

かまぼこの火戻り現象に及ぼす
緑豆由来プロテアーゼインヒビターによる抑制効果に関する研究
The suppressive effect of protease inhibitor purified
from mung bean on phenomenon of *himodori kamaboko*

2018年12月

長崎大学大学院水産・環境科学総合研究科

宮崎 貴美子

Kimiko Miyazaki

目次

第 1 章	緒言	1
第 2 章	かまぼこの火戻り温度での加熱に伴う筋原線維懸濁液への プロテアーゼインヒビター添加の影響	17
1	実験方法	19
1-1	試薬	19
1-2	筋原線維の調製と加熱	19
1-3	SDS-PAGE およびイムノブロッティング	21
1-4	筋原線維の透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察	21
2	結果および考察	22
2-1	SDS-PAGE	22
2-3	イムノブロッティング	24
2-4	筋原線維の TEM 観察	24
第 3 章	プロテアーゼインヒビター添加がかまぼこの 火戻り現象に及ぼす影響	29
1	実験方法	31
1-1	試薬	31
1-2	かまぼこの作製と加熱条件	31
1-3	物性値の測定	33
1-4	光学顕微鏡 (SEM) 観察	34
1-5	透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察	34
1-6	統計処理	34
2	結果および考察	34
2-1	物性値 (破断応力および破断変形)	34

2-2 SEM 観察.....	35
2-3 TEM 観察.....	39
第 4 章 総合考察.....	42
参考文献.....	48
謝辞.....	54

第 1 章 緒言

世界の人口は現在の 74 億人から 2050 年には 90 億人に達することが予想され、それに伴い飢餓人口は現在の 9 億人からさらに増加することが危惧されている。人口問題は食糧問題と大きく関わることから将来のさらなる食糧不足が危ぶまれる。世界の食糧不足を解決するための生産地としての耕地は、気候変動による降水パターンの変化により乾燥地帯が増加し、亜熱帯雨林地帯の雨量は増加するといわれている。このようなことから、陸地を耕地として利用することは難しく、海を豊かな状態にして多くの食糧を供給することが有効であろうと考えられている。

一方、世界的な健康志向により、魚介類に対する関心が高まり、その消費量は増え続けている。なかでも、水産練り製品に代表されるかまぼこは全く新しい食材として世界中に拡大しつつある。そもそも、かまぼこは日本独自の水産加工品であるが、最近では日本以外でもかまぼこに代表される水産練り製品や冷凍すり身産業は急速に発展し、それらの生産量は日本と同じレベルにまで増大している。世界のすり身・水産練り製品生産・消費量 (Fukuda, 2014; みなと新聞, 2018) によると、2017 年のすり身の生産量は日本が 4.1 万トンであるのに対し、アメリカは 23.7 万トン、中国は 13.0 万トン、インドは 11.0 万トン、タイは 6.0 万トンと日本の生産量より多い (Fig. 1-1)。しかし、同年のすり身の消費量をみると、日本が 27.0 万トンと最多で、次いで韓国の 13.0 万トン、中国の 10.0 万トン、東南アジアの 9.0 万トン、アメリカと EU の 4.5 万トンと続き (Fig. 1-2)、すり身は世界各地で生産され、消費されているのがわかる。また、日本のすり身の消費量は生産量を

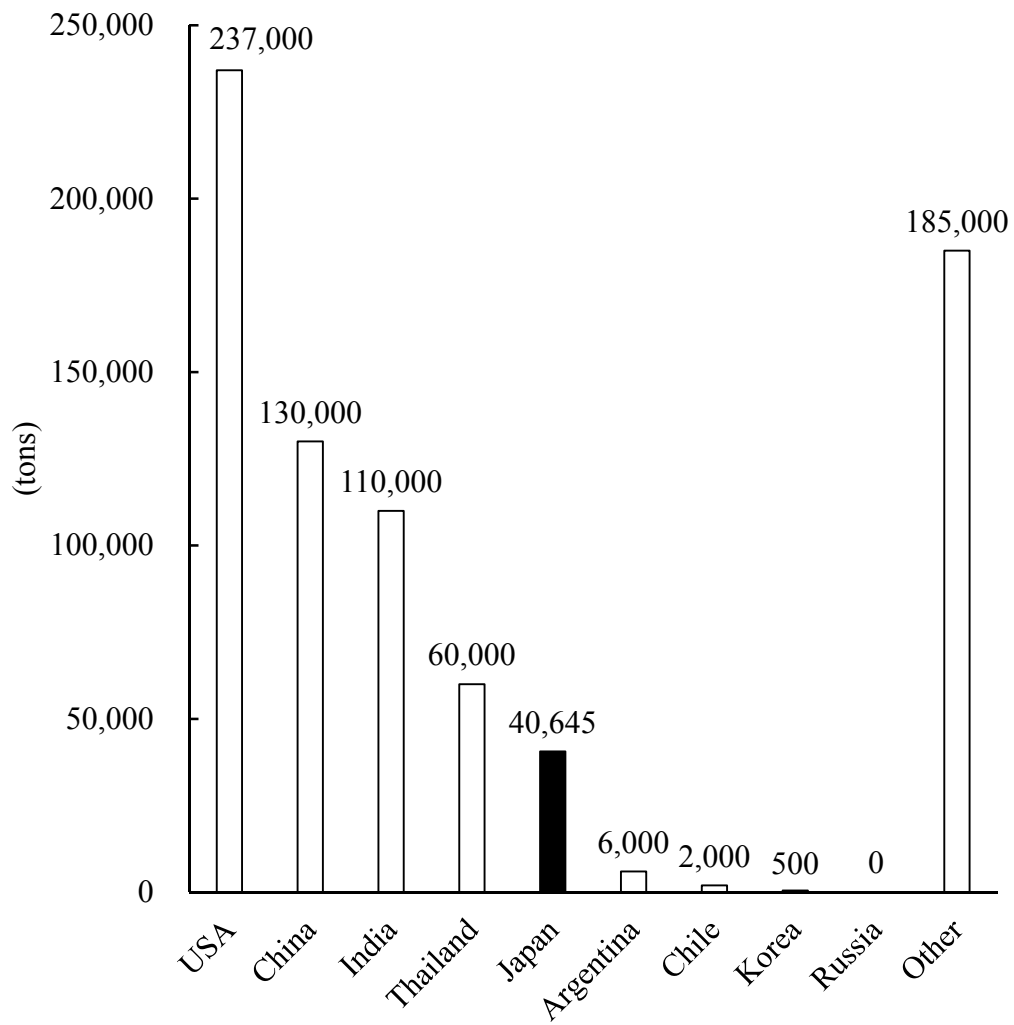


Fig. 1-1. World production of surimi in 2017.

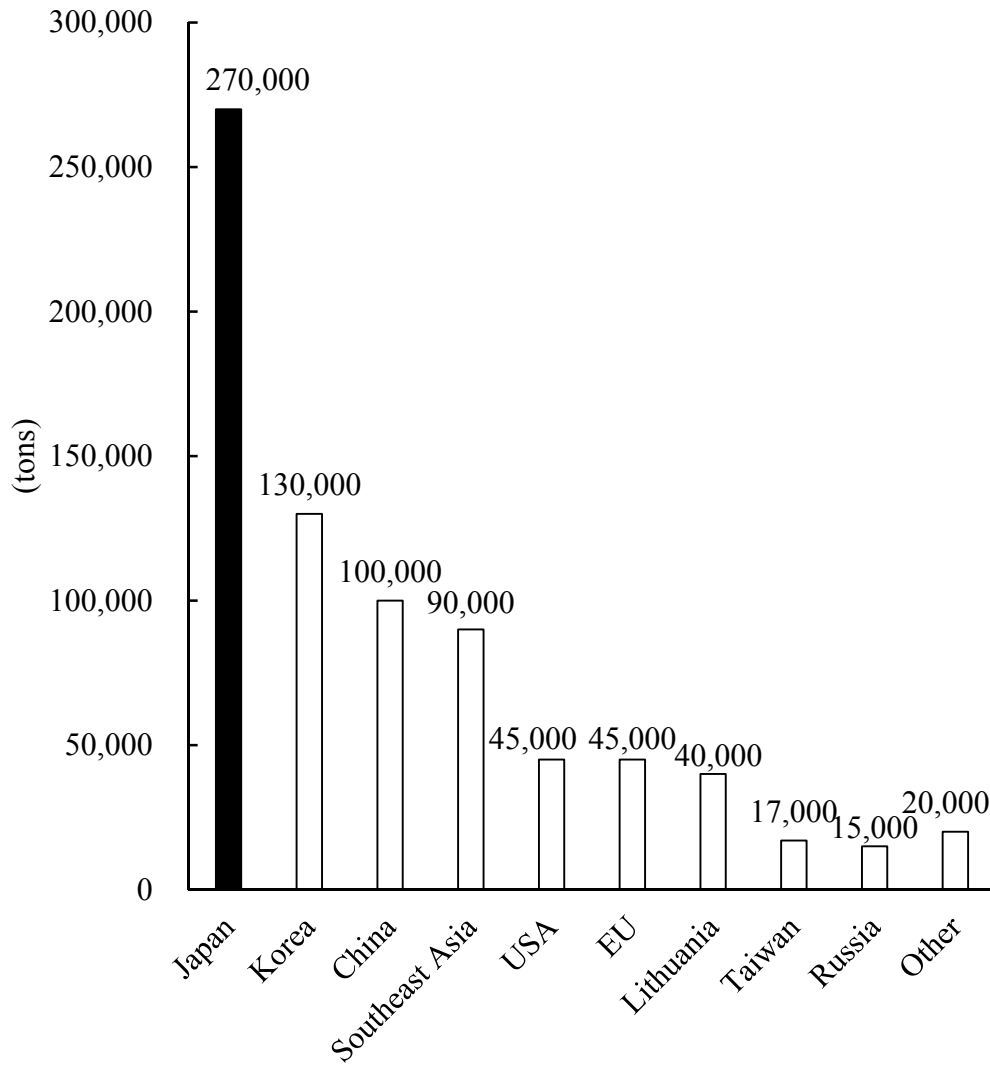


Fig.1-2 World consumption of surimi in 2017

大きく上回っていることから、日本国内に流通しているすり身の多くは海外に依存していると考えられる。さらに、練り製品の消費量をみると、日本は 50.5 万トン、次いで中国の 50.0 万トン、東南アジアの 30.0 万トン、韓国の 26.0 万トン、欧州の 14.5 万トン、北米の 11.5 万トンで (Fig. 1-3)、日本が最多で、いずれの国あるいは地域でも練り製品の消費量がすり身の消費量よりも多い。一方、水産物流通調査品目別水産加工品生産量累年統計 (農林水産省, 2018) によると、2006 年における日本の水産加工品の総生産量は約 200 万トンで、その後は緩やかに減少しており、2017 年は約 157 万トンとなっている。この間、練り製品の生産量は概ね 55 万トン前後で目立った変化はなく、水産加工品の総生産量に占める練り製品の生産量の割合も約 30% と高い割合のまま推移している (Fig. 1-4) また、家計調査 (二人以上の世帯) 品目別都道府県庁所在市及び政令指定都市 (2010 年 4 月 1 日現在で政令指定都市であった都道府県庁所在市以外の都市 (川崎市, 相模原市, 浜松市, 堺市及び北九州市) ランキング (総務省, 2018) によれば、2015 年から 2017 年における魚肉練り製品の 1 世帯当たり年間の支出金額の年間平均は長崎市が 15,306 円で第 1 位であり、同市は全国有数の魚肉練り製品の消費都市といえる (Fig. 1-5)。

ところで、かまぼこ製造業者らによれば、かまぼこは製造日の素材の質や加熱時間、温度などの違いで製品の出来具合が左右されるといわれている。かまぼこの品質は、特に足と呼ばれる特有の弾力で決まるともいわれ、その足は品質を決定する重要な要素のひとつとなっている。かまぼこの足を形成させるためには、魚肉に 3% 程度の食塩を加えてすりつぶし、筋原線維タンパク質を肉糊と呼ばれるゾルにした後、40~50℃の低い温度で加熱することで坐りと呼ばれる透明感のあ

