

## 開発魚種及びスケトウダラ筋肉のミオシン軽鎖の電気泳動図の比較\*

牧之段保夫\*\*・藤田眞夫\*\*

Comparison of the Electrophoresis Patterns of Myosin Light Chain  
from the Muscle of Developing Fish Species and Alaska Pollack\*

Yasuo MAKINODAN\*\* and Masao HUIITA\*\*

## Synopsis

Alaska pollack, *Theragra chalcogramma*, is the main fish used in the production of frozen minced fish meat (*reitou surimi*) in Japan. However, because international regulation of fishing for Alaska pollack is becoming rigorous more and more, the Japanese fishing industry is planning to use other fish for *surimi*, as well. It may become necessary to be able to distinguish between raw fish for this new *surimi* from Alaska pollack. Here, we examined whether certain other fishes suitable for use in *surimi* can be distinguished from Alaska pollack by comparison of the SDS-PAGE pattern of myosin light chain prepared from their *surimi*.

The SDS-PAGE patterns of hoki, *Macrurus novaezealandiae*; southern blue whiting, *Micromesistius australis*; Kingklip, *Genypterus capensis*; Nile perch, *Lates niloticus*; Chile jurel, *Trachurus murphyi*; dog shark, *Mustelus griseus*; requiem shark, *Triakis scyllia*; Japanese gray shark, *Hemirhamphys japonica*; and sting-ray, *Dasyatis akajei* were different, especially for myosin light chain-3, from the patterns from Alaska pollack. Accordingly, discrimination between other raw fish in *surimi* and Alaska pollack is possible by comparison of the SDS-PAGE patterns of myosin light chain prepared from the *surimi*.

## 結 言

スケトウダラ（以下スケトウと略す）冷凍すり身は、水産物製品の製造上欠くことのできない重要な原料となっている。昨年（1988年）わが国が生産したスケトウの洋上・陸上両冷凍すり身は合わせて約37万トンであった<sup>1)</sup>。しかし米国領海における漁獲規制は年々厳しさを増しており、来年以降は米国とのジョイント・ベンチャーで製造されるスケトウすり身は皆無になるものと予想されている<sup>1)</sup>。このような状況の中で、わが国によるスケトウ冷凍すり身の生産は今後大幅に減少するものと考えられる<sup>1)</sup>。ちなみに来年の生産高は28万トンと見込まれ

ている<sup>1)</sup>。

スケトウ冷凍すり身生産のこのような厳しい現状に対処するため、現在わが国では新しいすり身原料魚の開発が急がれている。これらの原料魚はスケトウ同様に冷凍すり身として搬入されよう。この場合、冷凍すり身の原料魚が規制対象魚のスケトウとは異なることを示す必要が生じることも考えられる。

すでに関<sup>2)</sup>は魚種の鑑別に魚肉ミオシン軽鎖の電気泳動図の比較が有効であることを示している。そこで本研究では、開発魚の冷凍すり身（または原魚）から調製したミオシン軽鎖の電気泳動図をスケトウのそれと比較することによって、冷凍すり身の原料

\* 本報告の概要は、平成元年7月日本水産学会近畿支部例会（奈良）において発表した。

\*\* 水産学科水産利用学研究室（Lab. Marine Food Technol., Fac. Agr., Kinki Univ., Nara 631, Japan）

魚とスケトウとの鑑別が可能かを検討した。

### 実験材料及び方法

**材料** シロザメ *Mustelus griseus* Pietschmann, ドチザメ *Triakis scyllia* Muller et Henle, エイラクブカ *Hemibranchius japonica* Muller et Henle, 及びアカエイ *Dasyatis akajei* Muller et Henle は活魚を活けめしたもののまたは死後硬直前の鮮魚を大阪魚市場から購入し、頭、内臓を除去した後、供試時まで $-20^{\circ}\text{C}$ で凍結貯蔵した。ミナミダラ *Micromesistius australis*, キングクリップ *Genypterus capensis* Smith, ナイルパーチ *Lates niloticus* Linnaeus, チリマアジ *Trachurus murphyi*, ホキ *Macruronus novaezelandiae*, 及びスケトウダラ *Theragra chalcogramma* Pallas は株式会社極洋から提供された冷凍魚を用いた。分子量測定用標準タンパク質キットはファルマシア社製を、また他の試薬はキシダ化学社製の特級あるいは生化学用試薬を用いた。

