

# 魚肉タンパク質の加熱ゲル形成に おけるSH基の役割に関する研究

伊 藤 慶 明

# 魚肉タンパク質の加熱ゲル形成に おけるSH基の役割に関する研究

伊 藤 慶 明

# 目 次

緒 言	1
第1章 かまぼこの足形成に及ぼすシステインおよび シスチンの影響	3
実験材料および方法	3
実 験 結 果	4
1. システインの効果	4
2. シスチンの効果	6
3. システインおよびシスチンの併用効果	6
4. 二、三の魚種のかまぼこの足形成に及ぼすシステインおよび シスチンの効果	6
5. コイ肉すり身に添加したシステインおよびシスチンの挙動	8
考 察	9
第2章 かまぼこの足形成に及ぼす無機還元剤の影響	12
実験材料および方法	12
実 験 結 果	12
1. 無機還元剤の影響	12
2. 無機還元剤とその他の足増強剤との比較	15
考 察	17
第3章 コイアクトミオシンのゲル形成能	19
実験材料および方法	19
実験結果および考察	22
1. KCl濃度の影響	22
2. pHの影響	22
3. リン酸緩衝液の影響	23

4. アクトミオシン濃度と剛性率の関係 .....	2 4
5. 加熱時間の影響 .....	2 5
6. 加熱温度の影響 .....	2 5
7. 二段加熱の影響 .....	2 6
第4章 コイアクトミオシンの加熱によるSH基の挙動 ...	2 8
実験材料および方法 .....	2 8
実験結果および考察 .....	2 9
1. アクトミオシン濃度と加熱後の全SH基量との関係 .....	2 9
2. 加熱による reactive SH基の挙動 .....	3 1
3. 加熱後の全SH基量と reactive SH基量との関係 .....	3 3
第5章 コイアクトミオシンの加熱ゲル形成に及ぼす SH試薬の影響 .....	3 6
実験材料および方法 .....	3 6
実験結果および考察 .....	3 7
1. 40℃におけるゲル形成に及ぼすSH試薬の影響 .....	3 7
2. 80℃におけるゲル形成に及ぼすSH試薬の影響 .....	3 9
第6章 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 ...	4 1
実験材料および方法 .....	4 1
実験結果および考察 .....	4 2
1. 未加熱アクトミオシンのCPG-10 2000 Å クロマトグラフィー .....	4 2
2. SH試薬無添加ゲルのCPG-10 2000 Å クロマトグラフィー .....	4 3

3. SH 試薬添加ゲルの CPG-10 2000 $\overset{\circ}{\text{A}}$ クロマトグラフィー	45
第7章 コイアクトミオシンの加熱ゲル形成におけるSS結合 によるタンパク質の高分子化	49
実験材料および方法	49
実験結果および考察	50
1. 8M 尿素溶液および6M 塩酸グアニジン溶液によるアクトミオシン ゲルの可溶化率の比較	50
2. DTT 処理による6M 塩酸グアニジン溶液可溶区分の CPG-10 2000 $\overset{\circ}{\text{A}}$ クロマトグラフィーパターンの変化	51
3. DTT 処理による6M 塩酸グアニジン溶液可溶区分の Bio-Gel A-15m クロマトグラフィーパターンの変化	54
要 約	57
謝 辞	62
文 献	63

## 結 言

水産ねり製品の弾力、いわゆる足、は製品の品質を左右する最も重要な要素である。ねり製品の足に関する研究は、かなり古くからなされている（清水、1935<sup>1)</sup>；平野、1939<sup>2)</sup>）。清水（1944<sup>3)</sup>、1966<sup>4)</sup>）は足の形成機作を推定し次のように述べている。「魚肉に食塩を加えてすりつぶせば収縮しているミオシン糸タンパク質がほどけて長くなり、内蔵されていた極性基が表面に現われ、これを加熱すれば極性基相互の結合が起ってからみあい、スポンジ状の網状組織が形成され、その中に溶液を包蔵して弾性を生じる。これが足の本体であろう。」その後、足に影響する諸要因に関する多くの研究がなされ、最近ではねり製品の足形成に対する各製造工程の意義がかなりよく説明できるようになった（志水、1976<sup>5)</sup>）。しかし、足の形成機作そのものに関してはまだ推論の域を出ていないのが現状である。特にタンパク質分子間の結合に関する知見は極めて少ない。

魚肉タンパク質の分子間に形成される塩結合、水素結合、疎水結合、およびSS結合のうち、水素結合および疎水結合が足形成に関与する可能性については丹羽（1975<sup>6)</sup>）の報告がある。また、塩結合の可能性も推察されている<sup>7)</sup>。さらに、高木（1973<sup>8)</sup>）はレオロジー的手法により足に対する各種橋かけの寄与率を求め、疎水結合＋水素結合 70～80%、塩結合 12～15%、SS結合 17～22%と算出している。

かまぼこの足形成におけるSS結合の関与を検討した岡田ら（1961<sup>9)</sup>）の結果によれば、足の強さとSH基量との間には相関がなかった。丹羽ら（1971<sup>10)</sup>）は、坐り（すり身を常温に放置した場合にゲル化が起る現象）におけるSH基量の変化がほとんどないことから、SH基は坐りに関与しないと報告している。一方、田端ら（1976<sup>11)</sup>）は、SH試薬の添加により足が弱くなること、および窒素下で魚肉を擂潰すれば調製したかまぼこの足が強くなることを報告している。しかし、彼等はSH基がSS結合を形成したとしても足の強さとの関連性は非常に少ないものと推察している。

以上のように、魚肉ねり製品の足形成におけるタンパク質のSH基およびSS結合の役割については、まだよくわかっていない。そこで本研究では、第1章および第2章において、まず魚肉の加熱ゲル形成にSH基およびSS結合が関与するかどうかを知る目的で、かまぼこの足形成に及ぼすシステイン、シスチン、および無機還元剤の影響を調べた。第3章では、魚肉のゲル形成機作を解明するためのモデル系を確立するため、コイ筋肉から抽出したアクトミオシンを用いて、その加熱ゲル形成に及ぼす各種要因について検討し、あわせて既知の魚肉足形成に及ぼす各種要因の影響と本実験の結果とを比較考察した。アクトミオシンあるいはミオシン区タンパク質は魚肉ゲル形成の主角と考えられているが、アクトミオシン自身のゲル形成能を直接検討した研究はまだほとんど行なわれていない。そこで、アクトミオシンのゲル形成にSH基が関与するかどうかを知る目的で、第4章ではアクトミオシンを加熱したときのSH基の挙動を、第5章ではアクトミオシンのゲル形成能に及ぼすSH試薬の影響をそれぞれ調べた。さらに、第6章ではアクトミオシンを加熱することによってSH基の関与する高分子化が起るかどうかを、第7章では分子間にSS結合が形成されるかどうかを調べた。

これらの研究結果から、これまでなされてきた水産ねり製品の足形成機作に関する研究の中でまだ未解決であったところのタンパク質分子間のSS結合が魚肉の加熱によって起るか否かという問題に対して、ある程度の解答が得られた。すなわち、魚肉の加熱によりタンパク質分子表面に露出されたSH基は分子間SS結合を形成することによって、魚肉タンパク質のゲル化すなわち足形成に寄与することがわかった。さらに、そのタンパク質分子間のSS結合は、SH基の酸化反応によってだけでなくSH-SS交換反応によっても形成される可能性が提起された。これらの反応機構の詳細をさらに追求することはなお今後に残された研究課題である。

## 第1章 かまぼこの足形成に及ぼすシステイン およびシスチンの影響

かまぼこの足形成における魚肉タンパク質のSH基およびSS結合の役割については、まだよくわかっていない。岡田ら<sup>9)</sup>および田端ら<sup>11)</sup>は、足形成の際のSH基の酸化によるタンパク質分子間のSS結合の形成に関して否定的な報告をしている。坐りにおけるSS結合の形成に関しても、丹羽ら<sup>10)</sup>により否定的な結果が報告されている。また、YASUIら<sup>12)</sup>およびSAMEJIMAら<sup>13)</sup>はウサギミオシンの加熱凝固にSH基の酸化によるSS結合の形成が直接関与していないと報告している。一方、田端ら<sup>11)</sup>は、SH試薬の添加によりかまぼこの足形成能が低下したと報告している。

本章では、かまぼこの足形成におけるタンパク質のSH基およびSS結合の役割を理解するための手がかりを得るため、かまぼこの足形成に及ぼすシステインおよびシスチンの添加効果を調べた。

### 実験材料および方法

**試料** スケトウタラ (*Theragra chalcogramma*) 冷凍すり身は、北海道の冷凍すり身業者から入手したものをを用いた。マダラ (*Gadus macrocephalus*) およびマグロ (*Thunnus thynnus*) は舞鶴漁連より入手したもので、コイ (*Cyprinus carpio*) は養殖場より入手した活魚を用いた。

**かまぼこの調製** 冷凍すり身を用いた場合には、すり身300gに所定量の試薬を加え、8℃の低温室で15分間擂潰した。他の魚肉を用いた場合には、常法通り採肉・水晒しした挽肉400gに対し3%の食塩と所定量の試薬を加え、30分間擂潰した。擂潰したすり身をクレハロンケーシングに充填し、8℃に35分間放置したのち、90±2℃で60分間加熱した。添加試薬は水溶液または水懸濁液として加えた。L-システイン塩酸塩およびL-システイン酸は添加直前にその溶液を中和した。添加液量は300gのすり身に対して10mlとなるようにした。



ゲル強度の測定 志水ら<sup>14)</sup>の方法で環状の試料片(厚さ3 mm)を作り、Food Rheometer(田葉井製作所製)で破断強度と破断伸長を測定した。これらの積をゲル強度( $\text{g} \times \text{cm}$ )とした。

すり身のpHの測定 加熱前のすり身に直接堀場ニードル型複合電極を挿入し、そのpHを測定した。

システインの定量 試料1gを3%メタリン酸溶液10 mlとともにガラスホモジナイザーでホモジナイズし、濾過後、濾液をGRUNERTら<sup>15)</sup>のニトロプルシッド法によりシステインを定量した。システインを加えたアクトミオン溶液中のシステインの定量はGAITONDE<sup>16)</sup>の酸ニンヒドリン法により行った。

アクトミオシンの調製 第3章に記載する方法に準じて、コイ筋肉よりWEBER-EDSALL溶液でアクトミオシンを抽出し、沈澱・溶解を二回くり返して精製した。

## 実 験 結 果

システインの効果 Fig.1に示したように、スケトウタラ冷凍すり身1g当り8  $\mu\text{mol}$ のL-システインを添加したとき、ゲル強度は最大になった。この効果がL-システインのSH基によるものかどうかを確かめるため、SH基が-Hに置き換わったL-アラニンおよび-SO<sub>3</sub>Hに置き換わったL-システイン酸の足形成に及ぼす影響を調べた。その結果、Fig.2に示したように、L-アラニンおよびL-システイン酸の添加はともに全く効果がなかった。このことからシステインの添加効果はそのSH基に由来するものであり、そのアミノ基やカルボキシル基を含むSH基以外の部分によるものでないと考えた。

また、グルタチオンおよびチオ乳酸のようなSH化合物もシステインと同様、足増強効果を示した。すなわち、冷凍すり身1g当り8  $\mu\text{mol}$ のグルタチオンあるいは4  $\mu\text{mol}$ のチオ乳酸を添加したとき、かまぼこのゲル強度はいずれも対照の1.5~1.6倍であった。

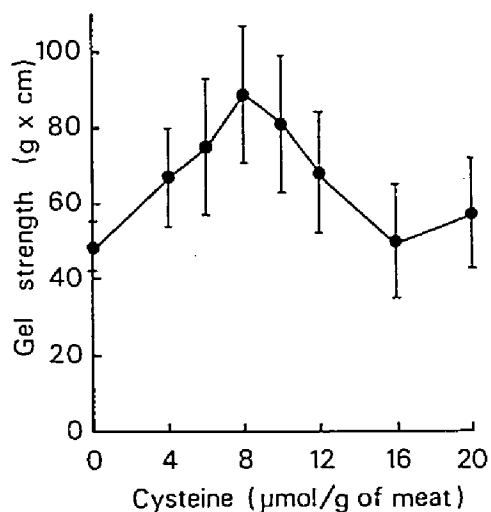


Fig. 1. Effect of L-cysteine on the gel formation of Alaska pollack brayed-meat. The brayed-meat of Alaska-pollack, which was of a commercial product in frozen state, contained 2.5% of sodium chloride, 10% of D-sorbitol, 11.6% of protein, and 76% of moisture. The brayed-meat was mixed with L-cysteine at about 8°C for 15 min. The paste stuffed into casing was heated at 90°C for 60 min. Each value represents the mean  $\pm$ S.D. for 5 determinations.

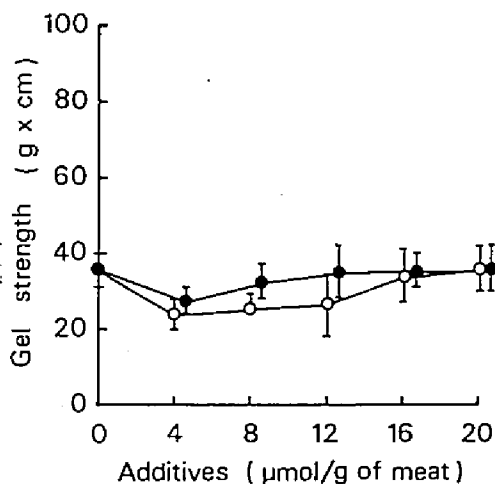


Fig. 2. Effects of L-alanine and L-cysteic acid on the gel formation of Alaska pollack brayed-meat. The gel was prepared by the same procedure as described in Fig. 1. —●—: L-alanine, —○—: L-cysteic acid. Each value represents the mean  $\pm$ S.D. for 5 determinations.

シスチンの効果 Fig.3に示したように、冷凍すり身1g当り10~20  $\mu\text{mol}$ のL-シスチンを添加することによりゲル強度は最大となり、シスチンもまた足増強効果を持つことが認められた。この結果は、スケトウタラ冷凍すり身にシスチンを加えても、そのかまぼこのジェリー強度は対照とほとんど変らなかったという三宅ら<sup>17)</sup>の報告とは異なっている。

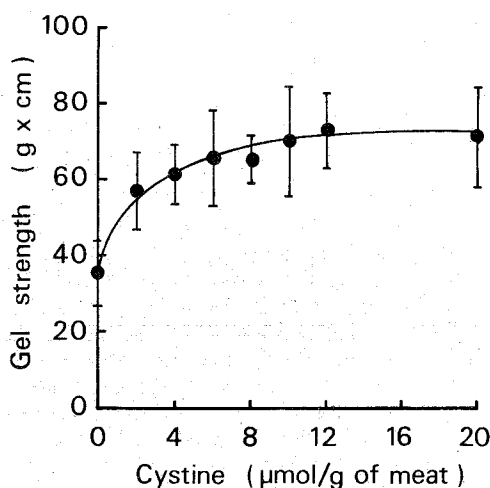


Fig. 3. Effect of L-cystine on the gel formation of Alaska pollack brayed-meat. The gel was prepared by the same procedure as described in Fig. 1. Each value represents the mean  $\pm$ S.D. for 5 determinations.

システインおよびシスチンの併用効果 システインおよびシスチンのどちらもかまぼこの足を増強したので、これらの併用により相乗効果がみられるかどうかを調べた (Fig. 4)。L-システイン 8  $\mu\text{mol}$  と L-シスチン 8  $\mu\text{mol}$  とを併用したときのゲル強度は、それぞれ単独に添加されたときのゲル強度のほぼ中間の値となり、システインとシスチンの相乗効果は認められなかった。

二、三の魚種のかまぼこの足形成に及ぼすシステインおよびシスチンの効果  
システインおよびシスチンの足増強効果をスケトウタラ冷凍すり身以外の魚肉についてさらに確かめるため、マダラ、マグロ、およびコイの肉を用いて、それら試薬の効果を調べた。その結果、Table 1に示したように、いず

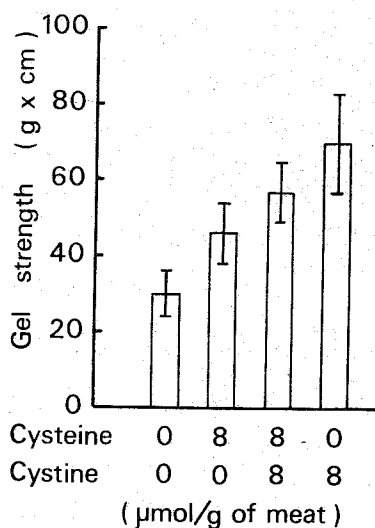


Fig. 4. Effect of the simultaneous use of L-cysteine and L-cystine on the gel formation of Alaska pollack brayed-meat. The gel was prepared by the same procedure as described in Fig. 1. Each value represents the mean  $\pm$ S.D. for 5 determinations.

Table 1. Effects of L-cysteine and L-cystine on the gel formation of fish meats from cod, tuna, and carp. Each dressed meat was chopped, washed with cold water, and minced. The minced meat was brayed in a mortar with 3% of sodium chloride and with L-cysteine or L-cystine. The resulting paste was stuffed into casing and heated at 90°C for 60 min.

Fish used	Additive	$\mu\text{mol/g}$ of fish meat	Gel strength (g $\times$ cm)	pH <sup>*4</sup>	Protein <sup>*5</sup> (%)	Moisture <sup>*5</sup> (%)
Cod ( <i>Gadus macrocephalus</i> )	None	—	89 $\pm$ 11 <sup>*3</sup>	6.52		
	CySH <sup>*1</sup>	8	153 $\pm$ 18	6.52	15.9	80.7
	CySSCy <sup>*2</sup>	10	139 $\pm$ 19	6.51		
Tuna ( <i>Thunnus thynnus</i> )	None	—	386 $\pm$ 34	6.24		
	CySH	8	408 $\pm$ 36	6.22	18.1	76.4
	CySSCy	10	424 $\pm$ 41	6.24		
Carp ( <i>Cyprinus carpio</i> )	None	—	120 $\pm$ 15	6.22		
	CySH	4	124 $\pm$ 15	6.18	24.5	71.0
	CySH	8	149 $\pm$ 15	6.26		
	CySSCy	10	156 $\pm$ 13	6.27		

\*1 L-Cysteine.