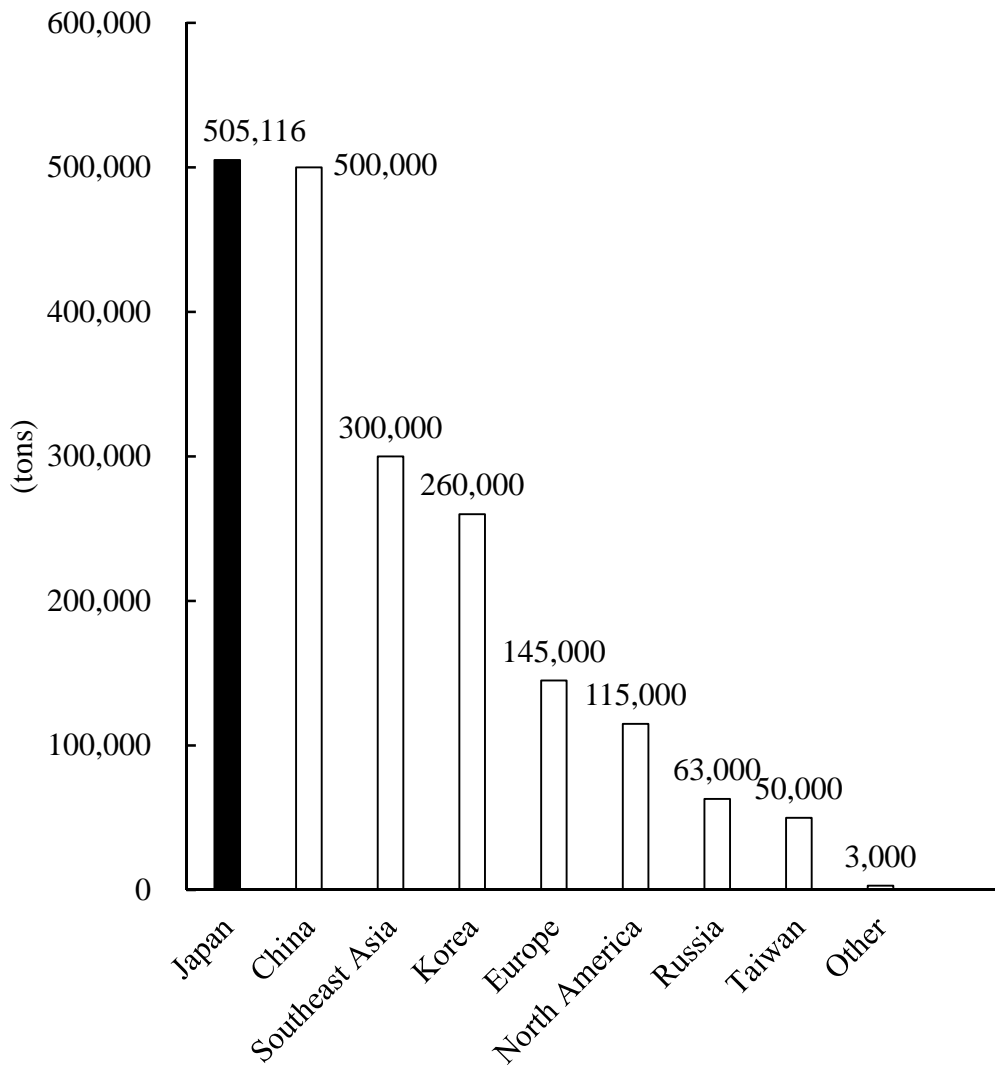


Fig. 1-3. World production of fish paste products in 2017.

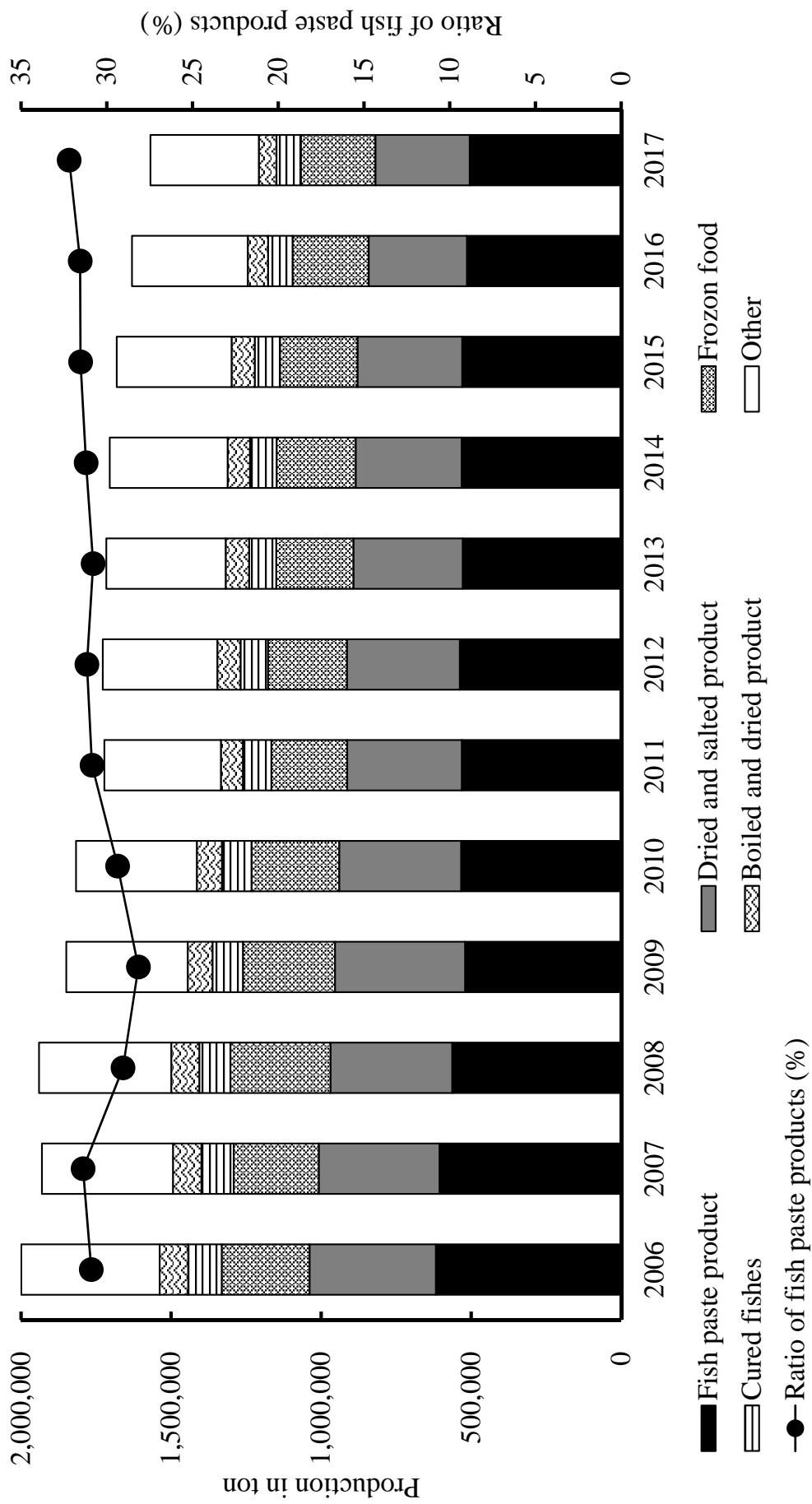


Fig. 1-4. Change in production of marine products.

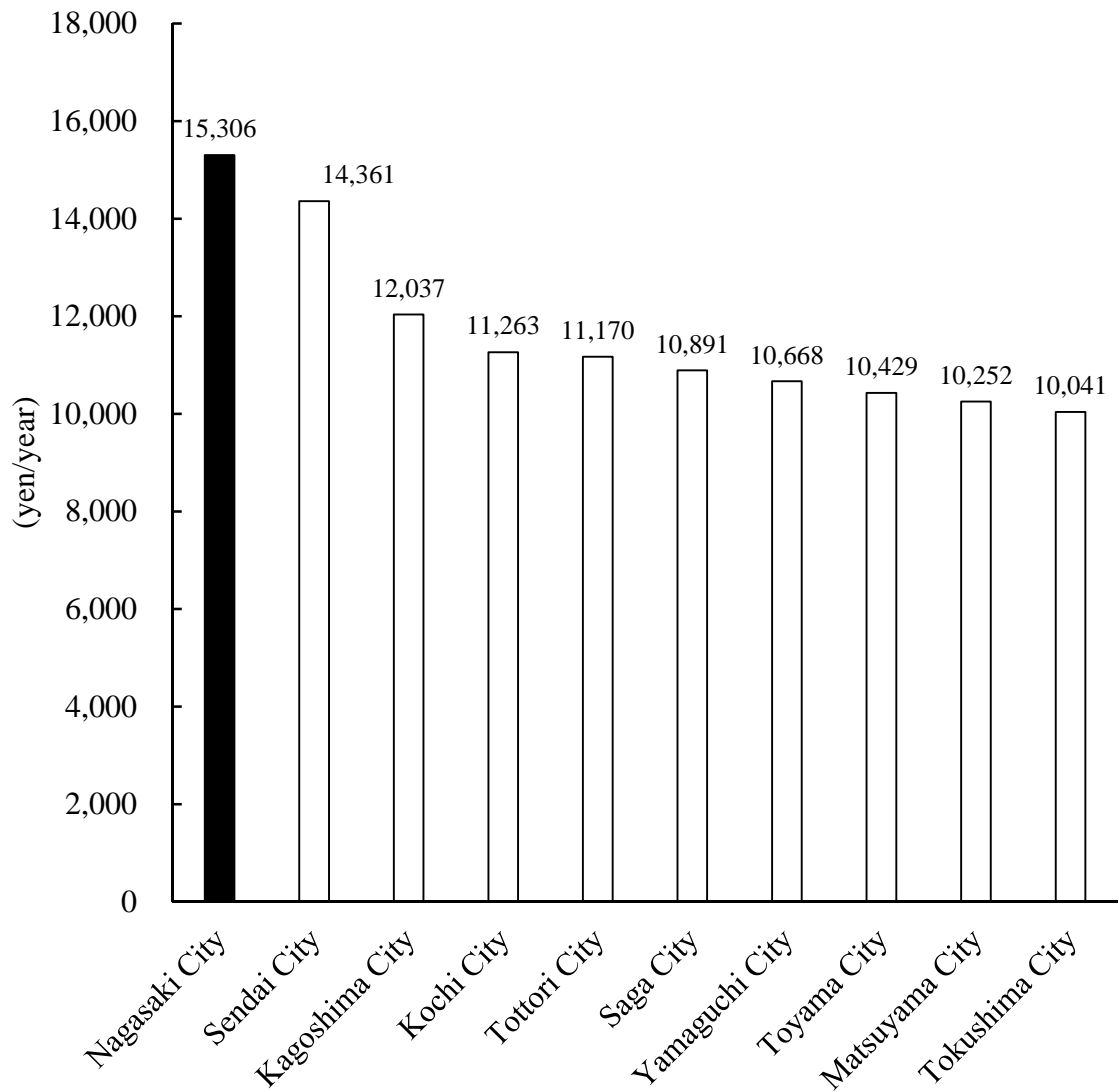


Fig. 1-5. Expenditure of fish paste products in Japan (2015-2017).

る強いしなやかなゲルに変化させる。坐りとは、肉糊を低温で加熱した際に肉糊中のアクトミオシンを主体とするタンパク質が不溶性の均一な網目構造に変換され、坐りゲルができる現象である(岡田, 2008)。さらに、この坐りゲルを 75℃以上で本加熱することで、かまぼことして仕上がるのである (Fig. 1-6)。これは、一度目の低温による加熱と食塩との作用で、タンパク質を適度に変質させ、タンパク質の分子同士が網目構造を形成し、二度目の激しい熱変性により、タンパク質分子間にさらに多数の架橋を形成させることによって網目構造が丈夫になるためである(岡田, 2008)。しかしながら、かまぼこは製造時の温度管理が難しく、この温度管理を怠ると、“火戻り”と呼ばれる足(弾力)の著しい減退が起こり、崩れやすい粗悪なかまぼこになることが関係業者により指摘されている。通常のかまぼこは指で押してもつぶれないが、火戻りを起こしたかまぼこは、指で軽く押すだけでつぶれてしまうほど弾力がなくなってしまう (Fig. 1-7)。火戻りが起こったかまぼこは商品価値がなくなり、関係業者に多大な経済的損害を与えることから、何らかの対策を講じることが求められている。また、かまぼこの原料魚の種類によっては、火戻りが生じやすい魚種と、そうでない魚種があることが知られている。極めて戻りやすい魚種には、マイワシ *Sardinops melanostictus*, ウルメイワシ *Etrumeus teres*, ウマヅラハギ *Thamnaconus modestus*, ニベ *Nibea mitsukurii*, マサバ *Scomber japonicus*, クロマグロ *Thunnus orientalis*, スケトウダラ *Theragra chalcogramma* など、戻りを起こしにくい魚種には、マエソ *Saurida macrolepis*, トビウオ *Cypselurus agoo*, マアジ *Trachurus japonicus* など、戻りを起こさない魚種には、ドクサバフグ *Lagocephalus lunaris* が挙げられる(志水ら, 1981)。このことから、戻りやすい魚種の種特異



Raw material fish



Fish meat



Water bleached fish
Fish after dehydration



Raikai
(karazuri • shiozuri • honzuri)



Molded



Two stage heating
Step of first heating : 40°C
Step of second heating : 90°C

Fig.1-6. Production process of kamaboko.