**各種筋原線維タンパク質の調製法** 筋原線維タンパク質は常盤<sup>3)</sup>の、ミオシンは高士ら<sup>4)</sup>の、ミオシン軽鎖は関ら<sup>5)</sup>の、アクチンは関ら<sup>6)</sup>の、またトロポミオシンは関ら<sup>7)</sup>の方法により調製した。

**電気泳動用タンパク質試料液の調製** 10 ml 容量付試験管にタンパク質溶液1.0 ml, 0.5 M トリス塩酸緩衝液 (pH 6.8) 1.2 ml, SDS 0.1 g, 及び2-メルカプトエタノール0.1 ml を入れ、沸騰水中で3分間加熱した。冷却後尿素4.8 g を加え、蒸留水で全量を10.0 ml とし試料液とした。

**SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)** アトー株のミニスラブ電気泳動装置を用い、Laemmli<sup>8)</sup>の方法によった。泳動後のタンパク質の染色にはコマシーブリアントブルーRを用いた。

### 結果及び考察

まず、スケトウ筋肉から調製したミオシン軽鎖標品について SDS-PAGE を行ない、軽鎖を同定した。同定の一助として分子量測定用標準タンパク質、調製アクチン標品及び調製トロポニン標品をも同時に電気泳動させた (Fig. 1)。SDS-PAGE で魚の普通肉のミオシン軽鎖は魚種によらず3本 (LC<sub>1</sub>, LC<sub>2</sub> 及び LC<sub>3</sub>) のバンドを示すことが報告されているが<sup>2)</sup>、本標品には4本のバンドが認められた。分子量及びトロポミオシン標品のバンドからすると、移動度の最も小さい分子量約3.4万のバンドは標品中に混在するトロポミオシンのバンドと同定できる。従って

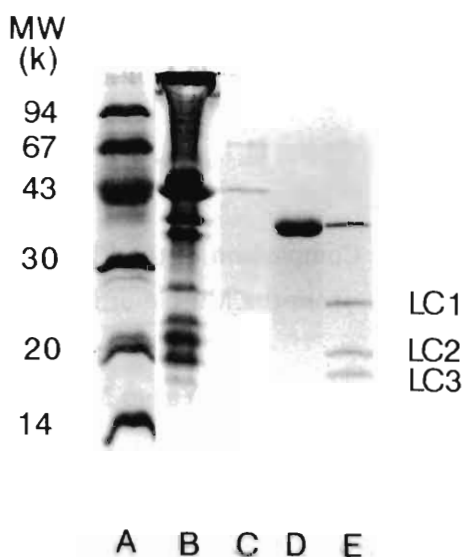


Fig. 1. SDS PAGE patterns of myofibrillar proteins prepared from Alaska pollack.

A, Standard protein; B, myofibrils; C, actin; D, tropomyosin, E, myosin light chain. The concentration of polyacrylamide was 15%.

分子量2万前後に認められる残り3本のバンドがミオシン軽鎖を示すものと考えられる。このような軽鎖の泳動パターンは従来の報告と一致するものである。なお、分子量2万付近の筋原線維タンパク質としてはトロポニンI及びトロポニンCがあるが、これらは軽鎖調製過程で除かれ<sup>5)</sup>、もし軽鎖標品中に少量混在したとしてもその染色は極く微弱で、軽鎖の同定を乱すものではないと思われる。以上から、われわれの調製したミオシン軽鎖標品は精製標品ではないが、これを用いても軽鎖は同定できると考え、以下このような標品を用いて実験を行った。なお、筋原線維の泳動図には多くのバンドが認められるが、ミオシン軽鎖は濃く染色されており筋原線維を用いてもその識別は不可能ではない。