\*2 L-Cystine.

\*3 Mean value  $\pm$  S.D. for 5 determinations.

\*4 pH of fish meat paste before heating.

\*5 Protein and moisture in fish meat gels.

れの魚肉においても L-システインおよび L-シスチンの添加により、そのゲル強度は増加した。

コイ肉すり身に添加したシステインおよびシスチンの挙動 L-システインおよび L-シスチンを添加したコイ肉すり身の加熱前後におけるシステイン量を定量し、これらの添加試薬の作用機作を考えるための一助とした (Fig.5)。システイン添加の場合、加熱前後とも添加したシステイン量の約 70% が、その添加量に関係なく検出された。シスチン添加の場合、加熱前ではシスチンのシステインへの還元はごくわずかであった。魚肉 1g 当たり 10  $\mu\text{mol}$  の L-シスチンを添加した場合には、加熱後にかまぼこから 7.2  $\mu\text{mol}$  のシステインが検出された。この加熱によるシスチンのシステインへの還元が、魚肉タンパク質とシスチンとの反応によるものかどうかを確かめるために、コイアクトミオシンに L-シスチンを添加し、種々の温度に温置後、システインを定量した。添加したシスチンはコイアクトミオシンにより

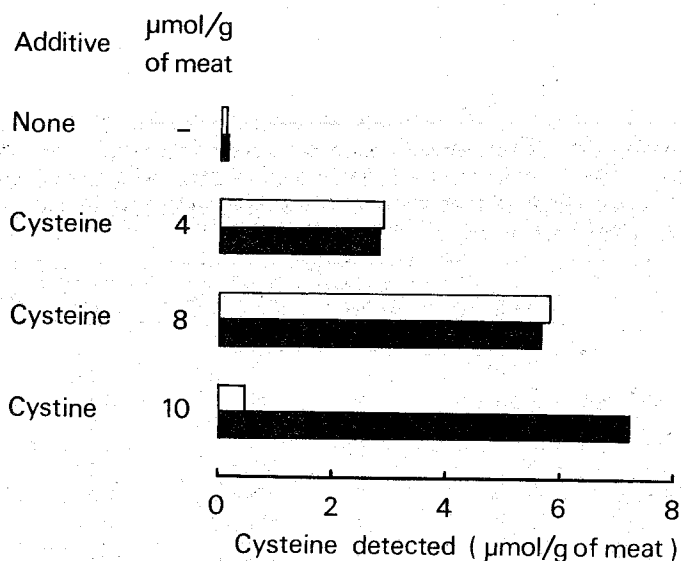


Fig. 5. Cysteine content in the carp meat, to which L-cysteine or L-cystine was added, before and after heating at 90°C for 60 min. The carp meat was identical with that described in Table 1. □ : before heating, ■ : after heating.

還元され、その還元量は温置の温度が高いほど多かった (Fig. 6)。HAMM<sup>18)</sup> は、筋原線維を加熱したとき、その加熱温度が高いほどタンパク質のSH基の露出量が増加すると報告している。アクトミオシンの加熱においても、加熱温度が高いほどSH基の露出量は増加し、そのため添加したシスチンのシステインへの還元量が増加したものと推察される。

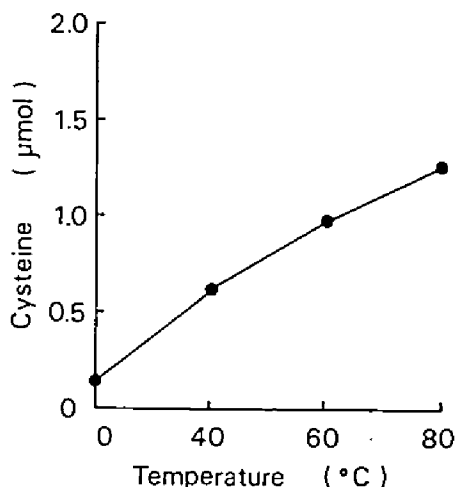


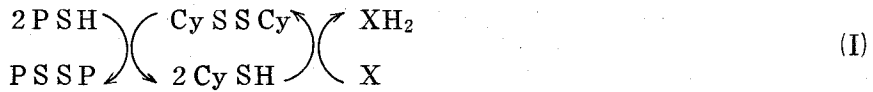
Fig. 6. Reduction of L-cystine to cysteine by carp actomyosin during incubation at various temperatures for 20 min. Reaction mixture contained 53 mg of actomyosin and 1  $\mu$ mol of L-cystine in 5 ml of 50 mM phosphate buffer, pH 6.7.

#### 考 察

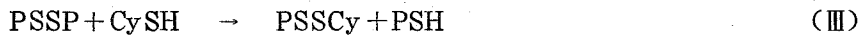
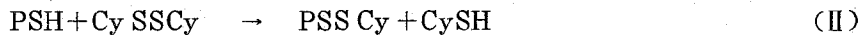
かまぼこの足がシステインおよびシスチンの添加により増強される機構として、タンパク質のSH基およびSS結合とシスチンおよびシステインとの反応性から、次の三つの可能性が考えられる。

(1) シスチンがタンパク質のSH基を酸化することによるタンパク質分子間SS結合の生成(酸化反応)：臭素酸カリウム<sup>9)</sup>やデヒドロアスコルビン酸<sup>10)</sup>の添加によってかまぼこの足が強くなることは、タンパク質分子間にSH基の酸化によるSS結合が形成されるためと考えられている。また、パン生地

の抗張力も酸化剤によって大きくなること<sup>20)</sup>や、フェリシアン化カリウムによって分子間に SS 結合が形成されること<sup>21)</sup>が報告されている。本実験で、すり身に添加した L-シスチンが還元されたことから、タンパク質の SH 基が酸化されることが推測される。システインは、いったん酸化されてシスチンになって足増強効果をもたらすものと考えられる。



(2) タンパク質の SH 基とシスチン，およびタンパク質の SS 結合とシステインとの SH-SS 交換反応による混合ジスルフィドの生成 (SH-SS 交換反応) : ウサギミオシンの SH 基と低分子 SS 化合物との間で SH-SS 交換反応が生じ，混合ジスルフィドが生成されることが報告されている。<sup>22-25)</sup> また，パン生地の混ねつ中に S<sup>35</sup> でラベルされたシステインおよびシスチンが，やはり SH-SS 交換反応によりタンパク質中にとり込まれることが確かめられている。<sup>26)</sup>



すり身やアクトミオシン溶液に添加されたシスチンが還元されることから，(II) の反応が起っていることも考えられる。(III) および (IV) の反応のようなシステインによる分子間 SS 結合および分子内 SS 結合の切断が起っているとすると，システインの添加により検出されなかった残り 30% のシステインはタンパク質にとり込まれたのかもしれない。(II)，(III)，および (IV) の反応が起こるとすれば，システインおよびシスチンの添加により足が強くなったのは，タンパク質の分子間 SS 結合以外の分子間結合によるものと考えられる。

(3) システインが SS 交換反応を促進することによるタンパク質分子間 SS 結合の生成 (SS 交換反応) : HUGGINS<sup>27)</sup> は，SH 基と SS 結合を持つタンパク質の尿素変性下でのゲル化の機構として，タンパク質分子間の交換反応

(V)によるSS結合の形成を推論した。



BENESCH ら<sup>28)</sup>は分子内SS結合を導入したゼラチンの溶液に、わずかなSH化合物を添加すると、SS交換反応により分子間SS結合が促進され、熱に安定なゲルがすみやかに形成されたと報告している。タンパク質の熱変性においてもSS交換反応が起こるといふ報告がある。<sup>29-31)</sup> RYLE ら<sup>32)</sup>は、SS化合物間の交換反応がSH化合物により促進されることを証明している。



かまぼこの足形成に対するシステインの添加効果も、魚肉タンパク質分子間のSS交換反応の促進によるものと考えることができる。また、SS化合物がタンパク質のSH基と反応し混合ジスルフィドを形成したとき生成されるSH化合物が、タンパク質のSS結合と反応するという報告<sup>33)</sup>がある。したがって、システインの足形成に対する効果も、(II)の反応により生成するシステインがタンパク質分子間のSS交換反応を促進するためであると考えられるであろう。

システインおよびシステインのそれぞれの足増強効果が、以上に挙げた反応仮説のいずれによるかは、今のところ断定することはできない。しかし、これまでの報告にみられるSH基の酸化反応による足増強効果だけでなく、SH-SS交換反応(II-IV)ならびにSS交換反応(V-VI)の促進による足増強の可能性についても今後さらに検討することは、足形成機作の解明に役立つものと考えられる。



## 第2章 かまぼこの足形成に及ぼす無機還元剤の影響

岡田ら<sup>9)</sup>は臭素酸カリウムがねり製品の足を増強することを見出し、その増強効果がタンパク質のSH基の酸化により形成される分子間SS結合に基づく網状構造の強化によることを示唆した。吉中ら<sup>19)</sup>はアスコルビン酸およびデヒドロアスコルビン酸がかまぼこの足を強くすることを見出し、それらの効果がいずれもデヒドロアスコルビン酸によるタンパク質SH基の酸化に基づくことを示唆した。前章において著者はシステインおよびシスチンがかまぼこの足を強くすることを明らかにし、それらの足増強効果がSH基の酸化によるタンパク質分子間SS結合の形成に基づくことその他、SSならびにSH-SS交換反応によるタンパク質分子間結合の増大とも関連していることの可能性を示唆した。

本章では、かまぼこの足形成における魚肉タンパク質のSH基およびSS結合の役割を理解する一助として、かまぼこの足形成に及ぼす二、三の無機還元剤の影響を調べた。

### 実験材料および方法

**試料** スケトウタラ (*Theragra chalcogramma*) 冷凍すり身は前章と同様、北海道の冷凍すり身業者から入手したものを使用した。

**かまぼこの調製およびゲル強度の測定** かまぼこの調製ならびに各かまぼこ試料片の破断強度および破断伸長の測定は前章に記載した方法に準じて行なった。

**すり身のpHの測定** pHの測定は前章に記載した方法に準じて行なった。

### 実験結果

**無機還元剤の影響** 無機還元剤として亜硫酸水素ナトリウム、亜硝酸ナトリウム、およびチオ硫酸ナトリウムを用い、これらのかまぼこの足形成に及ぼす影響を調べた。これらの試薬は水溶液とし、いずれもそのpHを調節せ

ずにスケトウタラすり身に添加した。その結果、亜硝酸ナトリウムおよびチオ硫酸ナトリウムはかまぼこの足をかなり増強することがわかった(Fig. 7)。スケトウタラすり身1g当りこれら試薬を16 $\mu$ mol添加したとき、ゲル強度はいずれも対照の約2倍となった。これら試薬の添加によるすり身のpHの変動はわずかで、いずれも16 $\mu$ mol/gの添加により、そのpHは約0.1上昇したにすぎなかった。一方、亜硫酸水素ナトリウムはわずかな足増強効果を示した。すなわち、4および8 $\mu$ mol/gの試薬を添加したときには、ゲル強度は対照よりやや高い値を示したが、8 $\mu$ mol/g以上を添加したときには、添加量の増加にともないその

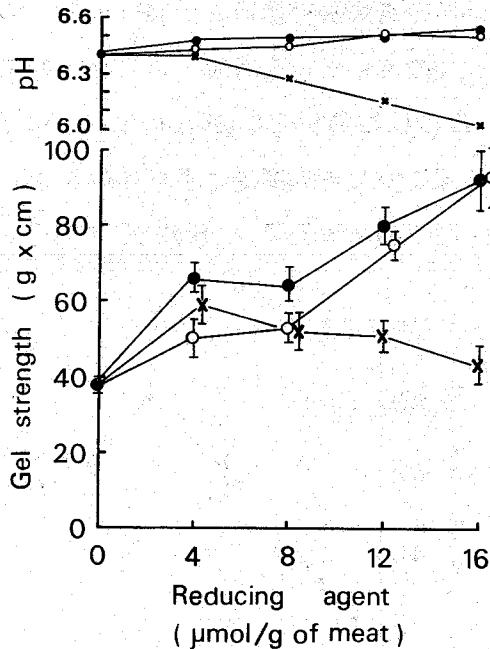


Fig. 7. Effects of reducing agents on the gel formation of Alaska pollack brayed-meat and on the pH of the paste. The brayed-meat of Alaska pollack, which was of a commercial product in frozen state, contained 2.5% of sodium chloride, 10% of D-sorbitol, 11.6% of protein, and 76% of moisture. The brayed-meat was mixed with each reagent at 8°C for 15 min. The paste stuffed into casing was heated at 90°C for 60 min. —●—,  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ; —○—,  $\text{NaNO}_2$ ; —×—,  $\text{NaHSO}_3$ . Each value represents the mean  $\pm$ S.D. for 5 determinations.

効果は減少した。4 $\mu$ mol/gの亜硫酸水素ナトリウムを添加したすり身のpHは対照のすり身のpH 6.4とほとんど変らなかったが、試薬の添加量の増加にともない、そのpHは低下した。16 $\mu$ mol/gの試薬を添加したときには、そのpHは対照のそれより約0.4低かった。

かまぼこの足の強さは、すり身のpHに依存することが報告されている。<sup>34)</sup>そこで本研究に用いたスケトウタラすり身のpHの変動がかまぼこのゲル強度にどの程度の影響を及ぼすかを調べた。すり身のpHは1N HClあるいは1N NaOHを用いて調節した。Fig.8に示したように、すり身のpHが7.7のとき、ゲル強度は最も大きかった。pH 5.8~7.7の範囲内では、pHの上昇にともない、ゲル強度はほぼ直線的に増加し、pH 0.1の上昇にともなうゲル強度の増加は約3.5 g $\times$ cmであった。亜硝酸ナトリウムあるいはチオ硫酸ナトリウムを16 $\mu$ mol/g添加したすり身のpHはいずれも約0.1上昇し、これらの試薬を添加したかまぼこのゲル強度はいずれも約50 g $\times$ cm増加した。これより、これらの還元剤の足増強効果はpHの上昇によるものではなく、こ

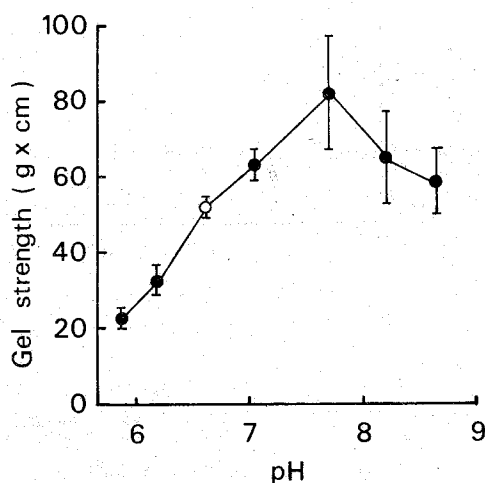


Fig. 8. Effect of pH of Alaska pollack brayed-meat paste on its gel formation. The brayed-meat of Alaska pollack was adjusted to the desired pH with 1 N HCl solution and 1 N NaOH solution. The resulting paste was stuffed into casing and heated at 90°C for 60 min. Each value represents the mean  $\pm$ S.D. for 5 determinations.

れら試薬のもつ還元力によるものと考えられる。亜硫酸水素ナトリウムの場合には、その添加量の増加にともない、すり身の pH は低下したが、これらかまぼこのゲル強度はいずれも対照のそれよりわずかに大きかった。このことは、Fig. 8 に示したように、すり身の pH の低下にともないかまぼこのゲル強度が低下することと考え合せると、亜硫酸水素ナトリウムもまた足増強効果をもつと考えることができる。

無機還元剤とその他の足増強剤との比較 無機還元剤の足増強作用の機作を推察する一助として、スケトウタラすり身に対する無機還元剤のもつ効果と既報の足増強剤の効果とを足の質的側面から比較検討した。既報の足増強剤としてピロりん酸ナトリウム、トリりん酸ナトリウム、臭素酸カリウム、L-アスコルビン酸、デヒドロ-L-アスコルビン酸、L-システイン、および L-シスチンを用いた。岡田<sup>9)</sup> は臭素酸カリウムの足増強効果が原料魚の種類によってかなり変動することを報告している。そこで上記足増強剤の効果を比較するに先立ってスケトウタラ冷凍すり身に対する臭素酸カリウムの足増強効果について検討した。Fig. 9 に示したように、使用したスケト

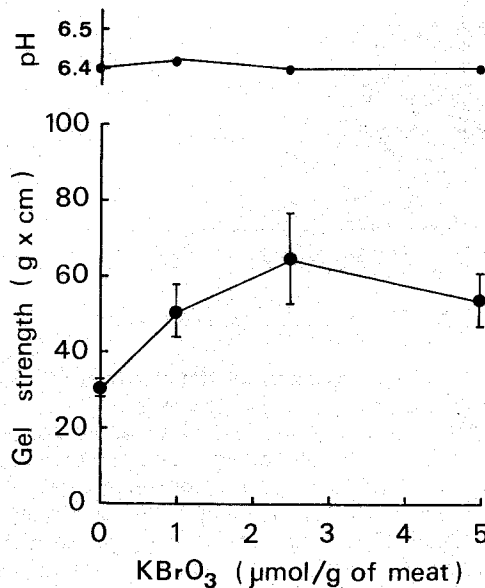


Fig. 9. Effect of potassium bromate on the gel formation of Alaska pollack brayed-meat and on the pH of the paste. The gel was prepared by the same procedure as described in Fig. 7. Each value represents the mean  $\pm$ S.D. for 5 determinations.