Nomal kamaboko



Himodori kamaboko

Fig.1-7. Nomal and himodori kamaboko.

性を系統発生や生態的特徴と結びつけるのは困難であるといわれている。関係業者らによれば、夏季に火戻りを生じやすいかまぼこの原料魚のひとつにワニエソ *Saurida wanieso* (Fig. 1-8) が指摘されている。ワニエソは、東シナ海、黄海、対馬海峡周辺海域などに生息し、主に底曳網漁業で漁獲される（酒井ら、2009）。他の底魚類に比べ身色が白く、ゲル形成能に優れていることから（志水ら、1976）、西日本を中心に高級練り製品の原料として需要が高いことでも知られている。しかし、関係業者によると、夏季、特に産卵期（7月頃）に、ワニエソでかまぼこを製造すると火戻りが生じやすいという。一方で、ワニエソを原料とするかまぼこは商品価値が高いため、関係業者らは火戻りを起こすことなく周年的なワニエソかまぼこを製造したいという切実な要望を持っている。本研究では、このワニエソを試料魚として研究を進めた。

ところで、かまぼこの火戻り発現機構については、いくつかの知見があり、現在のところ、「タンパク質の熱変性説」、「非酵素性火戻り誘因タンパク質説」、「筋肉プロテアーゼ説」の3説に大別される。タンパク質の熱変性説とは、50°C以上の温度域においてアクトミオシン粒子が受ける必然的な変化である（志水ら、1962）。また、志水ら（1962）は、60°C付近で顕著に現れるゲル劣化現象をもどりの一種である“火戻り”であろうとも報告している。非酵素性火戻り誘因タンパク質説とは、筋原線維（Mf）が熱によるかまぼこ形成への構造変化を起こす際にタンパク質との相互作用によりその構造変化過程を変え、かまぼこの性状を著しく変えることが主要因（岩田ら、1977）というものである。筋肉プロテアーゼ説とは、至適温度域で時間経過とともに進行するゲル崩壊現象が起こった際にミオシン重鎖の分解が起こる



Fig.1-8. Lizard fish *Saurida wanieso*.

(Suwansakornkul ら, 1993; 劉ら 1996a, b; 山下ら, 1996; Cao ら, 1999; Jiang ら, 2006) というものである。特に, コイの Mf 結合型セリンプロテアーゼを添加したゲルにおいて, 55~60℃の加熱により, ゲルの強度が低下すると同時に Mf が消失したことから, 水晒しを行っても除去できないこのセリンプロテアーゼは, 火戻りに影響を与えるプロテアーゼであるとの報告がある (Cao ら, 1999)。近年では, この筋肉プロテアーゼ説が有力視されている。一方, 魚類では, 産卵回遊中に筋肉タンパク質が脂肪とともに顕著に減少し, これら筋肉タンパク質の分解に関与するプロテアーゼ活性は産卵回遊にともなって激しく増加し, その程度は雄より雌で高い傾向であるとの報告がある (安藤と羽田野, 1986)。つまり, 火戻りに影響を与える筋肉プロテアーゼの活性には, 季節変動があるといえる。

ところで, かまぼこの火戻り発現時のゲル劣化はプロテアーゼインヒビター (PI) によって抑制されるとの知見がある。例えば, E-64 によるシステインプロテアーゼの抑制 (Yoshida ら, 2014), Pefabloc SC のよるセリンプロテアーゼの抑制 (Cao ら, 2000), EDTA によるメタロプロテアーゼの抑制 (桑原ら, 2004) などが報告されている (Table 1-1)。しかしながら, これら PI は食品添加物として認められていないため, 実際のかまぼこの製造現場では利用できないという問題がある。このような現状のなか, 最近, 天然素材であり食品添加物として利用可能な大豆または緑豆由来のトリプシンインヒビターが火戻り発現時のゲル劣化の抑制に効果あるのではなかろうかという期待がある。大豆由来のトリプシンインヒビター (SBTI) の分子量は 21.9kDa で, その活性は 100℃で加熱すると 30 分で 45%が失活し, ポリペプチド鎖でトリプシンとは 1:1 のモル比で反応する (Sun ら, 2010)。一方で,

Table 1-1. Inhibitory effect of protease

Inhibitory	protease
E-64	Cysteine protease Yoshida et al : Jpn. J. Food Chem. 21, 107-114 (2014)
Pefabloc SC	Serine proteinase Cao et al: comparative Biochemistry and Physiology Part B 125, 255-264 (2000)
EDTA	Metalloprotease kuwahara et al: Nippon Suisan Gakkaishi, 70, 922-927 (2004)

緑豆由来のトリプシンインヒビター (MBTI) は、もやしの原料として利用されている緑豆から精製されたもので、その分子量はトリシン-SDS-PAGE から約 9 k Da, TOF MS 分析から 8,887 Da とされ、pH 2~11 の間で安定であり、その熱安定性は SBTI よりも極めて高く、100°C で 1 時間の加熱でも 85% の活性が残存する (Table 1-2)。MBTI の阻害形態は、セリンプロテアーゼを阻害し、トリプシン様と報告されており、ポリペプチド鎖上に 2 個の阻害反応部位が存在し、各々阻害活性を有する (Sun ら, 2010)。このような阻害形態に加え、先に述べたように熱安定性の高さから、MBTI は SBTI よりも、かまぼこ製造時に 60°C 付近で顕著に現れるゲル劣化現象である火戻りを効果的に抑制できるのではないかと考えられている (Jiang ら, 2006; Sun ら, 2010; Sun ら, 2014)。そこで本研究では、火戻り発現時のゲル劣化の抑制効果については MBTI に着目して検討することとした。すなわち、先に述べたように高級かまぼこの原料魚であるワニエソを用い、実際のかまぼこ製造現場での利用を視野に置いて、火戻り発生温度での加熱に伴う筋原線維微細構造の変化を形態学的に明らかにするとともに、かまぼこ製造時におけるプロテアーゼインヒビターの添加、特に食品添加物として利用可能な MBTI の添加による火戻り抑制効果について検討した。

Table 1-2. Characteristics of MBTI

Molecular mass	About 9 kDa (Tricine-SDS-PAGE) 8887 Da (MALDI-QIT-TOF MS)
pH stability	Quite stable*
Thermal	Highly stable**
Type	Serine proteinase inhibitor



Mung bean

* : stable in the pH readerange 2~11

** : protein as more then 85% of its initial inhibitory activity remained after heat treatment at 100°C for 1 h.

Sun et al : J. Agric. Food Chem., 58, 12986-12992 (2010).

第2章 かまぼこの火戻り温度での加熱に伴う筋原線維懸濁液への プロテアーゼインヒビター添加の影響

魚肉練り製品では、足と呼ばれる弾力に富んだ独特の食感はその品質を決定するうえで重要な要素のひとつとなっている。そのうち、かまぼこでは魚肉の塩ずり身を40～50℃で加熱して坐りを起こさせた後、75～90℃で本加熱することで足が形成される（岡田，2008）。これは、一段目の加熱（一次加熱）で筋原線維タンパク質が適度に変性して網目構造ができ、二段目の加熱（二次加熱）で激しい熱変性作用によってタンパク質分子間にさらに多数の架橋ができて網目構造が丈夫になることによる（岡田，2008）。しかしながら、かまぼこ製造時の加熱処理中に温度管理を怠ると、火戻りと呼ばれる品質劣化現象が発生することがある。火戻りとは、一度形成されたゲルが50～70℃の中間温度帯を通過している間に劣化し、指で軽く押すだけで崩れてしまうほど弾力である足が激しく減退する現象であり（志水ら，1962；岡田，2008）、この現象が発生したかまぼこは商品価値がほとんど無く、産業上の経済的損失は大きい。

ところで、かまぼこのゲル形成性を担っているのは魚肉タンパク質の大部分を占める筋原線維タンパク質であり、それ自体の特性や加熱によって起こる構造変化が製品の品質を左右すると考えられる。この点について、火戻り条件である55～60℃の加熱においては加熱後に形成されるゲルの組織構造が崩壊することが報告されている（濱田ら，2006；Jiangら，2006）。また、同様の温度条件下ではミオシン重鎖（MHC）、アクチン、 α -アクチニン、トロポミオシンなどの筋原線維を構成する重要なタンパク質が分解するとの知見を得ている（濱田ら，

2006; Jiang ら, 2006)。つまり，ゲルの組織構造の崩壊には，これらタンパク質の分解に伴う筋原線維の微細構造の変化が影響していると考えられるが，その詳細は不明である。一方，火戻りの発現には，セリンプロテアーゼやシステインプロテアーゼ等の筋肉プロテアーゼの関与が有力視されている（劉ら, 1996a, b）。

そこで本章では，高級かまぼこの原料魚の一種であるワニエソを用い，火戻り発生温度での加熱に伴う筋原線維の微細構造の変化を形態学的に明らかにすることを目的とした。また，緑豆由来の MBTI を含む 2 種の PI 添加による筋原線維の微細構造の変化への影響についても検討した。

1. 実験方法

1-1. 試薬

PI は、以下の 2 種を用いた。セリン PI として、既報 (Sun ら 2010) に従って調製した MBTI を用いた。すなわち、乾燥緑豆を粉碎し、4 倍量の 0.1 M 硫酸に 24 時間浸漬後、ホモジナイズした。遠心分離後の上清を 1 M 水酸化ナトリウムで中和し、60°C で 90 分間加温した。加温後の遠心分離上清を 30 kDa で限外ろ過、透析後、Q-Sepharose イオン交換カラムで分画し、トリプシン阻害画分を凍結乾燥し、精製 MBTI とした。本調製では、乾燥緑豆 1 kg から精製 MBTI 119 mg が得られた。この精製 MBTI による阻害活性試験 (Cao ら 2000) 行った結果 (Table 2-1)、後述の MBTI 添加モデルへの添加量 (終濃度) はセリンプロテアーゼ活性を抑制可能な 56 μM とした。

また、システイン PI として E-64 (ペプチド研究所製) を用い、後述の E-64 添加モデルへの添加量 (終濃度) は同様に阻害活性試験 (木南ら 1993) (Table 2-1) から、システインプロテアーゼ活性を抑制可能な 10 μM とした。

1-2. 筋原線維の調製と加熱

試料魚として、2015 年 9 月 (夏季) に長崎県近海で漁獲後、氷蔵したワニエソ (平均体長 $30.8 \pm 5.4 \text{ cm}$, 平均体重 $397.4 \pm 217.3 \text{ g}$, $n=3$) を長崎魚市場より購入して用いた。筋原線維 (Mf) は、既報 (Tokiwa と Matsumiya, 1969) に準じて試料魚の普通筋から調製し、0.05 M リン酸緩衝液 (pH 7.2) に懸濁させた後 (タンパク質濃度 5 mg/ml), PI を添加せずに 40°C または 50°C でそれぞれ 30 分間加熱した。一方、Mf 懸濁液に MBTI (終濃度 56 μM) または E-64 (終濃度 10 μM) を添加し、

Table 2-1. Inhibitory effect of MBTI and E-64 on protease activities in leached minced meat of lizard fish

Protease	Protease inhibitor	Final concentration (μM)	Relative activity (%)
Serine *	MBTI	0	100
		5.6	72
		56	24
Cysteine **	E-64	0	100
		1	5
		10	1

* : Serine protease activity was determined by the addition of Boc-Phe-Ser-Arg-MCA to a final concentration of 5 μM with or without MBTI. The activity was reacted at pH 8.0 and 55°C for 10 min.

** : Cysteine protease activity was determined by the addition of Z-Phe-Arg-MCA to a final concentration of 2 μM with or without E-64. The activity was reacted at pH 5.5 and 37°C for 6 min.

