

## 熱変性したコイのアクトミオシンに対する 内在性トランスグルタミナーゼの影響

塚正泰之, 三宅康賀, 安藤正史, 牧之段保夫

(1999年7月16日受付, 2000年1月5日受理)

### Effect of Endogenous Transglutaminase on Heat-denatured Carp Actomyosin

Yasuyuki Tsukamasa,\* Yasuyoshi Miyake,\*  
Masashi Ando,\* and Yasuo Makinodan\*

To clarify the effect of heat-stability of actomyosin (AM) on the setting induced by endogenous transglutaminase (TGase), AM prepared from carp which is classified as a hard setting group was pre-heated at 40°C until 90 min and then incubated with TGase extracted from the same individual at 25°C. The rates of reduction in the amount of myosin heavy chain (HC) monomer and of formation of HC polymers increased with an extension in heat treatment of AM. However, the polymerization rate of HC monomer was slightly reduced by the addition of 5% sucrose which is a protectant against thermal denaturation of AM at pre-heating at 40°C. Since heat-denaturation of AM promoted polymerization of HC monomer, heat-stability of AM is suggested to relate to setting induced by TGase.

キーワード: コイ, トランスグルタミナーゼ, 坐り, アクトミオシン, 変性

魚肉における坐りの程度は魚種により著しく異なる。<sup>1)</sup> マイワシ,<sup>1-4)</sup> スケトウダラ,<sup>1,2,5)</sup> ホキ<sup>6)</sup>などの数魚種では, 坐りが非常に早く進行することが知られている。坐り過程における物性変化はタンパク質間に新たな架橋形成によるネットワーク構造が構築されたことを示している。

関ら<sup>7)</sup>によって魚肉中に存在することが明らかにされたトランスグルタミナーゼ (TGase, EC 2.3.2.13) は, タンパク質 (主にミオシン重鎖 (HC)) 間に  $\epsilon$ -( $\gamma$ -glutamyl) lysine (イソペプチド) 結合による架橋を形成することから, 坐りに関係すると考えられる。しかし, TGase の活性を阻害しても坐りが認められる場合があり,<sup>8,9)</sup> 坐りに関与する機構は単一ではないと考えられている。坐りゲル中の HC 間にイソペプチド架橋が形成されている場合, 坐りゲルを SDS-PAGE 分析することにより HC の多量体が認められることから, 坐り現象への TGase の関与は容易に調べることができる。<sup>4,7,10,11)</sup>

HC の多量化を伴う坐りの速さも魚種により著しく相違し, マイワシでは 20°C で 20 分間保持するだけでゲル化と HC の多量化が起こるのに対して, マサバやコイでは 30°C で 2 時間保持してもゲル化せず, HC の多量化もほとんど認められない。<sup>12)</sup> また, TGase を活性

化させるカルシウムをマサバ肉に加えると 30°C-2 時間でゲル化と HC の多量化がマイワシと同様に認められるようになる。<sup>12)</sup> 一方, コイ肉にカルシウムを添加し, 30°C で 2 時間保持してもゲル化せず, HC の多量化もほとんど認められないことから,<sup>12)</sup> コイは極めて坐りにくい魚種であるといえる。

Nozawa *et al.*<sup>13)</sup> は, コイを含む様々な魚介類筋肉から TGase を部分精製し, 基質となるカゼインおよびモノダンシルカダベリン (MDC) に対する各 TGase の反応性を反応速度論的に解析しており, 他の魚介類筋肉由来の TGase と比較してコイ TGase のカゼインに対する  $K_m$  値はそれほど変わらないのに対し, MDC に対する  $K_m$  値は著しく高いと報告しており, 魚介類筋肉由来の TGase であっても由来によって基質に対する特異性が著しく異なることを示している。

一方, Kishi *et al.*<sup>14)</sup> はコイ TGase を精製し, カゼインとミオシン B を基質とした場合の MDC の取り込み速度を調べ, ミオシン B への取り込み速度がカゼインへのそれよりも低いことを明らかにしている。また, Araki and Seki<sup>15)</sup> は, コイのアクトミオシン (AM) は他の魚種の AM よりも TGase の作用を受けにくいことを報告している。さらに, Maruyama *et al.*<sup>16)</sup> は, コイ

\* 近畿大学農学部水産学科 (Department of Fisheries, Faculty of Agriculture, Kinki University, Nakamachi, Nara 631-8505, Japan).