ウタラすり身に対して臭素酸カリウムは足増強効果をもち、その最適添加量は  $2.5 \mu\text{mol/g}$  であった。

各種足増強剤の効果を比較するために、ピロりん酸ナトリウムおよびトリりん酸ナトリウムについてはそれぞれ 0.1 および 0.25 % 添加したかまぼこを調製し、その他の増強剤については吉中ら<sup>19)</sup> および著者が得た最適量を添加したかまぼこを調製した。対照のかまぼこの破断強度 (T) および破断伸長 (L) に対する各かまぼこのそれぞれの相対値 (Tr および Lr) を求め、グラフ上にプロットした (Fig.10)。その結果、ピロりん酸ナトリウムやトリりん酸ナトリウムはかまぼこの破断強度の増大よりも破断伸長の増大により多く寄与しているのに対し、無機還元剤、臭素酸カリウム、アスコルビン酸

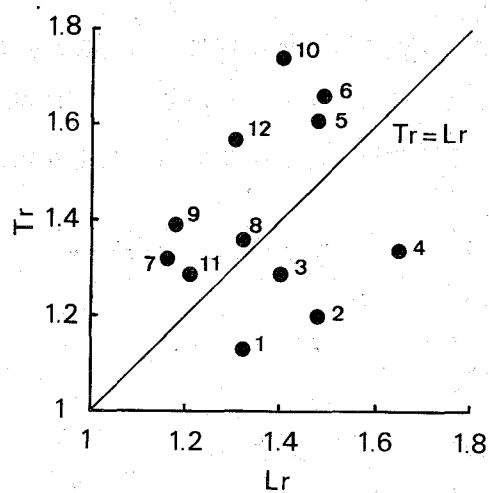


Fig. 10. Effects of various improvers on the elastic properties of Alaska pollack meat gel. The gel was prepared by the same procedure in Fig. 7. Tr and Lr designate the relative values of the tensile strength and the breaking length of each gel to those of the control gel, respectively. 1 and 2, triphosphate 1.0 and 2.5 mg/g of meat; 3 and 4, pyrophosphate 1.0 and 2.5 mg/g of meat; 5, sodium thiosulfate  $16 \mu\text{mol/g}$  of meat; 6, sodium nitrite  $16 \mu\text{mol/g}$  of meat; 7, sodium hydrogen sulfite  $4 \mu\text{mol/g}$  of meat; 8, potassium bromate  $2.5 \mu\text{mol/g}$  of meat; 9, L-ascorbic acid  $7 \mu\text{mol/g}$  of meat; 10, dehydro-L-ascorbic acid  $10 \mu\text{mol/g}$  of meat; 11, L-cysteine  $8 \mu\text{mol/g}$  of meat; 12, L-cysteine  $10 \mu\text{mol/g}$  of meat.

デヒドロアスコルビン酸，システイン，およびシスチンは破断伸長の増大よりもむしろ破断強度の増大により多く寄与していることがわかった。また，官能的にもこれら二つのグループの間にかまぼこの足の質の差異が認められた。すなわち前者のグループのかまぼこはしなやかで，伸びのある足をもっていたのに対し，後者のグループのそれは堅い感じの足をもっていた。

## 考 察

スケトウタラ冷凍すり身を原料とするかまぼこに対して，臭素酸カリウムのような酸化剤のみならず，亜硝酸ナトリウムやチオ硫酸ナトリウムのような還元剤も足増強効果をもっていることがわかった。これらの還元剤を添加したかまぼこの足の質はピロりん酸ナトリウムやトリりん酸ナトリウムを添加したかまぼこのそれとは明らかに異なり，臭素酸カリウム，アスコルビン酸，デヒドロアスコルビン酸，システイン，およびシスチンを添加したかまぼこのものとよく類似していた。ピロりん酸塩やトリりん酸塩の足増強効果は，これらりん酸塩によるアクトミオシンの解離あるいは保水性の増大と密接に関連しているといわれている。<sup>85, 86)</sup> 一方，臭素酸カリウム<sup>9)</sup> およびデヒドロアスコルビン酸<sup>19)</sup> の足増強作用は，その酸化作用によるタンパク質分子間の SS 結合の形成に基づくと報告されている。また前章において，著者は還元剤であるシステインおよびその酸化型であるシスチンがともにかまぼこの足に対して増強効果をもつことを明らかにした。その研究結果から，システインおよびシスチンの作用機作としてタンパク質 SH 基の酸化のみならず SS 交換反応によるタンパク質分子間の SS 結合の形成あるいは混合ジスルフィドの生成による SS 結合以外のタンパク質分子間結合の形成が推察され，魚肉ゲル形成における SH 基および SS 結合の関与の可能性が示唆された。無機還元剤添加によるかまぼこの足の質的变化が，臭素酸カリウム，アスコルビン酸，デヒドロアスコルビン酸，システイン，およびシスチン添加による変化と類似していることより，これら試薬はいずれもタンパク質分子間 SS 結合の形成を促進するものと考えられる。すなわち，シスチンの場合に

は臭素酸カリウムおよびデヒドロアスコルビン酸と同様に、タンパク質SH基の酸化により、また無機還元剤やシステインの場合にはタンパク質SS結合の交換反応により、タンパク質分子間にSS結合が形成されるものと推察される。後者の可能性はシステイン、亜硫酸ナトリウム、およびシアン化ナトリウムなどの還元剤が酸化型グルタチオンのSS交換反応を促進するというSLUYTERMANの報告<sup>37)</sup>からも推察される。

以上のように、システインあるいは無機還元剤の足増強効果がSS交換反応の促進に由来すると推測されるので、一般にかまぼこの足形成時にもSS交換反応が関与している可能性が考えられる。

### 第3章 コイアクトミオシンのゲル形成能

かまぼこ製造時に食塩を添加することの主な目的は魚肉中のアクトミオシ  
ンを溶解させるためであるといわれており<sup>38)</sup>、ミオシン区タンパク質あるいは  
アクトミオシンが魚肉のゲル形成の主役であると考えられている<sup>4, 39, 40)</sup>。こ  
の考え方は、魚肉の水さらしによって水溶性タンパク質が除去されることに  
よるかまぼこの足が強くなること<sup>41, 42)</sup>、あるいは冷凍魚<sup>48)</sup>や冷凍すり身<sup>44, 45)</sup>  
の貯蔵中におけるアクトミオシンの溶出性の低下とそれら原料のゲル形成能  
の低下とが相関することなどによっても支持されている。しかし、直接アク  
トミオシンあるいはミオシン区タンパク質自身のゲル形成能を検討した研究  
は極めて少ない。SAMEJIMA ら<sup>18)</sup>はウサギ筋肉のミオシン、アクチンおよびア  
クトミオシンのゲル形成能について報告している。また岩田ら<sup>46)</sup>はミオシン  
でかまぼこ様のゲルが形成されたことを報告している。

本報では魚肉のゲル形成機作を解明するためのモデル系を確立するため、  
コイアクトミオシンのゲル形成に及ぼす各種要因について検討し、あわせ既  
知の魚肉のゲル形成に及ぼす各種要因の影響と本実験の結果とを比較考察し  
た。

#### 実験材料および方法

アクトミオシンの調製 Fig.11 に示したように、コイ (*Cyprinus*  
*carpio*) の筋肉より WEBER-EDSALL 溶液 (0.6M KCl, 0.01M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>,  
0.04M NaHCO<sub>3</sub>) でアクトミオシンを抽出し、沈殿・溶解をくり返して精製  
した。できるだけタンパク質濃度の高いアクトミオシンゾルを得るため、二  
回目の希釈後の沈殿をさらに 3,000  $\sigma$  で 5 分間遠心分離し、得られた沈殿に  
KCl 粉末を加えて所定の KCl 濃度に上げた。加えた KCl 粉末は少量の適当  
な濃度の KCl 溶液で湿らせてからゆっくり攪拌溶解し、アクトミオシンゾル  
に気泡が入るのをさけた。以上の操作はすべて 5℃ 以下で行った。

タンパク質の定量 ミクロケールダール法により求めた窒素量に 6.0 を乗



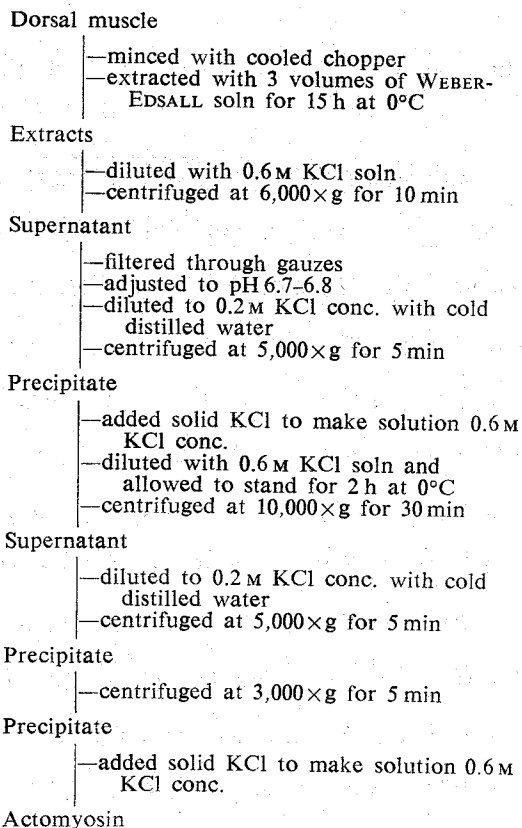


Fig. 11. Method of preparation of carp actomyosin.

じて、アクトミオシン量とした。

ゲルの剛性率の測定 SAUNDERS および WARD の方法<sup>47)</sup>に基づき、岸本<sup>48)</sup>が改良した装置を用いた ( Fig.12 および Fig.13 )。次式によって剛性率を求めた。

$$G = R^4 P / 8 r^2 L h$$

ただし、G は剛性率 ( dyn/cm<sup>2</sup> ), P は試料にかかった圧力 ( dyn/cm<sup>2</sup> ), R は試料管の半径 ( cm ), r は毛細管の半径 ( cm ), L は試料の長さ ( cm ), h は試料のひずみによって生じる指標物質のメニスカスの移動距離 ( cm ) である。用いた装置の R は 0.7 cm, r は 0.07cm であった。指標物質としてジエチルフタレイトを用いた。P はメニスカスの上昇による背圧を補正した値とした。測定はすべて 3 ± 1 °C で行った。

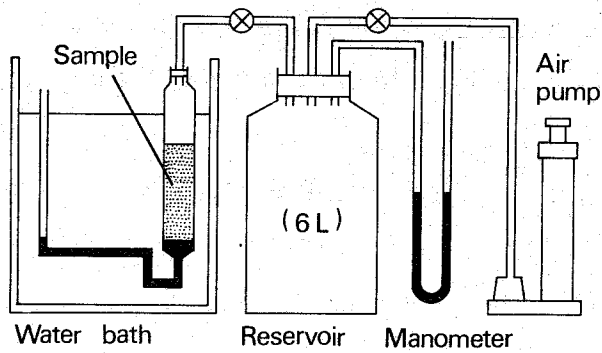


Fig. 12. Schematic diagram of the apparatus used for rigidity measurement of actomyosin gel.

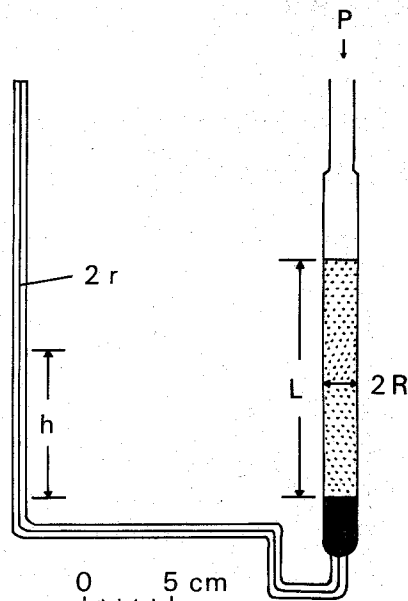


Fig. 13. Illustration of parameters required to calculate the rigidity modulus.

$2R$ : Inside diameter of sample tube (cm).

$2r$ : Inside diameter of capillary tube (cm).

$P$ : Applied pressure ( $\text{dyn/cm}^2$ ).

$L$ : Length of column sample (cm).

$h$ : Recovered displacement of index (cm).

アクトミオシンゲルの調製 ゲルの剛性率測定装置に約 10g のアクトミオシンゾルを流入し、装置ごと所定温度で所定時間加熱した後、 $3 \pm 1^\circ\text{C}$  で 3 時間冷却してアクトミオシンゲルを調製した。80°C においてアクトミオ

シンがゲル化する最低タンパク質濃度は、1.5～2.0%であることが肉眼的に観察されたので、以下の実験はタンパク質濃度2.0%以上で行った。

#### 実験結果および考察

**KCl 濃度の影響** 80℃で60分間加熱したときのアクトミオシンのゲル形成に及ぼすKCl濃度の影響を調べた。0.2, 0.4, 0.6, および1.0Mの各KCl濃度で測定した結果、Fig.14に示したように、ゲルの剛性率は0.6Mにおいて最大であった。0.2Mのときのゲルは大変弱く、水がわずかに遊離していた。0.4M以上でしっかりしたゲルが形成された。KCl濃度に対するアクトミオシンゲルの剛性率の挙動は、かまぼこの足の強さの食塩濃度に対する挙動<sup>38)</sup>とよく対応した。

**pHの影響** 80℃で60分間加熱したときのアクトミオシン(0.6MKCl溶液)のゲル形成に及ぼすpHの影響を調べた。pH 5.3, 6.3, 7.3, および8.3

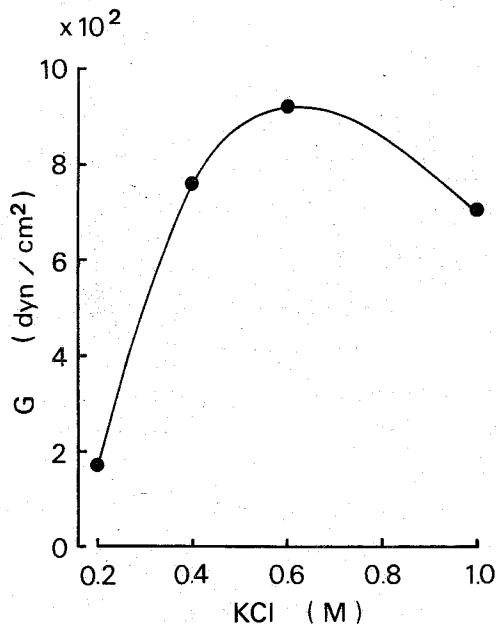


Fig. 14. Effect of KCl concentration on gel formation of carp actomyosin at 80°C. Actomyosin soln used was of 3.35% protein conc. and pH 6.3 (no buffer), and heated at 80°C for 60 min.

においてアクトミオシゲルを調製したとき、Fig.15 に示したように、ゲ

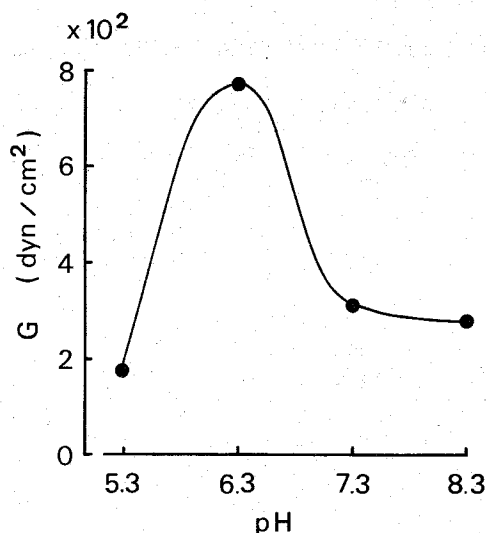


Fig. 15. Effect of pH on gel formation of carp actomyosin at 80°C. Actomyosin (3.31%) was heated at 80°C for 60 min in 0.6 M KCl and 50 mM phosphate buffer (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>).

ルの剛性率は pH 6.3 のとき最大であった。pH 5.3 では水の分離が見られた。このことは、かまぼこの足が pH 6.5 ~ 7.0 で最も強く pH 6.0 以下では水の分離が認められ、弾力も弱いという志水の結果<sup>49)</sup> とほぼ一致する。一方、すり身の pH を 7.0 付近まで高くするほど、かまぼこのゼリー強度が強くなることの原因が、筋原線維タンパク質の溶出性が pH の上昇にともなって増大すること<sup>50)</sup> により説明されている<sup>51, 52)</sup>。しかし、アルカリ側でタンパク質の溶出性は低下しない<sup>58)</sup> にもかかわらず、アルカリ側での足の低下<sup>50)</sup> が観察されていることから、かまぼこの足形成に及ぼす pH の影響は単にタンパク質の溶出性だけでは説明できないように考えられる。むしろアクトミオシンのゲル形成能に及ぼす pH の影響とよく対応しているので、アクトミオシン自身のゲル形成能から説明するほうが適当と思われる。

りん酸緩衝液の影響 pH 調節に 50 mM りん酸緩衝液 (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)、pH 6.3 を用いた場合のアクトミオシゲルの剛性率を、塩酸溶液で pH 6.3 に

調節した場合およびトリス・マレイトで pH 6.3 に調節した場合のゲルの剛性率と比較した結果、Table 2 に示したように、それらの間にほとんど差はなく、用いた 50 mM リン酸塩はゲル形成に影響を与えないことがわかった。

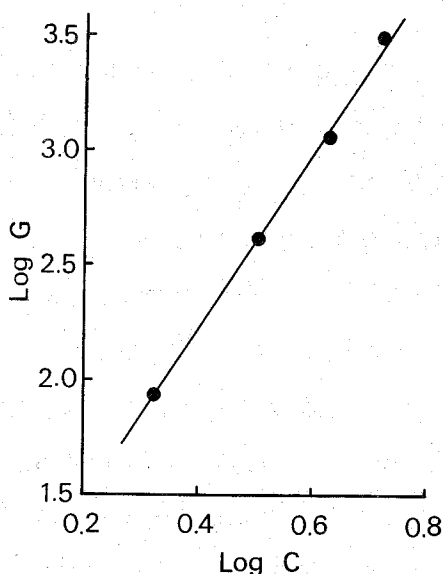
**Table 2.** Effects of buffers on the gel formation of carp actomyosin at 80°C. Actomyosin (4.44%) was heated at 80°C for 60 min in 0.6 M KCl (pH 6.3).

