

スケトウダラ肉糊の加温中に生成する 150 および 70 kDa 成分の同定とその存在状態

今野久仁彦, 今村 浩二

(1999年11月17日受付, 2000年4月3日受理)

Identification of the 150 and 70 kDa Fragments Generated during the Incubation of Salted Surimi Paste of Walleye Pollack

Kunihiko Konno*¹ and Kohji Imamura*¹

Incubation of salted surimi paste at 25°C generated the 150 and 70 kDa fragments. Two additional bands (bands a and b) migrating between myosin heavy chain monomer (HC) and dimer (HC2) were detected as well. Western blotting analysis of the above bands with anticarp subfragment-1 (s-1) HC antibody and sequencing of the amino terminal region of the 70 kDa fragment identified these 150 and 70 kDa fragments as heavy meromyosin (HMM)- and light meromyosin (LMM)-like fragments, respectively. The bands a and b are suggested to be the cross-linked product of HC and the 150 kDa, and two 150 kDa fragments, respectively. Thus, two distinct events, degradation and cross-linking of myosin HC, could occur on the same myosin molecule. These products were proved to be all aggregates losing salt-solubility.

キーワード: スケトウダラ, 坐り, ミオシン, ゲル化, すり身

スケトウダラすり身の熱ゲル化工程において, 塩摺した肉糊を比較的低温で予備加温するいわゆる「坐り」は最終的な加熱ゲルに高いゲル物性を付与するためには必須の工程であると言われている。この坐り効果について数多くの研究がなされ, その中で, 肉糊加温中にミオシン重鎖 (HC) が多量化する現象が見い出された。^{1,2)} その後, この現象は多くの研究者により追試, 確認され, スケトウダラ以外の魚種でも起こりうる事が確認された。³⁻⁷⁾ 坐り肉糊中に ϵ (γ グルタミン) リジンというイソペプチドが検出されたことより, この多量化はトランスグルタミナーゼ (EC 2.3.2.13) による HC の架橋反応の結果であると推定されている。⁸⁾ この HC の多量化とゲル物性の増大の間に相関があるため, HC の多量化はゲル形成の指標として使用されている。^{1,4,6,7,9-12)} ただし, 直加熱ゲルでは HC の多量化が全く起こらないので, ゲルの形成そのものに必須であるということではない。一方, 肉糊の加温中にこれとは逆の HC の低分子化が起こる現象も知られている。この成分は SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate 存在下でのポリアクリルアミドゲル電気泳動) 上の分子サイズから 150 kDa 成分, あるいは未同定の X1 成分などと論文の中で呼ばれ

ている。^{1,11)} 坐り効果が十分に発揮された坐り加熱ゲルの場合はこの成分が出現しないので, ゲル物性の低下と関連があるといわれている。⁹⁾ しかし, この生成量のみでゲルの劣化程度を説明できないともいわれている。^{9,11)} この 150 kDa 成分は正確に同定されていないのでミオシン分子由来であろうということ^{1,13)}の他には, 一致した見解に至っていない。

SDS-PAGE は上記の HC の多量化, 低分子化というミオシン HC に生じた架橋と切断という 2 つの共有結合の変化を容易に検出できるので多用されてきた経緯がある。しかし, SDS-PAGE はミオシンが肉糊中でどのような変性状態で存在しているかなど, 非共有結合に依存する構造変化については何も情報を与えない。本研究では, まず, スケトウダラ肉糊を 25°C で加温中した場合に生成する 150 kDa 成分の由来, 同定を行い, 次に, それら成分およびミオシンの加温肉糊中の変性状態について検討した。

方 法

肉糊はスケトウダラ冷凍すり身 (SA あるいは FA 級) に 25% の加水の後, 2.5% になるよう食塩を添加し,

*1 北海道大学大学院水産科学研究科食品生化学講座 (Laboratory of Food Biochemistry, Graduate School of Fisheries Sciences, Hokkaido University, Minato, Hakodate, Hokkaido 041-8611, Japan).