ミオシンには MDC を取り込める Gln 残基の数がホッケやニジマスのそれより少ないと報告している。これらの報告とコイで HC の多量化を伴う坐りが起こりにくいという事実とを照らし合わせると、そのような坐りが起こりにくい原因が HC の多量化を触媒する TGase 側だけにあるのではなく、むしろ基質となるミオシン側が重要であると考えられる。

魚肉 AM の熱安定性が、 $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性を指標として数多く調べられ、魚種により著しい開きがあることが知られている。<sup>17)</sup> コイ AM は魚類の中では比較的熱安定性が高く、坐りやすいスケトウダラやマイワシの AM の熱安定性は低いとされていることから、HC の多量化を伴う坐りを起こしやすい魚種では、低温、短時間に AM が変性するために Gln 残基または Lys 残基が分子表面に現れ、TGase の作用を受けやすくなっている可能性が考えられる。

本研究では、坐りにくいコイの AM を熱変性させた上で、TGase を作用させることにより、コイ肉が HC の多量化を伴う坐りを起こしにくい原因を解明しようとした。

### 実験方法

**供試魚** コイ (*Cyprinus carpio*) の活魚を用いた。

**かまぼこゲルの調製** コイの背部普通筋(タンパク質濃度 26.6%) を採取し、NaOH で pH 7.0 に調整し、肉重量に対して 20% の冷水と、その合計重量の 2.5% の食塩を加えて播潰し肉糊を調製した。ガラス製円筒容器(内径 1.6 cm, 高さ 1.6 cm) に充填後、プラスチックフィルムで密封し、25°C で 2, 4, 6, 24 時間または 40°C で 0.5, 1, 2, 4, 6 時間坐らせた後、85°C で 30 分間の 2 段加熱を行った。対照として、坐らせずに直接 85°C で 30 分間加熱したものを作成した。

**物性の測定** 直径 5 mm の円筒形プランジャーを用いて押し込み速度 6 cm/min で破断試験を行い、破断強度と破断凹みを測定し、3 検体の平均値を求めた。

**アクトミオシンの調製** コイの背部普通筋を採取し、10 mM NaCl, 5 mM EDTA, 3 mM ジチオスレイトール(DTT) を含む 0.02 M リン酸緩衝液 (pH 7.5) を肉量の 4 倍量加えてホモジナイズ後、3000×g で 10 分間遠心分離し、上澄を除去する操作を 4 回繰り返して、筋原線維を調製した。KCl 存在下では NaCl 存在下に比べて TGase の作用が弱いと報告されており、<sup>18)</sup> かまぼこ中の製造条件に近づける意味もあって、NaCl (終濃度 0.45 M) を筋原線維に加えて AM を抽出後、希釈沈殿し、NaCl の終濃度が 0.45 M となるように 3 M NaCl を加えて AM を再溶解した。

**TGase 粗酵素の調製** コイの背部普通筋に、10 mM

NaCl, 5 mM EDTA, 3 mM DTT を含む 0.02 M リン酸緩衝液 (pH 7.5) を肉量の 5 倍量加えてホモジナイズ後、透析チューブに詰め、ポリエチレングリコールで濃縮したものを粗酵素とした。

**TGase の部分精製** コイの背部普通筋に、10 mM NaCl, 25 mM EDTA, 5 mM DTT を含む 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) (緩衝液 A) を肉量の 5 倍量加えてホモジナイズ後、16000×g で 30 分間遠心分離した。得られた上澄の 30–60% 硫酸飽和沈殿画分を集め、少量の緩衝液 A で溶解後、緩衝液 A に対して一晚透析した。緩衝液 A で平衡化した Q-Sepharose (3×20 cm) を用い、0.01–0.3 M の NaCl 直線濃度勾配をもつ緩衝液 A で分離し、TGase 活性画分を集めた。同画分を緩衝液 A に対して透析後、ポリエチレングリコールによって濃縮したものを部分精製 TGase とした。