Buffer	Rigidity modulus ( $\times 10^8$ dyn/cm <sup>2</sup> )
None* <sup>1</sup>	2.04
50 mM Phosphate* <sup>2</sup> , pH 6.3	2.31
50 mM Tris-maleate, pH 6.3	2.09

\*<sup>1</sup> Adjusted to pH 6.3 with HCl.

\*<sup>2</sup>  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ – $\text{K}_2\text{HPO}_4$ .

アクトミオシン濃度と剛性率の関係 2～5%濃度のアクトミオシンの 0.6M KCl 溶液 (pH 6.3) を 80 °C で 60 分間加熱してゲルを調製し、その剛性率とアクトミオシン濃度の関係を求めた。両者の両対数プロットは Fig.16 に示



**Fig. 16.** Double logarithmic plot for actomyosin concentration vs. rigidity modulus of actomyosin gel formed by heating at 80°C. Actomyosin (2~5%) was heated at 80°C for 60 min in 0.6M KCl and 50 mM phosphate buffer ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ – $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ), pH 6.3.

したように、直線関係を示した。このことはアクトミオシン濃度が高いほど、ゲルの剛性率が高いことを示しており、魚肉中の可溶性ミオシン区含量とかまぼこの引張り強度との両対数プロットが直線関係を示すという志水<sup>48)</sup>の結果とよく対応する。三宅ら<sup>54)</sup>および志水ら<sup>55,56)</sup>の報告から魚肉中のミオシン区タンパク質の含量は平均10%程度と考えられる。10%濃度のアクトミオシンゲルの剛性率をFig.16の外挿により求めた結果、約 $8 \times 10^4$  dyn/cm<sup>2</sup>の値が得られた。一方、市販のかまぼこの動的剛性率は $10^5$  dyn/cm<sup>2</sup>のオーダーであったという報告<sup>57)</sup>がある。これら両者の値が近似していることから、アクトミオシンはかまぼこの足形成に大きく寄与しているものと推察した。

**加熱時間の影響** 80℃で加熱したときのアクトミオシンのゲル形成に及ぼす加熱時間の影響を調べた結果、Fig.17に示したように、120分間の加熱でアクトミオシンゲルの剛性率は最大になったが、60～120分間の範囲では大差はなかった。

**加熱温度の影響** 次に、アクトミオシンの0.6 M KCl 溶液 (pH 6.3) のゲル形成に及ぼす加熱温度の影響を調べた。5, 20, 40, 60, および 80℃ の各温度でアクトミオシンを60分間加熱したところ、40℃以上ではしっかりした

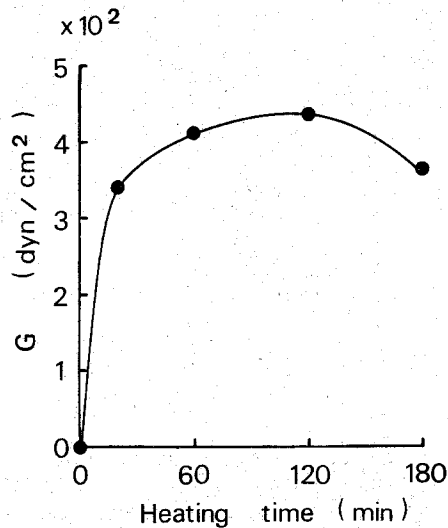


Fig. 17. Effect of heating time on gel formation of carp actomyosin at 80°C. Actomyosin (3.01%) was heated at 80°C in 0.6 M KCl and 50 mM phosphate buffer (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), pH 6.3.

ゲルが得られたが、5および20℃ではほとんどゲル化しなかった (Fig.18)。60℃加熱ゲルの剛性率が最も強く、次に40℃加熱ゲル、80℃加熱ゲルの順であった。小国ら<sup>58)</sup>はコイアクトミオシンを種々の温度で5分間加熱し、ゲルの硬さをレオロメーターで測定したところ、50℃で最大になり85℃でも同じであったと報告しており、高温域でのアクトミオシンのゲル形成能の挙動が著者の結果と異なっている。この相違が何によるものかは不明である。40℃でのアクトミオシンのゲル形成は魚肉塩すり身の坐りに対応するものと考えられる。アクトミオシンのゲル形成能が60℃で最大を示したことは、魚肉のゲル形成が60℃から80℃では、その弾力に差がないという結果<sup>59)</sup>あるいは“火もどり”をおこす魚種の場合のように60℃で極端に弱いゲルを作るという報告<sup>60)</sup>とは異なっている。

二段加熱の影響 各種温度で60分間加熱したアクトミオシンをさらに80

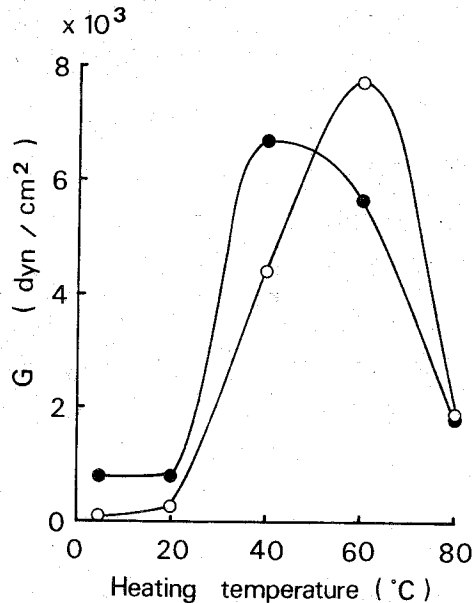


Fig. 18. Effect of heating temperature on gel formation of carp actomyosin. Actomyosin soln used was of 4.50% protein conc., 0.6 M KCl, 50mM phosphate buffer ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ – $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ), pH 6.3.  
 —○—: Heated at various temperatures for 60 min.  
 —●—: Heated further at 80°C for 60 min after heated at each temperature.

℃で20分間加熱したのち、ゲルの剛性率を測定した(Fig.18)。40℃加熱ゲルは80℃での再加熱によって、その剛性率が高くなった。このことは坐りを利用した足の増強法<sup>61)</sup>に対応すると考えられる。60℃加熱ゲルを80℃で再加熱すると、その剛性率は低下した。このことはマエソすり身を60℃で加熱後、90℃で20分間再加熱しても引張り強度は変らなかったという結果<sup>59)</sup>と対応しないが、スケトウタラの場合60℃で加熱後90℃での再加熱によりゲルの劣化が進んだという報告<sup>62)</sup>とは対応すると考えられる。

以上の結果から、80℃で加熱したときのアクトミオシンのゲル形成能は、KCl濃度0.6M、pH6.3、加熱時間60～120分間の条件下で最大であり、タンパク質濃度(2%以上)が高いほど強固なゲルが形成されることがわかった。また、アクトミオシンのゲル形成能に及ぼすこれら各種要因の影響は、既知の魚肉のゲル形成能に及ぼす各種要因の影響と多くの点で対応することが認められた。さらに、かまぼこの足の強さはアクトミオシンの加熱ゲルの強さに大きく依存することが推測された。従って、アクトミオシンのゲル形成機作を研究することより、魚肉のゲル形成機作に関する示唆が得られるものと考えた。



## 第4章 コイアクトミオシンの加熱によるSH基の挙動

第1章において、かまぼこの足形成に魚肉タンパク質のSH基が関与している可能性のあることを述べた。そこで本章では、アクトミオシンについて、その加熱によるゲル形成にSH基が関与するかどうかを解明するため、コイ筋肉から抽出したアクトミオシンを各種温度で加熱したときのSH基の挙動を調べた。

### 実験材料および方法

**アクトミオシンの調製** コイ筋肉より第3章に記載した方法で、アクトミオシンを抽出・精製した。

**加熱アクトミオシン溶液の8M尿素溶液による可溶化** 各種温度で加熱したアクトミオシン溶液0.5gを0.6M KCl, 50mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4 - \text{K}_2\text{HPO}_4$ , 6mM EDTAを含む8M尿素溶液(pH 7.0)と共にホモジナイズして、全容を25mlとした(8M尿素ホモジネート)。この8M尿素ホモジネートを30,000×gで30分間遠心分離して得られる上澄を8M尿素溶液可溶区分とした。

**全SH基の定量** BUTTKUS<sup>63)</sup>の方法に準じてSH基を定量した。すなわち、8M尿素ホモジネートあるいは可溶区分6mlに0.01M 5,5'-dithiobis 2-nitrobenzoic acid (DTNB)溶液0.04mlを加え、40℃で15分間温置後、412nmにおける吸光度を測定し、チオフェノレートアニオンの分子吸光係数を $1.36 \times 10^4$ として全SH基量を求めた。

**Reactive SH基の定量** DTNBを用いるSH基定量法は感受性を異にするSH基、すなわちタンパク質分子の表面に露出しているSH基(reactive SH基とする)と分子内部のSH基とを分別定量するのに適している。<sup>64)</sup>尿素処理しないタンパク質検液について測定した値をreactive SH基量とした。分子内部のSH基量はタンパク質を尿素処理して得られた全SH基量とreactive SH基量との差として求めた。

Reactive SH基の定量法は次のとおりである。1%アクトミオシン溶液

を種々の温度で一定時間加熱したのち、その 0.4 ml をただちに 5 °C の 50mm  $\text{KH}_2\text{PO}_4 - \text{K}_2\text{HPO}_4$  および 6mm EDTA を含む 0.6M KCl 溶液 (pH 7.0) に懸濁して、25ml 容とした。この溶液 6ml に 0.6M KCl 溶液で溶解した 0.01M DTNB 溶液 0.04ml を加え、5 °C で 1 時間放置後、412 nm における吸光度を測定し、SH 基量を求めた。

タンパク質の定量 8M 尿素ホモジネートおよび可溶区分のタンパク質濃度は、これらの検液に等容量の 2N KOH 溶液を加えたのち 280 nm における吸光度を測定し、あらかじめ作成したアクトミオシン濃度と吸光度との関係式を用いて、算出した。

#### 実験結果および考察

アクトミオシン濃度と加熱後の全 SH 基量との関係 第 3 章でアクトミオシンのゲル形成能はその溶液のタンパク質濃度に依存することを明らかにした。そこで、タンパク質濃度 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, および 4.0 % のアクトミオシン溶液を調製し、それぞれを 5, 20, 40, 60, および 80 °C の各温度で 100 分間加熱したのち、それらの 8M 尿素ホモジネートについて全 SH 基量を求めた。その結果、どの温度においてもアクトミオシン溶液 1g 中の全 SH 基量は溶液のアクトミオシン濃度に比例した (Fig. 19)。このことは、0.5 - 4.0 % の範囲のどのアクトミオシン濃度の溶液を用いても、タンパク質  $10^5$ g 当りの全 SH 基量は各温度で一定であることを示している。すなわち、加熱後のアクトミオシンの全 SH 基量は加熱時のアクトミオシン濃度に依存しないことがわかった。

また 8M 尿素溶液可溶区分の全 SH 基量およびタンパク質濃度はともに加熱時のアクトミオシン濃度と比例関係にあった。このことは 0.5 - 4.0 % の範囲のどのタンパク質濃度のアクトミオシン溶液を用いても、得られるアクトミオシンの 8M 尿素溶液による可溶化率 (あるいは不溶区分の生成率) および可溶区分中のタンパク質  $10^5$ g 当りの全 SH 基量は各温度で一定であることを示している。

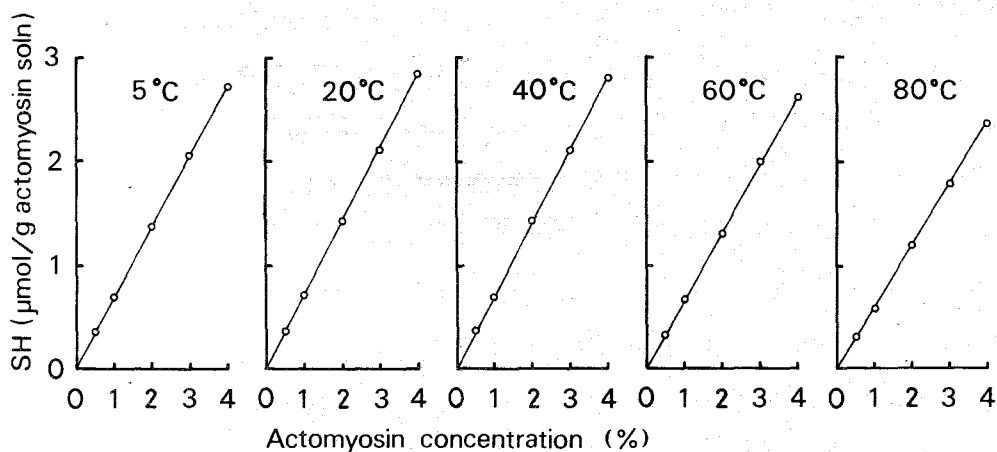


Fig. 19. Relationship between the protein concentration of carp actomyosin solution before heated and the amount of total sulfhydryl groups in the solution after heated at various temperatures for 100 min. Actomyosin (0.5–4.0%) was heated in 0.6M KCl and 50mM phosphate buffer, pH 6.3. The total sulfhydryl groups of the heated actomyosin were determined by using Ellman's method in the presence of 8M urea (pH 7.0).

そこで、これらの結果から、加熱アクトミオシンの8M尿素ホモジネートおよび可溶区分中のタンパク質 $10^5$ g当りの全SH基量、および可溶化率を求めた。ただし、全SH基量は検液のタンパク質濃度と検液中の全SH基量との直線関係から、また可溶化率はホモジネートのタンパク質濃度と可溶区分のタンパク質濃度との直線関係から、それぞれ最小自乗法により求めた傾きをもとにして計算した(Fig.20)。どの温度で加熱した試料についても、ホモジネートと可溶区分とのタンパク質それぞれ $10^5$ g当りの全SH基量にはほとんど差はなかった。5–40°Cまでの温度では両者の全SH基量はともに変化なく、60および80°Cと温度が高くなるほど、両者の全SH基量は同じように減少した。

加熱アクトミオシン8M尿素ホモジネート中の不溶区分のタンパク質は量的にわずかであったので、その全SH基量を正確に測定することはできなかったが、Fig.20に示したように各試料の8M尿素ホモジネートのタンパク

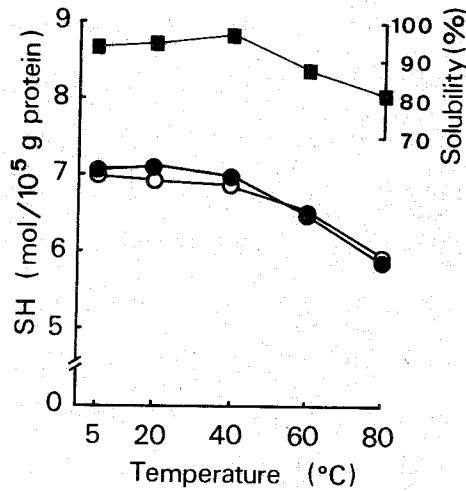


Fig. 20. Content of the total sulfhydryl groups per  $10^5$  g protein in the 8 M urea homogenate of the heated actomyosin and in the supernatant fraction, and the solubility of the heated actomyosin in 8 M urea solution (pH 7.0). The heated actomyosin samples were identical with those described in Fig. 19. The supernatant fraction was obtained by the centrifugation of the 8 M urea homogenate at  $30,000\times g$  for 30 min, and the solubility was expressed as the percentage of the protein concentration of the supernatant fraction to that of the homogenate. —●—, 8 M urea homogenate; —○—, supernatant fraction of the homogenate; —■—, solubility.

質  $10^5g$  当りの全 SH 基量が可溶区分のそれと非常に近似していたことから、不溶区分のタンパク質  $10^5g$  当りの全 SH 基量は可溶区分のタンパク質  $10^5g$  当りのそれと近似していることが示唆された。このように、不溶区分タンパク質の全 SH 基の加熱温度に対する挙動と可溶区分タンパク質のそれとが類似していると考えられることから、以後の実験において各種温度で加熱したときのアクトミオシンの全 SH 基量の変化を知るには、8 M 尿素ホモジネートについてその全 SH 基を測定すれば十分であることが確かめられた。

加熱による reactive SH 基の挙動 アクトミオシンを各種温度で加熱したときの reactive SH 基量の時間的変化を調べた (Fig. 21)。5 °C においては、アクトミオシンの reactive SH 基量は 120 分までの間には何ら変化せず、その値は  $2.65 \text{ mol}/10^5g \text{ protein}$  であった。これは全 SH 基量

の約40%に相当し、未変性アクトミオシンの reactive SH 基量と考えてよい。20℃に温置したとき、reactive SH基量は徐々に増加し、120分後には  $3.05 \text{ mol}/10^5 \text{ g protein}$  になった。40℃で加熱したとき、10分から30分の間に reactive SH基量は急激に増加し、120分後には  $4.40 \text{ mol}/10^5 \text{ g protein}$  になった。この値は未変性アクトミオシンの reactive SH基量の約1.5倍であり、また未変性アクトミオシンの全SH基量の約60%に相当する。60℃で加熱したとき、reactive SH基量は最初の10分間で急激に増加し、以後の増加はわずかで120分後には  $5.75 \text{ mol}/10^5 \text{ g protein}$  になった。この値は未変性アクトミオシンの reactive SH 基量の約2倍で、未変性アクトミオシンの全SH基量の約80%に相当する。80℃で加熱したとき、reactive SH基量は60℃加熱の場合と同様最初の10分間で急激に増加し、その値は  $4.80 \text{ mol}/10^5 \text{ g protein}$  となったが、

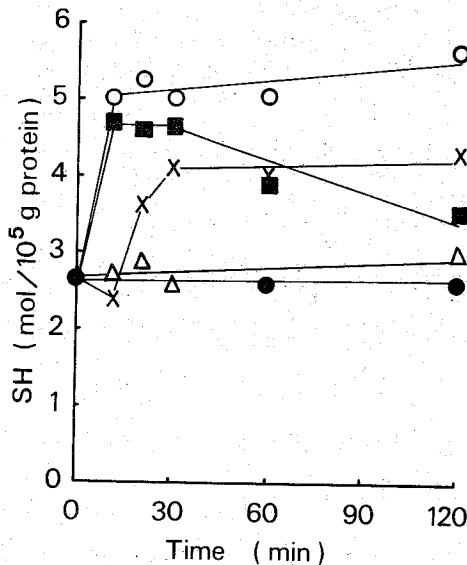


Fig. 21. Changes in the content of reactive sulfhydryl groups of carp actomyosin when heated at various temperatures. Actomyosin soln used was of 1.0% protein conc., 0.6M KCl, and 50 mM phosphate buffer (pH 6.3). The reactive sulfhydryl groups were determined by using Ellman's method in the absence of urea.  
 —●—, 5°C; —△—, 20°C; —×—, 40°C; —○—, 60°C; —■—, 80°C.