すでに述べたように、開発魚は冷凍すり身として搬入されると思われる。この場合、原料魚の冷凍すり身への加工がミオシン軽鎖の電気泳動図に影響を及ぼすかどうかを確かめておく必要がある。このことに関してすでに関<sup>2)</sup>は、スケトウ肉及びスケトウ冷凍すり身から調製したアクトミオシンの電気泳動図は酷似していることを報告している。そこで、筋原線維及び軽鎖標品についてこのことを検討した。Fig. 2はスケトウ冷凍魚及び冷凍すり身から筋原線

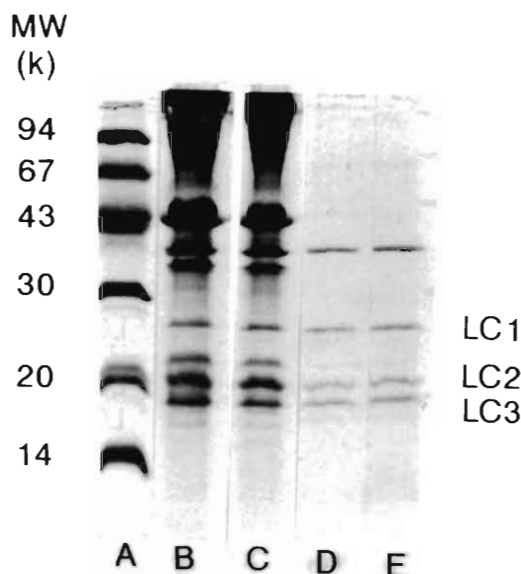


Fig. 2. Comparison of SDS-PAGE patterns of myofibrillar proteins prepared from Alaska pollack meat and its *surimi* (frozen minced meat).

A. Standard protein; B. fish meat myofibrils; C. *surimi* myofibrils; D. fish meat myosin light chain; E. *surimi* myosin light chain.

The concentration of polyacrylamide was 15%.

維及びミオシン軽鎖を調製し、それらのSDS-PAGE図を比較したものである。筋原線維及びミオシン軽鎖標品のいずれの電気泳動図も、冷凍魚と冷凍すり身とで全く相違しなかった。この結果は、魚種の鑑別材料には冷凍魚あるいは冷凍すり身のいずれをも供試できることを示している。

以上の結果に基づいて、スケトウと各種開発魚のミオシン軽鎖のSDS-PAGE図を比較した。Fig. 3に示したように開発魚のミオシン軽鎖標品には、スケトウのそれと異なり、分子量3.4万以上の各種タンパク質バンドが認められた。しかし、これらは軽鎖と比較して高分子量を示すことから、ミオシン軽鎖の識別を邪魔するものではない。スケトウと比較して、開発魚のLC<sub>1</sub>はいずれも分子量が大きく、またチリマアジを除いてLC<sub>3</sub>の分子量は小さかった。チリマアジではLC<sub>2</sub>とLC<sub>3</sub>の分子量が近似していたが、同様の傾向はマアジでも認められ(未発表)、また落合及び橋本<sup>9)</sup>もこれを認めている。近縁種間の軽鎖泳動図の比較は遺伝学的側面から興味ある課

題と思われる。以上のように、供試した開発魚(の冷凍すり身)とスケトウ(の冷凍すり身)とはミオシン軽鎖のSDS-PAGE図を比較することで鑑別は可能である。なお、スケトウの、特にLC<sub>2</sub>の移動度は実験によっては少し異なるようであった。従って泳動図の比較を行なうときには、その都度スケトウ試料を同時に泳動させることが必要と思われる。