スピードカッターを用い、塩摺して調製した。この肉糊を約5gづつラップで包み、25°Cの恒温槽中で加温した。経時的に取りだし、氷冷し、加温を停止させた。ただちに、ポリトロンを用いてその1gを15倍量の0.1M NaCl, 20mM Tris-HCl (pH 7.5) 中でホモジナイズした。SDS-PAGE 図形はその後1日経っても変化しなかったため、この操作により、HCの多量化および低分子化は停止したとみなした。このホモジネートを用いて以下の実験を行った。

(1) SDS-PAGE によるHCの多量化と低分子化の検討。ここでは、HC多量体をよく分離する目的で、3% ポリアクリルアミド/0.5% アガロースを支持体とするミニスラブゲルを用いた。¹⁴⁾ 本研究ではこの電気泳動システムをSDS-PAGE と称する。ゲルの作製の概略は以下の通りである。まず電気泳動用アガロース(ナカライテスク, PG-36)を沸騰水中でゲルbufferで溶解させた後、40°Cまで温水中で冷却させた。それにアクリルアミド溶液(和光純薬, アクリルアミドHG, ビス比30:1), 重合剤を連続して添加し、直ちにガラスプレートの中に流し込み、コームを差し込み、アクリルアミドを重合させた。この際、重合が数分で完了するように重合剤の量を調節する必要があった。次にゲルプレートを20-25°Cの水の中に移し、アガロースを凝固させた。以降の操作は通常のスラブゲルの場合と同じである。

(2) Ca²⁺-ATPaseの失活。ATPase活性は0.5M KCl, 25mM Tris-maleate (pH 7.0), 5mM CaCl₂, 1mM ATPの組成を用い、25°Cで測定した。

(3) NaClおよび尿素に対する溶解性の低下。塩溶解性はホモジネートを0.5M NaCl, 20mM Tris-HCl (pH 7.5) 中で氷冷下1時間保持した後、1mM ATP-Mgを添加し、直ちに遠心分離(20,000×g, 15分)した。¹⁵⁾ 尿素溶解性の場合には溶解液を8M urea, 20mM Tris-HCl (pH 7.5), 2% 2-mercaptoethanolとし、室温で1時間保持した後遠心分離した。両上澄みを可溶性画分とし、上記のSDS-PAGEに供し、溶解成分を解析した。

コイ・ミオシン・サブフラグメント-1 (S-1) 重鎖(HC)に対する抗体の作製のため、S-1から軽鎖(LC)を除いたS-1HCを単離した。まず、コイ筋原繊維(Mf)からEDTA存在下でのキモトリプシン消化、およびATP-Mg存在下の硫安分画でS-1を調製し、Sephacryl S-300を用いたゲル濾過で精製した。¹⁶⁾ このS-1を35°Cで30分加熱変性させることによりLCを遊離させた。この加熱S-1を遠心分離し、上澄みに未変性S-1や遊離したLC成分を除いた。¹⁷⁾ LCが除かれたS-1HC凝集体の沈殿を繰り返し洗浄し、最終的に0.1% SDSに溶解させた。このS-1HCを常法によりウサギ静脈に注射し、抗体を作製した。血清は精製するこ

となしに1/200に希釈して使用した。この抗体は結果に示すように、幸運にもスケトウダラS-1HCを認識したため、肉糊の加温中に生成した150kDa成分の同定に利用できた。Western blottingは常法に従った。¹⁸⁾ すなわち、SDS-PAGEで分離したバンドを、ニトロセルロース膜に転写し、これにS-1HC抗体を反応させた。2次抗体はペルオキシダーゼ結合ヤギ抗ウサギIgG(和光純薬)を用いた。発色はH₂O₂と3,3'-diaminobenzidineを用いて行った。また、タンパク質の染色はCoomassie brilliant blue R 250 (CBB)を使用した。

生成断片のアミノ末端部分の配列はSDS-PAGEで分離したフラグメントをpoly(vinylidenedifluoride) (PVDF)膜に転写させ、CBB染色後、目的とするバンドをはさみで切りだし、Perkin-Elmer Applied Biosystem model 473A Protein sequencerを用いて決定した。