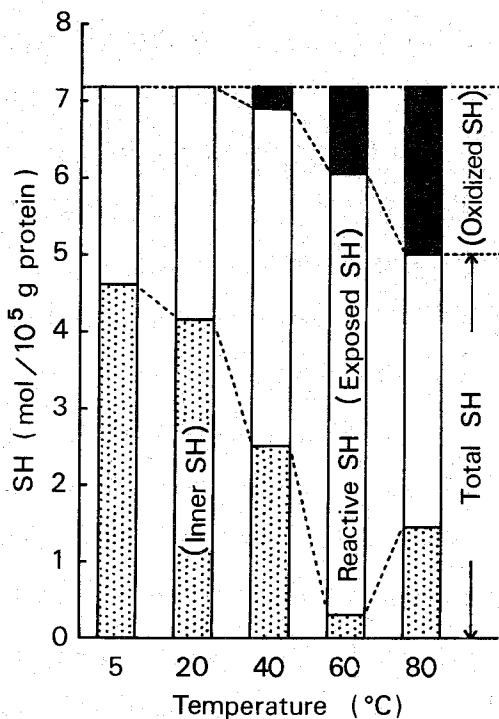


Fig. 22. Content of the total sulfhydryl groups and the reactive sulfhydryl groups of carp actomyosin heated at various temperatures for 120 min. The heated actomyosin samples were identical with those described in Fig. 21.

30分後から減少しはじめ、120分後には  $3.57 \text{ mol}/10^5 \text{ g protein}$  になった。すなわち未変性アクトミオシンの reactive SH 基量の約 1.8 倍になったのち、約 1.3 倍にまで減少した。

以上のように、アクトミオシンを  $40^\circ\text{C}$  以上で加熱すると、尿素の存在しない条件下で測定される reactive SH 基量が大きく増加したことから、加熱によりタンパク質分子のコンホメーション変化が起り、分子内部に隠れていた SH 基が露出してくるものと考えられる。

加熱後の全 SH 基量と reactive SH 基量との関係 各温度で 120 分間加熱したアクトミオシンの全 SH 基量と reactive SH 基量とを Fig. 22 に示した。加熱により酸化された SH 基量は、未変性アクトミオシンの全 SH 基量と加熱アクトミオシンの全 SH 基量との差から算出した。

$5^\circ\text{C}$  に置いた試料では、アクトミオシンの全 SH 基量の約 40% が露出し、

残りの約60%が内部に隠れていた。20℃に温置した場合にもSH基の酸化はなく、SH基の新たな露出もごくわずかであった。40℃で加熱したとき、未変性アクトミオシンの全SH基量の約4%が酸化されたにすぎなかった。露出しているSH基量は未変性アクトミオシンの全SH基量の約60%になり、露出されない分子内部のSH基量は約36%に減少した。60℃で加熱したとき、SH基の酸化量は40℃で加熱したときよりさらに多くなり、未変性アクトミオシンの全SH基量の約15%に相当した。また、露出しているSH基量は未変性アクトミオシンの全SH基量の約80%で、分子内部に隠れているSH基量は約5%であった。60℃で加熱した場合には多量のSH基が露出状態にあることがわかる。80℃で加熱したときは、60℃で加熱したときよりもさらにSH基の酸化量が多くなり、未変性アクトミオシンの全SH基量の約30%が酸化された。露出しているSH基量は未変性アクトミオシンの全SH基量の約50%であった。また、内部に隠れているSH基量は約20%となり、60℃加熱の場合よりも多くなった。

以上の結果より次のことが推論される。

- (1) 20℃までの温度では120分間温置しても、SH基の露出を伴うタンパク質のコンホメーションの変化およびSH基の酸化は起らない。
- (2) 40℃加熱では、SH基の酸化はごくわずかであるが、SH基の露出を伴うタンパク質のコンホメーション変化はかなり大きい。
- (3) 60℃加熱におけるSH基の露出を伴うタンパク質のコンホメーション変化とSH基の酸化は40℃の場合よりもさらに大きい。SH基が露出した状態のタンパク質のコンホメーションは比較的安定である。
- (4) 80℃加熱では、その初期に多量のSH基の露出が起るが、SH基の酸化が進行し、SH基が再び分子内部に隠れるようなコンホメーション変化が起る。

第3章において、アクトミオシンは40℃以上で強いゲルを形成し、そのゲル形成能は60℃で最大であることを明らかにした。アクトミオシンのゲル形成能とSH基の露出量との加熱温度に対する挙動はよく対応している。

このことから、加熱により露出されるSH基がゲル形成に関与することが推察される。すなわち、タンパク質分子が多くの reactive SH基を持つことは、SH基の酸化あるいはSH-SS 交換反応によるタンパク質分子間SS結合の形成、あるいはSS結合以外のタンパク質分子間の結合の増大をもたらすものと推察される。



## 第5章 コイアクトミオシンの加熱ゲル形成に及ぼすSH試薬の影響

第4章において、コイ筋肉から抽出したアクトミオシンを加熱した場合のSH基の挙動から、アクトミオシンのゲル形成にSH基が関与するものと考えた。本章では、さらにこの推論を確かめるために、コイアクトミオシンの加熱ゲル形成に及ぼすN-エチルマレイミド(NEM)およびp-クロロマーキュリアニソ酸(PCMB)の影響を調べた。

### 実験材料および方法

**アクトミオシンの調製** 第3章に記載した方法で、コイ筋肉からアクトミオシンを抽出・精製した。

**アクトミオシン加熱ゲルの調製** コイアクトミオシンの0.6M KCl溶液(pH 6.3)を40および80℃で60分間加熱後、5℃で1夜冷却することにより、ゲルを調製した。

**ゲルの剛性率の測定** 第3章に記載した方法で、ゲルの剛性率を測定した。

**ゲルの可溶化および溶解度の測定** ゲル0.5gを0.6M KCl, 50mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 6mM EDTAを含む8M尿素溶液(pH 7.0)と共にテフロン製ホモジナイザーでホモジナイズしたのち、30ml容とした。このホモジネートを30,000×g, 30分間遠心分離して得られる上澄をゲルの可溶区分とした。この可溶区分一定容に等容の2N KOHを加え、40℃, 15分間温置後測定した280nmにおける吸光度を、未加熱アクトミオシンを同様に処理した溶液の吸光度に対する百分率として表わしたものをゲルの溶解度とした。NEMを添加したゲルの8M尿素ホモジネートに2N KOHを加えて測定した280nmにおける吸光度はNEM無添加ゲルのそれとほとんど等しかったので、NEMの添加は溶解度の測定値に影響しないことが確かめられた。

**SH基の定量** 第4章と同様、BUTTKUS<sup>63)</sup>の方法に準じて、タンパク質の全SH基量を8M尿素的存在下で定量した。

### 実験結果および考察

40 °Cにおけるゲル形成に及ぼすSH試薬の影響 魚肉すり身の坐りに対応させるため、40 °Cにおけるコイアクトミオシンのゲル形成に及ぼすSH試薬の影響を調べた。

PCMBをアクトミオシン溶液中のタンパク質10<sup>5</sup>g当り7.0mol添加すると、Table 3に示したように、40 °C加熱ゲルの剛性率はPCMB無添加ゲルの剛性率に比べ低下した。すなわち、PCMB無添加ゲルの剛性率を100とすると、PCMB添加ゲルのそれは69であった。また、NEMをタンパク質10<sup>5</sup>g当り6.4mol添加すると、Table 4に示したように、そのゲルの剛性率はNEM無添加ゲルの剛性率より約50%低下した。このようにPCMBまたはNEMの添加によってアクトミオシンのゲル形成能は低下することがわかった。

Table 3. Effect of *p*-chloromercuribenzoate (PCMB) on the rigidity modulus of the heat-induced carp actomyosin gel. Actomyosin (4.29%) was heated at 40 and 80°C with or without PCMB in 0.6 M KCl and 50 mM phosphate buffer (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), pH 6.3.

Temperature (°C)	PCMB added (mol/10 <sup>5</sup> g protein)	Rigidity modulus (×10 <sup>8</sup> dyn/cm <sup>2</sup> )
40	0	5.45
	7.0	3.75
80	0	2.70
	7.0	0.97

Table 4. Effect of N-ethylmaleimide (NEM) on the rigidity modulus, sulfhydryl content and solubility in 8 M urea solution of the heat-induced carp actomyosin gel. Actomyosin was heated with or without NEM under the same conditions as described in Table 3.

Temperature (°C)	Protein conc. of actomyosin soln used (%)	NEM added (mol/10 <sup>5</sup> g protein)	Rigidity modulus (×10 <sup>8</sup> dyn/cm <sup>2</sup> )	Sulfhydryl content (mol/10 <sup>5</sup> g protein)	Solubility (%)
40	3.90	0	3.30	5.79	71.9
		3.2	2.28	3.92	76.7
		6.4	1.64	2.08	82.1
80	4.29	0	2.70	5.91	53.8
		5.8	2.17	1.75	66.6
		11.6	1.76	0.08	70.9

このようなゲル形成能の低下は、SH 試薬によってアクトミオシンの SH 基が修飾されたためと考えられるので、NEM 添加ゲルの SH 基量を測定した (Table 4)。まず、NEM を添加しない場合の未加熱アクトミオシンの全 SH 基量はタンパク質  $10^5$  ㉿当り 6.40 mol であったが、 $40^\circ\text{C}$  で 1 時間加熱したゲルの SH 基量は 5.79 mol であった。これより、最初の SH 基量の約 10% が加熱により減少したことがわかる。次に、NEM をアクトミオシン  $10^5$  ㉿当り 3.2 および 6.4 mol 加えた場合のゲルの SH 基量はそれぞれ 3.92 および 2.08 mol であった。これらの値は未加熱アクトミオシンの SH 基量に比べそれぞれ 39 および 67% の減少に相当する。このような SH 基量の減少はアクトミオシンの SH 基のかなりの部分が NEM により修飾されたことを示す。しかし、未加熱アクトミオシンの SH 基量と等モル量の NEM ( $64 \text{ mol} / 10^5$  ㉿) を添加したにもかかわらず、なお 33% の SH 基は修飾されなかったことになる。その理由として、NEM はタンパク質分子内部に隠れている SH 基とは反応しにくいこと<sup>64)</sup>、および  $40^\circ\text{C}$  加熱では SH 基が完全に露出しないこと (Fig. 21) が考えられる。また、0.2M 濃度の NEM が存在すると、NEM はタンパク質の SH 基以外にイミダゾール基や  $\alpha$ -アミノ基とも反応することが知られている<sup>65, 66)</sup> が、本実験で用いた NEM 濃度は 1.25 および 2.50 mM という低濃度であるので、SH 基以外の基との結合はほとんどないものと思われる。それ故、NEM 添加によりアクトミオシン溶液のタンパク質分子の表面の SH 基および加熱により露出した SH 基が選択的に修飾されたものと考えられる。

全 SH 基を定量する際には、ゲルに 8M 尿素溶液を加えるが、その時に NEM 添加ゲルは無添加ゲルよりも 8M 尿素溶液に速やかに溶けていく様子が肉眼的に観察された。そこで、次にゲルの溶解度を調べた。Table 4 に示したように、NEM 無添加ゲルの溶解度は 72% であったが、NEM をアクトミオシン  $10^5$  ㉿当り 6.4 mol 添加したゲルの溶解度は 82% に増加した。このことから、NEM を添加してアクトミオシンの SH 基を修飾することにより、その加熱ゲルの構造は NEM 無添加ゲルよりもほぐれやすい状態になると考

えられる。

これらの結果から、40℃加熱ゲルのNEM添加による剛性率の低下ならびに不溶化の抑制は、タンパク質分子表面のSH基および加熱により露出したSH基がNEMによって修飾され、SH基の関与する分子間結合が阻害されたことに起因すると考えられる。PCMB添加によるゲル剛性率の低下も同様の作用機作によるものと思われる。

80℃におけるゲル形成に及ぼすSH試薬の影響 魚肉すり身の足形成に対応させるため、80℃で加熱したコイアクトミオシンのゲル形成に及ぼすSH試薬の影響を調べた。

PCMBをアクトミオシン溶液中のタンパク質 $10^5$ g当り7.0mol添加すると、80℃加熱ゲルの剛性率はPCMB無添加ゲルの剛性率の約36%にまで低下した(Table 3)。またNEMをタンパク質 $10^5$ g当り5.8molおよび11.6mol加えると、ゲルの剛性率はNEM無添加ゲルの剛性率のそれぞれ約80および65%の値に低下した。

またこの実験に用いた未加熱アクトミオシンのSH基量はタンパク質 $10^5$ g当り7.70molであったが、80℃で1時間加熱することにより5.91molに減少した(Table 4)。これは加熱によってSH基が酸化されたためと考えられる。NEMをタンパク質 $10^5$ g当り5.8mol添加したゲルのSH基量は1.75molであった。添加したNEM量と残っているSH基量とを加えると7.55molとなり、未加熱時のアクトミオシンのSH基量とほぼ見合う。これより、NEM添加により、SH基の酸化はほとんど起っていないものと考えられる。NEMをタンパク質 $10^5$ g当り11.6mol加えると、SH基はわずか0.08molしか検出されなかった。このことは、80℃加熱では40℃加熱の場合とは異なり、短時間で大部分のSH基が露出する(Fig.21)ので、そのほとんどがNEMにより修飾されたことによるものと思われる。

NEM添加80℃加熱ゲルの8M尿素溶液の溶解度は、NEM無添加ゲルのそれよりも高くなったが、NEMをSH基量より過剰に加えたゲルにおいてもタンパク質の不溶化を完全に抑えることはできなかった。このことは、80℃

加熱によって形成されたゲルが本実験の可溶化条件下で 8M 尿素溶液によってほぐれにくい構造となっていることを示している。NEM 添加ゲルの方が NEM 無添加ゲルよりも速やかに 8M 尿素溶液に溶けていく様子が肉眼的にも観察されたのは 40℃ 加熱の場合と同様であった。すなわち SH 試薬添加によりゲルの形成が不十分で、ゲルはほぐれやすい構造になっているものと思われる。

以上の結果から、SH 試薬添加による 80℃ 加熱ゲルの剛性率の低下ならびに不溶化の抑制も、タンパク質の SH 基がこれらの試薬により修飾され、分子間 S S 結合が阻害されたことに起因すると考えられる。

以上のようにアクトミオシンの 40 および 80℃ におけるゲル形成能はいずれも SH 試薬の添加により低下した。このことより、これらの温度で加熱した場合のゲル形成においてアクトミオシンの SH 基は酸化あるいは交換反応によるタンパク質分子間の S S 結合の形成に関与することが考えられる。またこれらの結果は、魚肉すり身の坐りおよび足形成にアクトミオシンの SH 基が関与することを示唆する。

## 第6章 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

第5章において、SH試薬の添加によりコイアクトミオシンの加熱ゲル形成能が低下すること、およびSH試薬を添加したゲルは8M尿素溶液に溶けやすくなることを明らかにした。これらのことからアクトミオシンのゲル形成時に、SH基の関与したタンパク質分子間結合が形成されるものと推論した。

本章では、アクトミオシンの加熱ゲル化過程でタンパク質の高分子化が起こるかどうかが、およびアクトミオシンのSH基がその高分子化に関与するかどうかを明らかにすることを企てた。そのため、各種温度で加熱調製したアクトミオシゲルおよびSH試薬を添加して同様に調製したゲルを8M尿素溶液可溶区分と不溶区分とに分け、可溶区分についてはさらにCPG-10 2000 Å カラムを用いて分子ふるいクロマトグラフィーを行ない、不溶区分の生成量ならびに可溶区分のクロマトグラフィーパターンを比較検討した。

### 実験材料および方法

**アクトミオシンの調製** 第3章に記載した方法でコイ筋肉よりアクトミオシンを抽出・精製した。

**アクトミオシン加熱ゲルの調製** 第3章に記載した方法に従い、40, 60, および80℃で60分間加熱してゲルを調製した。

**アクトミオシゲルの8M尿素溶液可溶区分の調製** アクトミオシゲルに0.6M KCl, 50mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4 - \text{K}_2\text{HPO}_4$  および6mM EDTAを含む8M尿素溶液(pH 7.0)を等量加え、テフロン製ホモジナイザーでホモジナイズした。ホモジネートを8M尿素溶液に対して、5℃で一夜透析後、 $30,000 \times g$ で30分間遠心分離し、その上澄を可溶区分とした。

**タンパク質の定量** 第4章と同様、280nmにおける吸光度からタンパク

質量を求めた。

CPG-10 2000 Å クロマトグラフィー 加熱および未加熱アクトミオシンの8M尿素溶液可溶区分1mlを, CPG(Controlled-Pore Glass)-10 2000 Å (Electro-Nucleonics, Inc. 製, 120~200 メッシュ)を充填したカラム(カラムサイズ1.27×97.5cm)に添加し, 展開液として8M尿素溶液を用い, 流速45ml/hでクロマトグラフィーを行なった。タンパク質の溶出曲線は溶出液の280 nmにおける吸光度から求めた。カラムの排除容積は60ml, 全自由容積は110mlであった。

#### 実験結果および考察

未加熱アクトミオシンのCPG-10 2000 Å クロマトグラフィー 未加熱アクトミオシン(タンパク質濃度2.13%) 8M尿素溶液可溶区分についてCPG-10 2000 Å クロマトグラフィーを行なった(Fig. 23)。抽出直後の試料では,

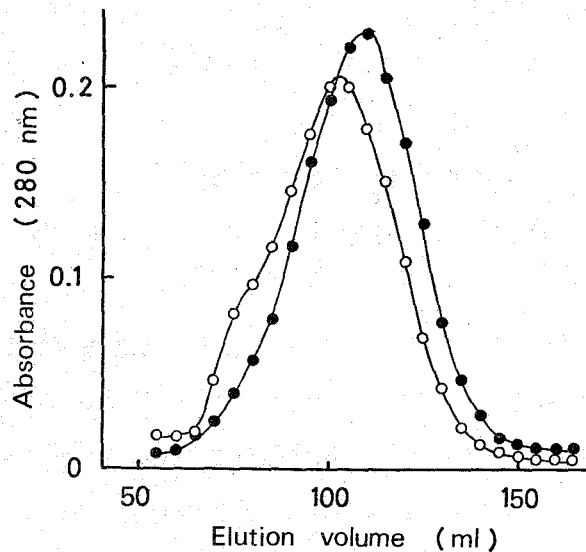


Fig. 23. Chromatography of 8 M urea soluble fraction of unheated actomyosin on CPG-10 2000 Å column. Actomyosin soln was of 2.13% protein concentration. The 8 M urea soluble fractions of fresh actomyosin (—●—) and of actomyosin stored at 0°C for 4 days (—○—) were chromatographed on CPG-10 2000 Å column (1.27 × 97.5 cm). The elution was performed with 8 M urea solution (pH 7.0) at the flow rate of 45 ml/h.