次に近海で漁獲された数種の板鰓類について上記開発魚と同様にSDS-PAGEを行なった。なお、板鰓類では本調製法でミオシン軽鎖を得ることが難しかったので、ミオシン(精製はしていない)を調製し、そのSDS-PAGE図をスケトウのそれと比較した(Fig. 4)。このミオシン標品にはアクチン、トロポミオシンなどが混在していたが、分子量2万前後にはスケトウでトロポニン-Iと思われるバンドが認められたほかは混在タンパク質のバンドは無く、これまでの実験結果から、ミオシン軽鎖の識別は可能と考えた。板鰓類ではミオシン軽鎖を示すと考えられる分子量の位置に計4本のバンドが認められた。加納ら<sup>9)</sup>のドチザメミオシンについての報告によると、LC<sub>3</sub>の分子量は約1.4万である。われわれの得た結果では分子量1.5万近辺に1本のバンド(染色強度は薄い)が識別できる。このバンドがLC<sub>3</sub>に相当すると考えられる。板鰓類のLC<sub>3</sub>の分子量はスケトウのそれに比べて明らかに小さかった。分子量2万付近に認められる1本のバンドはLC<sub>2</sub>であり、スケトウのものと大差なかった。さて、始めにも述べたが、魚類普通肉のミオシン軽鎖はSDS-PAGEで3本のバンドを示すと言われ、今回の開発魚についての結果もそうであった。この事実からすると、板鰓類のLC<sub>1</sub>は分子量2万5~6千付近に存在する2本のバンドの内のいずれかと考えられる。いずれにしても供試した板鰓類のLC<sub>1</sub>の分子量はスケトウのそれとほとんど相違しなかった。なお、分子量2万5~6千付近の2本のバンドは板鰓類に共通して認められたが、これが板鰓類特有の軽鎖組成を示すのかについては今後精製ミオシン軽鎖標品を用いて解明する必要があると思われる。

上記各種魚種の普通筋で得られたミオシン軽鎖のSDS-PAGE図を一括して模式的に示せばFig. 5のとおりである。スケトウと各魚種の泳動図、特にLC<sub>3</sub>の移動度には明らかな相違が認められる。従って、このような電気泳動パターンを比較することにより、スケトウと他の魚種、ひいては冷凍すり身の原料魚種をスケトウと識別することが可能である。

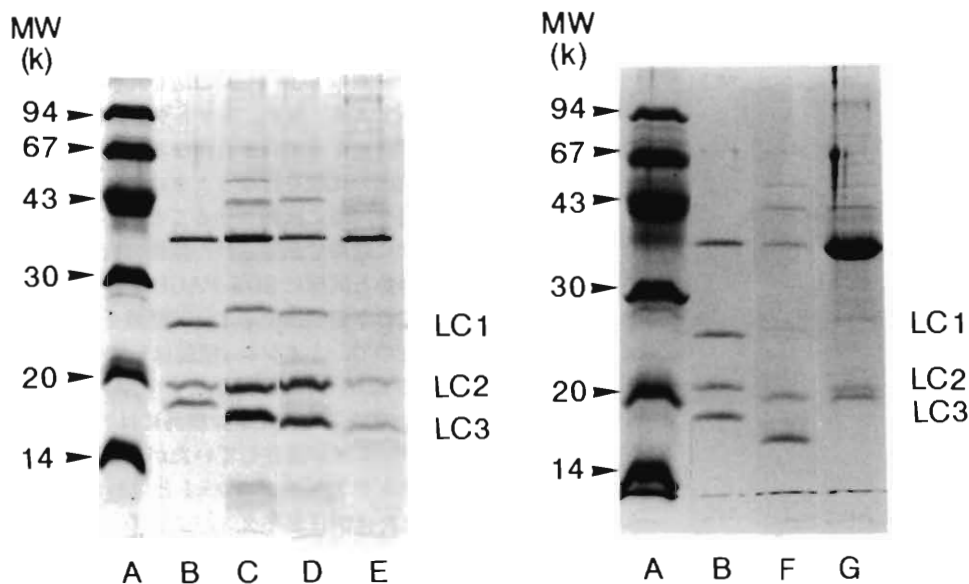


Fig. 3. Comparison of SDS-PAGE patterns of myosin light chain of Alaska pollack and fishes to be developed for use in *surimi*.