それぞれ 50℃で 30 分間加熱した。また、PI 無添加で非加熱の Mf 懸濁液を対照とした。なお、本研究での 40℃加熱とは通常のかまぼこ作製時の一次加熱温度、50℃加熱とは既報（志水ら、1962; 濱田ら、2006）に準じて実験的に火戻りが生じる加熱条件として設定した。

1-3. SDS-PAGE およびイムノブロッティング

SDS-PAGE およびイムノブロッティングは、非加熱および加熱した各 Mf 懸濁液を遠心分離し、沈殿を 1%SDS 溶液に溶解させた後、既報（Hirasaka ら、2016）に準じて行った。なお、イムノブロッティングにおける一次抗体にはマウス由来抗ヒト MHC 抗体およびラット由来抗ブリトロポミオシン抗体を用い、二次抗体にはそれぞれペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG ヒツジ IgG（Developmental Studies Hybridoma Bank 製）およびペルオキシダーゼ標識抗ラット IgG ヤギ IgG（Organon Teknica 社製）を用いた。

1-4. 筋原線維の透過型電子顕微鏡観察

筋原線維の透過型電子顕微鏡（TEM）観察試料の作製は、非加熱および加熱した各 Mf 懸濁液を前固定（2%グルタルアルデヒド、0.15 M リン酸緩衝液、pH 7.2）し、アガロースで固め、その後は既報（肖ら、2009）に準じて行った。すなわち、後固定（1%四酸化オスミウム、0.15 M リン酸緩衝液、pH 7.2）、アセトンの上昇系列で脱水、エポキシ樹脂包埋を行った後、超ミクロトーム（RMC社製MT-6000型）を用いてダイヤモンドナイフで薄切、酢酸ウラン・クエン酸鉛の電子染色を行い、TEM（日本電子製JEM-1011型）にて加速電圧80 kVで観察した。

2. 結果および考察

2-1. SDS-PAGE

SDS-PAGEにおいて、40°C加熱（PI無添加）では非加熱（PI無添加）と同様の泳動パターンを示した。しかしながら、PI無添加の50°C加熱では分子量200 kDa付近のMHCの減少が認められ、さらに45 kDa付近のアクチンより低分子域にみられるバンドA～D（38 kDa, 26 kDa, 23 kDa, 22 kDaより低分子域）が40°C加熱のものより若干淡くなった。一方、Mf懸濁液にMBTIあるいはE-64を添加して50°C加熱したところ、200～45 kDaにおけるバンドの様相は40°C加熱（PI無添加）と同様であったが、それより低分子域のバンドA～DはPI無添加の50°C加熱と同様、淡くなっていた（Fig. 2-1）。このように、PI無添加での40°C加熱と50°C加熱での電気泳動的にみたタンパク質の挙動は異なる結果を示した。40°C加熱とはかまぼこ製造時の一次加熱温度、50°C加熱とは火戻りが生じやすい温度として設定した実験的条件であるが、この10°Cの温度差が前述のタンパク質の挙動に影響を及ぼしたと考えられた。この点に関して、フナ*Carassius auratus*やコイ*Cyprinus carpio*のMfを種々の温度で反応させたところ、MHCやトロポミオシンのタンパク質バンドは55°C付近でよく分解されており、これがMf結合型セリンプロテアーゼ（MBSP）の作用によるものであるとの報告がある（Caoら, 1999, 2006）。また、このMBSPはかまぼこのゲル強度を低下させる作用をもつことが明らかになっている（Caoら1999）。すなわち、本章で用いたワニエソにおいても、50°Cでの加熱によって活性化したMBSPがMHCやトロポミオシンを分解したと考えられ、これらの分解がかまぼこ製造時のゲル強度の低下に影響する可能性が示唆された。

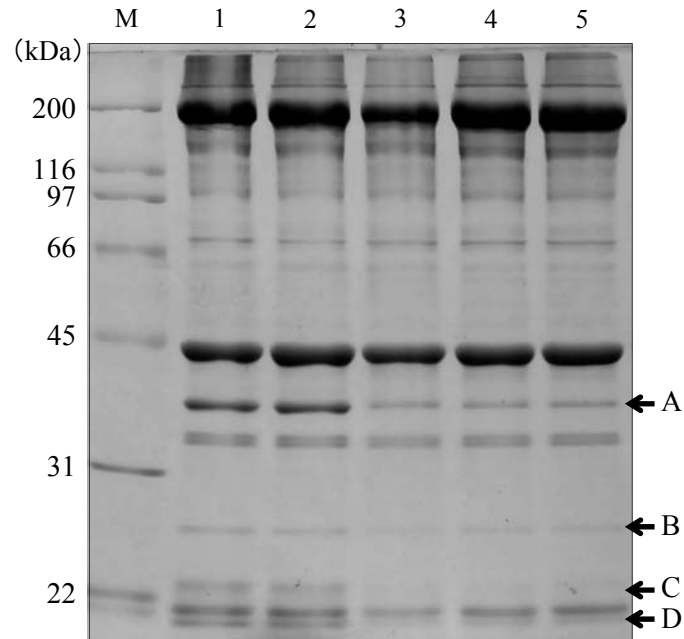


Fig. 2-1. SDS-PAGE analysis on the degradation of myofibrillar proteins in the skeletal muscle of lizard fish.

Each myofibril suspension was solubilized in the SDS-urea solution and applied on SDS-PAGE using 10% gel. Lanes; M, molecular marker; 1, non-heated; 2, heated for 30 min at 40°C without PI; 3, heated for 30 min at 50°C without PI; 4, heated for 30 min at 50°C with MBTI (56 μ M); 5, heated for 30 min at 50°C with E-64 (10 μ M). Arrows (A-D) indicate the protein degradation.

2-2. イムノブロッティング

抗ヒト MHC 抗体を用いたイムノブロッティングにおいて、いずれも MHC 相当部位に抗原陽性反応が認められたが、PI 無添加の 50°C 加熱では MHC の分解産物と考えられるバンドが 40°C 加熱 (PI 無添加) より濃く検出された。一方、Mf 懸濁液に MBTI あるいは E-64 を添加したところ、MHC の分解産物と考えられる反応は PI 無添加の 50°C 加熱よりも淡かったが、40°C 加熱 (PI 無添加) でみられる分解産物よりさらに低分子域に若干の抗原陽性反応が認められた (Fig. 2-2)。また、抗ブリトロポミオシン抗体を用いたイムノブロッティングにおいて、いずれもトロポミオシン相当部位に抗原陽性反応が認められたが、PI 無添加の 50°C 加熱では 40°C 加熱 (PI 無添加) と比較してトロポミオシン相当部位の反応が淡かった。一方、Mf 懸濁液に MBTI を添加したところ、PI 無添加または E-64 添加の 50°C 加熱より幾分抗原陽性反応が濃く検出された (Fig. 2-3)。

2-3. 筋原線維の TEM 観察

非加熱 (PI 無添加) の筋原線維は、明帯と暗帯が規則正しく並ぶ骨格筋特有の横紋構造を呈しており、明帯の中央には Z 線がジグザグ状に筋原線維を横断している様相が観察された。また、筋原線維を構成するフィラメント構造は筋原線維の長軸方向に明瞭に観察された。40°C 加熱 (PI 無添加) では、非加熱と比較すると幾分フィラメント構造が不明瞭になっていたが、概ね非加熱と同様の形態を維持していた。PI 無添加の 50°C 加熱では、明帯や暗帯の中央部分 (H 帯) の電子密度が極めて低く白く抜けており、Z 線および M 線は完全に消失していた。このことから、火戻りが発生する温度では、特に明帯フィラメントが

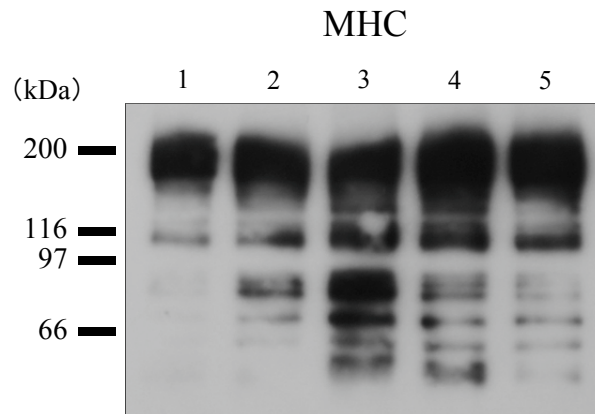


Fig.2-2. Immunoblotting of the degradation of myosin heavy chain (MHC). Myofibrils were SDS-treated and applied to SDS-PAGE same as Fig. 1. Proteins were then electrophoretically transferred to PVDF membrane and detected with mouse anti-MHC IgG. Lanes; 1, non-heated; 2, heated for 30 min at 40°C without PI; 3, heated for 30 min at 50°C without PI; 4, heated for 30 min at 50°C with MBTI (56 μM); 5, heated for 30 min at 50°C with E-64 (10 μM).

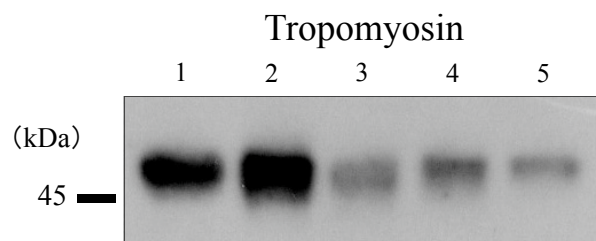


Fig. 2-3. Immunoblotting of the degradation of tropomyosin.

Myofibrils were SDS-treated and applied to SDS-PAGE same as Fig. 1. Proteins were then electrophoretically transferred to PVDF membrane and detected with rat anti-tropomyosin IgG. Lanes; 1, non-heated; 2, heated for 30 min at 40°C without PI; 3, heated for 30 min at 50°C without PI; 4, heated for 30 min at 50°C with MBTI (56 μ M); 5, heated for 30 min at 50°C with E-64 (10 μ M).

影響を受けることが示された。また、非加熱（PI 無添加）および 40℃ 加熱（PI 無添加）で明瞭に観察されたフィラメント構造が極めて不明瞭になっており、筋原線維の崩壊の様相が観察された。一方、MBTI 添加の 50℃ 加熱では、明帯および暗帯の電子密度が PI 無添加の 50℃ 加熱より高く、一部には筋原線維の長軸方向に走るフィラメント構造が維持されていた（Fig. 2-4. 4 の拡大部）。E-64 添加の 50℃ 加熱の場合においても同様、明帯および暗帯の中央部分（H 帯）の電子密度が幾分高いようであったが、MBTI 添加の場合に認められたフィラメント構造は確認されなかった（Fig. 2-4.）。この結果を先の電気泳動の結果と併せ考えると、50℃ 加熱に伴いトロポミオシンが分解することによって、その相互作用が崩れ、明帯フィラメントは構造を維持出来なくなったと考えられた。他方、養殖マダイ *Pagrus major* を含むいくつかの魚種で、鮮度低下に伴う肉質軟化には Z 線の消失やその構成タンパク質である α -アクチニンの分解が大きく影響することが明らかにされている（橘ら, 1993, 2001）。しかしながら、火戻り発生温度にて、 α -アクチニンは分解しないという報告がある（Cao ら, 2000; Sun ら, 2010）。このことから、本章での 50℃ 加熱に伴う明帯の構造崩壊には、 α -アクチニンの分解よりも、むしろトロポミオシンの分解による影響が非常に大きいと考えられた。

以上より、ワニエソ Mf の火戻り発生温度での加熱における微細構造の崩壊にはトロポミオシンが深く関与していることが明らかとなった。また、MBTI の添加によって 50℃ での加熱によるタンパク質の分解や構造崩壊が幾分抑制されたことから、かまぼこ製造時においてもある程度の火戻り抑制が期待されるであろうと考えられた。

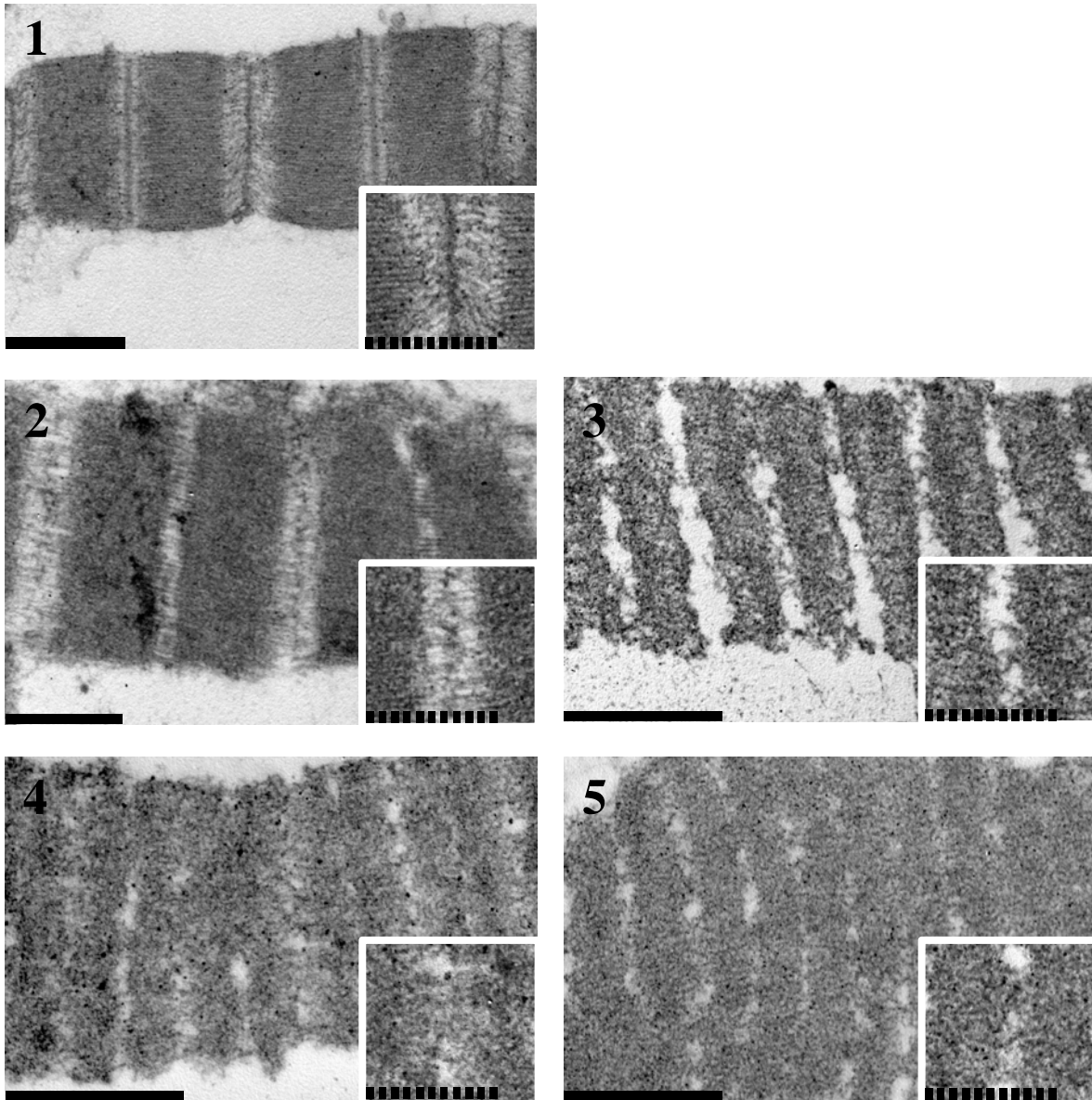


Fig. 2-4. Electron micrographs of myofibril of lizard fish.