**タンパク質濃度の測定** ウシ血清アルブミンを標準タンパク質として、肉のタンパク質濃度は 0.1 N NaOH で溶解後にビウレット法<sup>19)</sup>で、酵素液および AM のタンパク質濃度は色素結合法<sup>20)</sup>により測定した。

**TGase 活性の測定** Takagi *et al.* の方法<sup>21)</sup>に準じ、N', N ジメチルカゼインと MDC を基質として、25°C で TGase 活性を測定した。TGase 活性 1 unit は、1 分間に 1 nmol の MDC をカゼインに取り込ませる活性とした。

**TGase 粗酵素と熱変性 AM との反応** AM の熱変性程度の違いによる TGase との反応性を調べるため、AM だけを 40°C で 0, 30, 60, 90 分間加熱後急冷したものについて TGase 粗酵素との反応性を比較した。反応時の終濃度で 4 mg/ml AM, 0.45 M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5),  $2.03 \times 10^{-2}$  unit/ml の TGase 粗酵素を含む反応混液を 25°C で 0, 6, 12, 18, 24 時間保持後、SDS 処理液(添加後の終濃度が 2% SDS, 2% 2-メルカプトエタノール, 8 M 尿素, 50 mM Tris-HCl (pH 6.8)) を加え、100°C で 2 分間加熱して、酵素反応を停止させ、一晚攪拌した。また、ショ糖添加による熱変性抑制試験として、AM 加熱時に終濃度で 5% のショ糖を加えたものについても同様の条件で TGase 粗酵素と反応させた。

**部分精製 TGase と熱変性 AM との反応** ロイペプチン (0.1 mM) を加えた上で(1) 40°C で 0, 30, 60, 90 分間加熱したもの(2) 30°C, 40°C, 50°C で 60 分間加熱したものについて、終濃度で 1 mg/ml AM, 0.45 M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5),  $2.03 \times 10^{-2}$  unit/ml の部分精製 TGase を含む反応混液を調製し、粗酵素を用いた場合と同様に処理し、3.75 μg/レーンずつ SDS-PAGE 分析に供した。また、反応に及ぼす AM 濃度の影響を調べるため、40°C で 60 分間加熱した AM の終濃度を 2, 3,

4 mg/ml とし, AM 1 mg 当りの酵素活性を  $2.03 \times 10^{-2}$  unit に保って 25°C で坐らせた。

**SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) 分析** 服部と辰巳の方法<sup>22)</sup>に従い, 0.5% アガロースを含む 2.5% ポリアクリルアミドゲルを用いて SDS 処理した AM を分析した。SDS-PAGE 上のタンパク質サブユニット組成は, 泳動ゲルの画像をスキャナー GT-5500WINS (エプソン社) により赤色光源を使ってパーソナルコンピュータに取り込み, 画像解析ソフト NIHimage の Windows 版である Scion image (Scion 社) によって各バンドの染色強度を測定し, 総染色強度に対する各バンドの比率を求めた。泳動ゲル中の総染色強度が減少する場合は, SDS-尿素混液に可溶化した HC の多量体がゲル中に侵入できないために起こったものと推定し, その量を計算によって求めた。

