

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 中 村 幸 信

本論文はヌクレオシド-5' -リン酸 (NMP) が豚肉からの筋原線維タンパク質の抽出とその加熱ゲル形成に及ぼす影響を調べたものである。

本論文の序論では、まず、この研究の背景として、日本の生産者や消費者が、高品質のソーセージ、すなわち、適度な保水性および結着性を有したソーセージの生産に関心が高いことが述べられている。そして、このような品質の発現には、主原料となる食肉に存在する筋原線維タンパク質 (Mf-p)、特にミオシンが必須であること、Mf-p は、製造の塩漬工程で食肉から抽出され、続く加熱工程で3次元の網目構造を形成し、最終的にソーセージの保水性および結着性を発現させることが述べられている。さらに、日本のソーセージ製造では塩味を抑えるために、低塩濃度下 (1.5%) における塩漬工程が主流であり、そこでは、Mf-p を抽出するためにピロリン酸塩が使用されていること、および、このピロリン酸塩の役割は、食肉において死後硬直時に形成されたアクチン-ミオシンの硬直結合体 (アクトミオシン) をアクチンとミオシンに解離させ、これらタンパク質の抽出を容易にすることであることが述べられている。

他方、アデノシン-5' -リン酸 (AMP) やイノシン-5' -リン酸 (IMP) がアクトミオシンをアクチンとミオシンに解離させるという、ピロリン酸塩と同様の作用を有することが明らかにされているが、AMP や IMP によるアクトミオシン解離機構は明らかになっていないことも指摘されている。

以上のような背景のもと、NMP によるアクトミオシン解離機構の解明と NMP によるピロリン酸塩の代替の可能性の検証を目的として研究が遂行され、下記に示した I ~ V の成果が得られている。

### I、NMP によるアクトミオシンの解離作用

精製アクトミオシンとそれぞれ 8 mM の GMP、シチジン-5' -リン酸 (CMP)、デオキシチミジン-5' -リン酸 (dTMP) およびウリジン-5' -リン酸 (UMP) を 0.2 M KCl 下、pH 7.2、0°C で 16 時間インキュベートした。この結果、GMP は AMP や IMP と同様

にアクトミオシンをアクチンとミオシンに解離させたが、CMP、dTMP および UMP はアクトミオシンを解離させなかった。したがって、プリン骨格を有する AMP、IMP および GMP のみがアクトミオシンを解離できることが明らかとなった。プリン骨格を有する NMP (PrMP) は、ピリミジン骨格を有する NMP よりもアクトミオシンに対して強く結合することができるためにアクトミオシンの解離作用を示したと推定されている。

これらの知見は、アクチン-ミオシン間結合に関わる構造を推定するにあたって重要な情報を提供することになり、タンパク質化学的な意義が大きい。

## II、PrMP による Mf-p の抽出～ピロリン酸塩との比較～

食肉に 9-36 mM IMP あるいは GMP を含む 0.3-0.5 M NaCl 溶液を 9 倍量加えて、Mf-p を抽出した。この抽出に対する NaCl 濃度、IMP あるいは GMP 濃度および抽出時間の影響が調べられ、1.5-9 mM のピロリン酸四カリウム (KPP) の作用と比較された。その結果、IMP および GMP が、Mf-p の抽出を高めることが明らかになった。これは IMP および GMP が有するアクトミオシンの解離作用に起因するものと考えられた。IMP による Mf-p 抽出の増加は、NaCl 濃度と IMP 濃度の増加および抽出時間経過によってさらに高められた。GMP による Mf-p 抽出の増加は、NaCl 濃度と GMP 濃度の増加によってさらに高められたが、抽出時間経過に伴い抽出率の低下が生じた。他方、KPP によっても Mf-p の抽出は増加したが、NaCl 濃度の増加や抽出時間経過によって高められなかった。IMP、GMP および KPP はいずれもアクトミオシンの解離作用を有しているが、これらの Mf-p の抽出性については異なることが明らかになった。KPP は比較的低い NaCl 濃度および短時間で Mf-p を抽出することが可能であった。GMP 抽出における抽出時間経過による抽出率の低下は、アクトミオシンを解離させていた GMP が 4 量体の G カルテットを形成することに起因するものと推定されている。

これらの結果は、日本において主流の低塩濃度 (1.5%=0.26M) に近い塩濃度で、PrMP が KPP と同様に Mf-p 抽出を増強する作用を有しており、その作用様式が KPP とは若干異なることを示した新規知見である。