1, non-heated; 2, heated for 30 min at 40°C without PI; 3, heated for 30 min at 50°C without PI; 4, heated for 30 min at 50°C with MBTI (56 μM); 5, heated for 30 min at 50°C with E-64 (10 μM). Each myofibril was prefixed with 2% glutaraldehyde and postfixed with 1% osmium tetroxide. The fixed myofibrils were dehydrated and embedded in epoxy resin. The sections were cut by ultramicrotome and were doubly stained with uranyl acetate and lead citrate. Solid bars and dotted bars represent 1 μm and 500 nm, respectively.

第3章 プロテアーゼインヒビター添加がかまぼこの火戻り現象に及ぼす影響

かまぼこは足と呼ばれる特有の弾力を持っており（関と原, 2003）、かまぼこの品質を決める重要な要素となっている。かまぼこに強い足を形成させるためには、魚肉すり身を 40～50℃の低温で加熱した後、75～90℃で本加熱する二段加熱の方法が知られている（志水ら, 1962; 山下ら, 1996; 関と原, 2003; 濱田ら, 2006）。これは一段目の加熱時に坐りとよばれるタンパク質の均質な網目構造を形成し、二段目の加熱によりその構造をさらに強化している。しかし、かまぼこ製造時にこの温度管理を怠ると、足の著しい減退が起こり、崩れやすい粗悪なかまぼこになることが関係業者により指摘されている。志水ら（1962）は、60℃付近で顕著に現れるゲル劣化現象を戻りの一種である“火戻り”であろうと報告している。火戻りが発生したかまぼこの商品価値はほとんど無いため、何らかの対策を講じることが求められる。

かまぼこの戻りやすさには季節変動があり、西日本で高級かまぼこの原料魚として用いられるワニエソでは、夏季、特に産卵直後である7月期にかまぼこの足が弱くなり、火戻りが生じやすいといわれている。火戻りの発現機構は、大別するとタンパク質の熱変性説（志水ら, 1962）、非酵素性火戻り誘因タンパク質説（岩田ら, 1977）、筋肉プロテアーゼ説（Suwansakornkul ら, 1993; 劉ら, 1996a, b; 山下ら, 1996; Cao ら, 1999; Jiang ら, 2006）の3説が唱えられている。筋肉プロテアーゼ説については、魚肉中に存在する数種のプロテアーゼが関与している可能性が示されており、特にセリンプロテアーゼとシステインプロテアーゼに着目した研究が多数報告されている。例えば、コイの筋原線

維結合型セリンプロテアーゼ (MBP) を添加した同魚種のかまぼこゲルは 50~60℃付近の加熱でゼリー強度が著しく低下したことから、水晒しでも除去できない MBP が火戻りに最も影響を与えるプロテアーゼであるとの報告がある (Cao ら, 1999)。

火戻り発現時のゲル劣化は PI によって抑制されるとの知見があり (Cao ら, 2000; 桑原ら, 2004; Yoshida ら, 2014), 近年では食品添加物として利用可能な PI に関する研究が進められている (Jiang ら, 2006; 下元ら, 2006; Sun ら, 2010)。特に, MBTI (Sun ら, 2010) は, 火戻りで問題となる 50~60℃の加熱であっても, その活性は十分に残存し, ゲル劣化の抑制に効果をもたらすものと期待される。そこで本章では, ワニエソかまぼこ作製時のすり身に MBTI を添加し, 実験的に火戻りが起こる条件で加熱した際の火戻り抑制効果を検討した。また, 火戻りにはシステインプロテアーゼの関与も報告 (Suwansakornkul ら, 1993; 劉ら, 1996a, b; 山下ら, 1996; Sun ら, 2010) されていることから, その PI のひとつである E-64 についても検討した。

1. 実験方法

1-1. 試薬

第1章と同様に、PIは以下の2種を用いた。セリンPIは、既報（Sunら，2010）に従って調製したMBTIを用いた。この精製MBTIによる阻害活性試験を既報（Caoら，2000）に準拠して行った結果から（Table 3-1），後述のMBTIかまぼこへの添加量（終濃度）はセリンプロテアーゼ活性を抑制可能な56 μM とした。

一方、システインPIはペプチド研究所製の市販品であるE-64を用いた。このE-64による阻害活性試験（木南ら，1993）（Table 3-1）から，後述のE-64かまぼこへの添加量（終濃度）はシステインプロテアーゼ活性を抑制可能な100 μM とした。

1-2. かまぼこの作製と加熱条件

かまぼこの作製には、試料魚としてワニエソ（平均体長 31.2 ± 1.9 cm, 平均体重 382.3 ± 47.7 g, $n=11$ ）を用いた。なお、試料魚は2011年7～8月期（夏季）に長崎県近海で漁獲後、氷蔵したものを長崎魚市場より購入し、直ちに研究室に搬入し用いた。試料魚から内臓、皮および骨を除去した体側筋をミートチョッパー（山善製 FC-200）で細砕肉して落とし身を得た。この落とし身の重量に対して約5倍量の冷純水を加え、攪拌して水晒した。水晒し工程は3回行い、晒し肉を濾布に入れて圧搾脱水した。脱水肉は4℃の冷蔵庫内で、攪拌擂潰機（柳屋鉄工所製 No. 6 C）を用いて空ずりを5分間、脱水肉に対して3%食塩を添加して塩ずりを10分間行った。その後、PI無添加またはPI添加の冷純水を加えながら、水分含量を83%となるように本ずりを5分間

Table 3-1. Inhibitory effect of MBTI and E-64 on protease activities in leached minced meat of lizard fish

Protease	Protease inhibitor	Final concentration (μM)	Relative activity (%)
Serine ¹⁾	MBTI	0	100
		0.56	98
		5.6	56
		56	30
Cysteine ²⁾	E-64	0	100
		1	11
		100	3

* : Serine protease activity was determined by the addition of Boc-Phe-Ser-Arg-MCA to a final concentration of 5 μM with or without MBTI. The activity was reacted at pH 8.0 and 55°C for 10 min.

** : Cysteine protease activity was determined by the addition of Z-Phe-Arg-MCA to a final concentration of 2 μM with or without E-64. The activity was reacted at pH 5.5 and 37°C for 6 min.

行った。それぞれのすり身は、プラスチックチューブ（ ϕ 3 cm 長さ 10 cm）に 3 本ずつ充填し、遠心（5,000 rpm, 15 分間, 4°C）に供して充填中に生じた気泡を除去した。これらのプラスチックチューブを恒温槽中で二段加熱後、氷水中で急冷した。本研究では、PI 無添加で一段目の加熱を 40°C で 30 または 120 分間、二段目の加熱を 90°C で 30 分間行ったかまぼこを常法かまぼこ、一段目の加熱を 60°C で 30, 60, 90 または 120 分間、二段目の加熱を 90°C で 30 分間行ったかまぼこを火戻りかまぼことした。また、MBTI を添加して火戻りかまぼこと同じ加熱条件で作製したかまぼこを MBTI かまぼこ（終濃度 56 μ M）、E-64 を添加して火戻りかまぼこと同じ温度で一段目の加熱を 30 または 120 分間、二段目の加熱を 30 分間行ったかまぼこを E-64 かまぼこ（終濃度 100 μ M）とした。

1-3. 物性値の測定

物性値（破断応力と破断変形）は、既報（肖ら 2010）に準じてレオナー（山電社製 RE-3305 型）を用いて押し込み試験により測定した。本測定は、作製したかまぼこ 1 本につき、 ϕ 3 cm 長さ 1.5 cm で 3 ブロックを切り出し、円柱型プランジャー（ ϕ 5 mm）、押し込み速度 1 mm/sec、測定歪率 90% の条件で行った。1 ブロックにつき 5 回ずつ測定して、最大値と最小値を除いた平均値を 1 ブロックの測定値とした。さらに、3 本のかまぼこの平均値をそれぞれのかまぼこの物性値とした。なお、常法かまぼこについては、一段目の加熱を 30 分間、次いで二段目の加熱を行ったかまぼこのみ測定を行った。

1-4. 光学顕微鏡 (SEM) 観察

SEM 観察試料の作製は、既報 (Mora ら 2007) に準じて行った。すなわち、一段目の加熱 120 分間のかまぼこを細切、10% 中性緩衝ホルマリンで固定後、パラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色して SEM (OLYMPUS 社製 BX50 型) にて観察した。

1-5. 透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察

TEM 観察試料の作製は、既報 (肖ら 2009) に準じて行った。すなわち、一段目の加熱 120 分間のかまぼこを細切、前固定 (2% グルタルアルデヒド, 0.15 M カコジル酸緩衝液, pH 7.4), 後固定 (1% 四酸化オスミウム, 0.15 M カコジル酸緩衝液, pH 7.4) し、アセトンの上昇系列で脱水、エポキシ樹脂包埋を行った。その後、超マイクロトーム (RMC 社製 MT-6000 型) を用いてダイヤモンドナイフで薄切、酢酸ウラン・クエン酸鉛の電子染色を行い、TEM (日本電子製 JEM-1011 型) にて加速電圧 80 kV で観察した。

1-6. 統計処理

実験項目の物性値は平均値 \pm 標準偏差で示し、有意差の検定には student's *t*-test を用いた。

2. 結果および考察

2-1. 物性値 (破断応力および破断変形)

破断応力は、一段目の加熱 30 分間の常法かまぼこでは 34.96 ± 7.78 N/cm², 火戻りかまぼこでは 25.20 ± 1.31 N/cm², MBTI かまぼこでは 32.36 ± 0.92 N/cm² を示した。火戻りかまぼこと MBTI かまぼこは加熱

時間の延長に伴い低下し，一段目の加熱 120 分間ではそれぞれ $7.56 \pm 0.03 \text{ N/cm}^2$ ， $12.54 \pm 0.13 \text{ N/cm}^2$ を示した。E-64 かまぼこでは一段目の加熱 30 分間で $28.66 \pm 1.43 \text{ N/cm}^2$ ，120 分間で $9.73 \pm 0.67 \text{ N/cm}^2$ となった。一段目の加熱 30 分間，120 分間ともに，MBTI かまぼこの破断応力は火戻りかまぼこ，E-64 かまぼこより有意に高い値を示した (Fig. 3-1)。

破断変形は，一段目の加熱 30 分間の常法かまぼこでは $10.76 \pm 0.64 \text{ mm}$ ，火戻りかまぼこでは $10.97 \pm 0.49 \text{ mm}$ ，MBTI かまぼこでは $11.44 \pm 0.27 \text{ mm}$ を示した。火戻りかまぼこと MBTI かまぼこは加熱時間の延長に伴い低下し，一段目の加熱 120 分間ではそれぞれ $6.92 \pm 0.24 \text{ mm}$ ， $8.52 \pm 0.47 \text{ mm}$ を示した (Fig. 3-2)。E-64 かまぼこでは一段目の加熱 30 分間で $10.73 \pm 0.34 \text{ mm}$ ，120 分間で $7.19 \pm 0.56 \text{ mm}$ となった。各かまぼこの破断変形は，一段目の加熱 30 分間では同程度であったが，MBTI かまぼこの加熱時間の延長に伴う低下は火戻りかまぼこより緩やかであった (Fig. 3-2)。このことから，火戻りかまぼこでは，火戻り現象が発生していたと判断した。