### 結果および考察

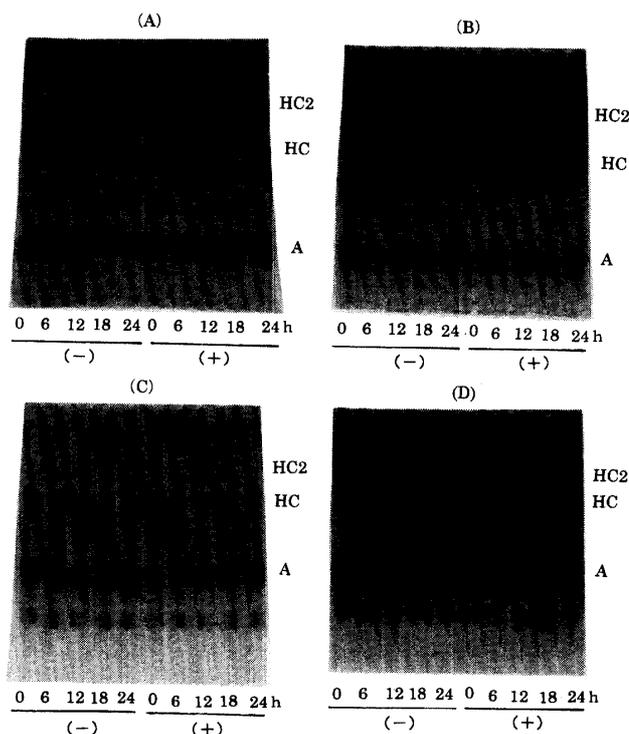
**かまぼこの物性および SDS-PAGE パターン** コイの落とし身を 25°C または 40°C で加温して得たかまぼこの破断強度および破断凹みの経時変化を調べた結果, 25°C では破断強度および破断凹みは 24 時間までほぼ直線的な増加を示したが, 40°C では破断強度および破断凹みともに 1 時間でピークとなり, その後 6 時間まで両者ともに減少した。この結果は, よく知られた事実であるため図示しなかった。また, かまぼこの SDS-PAGE パターン (図示せず) についても, 25°C 坐りの時間が長くなるにしたがい, ミオシン重鎖二量体の増加が認められ, 24 時間後には三量体の形成も確認されたことから HC の多量化を伴う坐りが進行したものと考えられるが, HC 三量体以上の高分子成分が 24 時間後によく確認できる程度であったことから, 25°C における HC の多量化を伴う坐りは起こりにくいといえる。

**TGase の熱安定性** コイ粗酵素液 (8.93 mg/ml) 中の TGase の 40°C における熱安定性を測定した。40°C で 5, 10, 30 分間加熱後に急冷し, 25°C で活性を測定した。処理時間を  $t$ , 変性前後の相対活性をそれぞれ  $C_0$ ,  $C_t$  として, 変性速度定数 ( $K_D$ ) を  $K_D = (\ln C_0 - \ln C_t) \cdot 1/t$  で表すと,  $K_D$  は  $4.98 \times 10^{-4}/\text{sec}$  となり, 30 分後の残存活性は 35.5% であった。なお, 未変性 TGase の比活性は  $2.03 \times 10^{-2} \sim 3.10 \times 10^{-2}$  unit/mg であった。

Kishi *et al.*,<sup>14)</sup> Araki and Seki<sup>15)</sup> はコイ肉中の TGase 全活性を調べ, その値は他の魚種の TGase 全活性と比較して決して低くなく, むしろ高い部類に属することを報告している。また, Araki and Seki<sup>15)</sup> は, コイの TGase をコイを含む数種魚肉 AM に作用させ, 同じ条件下でも, HC 多量体の形成速度に著しい違いがあり,

コイ AM に対しては TGase が作用しにくいことを認めている。コイの HC は TGase の基質になりにくいとの報告<sup>15)</sup>があるが, AM の熱安定性との関係は明らかでない。そこで, 熱変性 AM に対する TGase の影響を調べた。

**40°C で熱変性させた AM に対する内在性 TGase (粗酵素) の影響** 40°C で所定の時間熱変性させたコイの AM (4 mg/ml) に対して同じコイから抽出した TGase の粗酵素を添加し, 25°C で 24 時間まで 6 時間間隔で坐らせたものを 5 $\mu\text{g}$ /レーンずつ SDS-PAGE 分析した結果を Fig. 1 に示した。未処理区 (A) では HC 二量体は 24 時間後まで徐々に増加し, HC 三量体もまた 24 時間後にわずかに観察された。一方, 40°C 加熱区では, 30 分間, 60 分間, 90 分間と処理時間が長くなるにしたがい HC 三量体以上の高分子成分が坐りの時間に応じて認められるようになった。しかし, HC



**Fig. 1.** SDS-PAGE patterns of actomyosin (AM) incubated at 25°C with crude endogenous transglutaminase.

AM was previously heated at 40°C for 0 (A), 30 (B), 60 (C), and 90 (D) min in the presence (+) or absence (-) of 5% sucrose. The heated AM (4 mg/ml) was incubated at 25°C for 0, 6, 12, 18, and 24 h with crude endogenous transglutaminase ( $2.03 \times 10^{-2}$  unit/ml). Polyacrylamide gels were prepared with 2.5% acrylamide and 0.5% agarose. HC2, myosin heavy chain dimer; HC, myosin heavy chain monomer; A, actin.