## III、PrMP と KPP の併用による Mf-p の抽出

食肉に 9-36 mM IMP あるいは GMP と 1.5-3.0 mM KPP を併用した 0.3 M NaCl 溶液を

9 倍量加えて、Mf-p を抽出した。この抽出に対する PrMP と KPP の併用効果が調べられた。この結果、PrMP と 1.5 mM KPP の併用が、Mf-p の抽出を著しく高めることが明らかになった。特にミオシン抽出に関しては、相乗効果が示された。PrMP と 1.5 mM KPP の併用による Mf-p の抽出の著しい増加は、PrMP と KPP による Mf-p の抽出様式が異なっており、PrMP による抽出の律速段階を KPP が除去する補完作用によってもたらされたと推定された。IMP と KPP を併用した場合、抽出時間経過によってアクチン抽出は増加したが、ミオシン抽出は増加しなかった。この結果は、両タンパク質の筋原線維における存在状態の違いに起因するものと推定されている。

これらの結果は、PrMP を併用することにより、低濃度の KPP で低塩濃度のソーセージを製造する可能性を示したもので、その実用的意義は大きい。

#### IV、生理的イオン強度下での IMP および KPP による Mf-p の抽出様式

精製アクトミオシンと 8 mM IMP を 0.06-0.2 M KCl、pH 7.2、0°C で 4 時間までインキュベートして、アクトミオシンの解離に要する時間と KCl 濃度の影響が調べられた。その結果、IMP によるアクトミオシンの解離は 10 分以内に完了することおよび KCl 濃度が 0.19 M 以上で起こることが明らかにされた。他方、KPP によるアクトミオシンの解離は、KCl 濃度が 0.06 M 以上で起こった。IMP がアクトミオシンの解離に要する時間が、KPP とほぼ同等であることから、高イオン強度下での筋原線維からのアクチンとミオシンの抽出に IMP が KPP より時間を要する原因は、アクトミオシン解離作用そのものにはないと考えられた。

精製した筋原線維と 8 mM IMP または KPP を 0.2 M KCl、pH 7.2、0°C でインキュベートした。その結果、IMP により Mf-p は抽出されなかったが、KPP により抽出された。さらに、IMP (8 mM) と KPP (1 mM) を併用した場合、Mf-p は抽出された。これらの結果から、次のことが推定されている。生理的イオン強度下での抽出において、IMP は細いフィラメントと太いフィラメント間の結合を解離させるが、細いフィラメント-Z 線間の結合および太いフィラメント-コネクチン-Z 線間の結合を解除しないために、アクチンおよびミオシンは筋原線維内に拘束され抽出されなかったと推定された。他方、KPP は細いフィラメントと太いフィラメント間の結合を解離させるばかりでなく、細いフィラメントと Z 線間および太いフィラメントとコネクチン-Z 線間の結合を解除

する能力を有していると推定された。このような IMP と KPP の性質の違いが、高イオン強度下で認められた両者の抽出様式の違いの原因であると考えられている。

これらの知見は、筋原線維の微細構造に対する、PrMP とピロリン酸塩の効果を明らかにしたものであり、微細構造解明のためのツールとして両物質が有用であることを示し、その意義は大きい。

#### V、IMP を添加した加熱ゲルの保水性、物性および官能特性～ピロリン酸塩との比較～

IMP を添加した加熱ゲルを作製した。保水性測定用のゲルは、食肉に 9-36 mM IMP を含む 0.3-0.5 M NaCl 溶液を 9 倍量加えて、0、12 時間抽出して得られたホモジネートを加熱して得られた。物性測定および官能試験用のゲルは、食肉に 0.5 倍量の IMP を含む NaCl 溶液を加えて得られたホモジネートを加熱して得られた (IMP 終濃度 9-36 mM、NaCl 終濃度 0.3 M)。これらのゲルが調べられた結果、IMP の添加が、加熱ゲルの保水性、物性および官能特性を高めることが明らかになった。IMP 添加ゲルが有するこれらの性質は、KPP 添加加熱ゲルに匹敵した。この原因は、IMP による Mf-p 抽出によるものと推定されている。さらに、細いフィラメントと太いフィラメントの間の結合が解離された筋原線維も、保水性および物性を高めるものと推定されている。

以上の知見は、PrMP による加熱ゲルの保水性および物性の向上効果を示したものであり、良質な食肉製品の製造に大いに貢献するものである。PrMP とピロリン酸塩の Mf-p 抽出に対する相乗効果は、弱い収斂性を有し、生体内に存在しないピロリン酸塩の使用量をなるべく少なくした上で高品質のソーセージを製造することにつながり、その産業的意義は大きい。また、PrMP によるアクトミオシンの解離作用にプリン骨格が必要であることや、PrMP と KPP の筋原線維からアクチンおよびミオシンを抽出する様式が異なることなどの知見はアクトミオシンや筋原線維の構造の詳細を明らかにすることに貢献するであろう。

以上のように、本論文に記述された結果は新規性が高く、その考察は優れたものであり、それらは学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって、審査委員一同は、本論文が博士 (応用生命科学) の学位論文として十分な価値を有するものと認め、合格と判定した。