結果および考察

スケトウダラ肉糊加温中のSDS-PAGE 図形の変化SAおよびFA級すり身を用いて肉糊を作製し、25°Cで4時間まで加温したときの筋肉構成成分の変化をSDS-PAGEで示した(Fig. 1A, B)。Fig. 1Aに示すように、SA級すり身では、これまでの多くの研究結果に一致するように加温時間とともに、HCが減少し、HC多量体が形成されている。このゲルシステムでは5量体程度までの多量体を十分分離している。しかし、これ以上の多量体が分離されるであろうゲル上部の領域にはまったくバンドが検出されなかった。この原因はゲルの分離能が劣るためではなく試料の問題であると判断した。なぜなら、Fig. 1Aに示すように、分子量200万のβコネクチンと思われるバンドはゲルに侵入し、十分に分離しているからである。¹⁹⁾ HCの高分子は架橋によるとすれば、できた多量体にはその程度に応じた分岐が存在していることになる。これが一本の直鎖の高分子成分であるコネクチンとのSDS-PAGE上での挙動の違いの原因であろうと考えた。多分、試料中で分岐した多量体同士が非共有結合的に集まり、さらに巨大な粒子を形成し、ゲル内に侵入できなくなったものと推察した。そうだとすれば、ゲル上に現われた多量体は形成された多量体の総量を示していない可能性がある。架橋により形成された高分子成分をSDS-PAGEで解析する場合には慎重を期すべきである。なお、高分子架橋体をさらによく分離している尿素存在下での1.8%ポリアクリルアミドゲルについても、高分子部分にはバンドが検出されないため、同じ問題があるものと思われる。現時点において、これを克服する手段は見つかっていない。それゆえ、HCより大きな成分をまとめてHCnなどと定量す

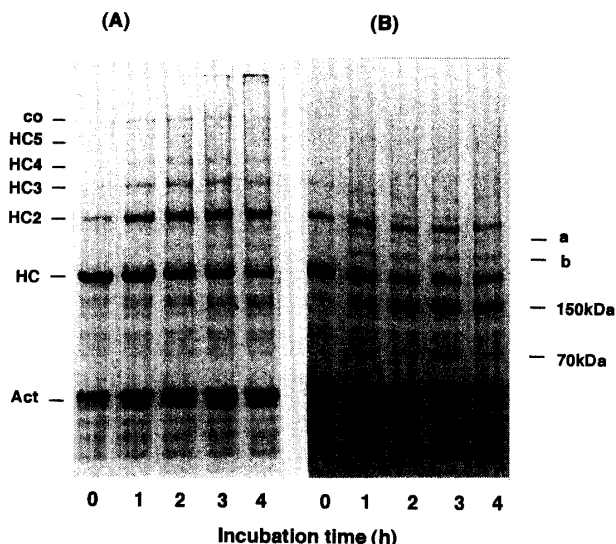


Fig. 1. Changes in SDS-PAGE patterns of salted surimi paste of walleye pollack during heating.

Salted surimi paste was prepared by grinding with 2.5% NaCl. Wrapped pastes were incubated at 25°C. Incubated paste (1 g) was homogenized in 15 vols of 0.1 M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) on Polytron homogenizer. SDS-PAGE was conducted with a slab gel consisted of 3% polyacrylamide and 0.5% agarose containing 0.1% SDS. HC, HC2, HC3, HC4, HC5 are myosin heavy chain monomer, dimer, trimer, tetramer, and pentamer, respectively. Act and co are actin and connectin bands. (a), (b), 150 kDa and 70 kDa are newly appeared bands. (A) and (B) are different surimi.

