1989)。
- M. Hirose and H. Yamashita: Partially folded state of the disulfide-reduced N-terminal half-molecule of ovotransferrin as a renaturation intermediate. *J. Biol. Chem.*, **266**, 1463-1468 (1991)。
- T. Taguchi, S. Ishizaki, M. Tanaka, Y. Nagashima, and K. Amano: Effect of ultraviolet irradiation on the thermal gelation of fish meat pastes. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, **35**, 452-455 (1988)。
- T. Taguchi, S. Ishizaki, M. Tanaka, Y. Nagashima, and K. Amano: Effect of ultraviolet irradiation on thermal gelation of muscle pastes. *J. Food Sci.*, **35**, 1438-1440 & 1465 (1989)。
- S. Ishizaki, M. Hamada, N. Iso, and T. Taguchi: Effect of ultraviolet irradiation on rheological properties of thermal gels from sardine and pork meat pastes. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **59**, 1219-1224 (1993)。
- 丹羽榮二：魚肉のゲル化と疎水結合について。日水誌，**41**, 907-910 (1975)。
- E. Niwa, K. Sato, R. Suzuki, T. Nakayama, and I. Hamada: Fluorometric study of setting properties of fish flesh sol. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **47**, 817-821 (1981)。
- E. Niwa, T. Nakayama, and I. Hamada: The third evidence for the participation of hydrophobic interactions in fish flesh gel formation. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **49**, 1763 (1983)。
- E. Niwa, Y. Matsubara, and I. Hamada: Hydrogen and other polar bondings in fish flesh gel and setting gel. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **48**, 667-670 (1982)。
- 伊藤慶明，吉中禮二，池田静徳：コイアクトミオシンの加熱によるSH基の挙動。日水誌，**45**, 1019-1022 (1979)。
- 伊藤慶明，吉中禮二，池田静徳：コイアクトミオシンの加熱ゲル形成におけるタンパク質の高分子化およびその高分子化へのSH基の関与。日水誌，**46**, 617-620 (1980)。
- 関 伸夫，宇野秀樹，李 南赫，木村郁夫，豊田恭平，藤田孝夫，新井健一：スケトウダラ筋肉およびすり身中のトランスグルタミナーゼ活性とミオシンB との反応。日水誌，**56**, 125-132 (1990)。
- H. Kishi, H. Nozawa, and N. Seki: Reactivity of muscle transglutaminase on carp myofibrils and myosin B. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **57**, 1203-1210 (1991)。
- S. Ishizaki, M. Hamada, M. Tanaka, and T. Taguchi: Conformational changes in actomyosin from fish and pork muscles by ultraviolet irradiation. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **59**, 2071-2077 (1993)。
- S. Ishizaki, M. Ogasawara, M. Tanaka, and T. Taguchi: Ultraviolet denaturation of flying fish myosin and its fragments. *Fisheries Sci.*, **60**, 603-606 (1994)。
- C. Boyer, S. Joandel, A. Ouali, and J. Culioli: Determination of surface hydrophobicity of fast and slow myosins from rabbit skeletal muscles: Implication in heat-induced gelation. *J. Sci. Food Agric.*, **72**, 367-375 (1996)。
- W.-L. Lin, S. Ishizaki, M. Tanaka, R. Takai, T. Taguchi, and K. Amano: Thermal gel-forming properties of oval filefish muscle proteins in the presence of *n*-butanol. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, **40**, 738-742 (1993)。
- S. Ishizaki, W.-L. Lin, M. Tanaka, T. Taguchi, and K. Amano: Fish myosin fragments solubility and ANS-fluorescence intensity affected by *n*-butanol. *J. Food Sci.*, **59**, 97-100 & 114 (1994)。
- L. Wicker, T. C. Lanier, D. D. Hamann, and T. Akahane: Thermal transitions on myosin-ANS fluorescence and gel rigidity. *J. Food Sci.*, **51**, 1540-1543 (1986)。
- K. Yamamoto: Electron microscopy of thermal aggregation of myosin. *J. Biochem.*, **108**, 896-898 (1990)。
- A. Sharp and G. Offer: The mechanism of formation of gels from myosin molecules. *J. Sci. Food Agric.*, **58**, 63-73 (1992)。
- R. Hayashi: Application of high pressure to food processing and preservation: philosophy and development, in "Use of High Pressure to Food Processing and Preservation; Engineering and Food" (ed. by W. E. L. Spiess and H. Schubert), Vol. 2, Elsevier Applied Sci., London, 1989, pp. 815-826。
- W.-C. Ko, M. Tanaka, Y. Nagashima, T. Taguchi, and K. Amano: Effect of high pressure treatment on the thermal gelation of sardine and alaska pollack meat and myosin pastes. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, **37**, 637-642 (1990)。
- 昌子 有，佐伯宏樹，若目田 篤，中村 誠，野中道夫：高圧によるスケトウダラすり身のゲル化と筋原線維タンパク質の変化。日水誌，**56**, 2069-2076 (1990)。
- 昌子 有，佐伯宏樹，若目田 篤，中村 誠，野中道夫：スケトウダラすり身加圧ゲルの弾力と筋原線維タンパク質の変化に及ぼす保存温度の影響。日水誌，**58**, 329-336 (1992)。
- S. Ishizaki, M. Tanaka, R. Takai, and T. Taguchi: Stalibity of fish myosins and their fragments to high hydrostatic pressure. *Fisheries Sci.*, **61**, 989-992 (1995)。
- S. Ishizaki, K. Endo, W.-L. Lin, M. Tanaka, T. Taguchi, and K. Amano: Thermal gelformation of air blown fish

- muscle actomyosin. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, **41**, 355-357 (1994).
- 37) S. Ishizaki, T. Kohno, M. Tanaka, T. Taguchi, and K. Amano: Thermal gelation of fish muscle proteins treated with electric pulses and air-blowing. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, **42**, 131-136 (1995).
- 38) H. Araki and N. Seki: Comparison of reactivity of transglutaminase to various fish actomyosins. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **59**, 711-716 (1993).
- 39) N. Maruyama, H. Nozawa, I. Kimura, M. Satake, and N. Seki: Transglutaminase-induced polymerization of a mixture of different fish myosins. *Fisheries Sci.*, **61**, 495-500 (1995).
- 40) T. Koseki, N. Kitabatake, and E. Doi: Conformational changes in ovalbumin at acid pH. *J. Biochem.*, **103**, 425-430 (1988).
- 41) V. E. Bychkova, R. Berni, G. L. Rossi, V. P. Kutysenko, and O. B. Ptitsyn: Retinol-binding protein is in the molten globule state at low pH. *Biochemistry*, **31**, 7566-7571 (1992).