溶出液量110 mlの位置にピークをもつ溶出曲線が得られた。一方、抽出後0℃で4日間貯蔵したアクトミオシンからの試料では、抽出直後の試料のピーク位置よりわずかに高分子側にピークが移動すること、およびそれよりさらに高分子側に肩が認められた。CPG-10 2000 Å の分画範囲は球状タンパク質では分子量100万～10億、ポリスチレンでは10万～1000万といわれているので、ピーク位置のわずかな移動でも、分子量はかなり変化していると考えられる。アクトミオシンは0℃においてすら不安定で高分子化することがわかったので、以後の実験には抽出直後のものを用いることにした。

SH 試薬無添加ゲルのCPG-10 2000 Å クロマトグラフィー タンパク質濃度1.86%のアクトミオシン溶液を40, 60, および80℃の各温度でゲル化させ、それぞれのゲルの8M尿素溶液可溶区分についてCPG-10 2000 Å クロマトグラフィーを行なった。それらの結果をFig.24～26に示

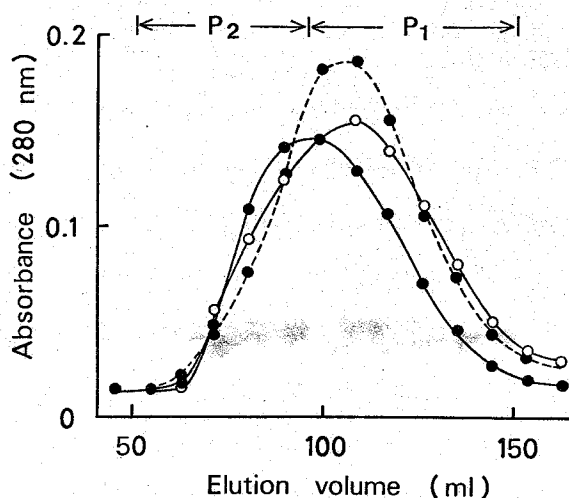


Fig. 24. Chromatography of 8 M urea soluble fraction of actomyosin gel formed by heating at 40°C with or without N-ethylmaleimide (NEM) on CPG-10 2000 Å column.

Actomyosin soln (1.86%) was heated at 40°C for 60 min with or without NEM. The gels were solubilized by 8 M urea solution (pH 7.0). The soluble fractions were chromatographed on CPG-10 2000 Å column. The conditions of chromatography were the same as described in Fig. 23. --●--, 8 M urea soluble fraction of unheated actomyosin; —●—, 8 M urea soluble fraction of actomyosin gel formed without NEM; —○—, 8 M urea soluble fraction of actomyosin gel formed with 5 μmol of NEM/g of the soln.



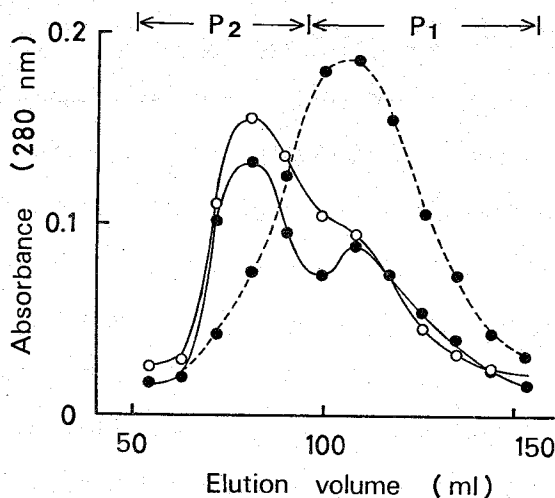


Fig. 25. Chromatography of 8 M urea soluble fraction of actomyosin gel formed by heating at 60°C with or without NEM on CPG-10 2000 Å column.

The experimental conditions except for heating temperature were the same as described in Fig. 24. --●--, 8 M urea soluble fraction of unheated actomyosin; —●—, 8 M urea soluble fraction of actomyosin gel formed without NEM; —○—, 8 M urea soluble fraction of actomyosin gel formed with NEM.

した。40°C 加熱ゲルの可溶区分は単一のピークを示したが、そのピークは未加熱アクトミオシンの可溶区分のそれより高分子側へ移動した。60および80°C加熱ゲルの可溶区分では、さらに高分子側に移動したピークと低分子側のピークとの2個のピークに分かれ、高分子側のピークは低分子側のピークより高かった。クロマトグラフィーパターンでは高分子化の量的な変化を把握できないので、これらの結果をもとにして、各試料の8M尿素溶液可溶区分を、早く溶出される高分子側の画分（P<sub>2</sub>：溶出液量50～95ml）とそれより低分子側に溶出される画分（P<sub>1</sub>：溶出液量95～150ml）に分け、それぞれの画分のタンパク質量を求めた。各試料について、P<sub>1</sub>、P<sub>2</sub>画分および8M尿素溶液不溶区分の比率をそれぞれのタンパク質量から計算し、Fig. 27に示した。加熱温度の上昇にともないP<sub>1</sub>画分は明らかに減少し、P<sub>2</sub>画分は増加していた。40°C加熱ゲルの不溶区分は未加熱アクトミオシンのそれと大差はなかったが、60および80°C加熱ゲルの不溶区分は増加していた。

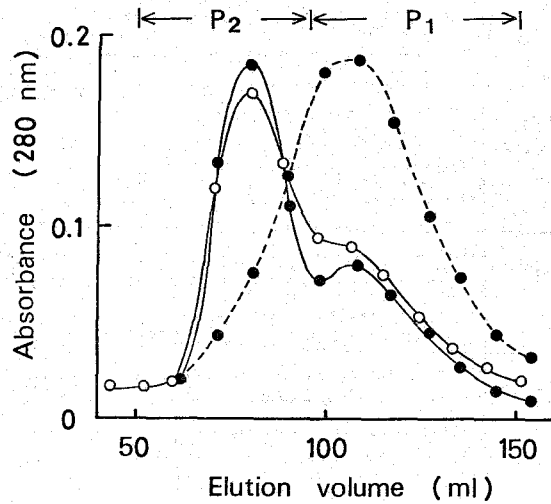


Fig. 26. Chromatography of 8 M urea soluble fraction of actomyosin gel formed by heating at 80°C with or without NEM on CPG-10 2000 Å column. The experimental conditions except for heating temperature were the same as described in Fig. 24. --●--; 8 M urea soluble fraction of unheated actomyosin; —●—, 8 M urea soluble fraction of actomyosin gel formed without NEM; —○—, 8 M urea soluble fraction of actomyosin gel formed with NEM.

これらの結果から、アクトミオシンの加熱ゲル化の過程で、8 M 尿素溶液 (pH 7.0) の中でもなお切断されない結合がタンパク質分子間に形成され、その結果としてタンパク質の高分子化が起るものと考えた。

SH 試薬添加ゲルの CPG-10 2000 Å クロマトグラフィー 先の実験と同じアクトミオシン溶液 (タンパク質濃度 1.86%) に、溶液 1 g 当たり 5 μmol の N-エチルマレイミド (NEM) を添加し、各種温度で加熱ゲル化させた。これらゲルの 8 M 尿素溶液可溶区分の CPG-10 2000 Å クロマトグラフィーの結果を Fig. 24 ~ 26 に示した。

NEM を添加した 40°C 加熱ゲルの可溶区分の溶出ピークは、NEM 無添加の場合よりも低分子側に移動した (Fig. 24)。NEM を添加した 60 および 80 °C 加熱ゲルの可溶区分では NEM 無添加ゲルの場合と同様、高分子側と低分子側との 2 個のピークが認められた (Figs. 25, 26)。しかし、これら

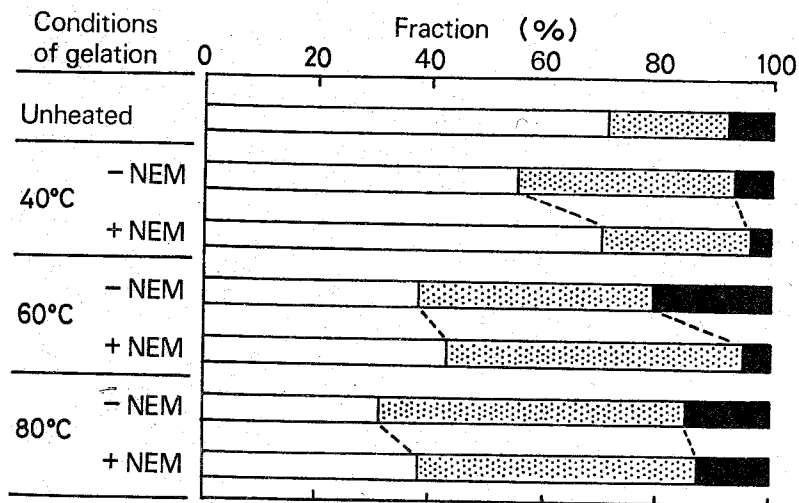


Fig. 27. Effect of the addition of NEM to actomyosin soln on the solubility of the gel in 8 M urea solution and on the protein content in  $P_1$  and  $P_2$  portions of 8 M urea soluble fraction. Actomyosin gel was fractionated into 8 M urea insoluble fraction (■) and soluble fraction. The soluble fraction was divided into lower ( $P_1$ , □) and higher ( $P_2$ , ▨) molecular-weight portions on the basis of the chromatogram as shown in Figs. 24-26.

2 個のピーク分離は NEM 無添加の場合ほど明瞭ではなかった。このことは、両ピーク成分の中間的な分子量の成分が存在することを示唆している。各試料の  $P_1$ 、 $P_2$  画分および不溶区分のタンパク質量の比率を求め、Fig. 27 に示した。NEM の添加はゲルの  $P_1$  画分の増加および不溶区分の減少をもたらした。すなわち、加熱にともなうタンパク質の高分子化および不溶化は NEM 添加によりある程度抑制された。

NEM 添加ゲルで観察された結果を確認するため、*p*-クロロマーキュリ安息香酸 (PCMB) を用いて同様の実験を行なった。タンパク質濃度 2.13% のアクチン溶液に同溶液 1g 当たり  $2.78 \mu\text{mol}$  の PCMB を添加したものおよび無添加のものをそれぞれ  $80^\circ\text{C}$  で加熱してゲル化させた。これらゲルの 8M 尿素溶液可溶区分の CPG-10 2000Å クロマトグラフィーの結果を Fig. 28 に、各ゲルの  $P_1$ 、 $P_2$  画分および不溶区分のタンパク質量の比率を Fig. 29 に示した。NEM を添加した  $60^\circ\text{C}$  加熱ゲルの場合と同様、PCMB 添加  $80^\circ\text{C}$  加熱ゲルでも、無添加ゲルに比べ、そ

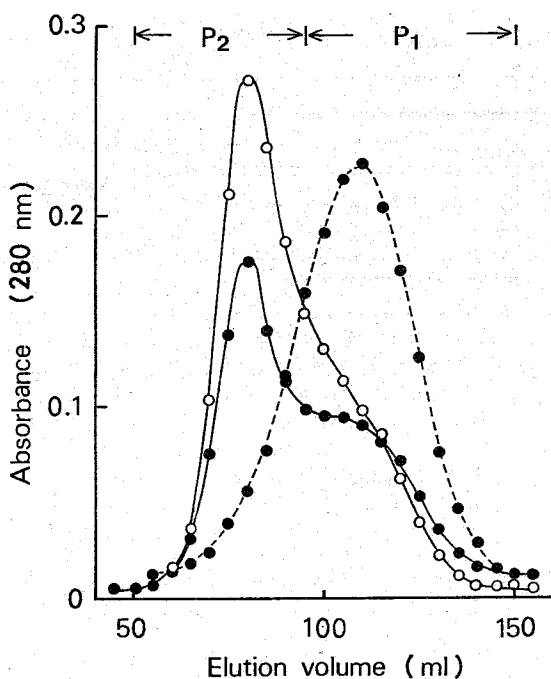


Fig. 28. Chromatography of 8 M urea soluble fraction of actomyosin gel formed by heating at 80°C with or without *p*-chloromercuribenzoate (PCMB) on CPG-10 2000 Å column.

Actomyosin soln (2.13%) was heated at 80°C with or without PCMB. The other experimental conditions were the same as described in Fig. 24. --●--, 8 M urea soluble fraction of unheated actomyosin; —●—, 8 M urea soluble fraction of actomyosin gel without PCMB; —○—, 8 M urea soluble fraction of actomyosin gel with 2.78 μmol of PCMB/g of the soln.

の P<sub>2</sub> 画分は増加し、不溶区分は減少していた。すなわち PCMB もまたゲルの不溶化を抑制することがわかった。NEM あるいは PCMB を添加したとき、不溶区分が減少し、P<sub>2</sub> 画分が増加するという事実は、不溶区分成分の分子量が P<sub>2</sub> 画分成分の分子量と同等かそれ以上であること、換言すれば不溶化の過程で高分子化がおこっていることを示唆している。

以上の結果から、アクトミオシンの加熱ゲル化の過程で、タンパク質の高分子化が起ること、およびその高分子化にタンパク質の SH 基が関与するこ

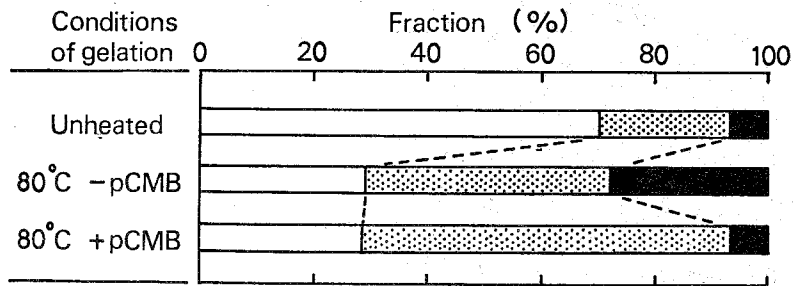


Fig. 29. Effect of the addition of PCMB to actomyosin soln on the solubility of actomyosin gel formed by heating at 80°C and on the protein content in P<sub>1</sub> and P<sub>2</sub> portions of 8M urea soluble fraction. Actomyosin gel was fractionated into 8 M urea insoluble fraction (■) and soluble fraction. The soluble fraction was divided into lower (P<sub>1</sub>, □) and higher (P<sub>2</sub>, ▨) molecular-weight portions on the basis of the chromatogram as shown in Fig. 28.