るといやり方は現実的な克服方法かもしれない。¹⁾このような限界があるが、ここで用いたアガロースで強固にした低濃度アクリルアミドスラブゲルは、調製の容易さ、分離能、取扱いの容易さなどのメリットがあるので、高分子成分の変化を示す際には利用価値の高い方法であろう。

一方、FA級のすり身を用いた Fig. 1B の場合は、肉糊の加温に伴い多少の HC の多量化は認められたが、ミオシン HC より低分子の 150 kDa 成分の生成が顕著であった。これも過去の報告と一致している。^{1,12)} この SDS-PAGE 図形を詳細にみると、150 kDa に加え、70 kDa 成分が生成されていること、さらに HC と HC2 量体の間に泳動される 2 本のバンド (移動度の小さいほうからバンド a, b) が生成されていることがわかる。バンド a, b については、これまで高分子量領域を分離するゲルシステムで観察した例がなかったため報告がなかったものと思われる。また、HC2 と HC3 の間にも同様のバンドが検出されている。そして、150 kDa がほとんど生成されていない Fig. 1A ではバンド a, b も

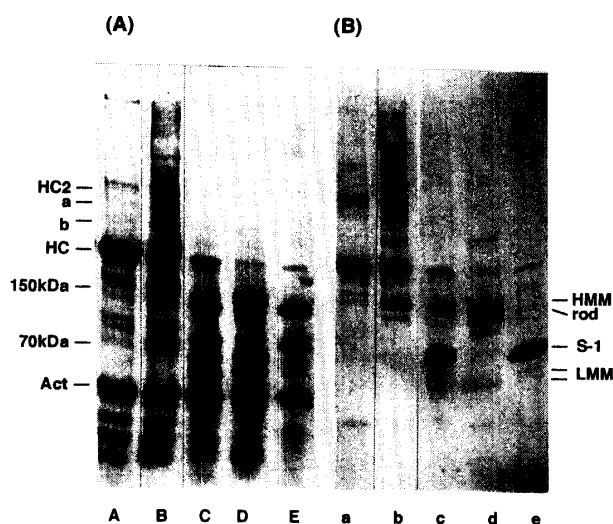


Fig. 2. Western blotting analysis of the bands generated during the incubation of salted surimi paste.

Surimi paste without incubation (A, a), one incubated for 1 h at 25°C (B, b) were allowed to react with anti carp S-1HC antibody. (C, c), (D, d), and (E, e) are standard chymotryptic fragments. (C, c), pollack Mf digest in 0.05 M KCl, 20 mM Tris-maleate (pH 7.0), 1 mM EDTA (S-1/rod cleavage); (D, d), pollack Mf digest in 0.5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM CaCl₂ (HMM/LMM cleavage); and (E, e), carp Mf digest (S-1/rod cleavage). HC2, a, b, HC, 150 kDa, 70 kDa and Act are the same as in Fig. 1. HMM, rod, S-1, and LMM are heavy meromyosin, rod, subfragment-1 and light meromyosin subunit, respectively. (A) and (B) are protein staining with CBB and immunostaining with anti carp S-1HC antibody, respectively.

ほとんど生成されないで、両者の生成には因果関係があることが予想された。なお、本研究では SA と FA 級というすり身を用いて 2 つの典型的な経時変化を示したが、必ずしもそれらの等級のすり身がこのような挙動を示すということではない。

加温中に生じる 150 kDa 成分の同定 Fig. 1B で生成した 150 kDa, 70 kDa, バンド a, b はミオシン HC が起源であることが予想されたのでその同定を行った。最初に抗コイ S-1HC 抗体を使用した Western blotting からの断片に S-1 が移行しているのかについて検討した。それに先立ち、標準物質を用いて、抗体の特異性について検討した。コイ筋原繊維 (Mf) を 0.05 M KCl, 20 mM Tris-maleate (pH 7.0), 1 mM EDTA 存在下でキモトリプシン消化した消化物 (S-1/rod 切断, E, e) では当然、S-1HC のみが抗体と反応した (Fig. 2E, e)。用いた抗体がスケトウダラミオシンにおいても S-1HC のみ