A. Standard protein; B. Alaska pollack; C. hoki; D. southern blue whiting; E. kingklip; F. Nile perch; G. Chile jurel.

The concentration of polyacrylamide was 15%.

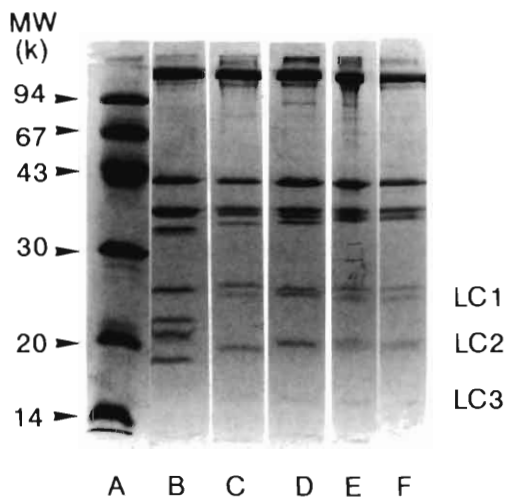


Fig. 4. Comparison of SDS-PAGE patterns of myosin light chain of Alaska pollack and elasmobranchs.

Preparations of myosin were used instead of myosin light chain.

A. Standard protein; B. Alaska pollack; C. dog shark; D. requiem shark; E. Japanese gray shark; F. sting-ray. The concentration of polyacrylamide was 15%.

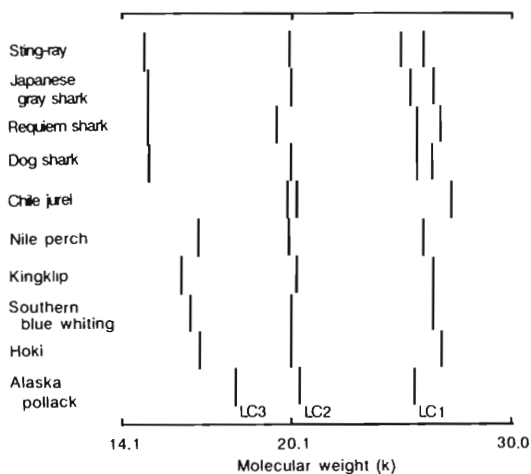


Fig. 5. Diagram of SDS-PAGE patterns of myosin light chain of fishes.

## 謝 辞

この研究を行なうに当たり、本学水産利用学専攻学生、小山康弘及び加地祐毅両君の協力を得ました。感謝の意を表します。また開発魚のお世話を頂いた株式会社極洋の西出亨及び葛西英一両氏に心からお礼申し上げます。

## 文 献

- 1) 有岡正浩：水ねり技研誌，14，385-393(1989)
- 2) 関伸夫：“水産食品の鑑定”（日本水産学会編）78-92，恒星社厚生閣，東京（1979）
- 3) 常磐知宣：“水産生物化学・食品学実験書”（斉藤恒行・内山均・梅本滋・河端俊治編）170-178，恒星社厚生閣，東京（1974）
- 4) 高士令二・新井健一・斉藤恒行：日水誌，36，165-168（1970）
- 5) 関伸夫・高安道郎・国領祐：日水誌，46，1001-1006（1980）
- 6) 関伸夫・北尾勝・今野久仁彦・新井健一：日水誌，39，1211-1219（1973）
- 7) 関伸夫・今野久仁彦：日水誌，41，1135-1141（1975）
- 8) J.K. LAEMMLI：Nature, 227, 680-685（1970）
- 9) 落合芳博・橋本周久：水ねり技研誌，14，241-250（1988）
- 10) 加納哲・渡部終五・橋本周久：日水誌，49，757-763（1983）