よりも移動度の大きい成分も 25°C 坐り中に新たに認められるようになり, 40°C 処理時間が長いほど生成量が大きくなっていった。したがって, HC は多量化するとともに低分子化しているものと考えられる。この原因としては, TGase 粗酵素液中に共存すると思われるカテプシン B<sup>23)</sup> やカルパイン<sup>24-28)</sup> の他, 筋原線維に強く結合したセリンエンドペプチダーゼ<sup>29)</sup> による HC の分解が考えられる。AM は 40°C で変性処理されており, 加熱時間が長い処理区ほど分解産物が多く認められることから処理中に筋原線維結合型のセリンエンドペプチダーゼが作用していると考えられる。また, 25°C での加温中にはカテプシン B<sup>23)</sup> や TGase と同様にカルシウムで活性化されるカルパイン<sup>24-28)</sup> が作用すると考えられる。熱変性したコイミオシンはカルパインの他, 様々なエンドペプチダーゼの作用を受けやすくなると報告<sup>30)</sup> されており, 変性が進行した AM ほど分解しやすくなっているものと考えられる。したがって, 本実験条件では熱変性した AM に対して TGase だけでなく内在性エンドペプチダーゼが同時に作用していたことになり, AM の熱変性だけの影響とはいえない面がある。しかし, AM の変性を抑制するためにシヨ糖を添加して 40°C 加熱した AM に対する TGase の作用を調べた結果によると (Fig. 1), シヨ糖を添加することで各時間区ともに HC の多量体の生成が抑制されており, 特に 60 分間および 90 分間加熱処理区では HC 三量体以上の多量体の生成が抑制されていたことから, AM の変性によって TGase による HC の多量化が進行すると考えられる。

ロイペプチンを添加して 40°C で熱変性させた AM に対する部分精製 TGase の影響 AM に粗酵素を添加した条件では内在性の TGase 以外に内在性のエンドペプチダーゼが影響することが判明した。そこで 40°C 変性処理時および 25°C 反応時の筋原線維結合型セリンエンドペプチダーゼ<sup>29)</sup> による HC 分解を抑制するため, AM にセリンおよびシステインエンドペプチダーゼの阻害剤であるロイペプチンを 0.1 mM 加えて熱処理した。また, TGase についても, カテプシン B<sup>23)</sup> またはカルパイン<sup>24-28)</sup> (ともにシステインエンドペプチダーゼ) の混入を防ぐために, 硫安分画および Q-Sepharose による陰イオン交換クロマトグラフィーにより部分精製 (精製度 57 倍) した TGase を用いた。さらに TGase 添加時にもロイペプチンを終濃度で 0.1 mM となるように添加した。なお, 0.1 mM ロイペプチン存在下でも TGase が 90% 以上の活性を保つことを確認した。また, 本実験系において HC の分解物と思われる低分子成分の生成は認められなかった。

#### 1. 変性温度および変性時間と HC 多量化との関係

40°C における熱処理時間と HC の多量化の関係を

Fig. 2((A), (D)~(F)) に示した。変性時間が長くなるほど HC 単量体量の減少が早くなり, HC 多量体の増加が促進された。また, 変性が進むほど HC 二量体の形成量は少なくなり, HC 三量体以上の多量化の形成が進んだ。この結果は, 粗酵素液を用いた実験 (Fig. 1) と類似していた。つぎに, 変性時間を 60 分間と一定にし, 温度を 30, 40, 50°C として変性温度の影響を調べた結果を Fig. 2((A)~(C), (E)) に示した。この場合も変性温度が上昇するほど HC 単量体の減少速度が速くなり, HC 多量体の形成速度が速まることが確認された。また, HC 二量体は変性温度が高くなるほど, 認められなくなり, それよりも高分子量の成分が形成されることを示した。