を認識することを示したのが Fig. C, c, および D, d, の結果である。スケトウダラ Mf 消化物 (S-1/rod 切断, C, c) でもこの抗体は S-1HC とのみ反応し, rod とは反応しなかった。なお, rod 付近に反応している薄いバンドは D, d の結果に示すように, 移動度が rod より小さく, 少量生成されたヘビーメロミオシン (HMM) である。また, S-1 より移動度の大きい低分子量のバンドは rod が内部で切断されて生成したサブフラグメント-2 (S-2) やライトメロミオシン (LMM) 由来のバンドと推定されたが, それらとも反応していない。スケトウダラ Mf を 0.5 M KCl, 1 mM CaCl₂ 存在下でキモトリプシン消化した試料 (HMM/LMM 切断) と反応させたのが Fig. 2D, d である。明かに S-1 部分を含む HMM が強く反応し, LMM は反応していない。このような結果から, この抗体は本来コイ S-1HC に対する抗体であるが, 結果としてスケトウダラミオシンでも S-1HC を認識すると結論した。この抗体を 25°C で 0 および 1 時間加温した肉糊から調製した試料と反応させた。すると, 加温 0 時間の試料では (Fig. 2A, a), ミオシン HC が強く反応した。さらに少量形成されている 2 量体も検出された。一方, 加温 1 時間のものでは (Fig. 2B, b), ミオシン HC やその多量体に加え, 150 kDa 成分が強く反応した。しかし, 70 kDa を含む低分子領域のバンドで抗体と反応する断片は認められなかった。もし, 150 kDa が rod と S-1 のカルボキシル末端部分から構成されていると仮定すれば, S-1 内部で切断が起こったこととなり, S-1 の残りの部分が抗体で認識されるはずである。しかし, そのような断片の存在を認めなかった。なお, この抗体は S-1 の 3 つのトリプシン断片に反応することを確かめている。さらに, S-1 部分が小断片化され, ゲルから流出したために反応する断片が検出されないとの推定も有り得るが, この実験ではバンドをニトロセルロース膜に転写させてから反応させているので, バンドの流出の可能性は非常に低いと考える。この結果より, スケトウダラミオシン HC の S-1 部分は全て 150 kDa に移行し, HC は S-1 を含む 150 kDa の HMM 様断片と残りの 70 kDa の LMM 様の 2 断片に rod 内で切断されたと結論した。

さらに, HC と HC2 量体の間に泳動されるバンド a, b も強く抗体と反応しているので S-1HC を含むことが分かる。そして, 分子サイズから, 移動度の大きい下のバンド b は 150 kDa の 2 量体, 上のバンド a は 150 kDa と HC の重合体と考えるとよく説明できる。しかし, これらが切断を受けてから重合したのか, 重合してから切断されたかの区別はできない。多分両方の経路で生成したのであろう。もし, 70 kDa 断片に架橋部位が含まれるとすれば, 70 kDa の 2 量体は抗体では認識で

きないが, HC と 70 kDa の架橋体は予想される分子サイズからバンド b と HC の間に抗体と反応するバンドとして検出できるはずである。しかし, そのようなバンドは認められなかった。そえゆえ, ミオシンの LMM 部分に相当する 70 kDa 部分は多量化に関わらないことが確かめられた。S-2 部分に反応性の高い Gln が存在し, トランスグルタミナーゼにより架橋が起こるといわれているが, 本結果はそれと矛盾しない。^{20,21)}

このような切断が HC で起こっているとすれば, その切断部位を同定できるはずである。Fig. 3 に示すように, LMM 様断片と類推した 70 kDa 断片のアミノ末端部分から ValGlnSerAlaArg という 5 残基のアミノ酸配列を読み取ることができた。この配列をすでに報告されている cDNA から演繹されたスケトウダラミオシン HC のアミノ酸配列上で探すと,²²⁾ Val-1335 からの 5 残基と一致した。すなわち, Gly-1334/Val1335 で切断が起こって 150 kDa, 70 kDa 2 つの断片が生成したと結論した。150 kDa 断片についてはエンドマン分解により決定できるようなアミノ酸が生成しなかったので, アミノ末端がブロックされていることが推定された。一方, スケトウダラ Mf のキモトリプシン消化により生成した LMM (Fig. 2D) のアミノ末端部分を決定したところ, Trp-1373/Arg-1374 と Tyr-1377/Glu-1378 で切断された 2 種の LMM が検出された (Fig. 3)。この一方は Ojima らの結果と一致した。²²⁾ 肉糊の加温中に生成した LMM 様断片はキモトリプシン LMM より 40 残基ほどアミノ末端部分が長いことになる。