とが示唆された。アクトミオシンを加熱すると露出SH基量が増加すると共にSH基の酸化量も増加することを第4章で明らかにした。それ故、加熱ゲル化過程での高分子化はタンパク質分子間のSS結合の形成に基くものと推察される。

## 第7章 コイアクトミオシンの加熱ゲル形成における SS結合によるタンパク質の高分子化

第6章において、コイアクトミオシンの加熱ゲル化の過程で、8M尿素溶液中でも切断されない結合によってタンパク質の高分子化が起ること、およびその高分子化はSH試薬により阻害されることを明らかにした。それらの結果から、アクトミオシンのゲル形成時にタンパク質分子間にSS結合が形成されるものと推論した。しかし加熱変性したタンパク質が8M尿素溶液中でお完全にunfoldされているかどうかは不明であるので、ゲル化にともなう高分子化が非共有結合による分子間結合の結果であるかもしれない。

本章では、加熱アクトミオシンが8M尿素溶液中で十分unfoldされるかどうか、およびアクトミオシンの加熱ゲル化の過程で分子間にSS結合が形成されるかどうかを明らかにすることを企てた。

### 実験材料および方法

**アクトミオシンの調製** 第3章に記載した方法で、コイ筋肉よりアクトミオシンを抽出・精製した。

**アクトミオシン加熱ゲルの調製** 第3章に記載した方法に従い、40, 60, および80℃で60分間加熱してゲルを調製した。

**8M尿素溶液 (pH 7.0) および6M塩酸グアニジン溶液 (pH 7.0) によるアクトミオシンゲルの可溶化率の測定** アクトミオシンゲル0.5gを、それぞれpH 7.0に調節された8M尿素溶液あるいは6M塩酸グアニジン溶液と共にテフロン製ホモジナイザーでホモジナイズしたのち、それぞれの溶液で全量を25mlとした。ホモジネートの一部を30,000×gで30分間遠心分離して得た上澄を可溶区分とした。各ホモジネートおよびその可溶区分の280および350nmにおける吸光度を測定し、ホモジネートの280nmと350nmの吸光度の差( $E_{280} - E_{350}$ )に対する可溶区分のその百分率をゲルの可溶化率とした。

**6M 塩酸グアニジン溶液 (pH 8.5)** によるアクトミオシンゲルの可溶化  
アクトミオシンゲルに 0.3M トリス-塩酸および 10mM EDTA を含む 6M 塩酸グアニジン溶液 (pH 8.5) を等量加え、テフロン製ホモジナイザーでホモジナイズした。ホモジネートを同溶液に対して一夜透析したのち、30,000×g で 30 分間遠心分離し、その上澄を可溶区分とした。

アクトミオシンの還元 未加熱アクトミオシンおよび加熱ゲルの 6M 塩酸グアニジン溶液 (pH 8.5) 可溶区分 1ml に 1.5mmol のジチオスレイトール (DTT) を加え、40℃で 2 時間温置した。必要に応じ、還元処理液を 6M 塩酸グアニジン溶液 (pH 6.5) に対して透析し、DTT を除去した。

**CPG-10 2000 Å** クロマトグラフィー 展開液として 50mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ - $\text{K}_2\text{HPO}_4$  および 10mM EDTA を含む 6M 塩酸グアニジン溶液 (pH 6.5) を用いたほかは、第 6 章の方法に準じた。

**Bio-Gel A-15m** クロマトグラフィー 試料液 1ml を Bio-Gel A-15m (Bio-Rad. Lab. 製, 100~200 メッシュ) を充填したカラム (カラムサイズ 2.5×40cm) に添加し、展開液として 50mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ - $\text{K}_2\text{HPO}_4$  および 10mM EDTA を含む 6M 塩酸グアニジン溶液 (pH 6.5) を用い、流速 7.5ml/h でクロマトグラフィーを行なった。タンパク質の溶出曲線は溶出液の 280nm における吸光度から求めた。カラムの排除容積は 80ml, 全自由容積は 210ml であった。

#### 実験結果および考察

**8M 尿素溶液および 6M 塩酸グアニジン溶液によるアクトミオシンゲルの可溶化率の比較** タンパク質濃度 2.70% のアクトミオシン溶液を 60℃で 60 分間加熱して得たゲルに対する 8M 尿素溶液 (pH 7.0) および 6M 塩酸グアニジン溶液 (pH 7.0) の可溶化能を比較した (Table 5)。

ゲルの 8M 尿素ホモジネートおよびその可溶区分は白濁していたが、6M 塩酸グアニジン溶液を用いたホモジネートおよび可溶区分は濁りがほとんどなかった。このことはそれぞれの 350nm における吸光度 ( $E_{350}$ ) に反映さ

**Table 5.** Solubilization of actomyosin gel by 6 M guanidine HCl (Gu·HCl) solution and 8M urea solution. Actomyosin soln (2.70%) was heated at 60°C for 60 min. The gel formed was homogenized with 6M Gu·HCl solution (pH 7.0) and 8M urea solution (pH 7.0). The supernatant was obtained by centrifuging an aliquot of the homogenate at 30,000 × g for 30 min.

	6 M Gu·HCl solution			8 M urea solution		
	E <sub>280</sub>	E <sub>350</sub>	E <sub>280</sub> -E <sub>350</sub>	E <sub>280</sub>	E <sub>350</sub>	E <sub>280</sub> -E <sub>350</sub>
Homogenate (A)	1.051	0.077	0.974	1.432	0.323	1.109
Supernatant (B)	0.907	0.023	0.884	0.886	0.128	0.758
Solubility (%) (B/A × 100)	90.8			68.3		

れていた。各ホモジネートおよび可溶区分の 280 nmにおける吸光度 (E<sub>280</sub>) はタンパク質の吸収だけでなく、濁りの影響を受けていると考えられる。そこで濁りの影響を除くため、E<sub>280</sub> - E<sub>350</sub> の値を用いて、各溶液によるゲルの可溶化率を求めた結果、8 M 尿素溶液によるゲルの可溶化率は 68.3 %、6 M 塩酸グアニジン溶液によるそれは 90.8 %であった。ゲルに対する溶解力の点で、6 M 塩酸グアニジン溶液の方が 8 M 尿素溶液より優れていることから、6 M 塩酸グアニジン溶液の方がタンパク質をよく unfold していると考えられる。

第 6 章において、SH 試薬添加および無添加アクトミオシゲルの 8 M 尿素溶液可溶区分の分子ふるいクロマトグラフィーの結果から、アクトミオシンの加熱ゲル形成時にタンパク質分子間に SS 結合が形成され、その結果としてタンパク質の高分子化が起るものと推察した。しかし、本実験結果から、ゲルは 8 M 尿素溶液中で十分 unfold されないことが示唆されたので、第 6 章で観察された高分子化は非共有結合による分子間結合の結果であるとも考えられる。そこで、アクトミオシンのゲル形成時に分子間 SS 結合が形成されるという第 4 章、第 5 章、および第 6 章で得た仮説を証明するため、8 M 尿素溶液より変性力の強い 6 M 塩酸グアニジン溶液を用いて、以下の実験を行なった。

DTT 処理による 6 M 塩酸グアニジン溶液可溶区分の CPG-10 2000 Å<sup>o</sup> クロマトグラフィーパターンの変化 タンパク質濃度 2.74% のアクトミオ



シン溶液を 40, 60, および 80 °C の各温度で加熱して得たゲルの 6 M 塩酸グアニジン溶液 (pH 8.5) 可溶区分および対照として未加熱アクトミオシンの可溶区分について, CPG-10 2000 Å クロマトグラフィーを行なった。その結果を Fig. 30 に示した。未加熱アクトミオシンの可溶区分は低分子側

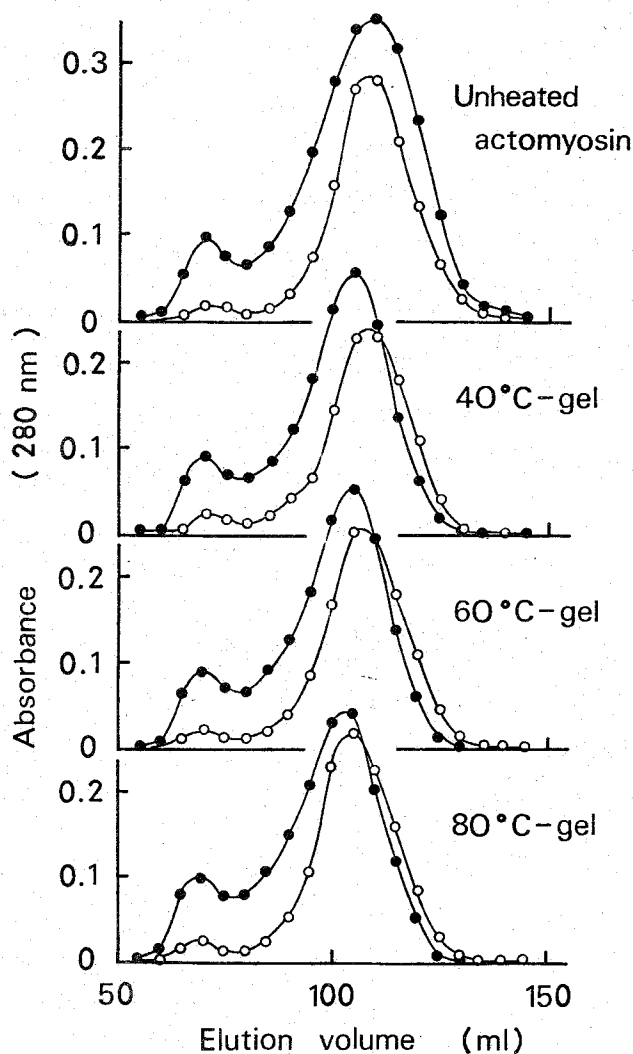


Fig. 30. Effect of dithiothreitol (DTT) treatment of 6 M guanidine HCl soluble fractions of actomyosin gels on the elution pattern of CPG-10 2000 Å column chromatography. Actomyosin soln (2.74%) was heated at 40, 60 and 80°C for 60 min. The gels formed and unheated actomyosin were solubilized by 6 M guanidine HCl solution (pH 8.5). Each aliquot of the soluble fractions was treated by DTT and was dialyzed against 6 M guanidine HCl solution (pH 6.5). Samples before (—●—) and after DTT treatment (—○—) were chromatographed on CPG-10 2000 Å column (1.27 × 97.5 cm). The elution was performed with 6 M guanidine HCl solution (pH 6.5) at the flow rate of 45 ml/h.

に大きなピーク (P<sub>1</sub> 画分) と高分子側に小さなピーク (P<sub>2</sub> 画分) を示した。アクトミオシンを加熱して得たゲルはいずれも 2 個のピークを示したが、P<sub>1</sub> 画分のピークはゲル調製時の加熱温度が高いほど高分子側に移動した。また P<sub>2</sub> 画分の溶出位置は各試料間で差異は認められなかったが、全溶出タンパク質量に対する P<sub>2</sub> 画分のタンパク質量の割合は加熱温度が高いほど増加した (Table 6)。これらの結果から、アクトミオシンのゲル形成時に 6 M

**Table 6.** Proportion of the protein content in higher molecular-weight portion to the total protein content of 6 M Gu-HCl soluble fraction. Each value was calculated on the basis of the elution pattern as shown in Fig. 30.

	Heating temperature (°C)			
	Unheated	40	60	80
Before DTT treatment	12.1%	17.3%	17.2%	19.9%
After DTT treatment	3.1	6.0	5.4	6.2

塩酸グアニジン溶液でもなお切断されない結合によりタンパク質の高分子化が起ること、および加熱温度が高いゲルほど高分子化が進んでいることが明らかとなった。

次に、ゲル形成時に起るタンパク質の高分子化がタンパク質分子間 S S 結合の形成に基づくかどうかを明らかにするため、以下の実験を行なった。すなわち、先の実験に用いたものと同じ 6 M 塩酸グアニジン溶液可溶区分を DTT で処理したのち、DTT を除去するため 6 M 塩酸グアニジン溶液 (pH 6.5) に対して透析した。この透析試料液について、CPG-10 2000 Å クロマトグラフィーを行ない、その結果を Fig. 30 に示した。未加熱アクトミオシンの場合には、還元処理してもピーク位置の移動は認められなかった。しかし加熱ゲルの場合には、いずれも還元処理により P<sub>1</sub> 画分のピークがより低分子側に移動し、未加熱試料のピーク位置に接近していた。また未加熱アクトミオシンおよび加熱ゲルのいずれの場合にも、還元処理により高分子側の P<sub>2</sub> 画分が減少し、その減少の割合は加熱温度が高いほど大きかった (Table 6)。これらの結果は、加熱ゲル化の過程で高分子化されたタンパ

ク質が還元処理により未加熱試料の分子量にまで低分子化したこと、換言すればゲル化過程でタンパク質分子間のSS結合による高分子化が起ることを示している。また未加熱アクトミオシン中に分子間SS結合が存在することがわかった。

DTT処理による6M塩酸グアニジン溶液可溶区分のBio-Gel A-15mクロマトグラフィーパターンの変化 先の実験で、アクトミオシンの加熱によりあるいは可溶区分の還元処理により低分子側のピーク(P<sub>1</sub>画分)に移動が認められたが、いずれもその移動はわずかであった。このことはCPG-10 2000 Å<sup>○</sup>の分画範囲がかなり高分子領域であることに基因していると考えられる。この低分子側成分の分子量変化をより明確に把握するため、CPG-10 2000 Å<sup>○</sup>よりも低分子領域に分画範囲をもつBio-Gel A-15m(分画範囲;  $4 \times 10^4 \sim 1.5 \times 10^7$ )を用いて、タンパク質濃度3.50%のアクトミオシン溶液およびその加熱ゲルの6M塩酸グアニジン溶液可溶区分について、クロマトグラフィーを行なった。その結果をFig. 31に示した。未加熱アクトミオシンの可溶区分では3個のピークが認められた。40℃加熱ゲルの可溶区分では、ピークは3個であったが、未加熱アクトミオシンの場合よりも低分子側成分が減少し、高分子側成分が増加した。60および80℃加熱ゲルの場合には、ピークは2個となり、低分子側成分はさらに減少し高分子側に移動していた。これらの結果から、調製時の加熱温度が高いゲルほど、タンパク質の高分子化が進んでいることが明らかとなった。

次に未加熱アクトミオシンおよび加熱ゲルの可溶区分をDTT処理したものについて、Bio-Gel A-15mクロマトグラフィーを行なった。結果をFig. 31に示した。未加熱アクトミオシンおよび加熱ゲルのいずれの場合にも、類似した溶出パターンが得られた。溶出液量200ml付近に溶出される大きいピークにはタンパク質は検出されなかったので、このピークはDTTおよびその酸化型であると考えられる。還元処理により、いずれの場合も高分子側成分は減少し、低分子側成分は増加することが認められた。先の結果と同様、これらの結果からも未加熱アクトミオシン中に分子間SS結合が存在

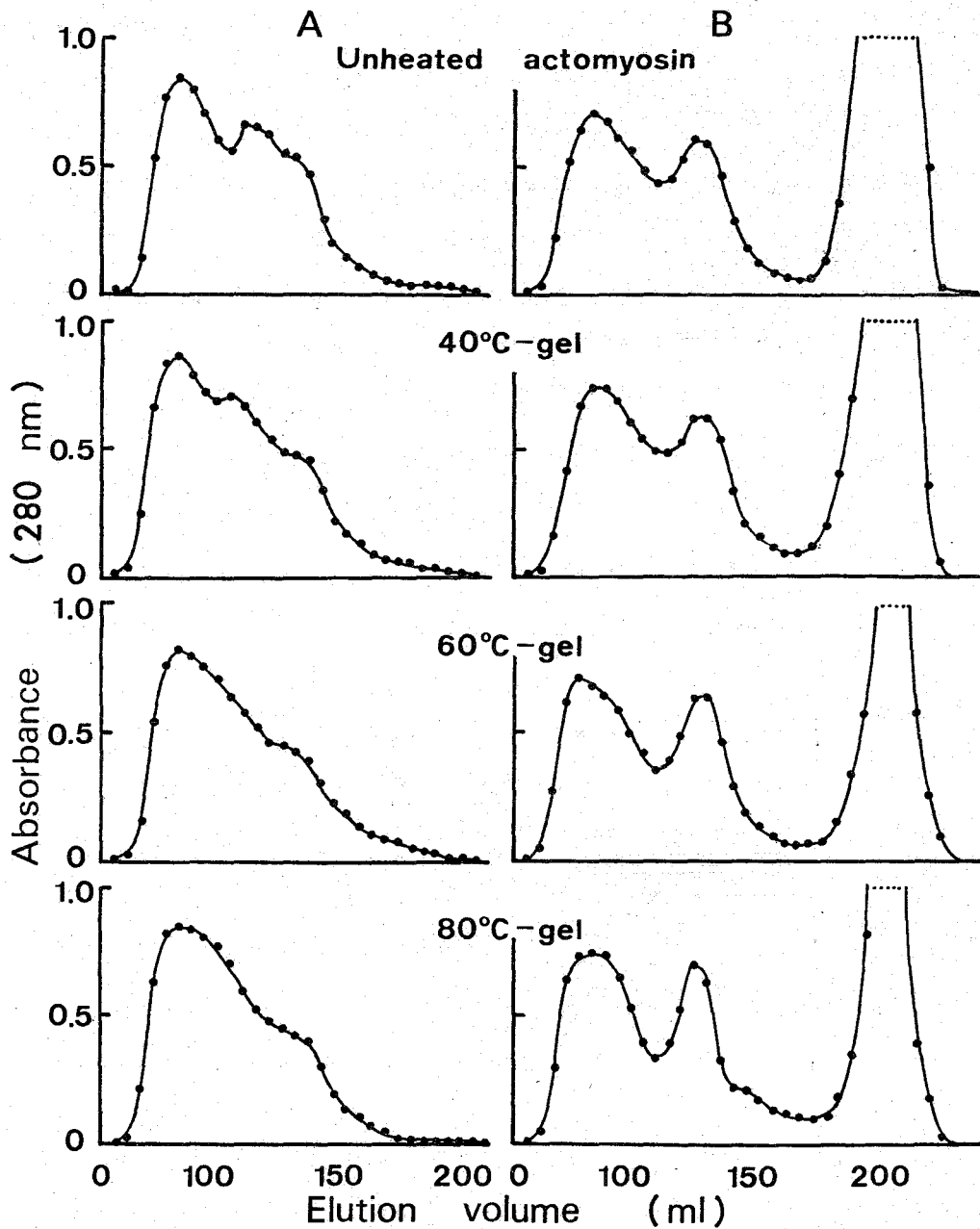


Fig. 31. Effect of DTT treatment of 6 M guanidine HCl soluble fractions of actomyosin gels on the elution pattern of Bio-Gel A-15m column chromatography. Actomyosin soln (3.50%) was heated at 40, 60, and 80°C for 60 min. The gels formed and unheated actomyosin were solubilized by 6 M guanidine HCl solution (pH 8.5). Each aliquot of the soluble fractions was treated by DTT. Samples before (A) and after DTT treatment (B) were chromatographed on Bio-Gel A-15m column (2.5 × 40 cm). The elution was performed with 6 M guanidine HCl solution (pH 6.5) at the flow rate of 45 ml/h. The third peak in the chromatogram B was due to DTT or oxidized DTT in the sample.