#### 2. AM 濃度と多量化の関係

本実験はかまぼこゲルよりも希薄なタンパク質濃度で行っているため, タンパク質濃度の影響についても調べた (Fig. 3)。変性条件は同じ 40°C-60 分間であるが, タンパク質濃度が高くなるに従い, HC の多量化が抑制されるとともに, HC 二量体の蓄積が認められた。したがって, 高タンパク質濃度のかまぼこゲルでは, 多量化の進行がこれよりも遅くなることがあると思われる。タ

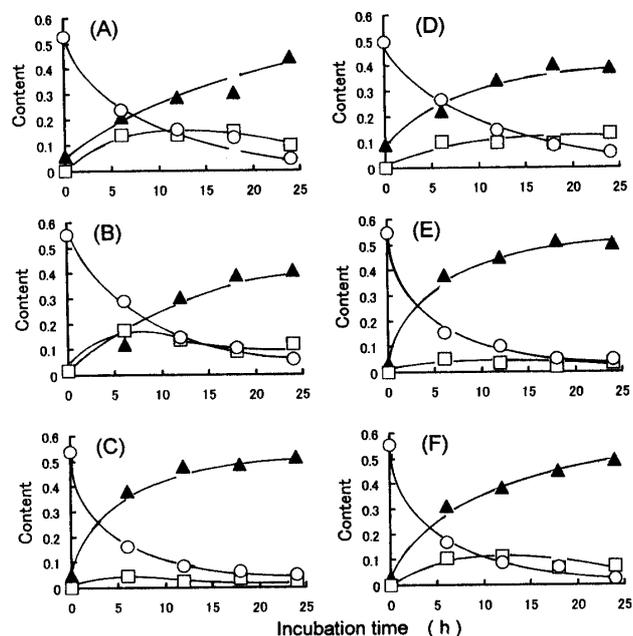


Fig. 2. Changes in the amount of myosin heavy chain (HC) during incubation at 25°C with partially purified endogenous transglutaminase.

Actomyosin which was previously heated at 30°C (B), 40°C (E), and 50°C (C) for 60 min or at 40°C for 30 min (D) and 90 min (F) in the presence of leupeptin (0.1 mM) or not heated (A) was incubated at 25°C. (○), HC monomer; (□), HC dimer; (▲), >HC trimer.

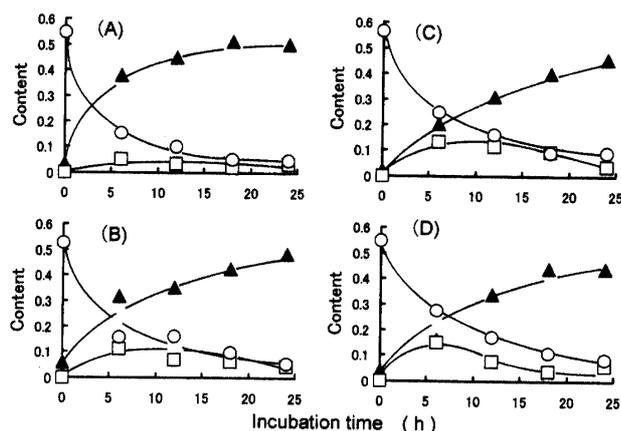


Fig. 3. Effect of protein concentration of heat-denatured actomyosin on the amount of myosin heavy chain (HC) during incubation at 25°C with partially purified endogenous transglutaminase.

One (A), 2 (B), 3 (C), and 4 (D) mg/ml of actomyosin which was previously heated at 40°C for 60 min in the presence of leupeptin (0.1 mM) was incubated with partially purified endogenous transglutaminase ( $2.03 \times 10^{-2}$  unit/mg actomyosin) at 25°C for 0, 6, 12, 18, and 24 h. (○), HC monomer; (□), HC dimer; (▲), >HC trimer.