すでにスケトウダラ肉糊を加温しておく時に N-[N-(L-3-trans) carboxyoxiran-2-carbonyl]-L-leucyl]agmatine (E-64) を添加しておけば, 150 kDa の生成が抑制されることが報告されているので,²³⁾ 切断に関わる

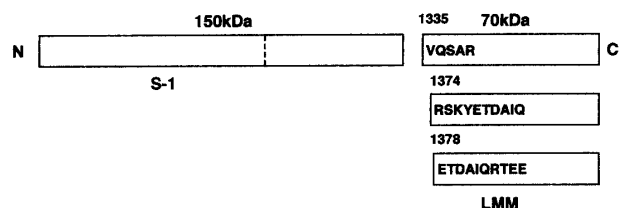


Fig. 3. Determined cleavage site on pollack myosin HC for producing the 150 and 70 kDa fragments.

Incubated surimi paste was separated on SDS-PAGE as in Fig. 1B, and the bands were transferred to PVDF membrane. The band for the 70 kDa was sequenced. Determined 5 residues are shown. Amino terminal region of chymotryptic LMM was also sequenced for reference purposes.

酵素は cysteine protease であることが予想されるが、カテプシンの基質特異性ではこの切断は説明できなかった。また、150 kDa 成分はそれ以上の切断を受ける様子がないことから、この酵素はミオシン HC をこの特定の部位以外では切断せず、かなり特殊な基質特異性を示す酵素であると推定した。

本研究ではあくまでスケトウダラを 25°C という比較的低温で保持したときに生じる断片に限定して同定した。これまで、筋肉中には数多くのプロテアーゼの存在が報告されているので、加温条件が変わったり、魚種が変わったりすれば、別の酵素が作用し、別の切断が起こることは当然予想される。そういう意味ではバンドを限定せず、これら HC とアクチンの間に泳動される成分をまとめて X1 成分と定義する方が一般的な処理法かもしれない。¹⁾

肉糊加熱中の変性と存在様式 これまでの結果から、スケトウダラ肉糊の加温中にミオシンが HMM/LMM 様に切断されることが示された。しかし、SDS-PAGE のみの結果ではこれらが未変性なのか変性しているのか、単量体なのか凝集しているのかなどはわからない。そこで、FA 級すり身を用いて肉糊加温中のミオシンの変性とこの断片の関係、および存在状態についてさらに検討した。まず、肉糊中のミオシン変性を ATPase 失活から検討した。経時的に取り出した肉糊のホモジネートの Ca²⁺-ATPase 失活を追跡ところ、約 120 分で ATPase はほぼ消失していた (Fig. 4)。にもかかわらず、HMM 様の 150 kDa は 240 分に至っても全く減少していなかった (Fig. 1B)。このことは 150 kDa 中の S-1

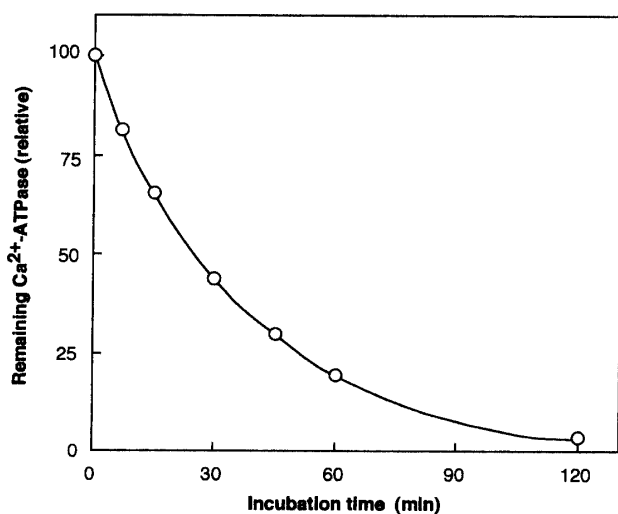


Fig. 4. ATPase inactivation during the incubation of salted surimi paste.