すること、および加熱ゲル化にともないタンパク質分子間にSS結合が形成されその結果として高分子化が起ることが明らかになった。

前章までに、アクトミオシン溶液にSH試薬を添加したとき、そのゲル形成能 (Tables 3,4)ならびに加熱にともなうタンパク質の高分子化 (Figs. 27, 29)が阻害されること、およびアクトミオシンを加熱したときタンパク質分子の表面にSH基が露出すること (Figs. 21,22)等を明らかにした。それらの結果および本実験結果から、アクトミオシンの加熱により露出されるSH基が酸化されて分子間SS結合を形成し、このSS結合がアクトミオシンの加熱ゲル形成に寄与しているものと推察される。

## 要 約

I. かまぼこの足形成における魚肉タンパク質のSH基およびSS結合の役割を知る目的で、L-システインおよびL-シスチンの添加効果を調べた。

システインおよびシスチンはいずれも足増強効果を示した。しかし、それらの相乗効果はみられなかった。コイ肉すり身に添加したシスチンは加熱により還元された。

タンパク質のSH基の酸化に関与すると考えられるシスチンのみならず、還元力のあるシステインにも足増強効果がみられたことから、足形成に対するSH-SSならびにSS交換反応の関与の可能性が示された。

II. 還元力をもつシステインがかまぼこの足増強効果を示すことがわかったので、さらに二、三の無機還元剤について、その添加効果を調べた。

亜硝酸ナトリウム、チオ硫酸ナトリウムの添加によって足は増強された。これらの無機還元剤あるいはシステインの添加によるかまぼこの足の質的变化は、臭素酸カリウムやデヒドロアスコルビン酸添加の場合とよく似ており、多りん酸塩添加の場合とは明らかに異っていた。

この結果から、タンパク質分子間のSH-SS交換反応によるSS結合の形成が還元剤の添加によって促進されるものと推察した。

III. 魚肉のゲル形成機作を解明するためのモデル系を確立する目的で、コイアクトミオシンのゲル形成能を種々の条件下で検討した。

80℃加熱では、アクトミオシン濃度2%以上でゲル化し、0.6M KCl, pH 6.3, 加熱時間60~120分間においてゲルの剛性率は最大であった。またアクトミオシンは40℃以上でゲル化し、60℃で最大の剛性率を示した。各温度で加熱したゲルを80℃で再加熱すると、40℃ゲルの剛性率はさらに強くなり、60℃ゲルのそれは弱くなった。

多くの点で既報の魚肉のゲル形成能との対応が認められ、かまぼこの足の強さはアクトミオシンの加熱ゲルの強さに大きく依存することがわかった。

Ⅳ. アクトミオシンの加熱ゲル形成におけるSH基の役割を明らかにするため、コイアクトミオシンを各種温度で加熱したときのSH基の挙動を調べた。

加熱温度が40℃以上の場合、SH基の酸化される量は温度が高いほど多かった。加熱温度が60℃の場合に、露出SH基量は最大、内部SH基量は最少であった。

このような加熱温度と露出SH基量との関係は、アクトミオシンのゲル形成能と加熱温度との関係によく対応した。これより、アクトミオシンの加熱により露出した分子表面のSH基が分子間の結合に関与し、ゲル形成に寄与することが示唆された。

Ⅴ. アクトミオシンの加熱ゲル形成に及ぼすSH試薬の影響を調べた。

NEM添加により、40および80℃で加熱して得たアクトミオシンの剛性率はいずれも低下し、8M尿素溶液に対する溶解度の低下は抑制された。また、PCMBによってもアクトミオシンの剛性率は低下した。

これらの結果は、アクトミオシンを40および80℃で加熱したときのゲル形成に、そのSH基が関与していることを示し、また、魚肉すり身の坐りおよび足形成にアクトミオシンのSH基が関与することを示唆する。

Ⅵ. アクトミオシンの加熱ゲル形成において、SH基が分子間結合に関与するかどうかを明らかにするため、種々の温度で加熱して得たアクトミオシンゲルおよびSH試薬を添加して調製したゲルの8M尿素溶液に対する溶解度および同溶液可溶区分のCPG-10 2000Å<sup>○</sup>クロマトグラフィーパターンを比較した。

その結果、加熱によりアクトミオシンの8M尿素溶液に対する溶解度は減

少し、同時にタンパク質は高分子化することがわかった。その高分子化の程度は40℃よりも60および80℃の方が大であった。一方、SH試薬を添加したゲルでは、いずれの加熱温度においても、不溶化および高分子化は抑制された。

これらの結果から、アクトミオシンの加熱ゲル形成時に起こる高分子化にSH基が関与していることがわかった。

Ⅶ. アクトミオシンの加熱ゲル形成時に分子間SS結合が形成されるかどうかを明らかにするため、アクトミオシンゲルの6M塩酸グアニジン溶液可溶区分および同区分をジチオスレイトールで還元処理した試料について、分子ふるいクロマトグラフィーを行なった。

その結果、アクトミオシンの加熱によりタンパク質は高分子化すること、およびこの高分子化された成分は還元処理されると再び低分子化することがわかった。

これらの結果から、アクトミオシンの加熱ゲル形成時に分子間SS結合による高分子化が起っていることがわかった。



# STUDIES ON THE ROLE OF THE SH GROUPS IN THE GEL FORMATION OF FISH MEAT PROTEIN BY HEATING

## Summary

I. In order to elucidate the role of SH groups and SS bonds of fish protein in the gel formation of fish meat by heating, the effects of L-cysteine and L-cystine on the gel formation were examined. The gel forming ability was evaluated via the gel strength, which is given as the product of the tensile strength and the breaking length. By adding L-cysteine and L-cystine to the fish meat paste from Alaska pollack, cod, tuna, and carp, the gel strength of their gels were increased. L-Cystine added to carp meat paste and to carp actomyosin solution was reduced to cysteine upon heating. These findings indicate the possibilities that the promoting effects of L-cysteine and L-cystine on the gel formation are due not only to the oxidation of SH groups to intermolecular SS bonds by L-cystine, but also to the formation of mixed disulfides by SH-SS interchange and to the enhancement of SS interchange between protein molecules by L-cysteine.

II. The effects of some inorganic reducing agents, sodium nitrite, sodium thiosulfate, and sodium hydrogen sulfite, on the gel formation of Alaska pollack brayed-meat were examined in order to estimate the participation of intermolecular SS bonds of protein in the gel formation.

It was found that the gel strength was increased by adding the inorganic reducing agents to the brayed-meat. The elastic properties of the gels containing the inorganic reducing agents were similar to those of the gels containing potassium bromate, ascorbic acid, dehydroascorbic acid, cysteine, and cystine, and were quite different from those of the gels containing pyrophosphate and triphosphate. On the basis of these findings, it is assumed that the inorganic reducing agents promote the formation of SS bonds between protein molecules via an SS interchange.

III. In order to establish a model system for the elucidation of the heat-gelling mechanism of fish meat in connection with the development of elastic properties of Kamaboko, the gel forming ability of carp actomyosin was investigated under various conditions. The gel forming ability of actomyosin was evaluated via the rigidity modulus, which was determined at  $3 \pm 1^\circ\text{C}$  by measuring the strain resulting from the stress of pressure exerted on the gel.

When actomyosin was heated at  $80^\circ\text{C}$  under various conditions, the rigidity modulus value of the gel was maximum under the conditions of KCl concentration 0.6 M, pH 6.3, and heating time 60–120 min. The double logarithmic plot for actomyosin concentration vs. rigidity modulus of the gel gave a straight line.

When actomyosin was heated at various temperatures for 60 min in 0.6 M KCl (pH 6.3), firm gels were formed above  $40^\circ\text{C}$ ; the gel formed at  $60^\circ\text{C}$  was the hardest. The gel formed at  $40^\circ\text{C}$  became harder and the gel formed at  $60^\circ\text{C}$  became softer by reheating at  $80^\circ\text{C}$  for 20 min.

The behavior of the gel forming ability at  $80^\circ\text{C}$  of actomyosin with respect to salt concentration, pH, and actomyosin concentration was compatible with the known behavior of the gel forming ability of fish meat under the same conditions. It can therefore be presumed that actomyosin contributes to the gel forming ability of fish meat.

IV. In order to clarify the participation of SH groups in the gel formation of actomyosin by heating, the effect of heating temperatures up to 80°C on the contents of total SH and reactive SH of carp actomyosin was examined. The total SH was determined in the presence of 8 M urea at pH 7.0 by using Ellman's reagent and the reactive SH was done without urea by using the same reagent.

The oxidized SH content, which was estimated from the decrement of the total SH content, increased with the rise of temperature above 40°C. When heated at 60°C, the reactive SH content, which seems to be the exposed SH content, was maximum, and the difference in the content between the total SH and the reactive SH, which is taken as the inner SH content, was minimum.

The behavior of the reactive SH of the actomyosin with respect to heating temperature is quite compatible with the behavior of the gel forming ability of the actomyosin. It can therefore be presumed that the reactive SH, which appeared on the molecular surface by heating, contributes to the gel formation of actomyosin through some bonding between the protein molecules.

V. The effects of two sulfhydryl reagents, N-ethylmaleimide and *p*-chloromercuribenzoate, on the gel formation of carp actomyosin by heating were examined in order to clarify the participation of the SH groups in the gel formation.

It was found that the rigidity modulus of the gels formed at 40 and 80°C was decreased by adding the sulfhydryl reagents to the actomyosin solution and that the gels containing the reagents were more soluble in 8 M urea solution than the control gel.

These results indicate that the SH groups participate in the gel formation of carp actomyosin by heating at 40 and 80°C and also suggest that the SH groups of actomyosin in fish meat participate in the gel formation of the meat paste by heating.

VI. The solubility, in 8 M urea solution (pH 8.5), of carp actomyosin gels formed with or without sulfhydryl reagents, N-ethylmaleimide and *p*-chloromercuribenzoate, and the chromatographic patterns of 8M urea soluble fractions of these gels on CPG-10 2000 Å column were examined in order to prove the participation of SH groups in intermolecular bonding during the gel formation of actomyosin.

It was found that the solubility of actomyosin decreased and the molecular weight of protein molecules increased during the gel formation. These changes were impaired to some extent by adding the sulfhydryl reagents to actomyosin.

These findings indicate that SH groups are involved in changes to higher molecular weight of protein molecules during the gel formation, and also suggest the formation of SS bonds between protein molecules.

VII. The effect of dithiothreitol treatment of 6 M guanidine HCl soluble fractions of carp actomyosin gels on the chromatographic pattern on CPG-10 2000 Å and Bio-Gel A-15m columns was examined in order to evidence the formation of intermolecular SS bonds during the gel formation.

It was demonstrated that the polymeric molecules of protein were produced during the gel formation, and the polymeric molecules were depolymerized by treating with dithiothreitol.

On the basis of these findings, it is concluded that polymeric protein molecules in the gel are produced as a result of the formation of intermolecular SS bonds during heating of actomyosin.

## 謝

## 辞

本研究を行なうにあたり終始御懇篤なる御指導と御鞭撻を賜わり、かつ、本論文の御校閲をいただいた京都大学教授 池田静徳先生に衷心より謝意を表します。また、本研究の遂行ならびに論文の作成にあたり、有益なる御教示と御助力を賜わった京都大学 吉中礼二博士に深謝致します。さらには、多くの御助言をいただいた京都大学水産化学講座の各位に謝意を表します。

本論文の作成のために、御高配いただいた大和学園 田中藤一学園長ならびに近畿大学教授 藤田真夫博士に謝意を表します。

## 文 献

- 1) 清水亘・竹林靖：水産製造会誌， **3**， 63-72 (1935)。
- 2) 平野弘：日水誌， **8**， 29-40 (1939)。
- 3) 清水亘：蒲 銓， 生活社， 東京， 1944, pp. 16-17.
- 4) 清水亘：水産ねり製品， 光琳書院， 東京， 1966, pp. 156-158.
- 5) 志水寛：昭和51年度日本水産学会春季大会講演要旨集， pp. 217-218.
- 6) 丹羽栄二：日水誌， **41**， 907-910 (1975)。
- 7) 丹羽栄二：食品の水(日本水産学会編)， 恒星社厚生閣， 東京， 1973, pp. 83-94.
- 8) 高木一郎：昭和48年度日本水産学会春季大会講演要旨集， p. 162.
- 9) 岡田稔・中山正夫：日水誌， **27**， 203-208 (1961)。
- 10) 丹羽栄二・三宅正人：日水誌， **37**， 884-890 (1971)。
- 11) 田端義明・野崎征宣・金津良一：長崎大水産学部研報， **41**， 29-33 (1976)。
- 12) T. Yasui, Y. Hashimoto, and Y. Tonomura: *Arch. Biochem. Biophys.*, **87**, 55-62 (1960).
- 13) K. Samejima, Y. Hashimoto, T. Yasui, and T. Fukazawa: *J. Food Sci.*, **34**, 242-245 (1969).
- 14) 志水寛・吉本晴樹・清水亘：日水誌， **28**， 610-615 (1962)。
- 15) P.R. Grunert and R.H. Phillips: *Arch. Biochem. Biophys.*, **30**, 217-225 (1951).
- 16) M.K. Gaitonde: *Biochem. J.*, **104**, 627-633 (1967).
- 17) 三宅正人・川上謙：日水誌， **32**， 446-449 (1966)。
- 18) R. Hamm and K. Hofmann: *Nature*, **207**, 1269-1271 (1965).
- 19) R. Yoshinaka, M. Shiraishi, and S. Ikeda: *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **38**, 511-515 (1972).
- 20) R. Frater, F.J.R. Hird, H.J. Moss, and J.R. Yates: *Nature*, **186**, 451-454 (1960).
- 21) I.M. Kolthoff and A. Anastasi: *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 4248-4250 (1958).
- 22) M. Bárány: in "Symposium on sulfur in proteins" (ed. by R. Benesch, R.E. Benesch, P.D. Boyer, I.M. Klotz, W.R. Middlebrook, A.G. Szent-Györgyi, and D.R. Schwartz), Academic Press, New York, 1959, pp. 317-328.
- 23) A. Stracher: *J. Biol. Chem.*, **239**, 1118-1121 (1964).
- 24) E. Gaetjens, T. Therattil-Antony, and M. Bárány: *Biochim. Biophys. Acta*, **86**, 554-566 (1964).
- 25) A.G. Weeds and B.S. Hartley: *Biochem. J.*, **107**, 531-548 (1968).
- 26) C.A.M. Mauritzen and P. Stewart: *Nature*, **197**, 48-49 (1963).
- 27) C. Huggins, D.F. Tapley, and E.V. Jensen: *Nature*, **167**, 592-593 (1951).
- 28) R. Benesch and R.E. Benesch: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **44**, 848-853 (1958).
- 29) L.K. Steinrauf and W.B. Dandliker: *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 3833-3835 (1958).

- 30) R.C. Warner and M. Levy: *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 5735-5744 (1958).
- 31) I.M. Kolthoff and B.H. Tan: *J. Am. Chem. Soc.*, **87**, 2717-2720 (1965).
- 32) A.P. Ryle and F. Sanger: *Biochem. J.*, **60**, 535-540 (1955).
- 33) I.M. Klotz, J. Ayers, J.Y.C. Ho, M.G. Horowitz, and R.E. Heiney: *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 2132-2141 (1958).
- 34) 志水寛・清水亘・池内常郎: 日水誌, **20**, 209-212 (1954).
- 35) 岡田稔・山崎惇子: 東海水研報, **23**, 49-59 (1958).
- 36) 岡村一弘・松田敏生・横山理雄: 日水誌, **24**, 826-832 (1959).
- 37) L.A. Sluyterman: *Biochim. Biophys. Acta*, **48**, 429-436 (1961).
- 38) 志水寛: 魚肉蛋白に関する原料学的研究, 学位論文(京都大学), 1961, pp. 114-116.
- 39) 平野弘: 日化, **63**, 1081-1084 (1942).
- 40) 清水亘: 水産ねり製品, 光琳書院, 東京, 1966, pp. 110-111.
- 41) 志水寛・吉本晴樹・清水亘: 日水誌, **28**, 610-615 (1962).
- 42) 岡田稔: 日水誌, **30**, 255-261 (1964).
- 43) 志水寛: 魚肉蛋白に関する原料学的研究, 学位論文(京都大学), 1961, pp. 155-163.
- 44) 西谷喬助・武田二美雄・田元馨・田中修・久保正: 北水研報, **21**, 40-60 (1960).
- 45) 西谷喬助・武田二美雄・田元馨・田中修・北林透: 北水試月報, **18**, 391-397 (1961).
- 46) K. Iwata, K. Kanna, and M. Okada: *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **43**, 237 (1977).
- 47) P.R. Saunders and A.G. Ward: in "Proceedings of the Second International Congress on Rheology" (ed. by V.G.W. Harrison), Butterworths Scientific Publications, London, 1954, pp. 284-290.
- 48) 岸本昭: 未発表.
- 49) 志水寛: 魚肉蛋白に関する原料学的研究, 学位論文(京都大学), 1961, pp. 120-123.
- 50) Y. Shimizu and W. Simidu: *Memoirs College Agr. Kyoto Univ. Fish. Series*, Special Number, June, pp. 68-76 (1958).
- 51) 清水亘: 水産ねり製品, 光琳書院, 東京, 1966, p. 186.
- 52) 岡田稔: 魚肉ねり製品(岡田稔・横関源延・衣巻豊輔編), 恒星社厚生閣, 東京, 1974, pp. 189-190.

- 53) W.J. Dyer, H.V. French, and J.M. Snow: *J. Fish. Res. Bd Canada*, **7**, 585–593 (1950).
- 54) 三宅正人・林孝市郎: 日水誌, **22**, 48–50 (1956).
- 55) 志水寛・清水亘: 日水誌, **26**, 806–809 (1960).
- 56) 志水寛・西岡不二男: 日水誌, **40**, 267–270 (1974).
- 57) A. Kishimoto and S. Hirata: *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **29**, 146–150 (1963).
- 58) 小国盛稔・猪上徳雄・葛西秀人・上居隆・秋場稔: 昭和49年度日本水産学会秋季大会講演要旨集 p. 164.
- 59) 志水寛: 魚肉蛋白に関する原料学的研究, 学位論文(京都大学), 1961, pp. 140–147.
- 60) 牧之段保夫・山本正男・清水亘: 日水誌, **29**, 776–780 (1963).
- 61) 岡田稔: 東海水研報, **36**, 83–88 (1963).
- 62) 志水寛・籾照明・川崎正之: 昭和51年度日本水産学会秋季大会講演要旨集 p. 139.
- 63) H. Buttkus: *Can. J. Biochem.*, **49**, 97–107 (1971).
- 64) 松本博: 化学と生物, **3**, 378–386 (1965).
- 65) D.G. Smyth, A. Nagamatsu, and J.S. Fruton: *J. Am. Chem. Soc.*, **82**, 4600–4604 (1960).
- 66) A. Riggs: *J. Biol. Chem.*, **236**, 1948–1954 (1961).