ンパク質濃度が高くなると多量化の進行が遅れる理由としては、AMゾルの流動性が低下し、酵素-基質複体の形成速度が低下することや、タンパク質の変性速度が低下することなどが考えられる。また、粗酵素液を用いた実験 (Fig. 1) では、Fig. 3(D)と同じ4 mg/mlのAMを用い、TGase活性は四分の一であったことから、本実験系と多量化速度に著しい違いがあったものと思われる。

Seki *et al.*<sup>31)</sup>は、熱変性させたスケトウダラ冷凍すり身のHCの多量化を伴う坐りの起こりやすさを調べ、変性が進んだすり身ほどHCの多量化が起こりにくくなることを確認した。しかし、熱処理により低下した活性に相当するTGaseを加えるとHCの多量化能が回復した (ただし、筋原線維が変性しているため、ゲル形成能は回復しない) ことから、熱変性によりHCの多量化を伴う坐りが起こりにくくなる原因がTGaseの失活にあるとしている。しかし、本研究で認めたように、AMの変性はTGaseによるHC架橋形成速度を促進させるのである。スケトウダラのように元来HC多量化反応が進みやすい魚種では、低温短時間でTGaseとの高い反応性を示すだけの筋原線維タンパク質の変性が進行するために、熱変性処理の影響が認められなかったと推測される。

本研究では40°Cで変性させたコイAMに対してコイTGaseは作用しやすくなることが判明した。しかし、実際のかまぼこゲルでは40°Cで坐らせても三量体以上のHCの多量体は認められず、坐り時間を長くしてもHC多量体は形成されない。これは、40°Cでは基質となるAMの変性と同時にTGase自体が失活していくことと、HCを分解する種々のエンドペプチダーゼ<sup>23-29)</sup>がHCの熱変性と反応温度の上昇によって活性が高まり、TGaseよりも先にHCを低分子化するからであろうと思われる。熱安定性試験の結果から、コイTGaseは40°Cで30分間加熱しても約36%の活性を保持している。この事実からするとすり身を40°Cで坐らせている間にすり身タンパク質はTGaseの作用を受けていても不思議ではない。今回用いたAM溶液系における実験で、AM濃度が高いほど多量化しにくくなる傾向が認められたことから、すり身のような高タンパク質濃度系ではTGaseは働きにくいのかも知れない。この点に関しては、一層の検討が必要と思われる。

## 文 献

- 1) 志水 寛, 町田 律, 竹並誠一: 魚肉肉糊のゲル形成特性に見られる魚種特異性. 日本誌, 47, 95-104 (1981).
- 2) 永峰文洋, 福田 裕, 松原 久, 石川 哲: サケ, スケトウダラおよびマイワシの落とし身の加熱温度・時間とゲル化. 水産わり製品技術研究会誌, 12, 162-171 (1986).
- 3) 塚正泰之, 志水 寛: ニシン目およびサケ目魚類筋肉のゲル形成特性. 日本誌, 55, 529-534 (1989).
- 4) 塚正泰之, 志水 寛: マイワシ肉とマサバ肉の坐り特性. 日本誌, 56, 1105-1112 (1990).
- 5) 沼倉忠弘, 関 伸夫, 木村郁夫, 豊田恭平, 藤田孝夫, 高間浩蔵, 新井健一: 坐りによる肉糊のゲル形成とミオシンの交差結合反応. 日本誌, 51, 1559-1565 (1985).
- 6) 李 南赫, 関 伸夫, 加藤 登, 中川則和, 照井正三郎, 新井健一: ホキの肉糊の坐りおよび加熱によるゲル形成とミオシン重鎖の変化. 日本誌, 56, 2093-2101 (1990).
- 7) 関 伸夫, 宇野秀樹, 李 南赫, 木村郁夫, 豊田恭平, 藤田孝夫, 新井健一: スケトウダラ筋肉およびすり身中のトランスグルタミナーゼ活性とミオシンBとの反応. 日本誌, 56, 125-132 (1990).
- 8) E. Niwa, T. Suzumura, A. AKM Nowsad, and S. Kanoh: Setting of actomyosin paste containing few amount of transglutaminase. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 59, 2043-2046 (1993).
- 9) A. AKM Nowsad, S. Kanoh, and E. Niwa: Setting of transglutaminase-free actomyosin paste prepared from Alaska pollack surimi. *Fisheries Sci.*, 60, 295-297 (1994).
- 10) I. Kimura, M. Seguro, K. Toyoda, N. Seki, K. Arai, and T. Fujita: A study on the cross-linking reaction of myosin in kamaboko "suwari" gels. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 57, 1389-1396 (1991).
- 11) Y. Tsukamasa, K. Sato, Y. Shimizu, C. Imai, M. Sugiyama, Y. Minegishi, and M. Kawabata:  $\epsilon$ -( $\gamma$ -glutamyl)lysine cross-link formation in sardine myosin sol during setting at 25°C. *J. Food Sci.*, 58, 785-787 (1993).
- 12) 塚正泰之, 志水 寛: トランスグルタミナーゼによる坐りに関するいくつかの要因. 日本誌, 57, 535-540 (1991).