Ca²⁺-ATPase was assayed with the homogenate prepared from the salted surimi paste incubated at 25°C as in Fig. 1.

部分は ATPase 活性を失い、機能的な構造が破壊されていることを示す。このミオシン HC を 150 kDa, 70 kDa に選択的に切断するプロテアーゼはこのような構造変化を全く認識しないことを示している。

150 kDa 成分は失活 S-1 を含むことが推定されたが、この変性断片の凝集状態を、塩および尿素への溶解性の変化から検討した。ホモジネートを 0.5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) に氷冷下 1 時間懸濁、溶解させた。そして、1 mM ATP-Mg を添加して直ちに遠心分離し、上澄みを塩溶性画分として集めた。ATP-Mg を添加したのはアクチンに依存しないミオシン変性による塩溶解性の変化のみを検出するためである。肉糊の成分を示したのが SDS/尿素を含む可溶化液で溶解した Fig. 5A の結果である。このうち、0.5 M NaCl に溶解した成分は Fig. 5C に示すものであった。未加温肉糊ではかなりのミオシンが溶解していることが分かる。どの加温時間の試料でも生成された 150 kDa 成分ならびに 70 kDa 成分は遠心上澄みには全く回収されず、塩に不溶化しており、凝集体を形成していることが分かった。また、150 kDa を含む架橋体であるバンド a, b も上澄みに回収されず、凝集体として存在していることが示された。SDS-PAGE 図形では低分子化されている、実際の肉糊中ではこのように凝集体として存在している、SDS-PAGE のみの情報とは随分解釈が異なってくる。

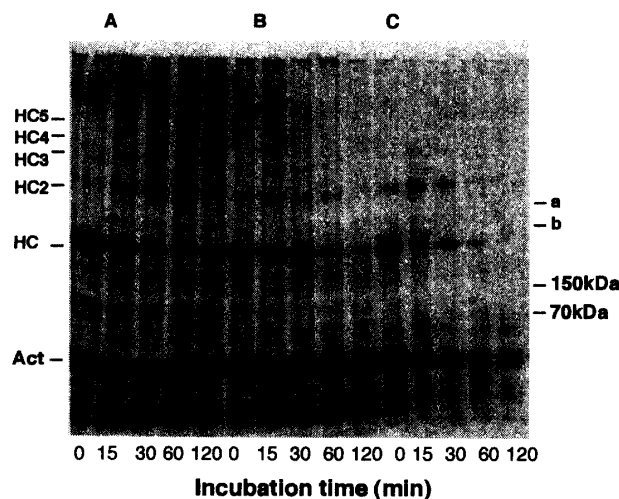


Fig. 5. Loss of salt- and urea-solubility upon incubation of the salted paste.

Incubated surimi paste was homogenized as in Fig. 1. Homogenate was allowed to dissolve in 2% SDS/8 M urea (A), 8 M urea (B) and 0.5 M NaCl (C), all buffered with 20 mM Tris-HCl (pH 7.5). Soluble fractions obtained as the supernatant by centrifugation were analyzed by SDS-PAGE as in Fig. 1. Symbols are also the same as in Fig. 1.