2-2. SEM 観察

一段目の加熱を 120 分間行ったかまぼこの SEM 像は，常法かまぼこでは組織全体のエオジンに対する染色性が均一で，濃いピンクに染まっていた (Fig. 3-3A)。火戻りかまぼこではタンパク質の消失によるエオジン非染色性の空胞が目立つ粗な構造が観察された (Fig. 3-3B)。MBTI かまぼこではエオジンに対する染色性が常法かまぼこと火戻りかまぼこの中間であった (Fig. 3-3C)。E-64 かまぼこでは MBTI かまぼこより非染色性の空胞が若干多い構造であった (Fig. 3-3D)。一般に，

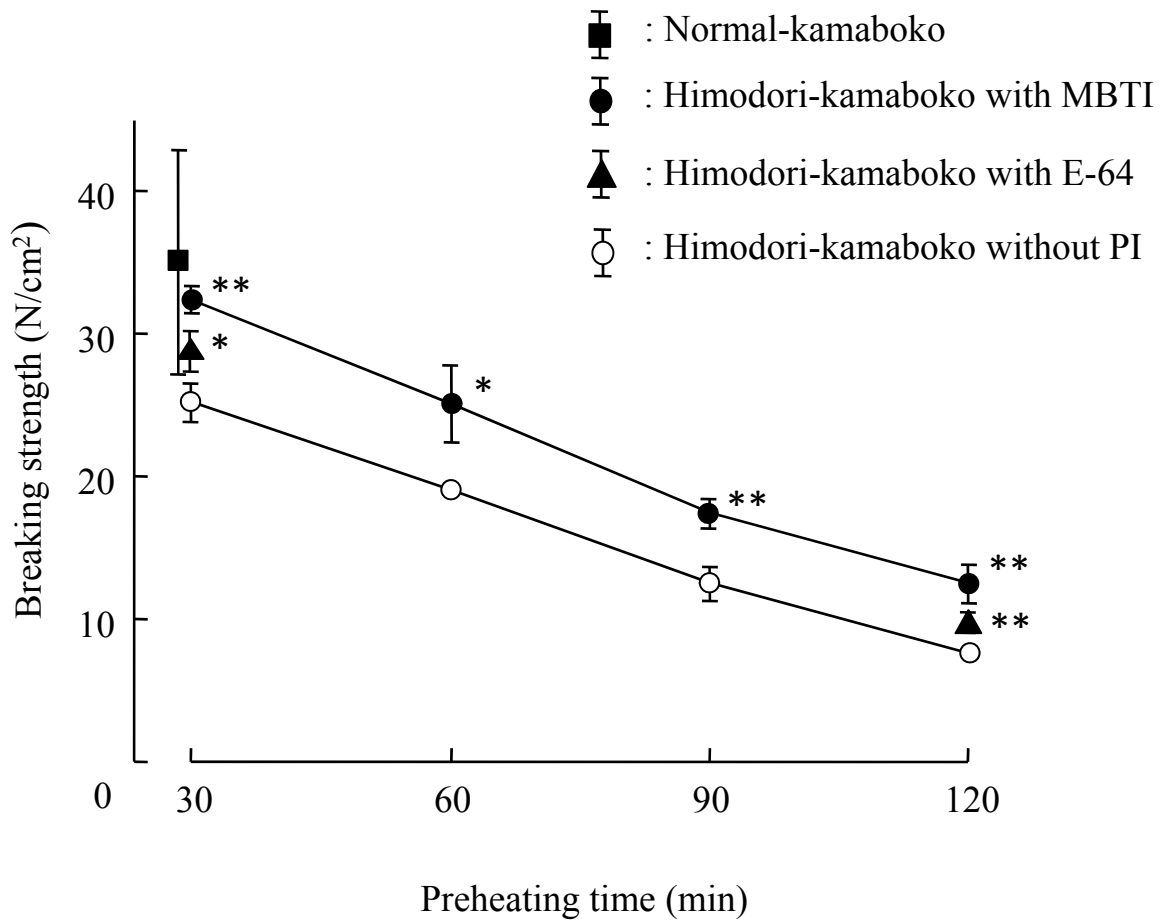


Fig. 3-1. Influence of preheating time on breaking strength of normal and himodori kamaboko.

Himodori kamaboko was preheated for indicated period at 60°C with or without PI. Normal kamaboko was indicated as control (preheated at 40°C). Each value is the mean \pm SD (n=3). *: difference from himodori kamaboko without PI at the same time (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; by student's *t*-test).

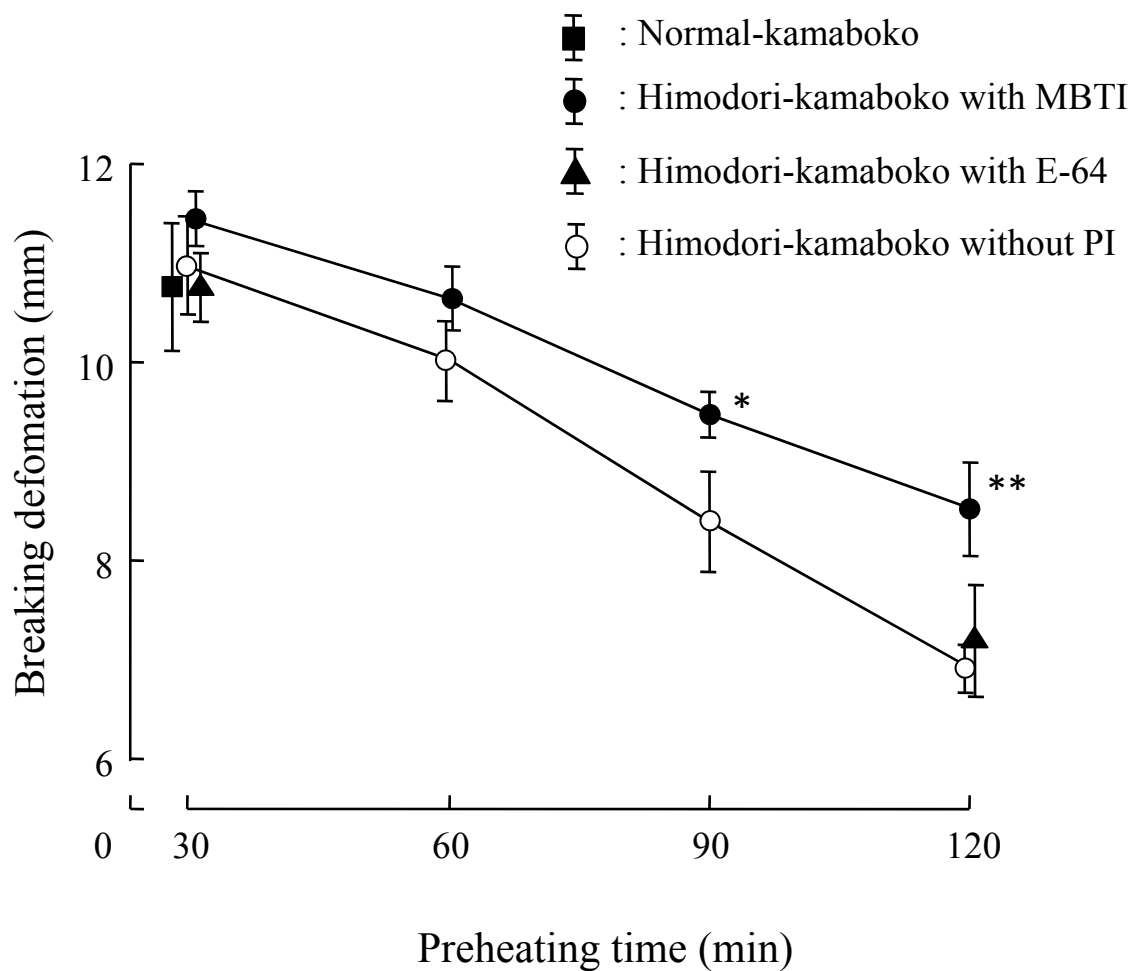


Fig. 3-2. Influence of preheating time on breaking deformation of normal and himodori kamaboko.

Himodori kamaboko was preheated for indicated period at 60°C with or without PI. Normal kamaboko was indicated as control (preheated at 40°C). Each value is the mean \pm SD (n=3). *: difference from himodori kamaboko without PI at the same time (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; by student's *t*-test).

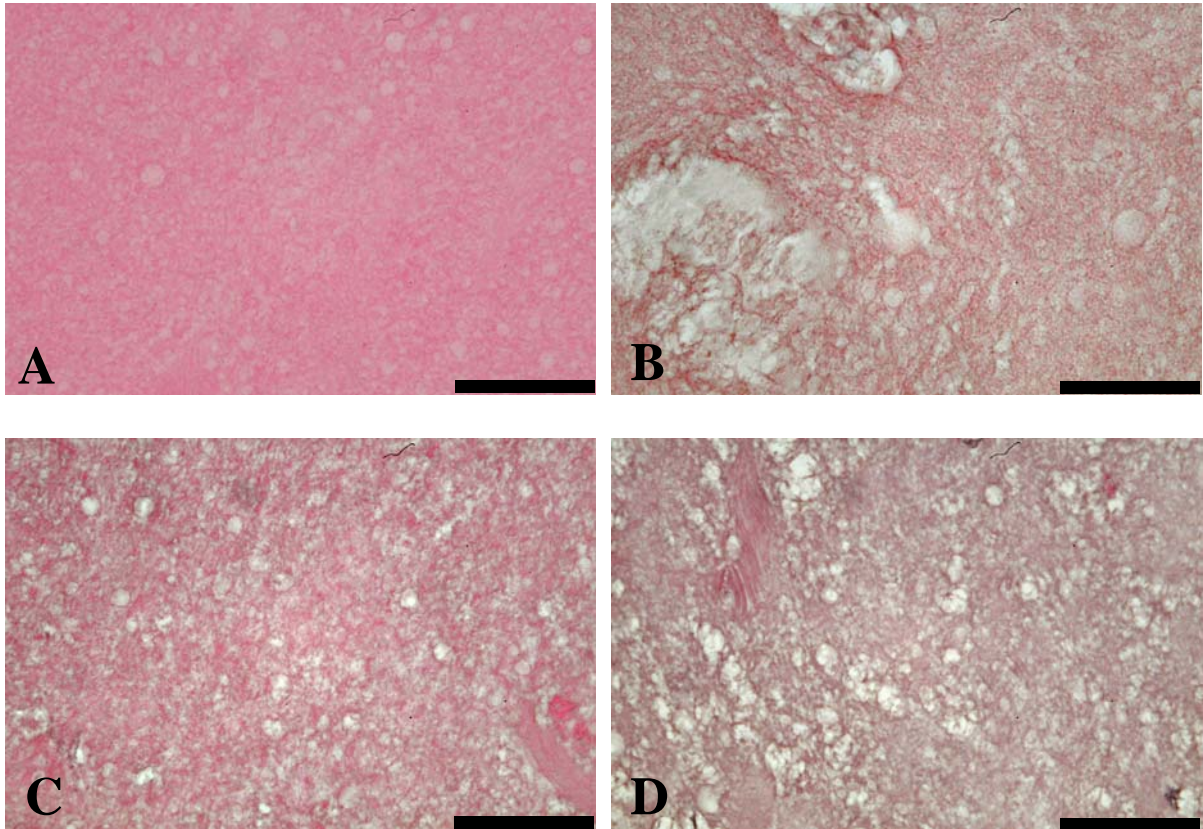


Fig. 3-3. Light micrographs of normal and himodori kamaboko.

Himodori kamaboko was preheated for 120 min at 60°C with or without PI. Normal kamaboko was indicated as control (preheated for 120 min at 40°C). Each section was doubly stained with haematoxylin and eosin. A, normal-kamaboko; B, himodori-kamaboko without PI; C, himodori-kamaboko with MBTI; D, himodori-kamaboko with E-64. Bars represent 25 μ m.