- 13) H. Nozawa, S. Mamegoshi, and N. Seki: Partial purification and characterization of six transglutaminases from ordinary muscle of various fishes and marine invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol.*, **118B**, 313-317 (1997).
- 14) H. Kishi, H. Nozawa, and N. Seki: Reactivity of muscle transglutaminase on carp myofibrils and myosin B. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **57**, 1203-1210 (1991).
- 15) H. Araki and N. Seki: Comparison of reactivity of transglutaminase to various fish actomyosins. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **59**, 711-716 (1993).
- 16) N. Maruyama, H. Nozawa, I. Kimura, M. Satake, and N. Seki: Transglutaminase-induced polymerization of a mixture of different fish myosins. *Fisheries Sci.*, **61**, 495-500 (1995).
- 17) 新井健一, 山本常治: 冷凍すり身, 日本食品経済社, 東京, 1986, pp. 143-158.
- 18) J. Wan, J. Miura, and N. Seki: Effects of monovalent cations on cross-linking of myosin in suwari gels from walleye pollack. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **58**, 583-590 (1992).
- 19) 萩原秀昭: 生体成分の検出・定量, 「蛋白質・酵素の基礎実験法 改訂第2版」(堀尾武一編), 南江堂, 東京, 1994, pp. 456.
- 20) 萩原秀昭: 生体成分の検出・定量, 「蛋白質・酵素の基礎実験法 改訂第2版」(堀尾武一編), 南江堂, 東京, 1994, pp. 458-460.
- 21) J. Takagi, Y. Saito, T. Kikuchi, and Y. Inada: Modification of transglutaminase assay: Use of ammonium sulfate to stop the reaction. *Anal. Biochem.*, **153**, 295-298 (1986).
- 22) 服部昭仁, 辰巳隆一: SDS-ポリアクリルアミドスラブゲル電気泳動法による巨大タンパク質の検出. *生化学*, **61**, 717-719 (1989).
- 23) K. Hara, A. Suzumatsu, and T. Ishihara: Purification and characterization of cathepsin B from carp ordinary muscle. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **54**, 1243-1252 (1988).
- 24) H. Toyohara, Y. Makinodan, K. Tanaka, and S. Ikeda: Purification and properties of carp (*Cyprinus carpio*) muscle calpain II (high- $\text{Ca}^{2+}$ -requiring form of calpin). *Comp. Biochem. Physiol.*, **81B**, 573-578 (1985).
- 25) 坂本慎一, 山田祐三, 関 伸夫: コイおよびウサギ筋肉のカルパインIIの含量と酵素的性質の比較. *日本誌*, **51**, 825-831 (1985).
- 26) 坂本慎一, 関 伸夫: カルパインによるコイミオシンの限定分解. *日本誌*, **51**, 1551-1557 (1985).
- 27) 坂本慎一, 高田早苗, 関 伸夫: カルパインによるコイのミオシンからの $\text{Mr}=150,000$ 成分の生成. *日本誌*, **53**, 439-444 (1987).
- 28) 関 伸夫, 高田早苗: 加熱変性コイミオシンのカルパイン感受性の増大. *日本誌*, **53**, 457-463 (1987).
- 29) K. Osatomi, H. Sasai, M. Cao, K. Hara, and T. Ishihara: Purification and characterization of myofibril-bound serine proteinase from carp *Cyprinus carpio* ordinary muscle. *Comp. Biochem. Physiol.*, **116B**, 183-190 (1997).
- 30) 村元 学, 関 伸夫: コイミオシンに対する各種プロテアーゼの作用. *日本誌*, **55**, 1605-1613 (1989).
- 31) N. Seki, H. Nozawa, and S. Ni: Effect of transglutaminase on the gelation of heat-denatured surimi. *Fisheries Sci.*, **64**, 959-963 (1998).