エオジンはかまぼこの組織構造において筋細胞由来のゲルタンパク質を染色すると考えられるため、今回の染色性の違いは常法かまぼこと火戻りかまぼこの組織構造の違いを反映していると考えられた。

2-3. TEM 観察

一段目の加熱を 120 分間行ったかまぼこの TEM 像は、常法かまぼこでは電子密度が異なる微細な粒子で構成され、比較的均一な構造として観察された (Fig. 3-4A)。火戻りかまぼこでは電子密度の高く凝集した粒子が認められ、凝集粒子間には極めて染色性が弱く白く抜けた部分が観察され、極めて粗な構造であった (Fig. 3-4B)。MBTI かまぼこでは常法かまぼこと同様に電子密度が異なる微細な粒子で構成され、火戻りかまぼこで認められた凝集構造は極めて少なかった (Fig. 3-4C)。E-64 かまぼこでは一部に火戻りかまぼこで認められた凝集構造と染色性が弱く白く抜けた部分が観察された (Fig. 3-4D)。これらのかまぼこの構造を比較すると、MBTI かまぼこは E-64 かまぼこより常法かまぼこに非常に近い様相を呈していた。このように SEM にて巨視的に、また TEM にて微視的に観察されたかまぼこの組織構造から、火戻り現象における物性値の低下はその崩壊が影響していると考えられた。このことから、ワニエソを原料とするかまぼこの火戻りには主としてセリンプロテアーゼが関与しており、セリン PI である MBTI が火戻りがある程度抑制したと考えられた。また、E-64 はワニエソすり身の火戻り抑制にも効果があることが明らかとなった。すなわち、ワニエソかまぼこの火戻り発現にはセリンプロテアーゼ、システインプロテアーゼといった数種類のプロテアーゼが関与していると考えられた。

以上より、ワニエソ Mf の火戻り発生温度での加熱に伴う微細構造

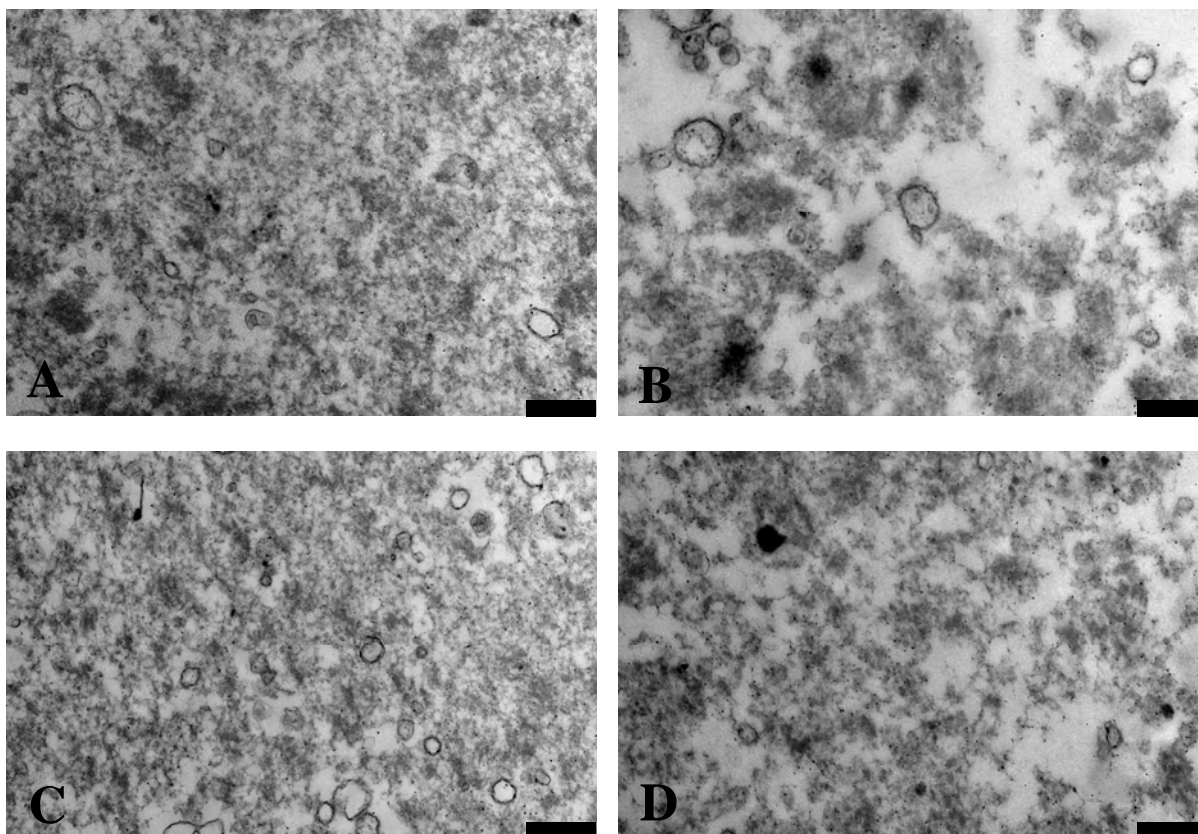


Fig. 3-4. Electron micrographs of normal and himodori kamaboko. Himodori kamaboko was preheated for 120 min at 60°C with or without PI. Normal kamaboko was indicated as control (preheated for 120 min at 40°C). Each section was doubly stained with uranyl acetate and lead citrate. A, normal-kamaboko; B, himodori-kamaboko without PI; C, himodori-kamaboko with MBTI; D, himodori-kamaboko with E-64. Bars represent 100 nm.

の崩壊には明帯を構成するトロポミオシンが深く関与している。ワニエソかまぼこ作製時における MBTI の添加は、ある程度火戻り抑制に効果があると考えられた。今後は、火戻り抑制により効果的で適切な添加方法や濃度等の検討が必要であろう。

第4章 総合考察

本研究では、かまぼこの品質劣化現象のひとつである火戻り現象に関して、これまで背景や研究例を総合的に整理した。現在、火戻り現象の発現機構については、筋肉プロテアーゼの関与が有力視されており、至適温度域で時間の経過とともに進行するゲルの崩壊現象が起こった際に MHC の分解が起こる(濱田ら, 2006; Jiang ら, 2006)。また、アクチン, α -アクチン, トロポミオシン等の Mf を構成する重要なタンパク質の分解に伴う微細構造の変化が影響しているといわれている(濱田ら, 2006; Jiang ら, 2006)。つまり、ゲルの組織構造の崩壊には、これらタンパク質の分解に伴う微細構造の変化が影響していると考えられる。このことから、かまぼこの火戻り現象に及ぼす PI 添加による抑制効果について、かまぼこの火戻り発生温度での加熱に伴う Mf の微細構造の変化について検討した。次に、かまぼこの火戻り抑制を目的として、かまぼこを実際に作製し PI 添加が火戻り現象に及ぼす影響について検討した。さらに、この成果を基に、かまぼこの火戻り発生温度での PI 添加による加熱に伴う Mf の微細構造の変化と火戻り抑制について総合的に考察した。

まず第2章にて、かまぼこの火戻り発生温度での加熱に伴うワニエソ Mf の微細構造の変化を形態学的に明らかにした。さらに、そのときの PI 添加 (MBTI と E-64) による影響を検討した。SDS-PAGE において、50°C で30分間加熱した Mf (PI 無添加) は分子量 200 kDa 付近の MHC や 45 kDa 付近のアクチンより低分子域にみられる幾つかのタンパク質バンドが 40°C 加熱のものと比較して若干淡くなっていた。また、MHC 抗体を用いたイムノブロットィングでは、50°C 加熱においては MHC 相当

部位に抗原陽性反応が確認されたが、それより低分子域にMHCの分解産物と考えられるバンドが濃く検出された。さらに、トロポミオシン抗体を用いたイムノブロットィングではトロポミオシン相当部位においても抗原陽性反応が淡くなっている様相が確認できたが、それより低分子域に限定分解産物と考えられるバンドが認められなかった。このことから、トロポミオシンの分解は極めて急速に進んだと考えられた。このように、PI無添加での40℃加熱と50℃加熱での電気泳動的にみたタンパク質の分解挙動は異なる結果を示した。本章において、40℃加熱とはかまぼこ製造時の一次加熱温度、50℃加熱は火戻りが生じやすい温度として設定した実験的条件であるが、この10℃の温度差が前述のタンパク質の分解挙動に影響を及ぼしたと考えられた。この点に関して、フナ *Carassius* やコイ *Cyprinus carpio* のMfを種々の温度で反応させたところ、MHCやトロポミオシンのタンパク質バンドは55℃付近でよく分解されており、これがMf結合型セリンプロテアーゼ (MBSP) の作用によるものであると報告されている (Caoら, 1999, 2006)。また、このMBSPはかまぼこのゲル強度を低下させる作用をもつことが明らかにされている (Caoら, 1999)。すなわち、本章で用いたワニエソにおいても、50℃での加熱によって高い活性を示すMBSPがMHCやトロポミオシンを分解したと考えられ、これらの分解がかまぼこ製造時のゲル強度の低下に影響する可能性が示唆された。

また、Mfの微細構造の変化に着目してTEMにて観察したところ、40℃加熱では非加熱のMfと同様、明帯と暗帯が規則正しく並ぶ骨格筋特有の横紋構造を呈していた。しかしながら、PI無添加の50℃加熱のMfでは明帯や暗帯の中央部分(H帯)の電子密度が極めて低く白く抜け、Z線およびM線が完全に消失している様相が観察されたことか

ら、火戻りが発生する 50°C 付近の温度では、特に明帯フィラメントが影響を受けることが示された。Mf の明帯は、アクチン分子で形成されるらせんの細い溝にトロポミオシンとトロポニンが結合してアクチンフィラメントを形成し、それを Z 線に連結する役目を α -アクチニンが担っている (Bruce ら, 1995)。すなわち、明帯はアクチンやトロポミオシン、トロポニン、 α -アクチニンの相互作用で形成されているといえる。先の電気泳動の結果と併せ考えると、50°C 加熱に伴いトロポミオシンが分解することによって、その相互作用が崩れ、明帯フィラメントは構造を維持出来なくなつたと考えられた。他方、養殖マダイを含むいくつかの魚種で、鮮度低下に伴う肉質軟化には Z 線の消失やその構成タンパク質である α -アクチニンの分解が大きく影響することが明らかにされている (橘ら, 1993, 2001)。しかしながら、火戻り発生温度にて、 α -アクチニンは分解しないという報告がある (Cao ら, 2000; Sun ら, 2010)。このことから、本章での 50°C 加熱に伴う明帯のフィラメント構造崩壊には、 α -アクチニンの分解よりも、むしろトロポミオシンの分解による影響が非常に大きいと考えられた。

一方、Mf 懸濁液に MBTI や E-64 を添加して 50°C 加熱すると、電気泳動的には PI 無添加で加熱した場合と比較して MHC やトロポミオシンの分解が幾分抑制された。また、形態学的にも PI 無添加の加熱と比較して明帯の電子密度が高い傾向にあり、MBTI 添加においては一部に Mf のフィラメント構造が維持されていた。この点に関して、火戻りの発現には、セリンプロテアーゼやシステインプロテアーゼの関与が知られている (劉ら, 1996a, b)。また、マルアジ *Decapterus maruadsi* の Mf 懸濁液に MBTI または E-64 を添加し、55°C で 2 時間加熱しても、MHC やトロポミオシンを含むタンパク質分解がほぼ完全に抑制され

ておりこれら PI は火戻り抑制効果を有すると報告されている (Sun ら, 2010)。しかしながら, 本章において E-64 では Mf の明帯フィラメントの崩壊が MBTI と比較して抑制されていないことから, 火戻りの加熱温度におけるワニエソ Mf の崩壊には, MBTI のほうが E-64 より幾分抑制効果がみられると考えられた。E-64 の効果も見られたことからその使用については, 食品添加物としての利用が許可されていないため, E-64 に代わるシステインプロテアーゼインヒビターとして, 卵白由来のシスタチンについても今後検討していきたいと考える。

これらのことから, ワニエソ Mf の火戻り発生温度での加熱における微細構造の崩壊にはトロポミオシンの分解が深く関与していることが明らかとなった。また, MBTI の添加によって 50℃での加熱によるタンパク質の分解や構造崩壊が幾分抑制されたことから, かまぼこ製造時においてもある程度の火戻り抑制が期待されるであろうと考えられた。

前章の結果を踏まえ, 第 3 章では, かまぼこを実際に作製し PI 添加が火戻り現象に及ぼす影響について検討した。まず, 比較的火戻りが生じやすいとされる産卵期のワニエソを用いてかまぼこを作製したところ, 60℃で一段目の加熱を行った火戻りかまぼこの破断応力は加熱時間の延長に伴い低下した。本章の火戻りかまぼこでは, 火戻り現象が発生していたと判断した。一方, SEM 像において, 常法かまぼこではエオジンに対する染色性が均一であったのに対し, 火戻りかまぼこではエオジン非染色性の空胞が目立つ粗な構造として観察された。一般に, エオジンはかまぼこの組織構造において筋細胞由来のゲルタンパク質を染色すると考えられるため, 今回の染色性の違いは常法かまぼこと火戻りかまぼこの組織構造の違いを反映していると考えられた。

また、SEM よりさらに拡大して TEM にてかまぼこの組織構造を観察したところ、常法かまぼこでは電子密度が比較的均一な構造として観察されたのに対し、火戻りかまぼこでは高電子密度の凝集像と低電子密度の白く抜けた部分が観察され、常法かまぼことは極端に異なる形態であった。このように SEM にて巨視的に、また TEM にて微視的に観察されたかまぼこの組織構造から、火戻り現象における物性値の低下はその構造崩壊が影響していると考えられた。

近年、火戻り現象の発現機構は筋肉プロテアーゼの関与が有力視されている。特に、ワニエソ、スケトウダラ、コイ、マルアジ、フナにおいては Mf 結合型セリンプロテアーゼ (MBSP) が 60°C 付近のゲル劣化に強く関与することが報告されている (Cao ら, 1999)。また、本章において、MBTI かまぼこの破断応力は、一段目の加熱時間の延長に伴い低下したが、いずれの加熱時間においても火戻りかまぼこより高い値を維持していた。また、TEM 観察において、MBTI かまぼこは火戻りかまぼこで認められた電子密度の低く白く抜けた構造が少なく、常法かまぼこに近い構造が観察された。このことから、ワニエソを原料とするかまぼこの火戻りにはセリンプロテアーゼが強く関与しており、セリン PI である MBTI が火戻りをある程度抑制したと考えられた。また、E-64 はワニエソすり身の火戻り抑制にも効果があることが明らかとなった。すなわち、ワニエソかまぼこの火戻り発現にはセリンプロテアーゼ、システインプロテアーゼといった数種類のプロテアーゼが関与していると考えられた。

これらのことから、本研究にてワニエソ Mf の火戻り発生温度域での加熱に伴う微細構造の崩壊には明帯を構成するトロポミオシンが深く関与していることが明らかとなった。また、ワニエソかまぼこ作製

時における MBTI の添加は、ある程度火戻り抑制に効果があることが示された。かまぼこへの MBTI 添加により、色調、食味に変化がなかったことから、今後は、火戻り抑制により効果的で適切な添加方法や濃度等の検討が必要であろう。

以上より、かまぼこ製造時において、MBTI の添加は火戻り抑制に効果的であろうと考えられ、将来、火戻り抑制の食品添加物として天然物由来の MBTI の利用が期待される。トリプシンインヒビターの人体に対する影響については、タンパク質消化が阻害されることの知見もある(盛永, 1997)ことから、MBTI の添加についてはかまぼこに直接添加するのではなく緑豆から MBTI を精製することなく、直接緑豆表皮を粉碎して食材としてかまぼこの製造に使用することで、火戻りを起こすことや食衛生上の問題、さらには人体への影響もなく、緑豆の食味や食感を活かしたかまぼこを製造することやイソフラボンなどの機能性も兼ね備えたかまぼこの製造が可能になるのではないかと考える。

実際に、MBTI の利用が可能になれば、かまぼこ製造業者らは火戻りを起こすことなくワニエソかまぼこを周年的に製造できるようになることはもちろん、未だ食べられていない魚種をかまぼことして利用することで、かまぼこ製造業者だけでなく関連する産業界全体に大きな経済効果もたらすと、大いに期待される。

参考文献

- 安藤浩一，羽田野六男：秋サケ筋肉の劣化と婚姻色の発現，科学と生物. 科学と生物, **24**, 792-798, (1986)
- Bruce, A., Dennis, B., Julian, L., Martin, R., Keith, R., James, D, W.: Molecular Biology of The Cell Third Edition, Tokyo, Kyoikusha, pp. 854-855 (1995).
- Cao, M. J., Hara, K., Osatomi, K., Tachibana, K., Izumi, T., Ishihara, T.: Myofibril-bound serine proteinase (MBP) and its degradation of myofibrillar proteins. Journal of Food Science, **64**, 644-647 (1999).
- Cao, M. J., Osatomi, K., Hara, K., Ishihara, T.: Identification of a myofibril-bound serine proteinase (MBSP) in the skeletal muscle of lizard fish *Saurida wanieso* which specifically cleaves the arginine site. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, **125**, 255-264 (2000).
- Cao M. J., Jiang X. J., Zhong H. C., Zhang, Z. J., Su, W. J.: Degradation of myofibrillar proteins by a myofibril-bound serine proteinase in the skeletal muscle of crucian carp (*Carassius auratus*). *Food Chemistry*, **94**, 7-13 (2006).
- Fukuda, Y.: Processing technology for walleye Pollock: surimi innovation.

Fisheries Science, **80**, 205-211 (2014).

濱田友貴，廣瀬岳史，川島 茜，デイシー・アロヨ・モラ，原 研治，槌本六良，橘 勝康：マダイかまぼこの火戻りに伴う物性の低下とその微細構造．日本食品化学学会誌，**13**，78-82 (2006).

Hirasaka K., Saito S., Yamaguchi S., Miyazaki, R., Wang, Y., Haruna, M., Taniyama, S., Higashitani, A., Terao, J., Nikawa, T., Tachibana, K.: Dietary supplementation with isoflavones prevents muscle wasting in tumor-bearing mice. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, **62**, 178-184 (2016).

岩田和士，小橋恭一，長谷純一：魚肉内アルカリ性プロテアーゼの研究-VI コイの筋肉中の“もどり”誘因たん白質とカテプシン A の精製．日本水産学会誌，**43**，181-193 (1977).

Jiang, X. J., Zhang, Z. J., Cai, H. N., Hara, K., Su, W. J., Cao, M. J.: The effect of soybean trypsin inhibitor on the degradation of myofibrillar proteins by an endogenous serine proteinase of crucian carp. *Food Chem.*, **94**, 498-503 (2006).

木南英紀，坂東祥晃：生物化学実験書 30 蛋白質分解酵素 I . 鶴 大典，船津 勝 編．東京，学会出版センター，pp. 39-56 (1993).

桑原浩一，大迫一史，今野久仁彦：数種有機酸塩が示したスルメイカ

肉の自己消化抑制作用による加熱ゲル形成能の向上. 日本水産学会誌, **70**, 922-927 (2004).

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. 日本水産学会誌, **62**, 275-279 (1996a).

劉 達嘉, Nowsad, A. AKM, 加納 哲, 丹波栄二: 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. 日本水産学会誌, **62**, 791-795 (1996b).

みなと新聞: 水産練り製品概要. 平成 30 年 11 月 26 日公表 (2018).

Mora, D. A., Hamada, Y., Okamoto, A., Tateishi, A., Tachibana, K.: Characteristics of burnt meat in cultured yellowtail *Seriola quinqueradiata*. *Fisheries Science*, **73**, 651-659 (2007).

農林水産省: 水産物流通調査品目別水産加工品生産量累年統計. 農林水産省ホームページ: http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/suisan_ryutu/suisan_kakou/index.html, 平成 30 年 8 月 7 日公開 (2018).

岡田 稔: 新訂かまぼこの科学. 成山堂, 東京, p. 64-71(2008).

関 伸夫, 原 研治: 第 1 章魚介類筋肉成分第 1・4 節坐り, 戻りおよび内在酵素のゲル化への関与. かまぼこその科学と技術. 恒星社厚

生閣，東京，pp. 63-92 (2003).

志水 寛，吉本晴樹，清水 亘：かまぼこの足について-XII “もどり”の現象．日本水産学会誌，**28**，610-615 (1962).

志水 寛，町田 律，武並誠一：魚肉肉糊のゲル形成特性に見られる魚種特異性．日本水産学会誌，**47**，95-104 (1981).

志水 寛，野村 明，西岡不二男：ニベミオシンの誘発性．日本水産学会誌，**52**，2027-2032 (1986).

下元 哲，野村 昭，北村有里，伊藤慶明：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．日本水産学会誌，**72**，58-64 (2006).

総務省：家計調査（二人以上の世帯）品目別都道府県庁所在市及び政令指定都市ランキング，総務省ホームページ，<https://www.stat.go.jp/data/kakei/5.html>，平成 30 年 3 月 15 日公表 (2018).

Sun L.C., Yoshida A., Cai Q.F., Liu, G. M., Weng, L., Tachibana, K., Su, W. J., Cao, M. J.: Mung bean trypsin inhibitor is effective in suppressing the degradation of myofibrillar proteins in the skeletal muscle of blue scad (*Decapterus maruadsi*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **58**, 12986-12992 (2010).

Sun, L. C., Chen, Y. L., Zhong, C., Okazaki, E., Cao, M. J., Weng, W. Y., Osako, K.: Autolysis of krill protein from North Pacific krill *Euphausia pacifica* during protein recovery via isoelectric solubilization/precipitation. *Fisheries Science*, **80**, 839-847 (2014).

Suwansakornkul, P., Itoh, Y., Hara, S., Obatake, A.: Identification of proteolytic activities of gel-degrading factors in three lizardfish species. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **59**, 1039-1045 (1993).

橘 勝康, 三嶋敏雄, 槌本六良: 養殖マダイと天然マダイの氷蔵中における普通筋の微細構造と細胞化学的 Mg^{2+} -ATPase 活性の変化日本水産学会誌, **59**, 721-727 (1993).

橘 勝康, 鈴木秀一, 八木基明, 三嶋敏雄, 原 研治, 槌本六良: 養殖マダイの氷蔵中における普通筋中 α -アクチニンの限定分解. 日本水産学会誌, **67**, 723-727 (2001).

Tokiwa T., Matsumiya H.: Fragmentation of fish myofibril. Effect of storage condition and muscle cathepsin. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **35**, 1099-1109 (1969).

盛永宏太郎: 焙煎大豆粉のタンパク質の消化とトリプシンインヒビター活性に及ぼす噴サイト加熱処理の影響. 日本食品化学工学学会誌, **57**, 219-225, (1997).

山下倫明, 逸見 光, 上田智広, 小原 貢, 田老孝則, 西岡不二男, 小長谷史郎: 産卵期サケ落とし身の加熱ゲル化過程で起きる著しいプロテオリシスとプロテアーゼインヒビター添加による魚肉ゲルの劣化抑制効果. 日本水産学会誌, **62**, 934-938 (1986).

肖 寧, 谷山茂人, 石原 光, 岡本 昭, 槌本六秀, 濱田友貴, 橘 勝康: 養殖ブリのヤケ肉発生に伴う普通筋の微細構造と細胞化学的 Mg^{2+} -ATPase 活性の変化. 日本食品化学学会誌, **16**, 137-142 (2009).

肖 寧, 谷山茂人, 石原 光, 竹下哲史, 槌本六秀, 濱田友貴, 橘 勝康: 養殖ブリのヤケ肉発生に伴う背部普通筋における α -アクチニンの変化. 日本食品化学学会誌, **17**, 207-212 (2010).

Yoshida, A., Kurihara, M., Ogata, H., Cao, M. J., Osatomi, K., Hara, K.: Proteolytic degradation of myofibrillar components by endogenous proteases in red sea bream muscle. Japanese Journal of Chemistry and Safety, **21**, 107-114 (2014).

謝 辞

本研究は、長崎大学大学院水産・環境科学総合研究科 橘 勝康 教授のご指導、ご鞭撻の下に行われたもので、ここに深甚なる謝意を表す。また、本論文のご高閲を賜った同研究科 長富 潔 教授に深く感謝申し上げます。細部にわたり直接ご指導を賜った同研究科 谷山茂人 准教授に深謝する。

本研究の機会を与えてくださった香蘭女子短期大学 坂根康秀 理事長・学長、豊崎俊幸 副学長に深くお礼申し上げます。

本論文の遂行に際して、多大なるご教示を賜った長崎大学大学院水産・環境科学総合研究科 平坂勝也 准教授、竹下哲史 准教授、濱田友貴 准教授に心より謝意を表す。また、数々の有益なご助言を賜った東筑紫短期大学食物栄養学科 宮崎里帆 助教、一般社団法人 長崎県水産加工振興協会 川井若菜 前研究員（現 飯塚市役所）にお礼申し上げます。

本研究の試料分析に多大なるご協力とご助言を賜った長崎県総合水産試験場水産加工開発指導センター 桑原浩一 所長、宮木廉夫 加工科長、野口絵理香 主任研究員をはじめ、職員の皆様に深謝する。

かまぼこ製造現場における聞き取り調査にご協力をいただいた NPO 法人長崎の食文化を推進する会 谷川昭夫 理事、長崎蒲鉾水産加工業協同組合 多比良純一 専務理事、松本勝彦 業務部課長に厚くお礼申し上げます。

水産物の加工技術や流通に関するご指導をいただいた九州丸一食品株式会社 江口志郎 会長、磯野隆尚 品質管理室長をはじめ、社員の皆様に謝意を表す。

本研究を進めるにあたり，種々のご協力をいただいた長崎大学水産学部食品栄養研究室各位，特に王 曜 女史，田中幹大 氏，齋藤志伸 氏，横山健二 氏，三沢優斗 氏に感謝する。

最後に，研究の道に導いて下さった恩師 矢野治江 博士（前中村学園大学教授）ならびに徳留裕子 博士（前名古屋学芸大学教授）に感謝する。