また、単量体 HC からなる肉糊中のミオシンの溶解性も加温に伴って急激に減少し、60 分の加温ではほとんど失われていた。多量体ではさらに不溶化が顕著で、上澄みには検出される多量体は加温初期の少量の 2 量体だけである。ミオシンの塩溶解性の減少と ATPase 失活 (Fig. 4) の結果を比較すると、溶解性の低下が明らかに速く、失活する前に塩溶解性が消失していることがわかる。それゆえ、肉糊中では S-1 変性による不溶化、凝集に加え、S-1 変性に依存しない凝集が起きていることが推定された。すでに、コイ・ミオシンを加熱すると ATPase 活性を保持しながら凝集しうることを示したが、これと似た現象が肉糊中でも起きているのかもしれない。²⁴⁾ また、肉糊中のアクトミオシンは直ちに凝集してしまうという過去の報告とも一致する。²⁵⁾

かなり急速に塩に不溶性の凝集体が形成されることが推定されたので、次に、さらに溶解効果の高い 8 M 尿素を使って凝集体を溶解させようとした (Fig. 5B)。明かに全ての成分の溶解量は増加したが、それでも、一部は不溶化していた。これは、25°C という割合低温の加熱でも、8 M 尿素にさえ溶解しない強固な非共有結合、多分疎水性相互作用などにより凝集体が形成されていることを示している。

以上の結果より、肉糊の 25°C での加温により、ミオシン HC は分子サイズ 150 kDa/70 kDa の HMM/LMM 様の 2 つの断片に切断されることが明かとなった。そして分解生成物である 150 kDa は架橋体を形成しうることも明かとなった。これは同一ミオシン分子に分解と架橋という 2 つの反応が起こりうることを示しており、架橋反応、分解反応を単純に分離できないことを示している。HMM 様の 150 kDa 断片の S-1 部分は変性しており、凝集体として存在し、さらにそれを含む架橋体 a, b も凝集体として存在することが分かった。肉糊の加温中にゲル化の中心成分であるミオシンにどのような変化が起こっているかを研究するためには SDS-PAGE による構成成分の解析では不十分で、凝集など非共有結合に由来した構造変化も平行して調べる必要がある。

文 献

- 1) 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能とミオシンの交差結合反応. 日本誌, 51, 1559-1565 (1985).
- 2) I. Kimura, M. Sugimoto, 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).
- 3) 今井千春, 塚正泰之, 杉山雅昭, 峰岸 裕, 志水 寛: マイワシおよびスケトウダラ坐り肉中の ϵ -(γ -glutamyl) lysine 架橋量と破断強度との関係に及ぼす坐り温度の影響. 日本誌, 62, 104-111 (1996).
- 4) 佐伯宏樹, 昌子 有, 平田史生, 野中道夫, 新井健一: カツオ, コイおよびスケトウダラの肉糊のゲル化とミオシン重鎖の多量化反応に及ぼす CaCl_2 の影響, 日本誌, 58, 2137-2146 (1992).
- 5) 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).
- 6) H. G. Lee, T. C. Lanier, D. D. Hamann, and J. A. Knopp: Transglutaminase effects on low temperature gelation of fish protein sols. *J. Food Sci.*, 62, 20-24 (1997).
- 7) G. G. Kamath, T. C. Lanier, E. A. Foegeding, and D. D. Hamann: Nondisulfide covalent cross-linking of myosin heavy chain in "setting" of Alaska pollack and Atlantic croaker surimi. *J. Food Biochem.*, 16, 151-172 (1992).
- 8) Y. Tsukamasa, K. Sato, Y. Shimizu, C. Imai, M. Sugiyama, Y. Minegishi, and M. Kawabata: ϵ -(γ -Glutamyl) lysine cross-link formation in sardine myosin sol during setting at 25°C. *J. Food Sci.*, 58, 785-787 (1993).
- 9) 沼倉忠弘, 木村郁夫, 豊田恭平, 藤田孝夫: スケトウダラ肉糊の坐りに伴うゲル強度とミオシン重鎖の変化の温度依存性. 日本誌, 56, 2035-2043 (1990).
- 10) 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).
- 11) 安永広作, 阿部洋一, 山澤正勝, 新井健一: 加熱に伴うスケトウダラ肉糊中のミオシン重鎖の交差結合とウシ血漿粉末の影響. 日本誌, 63, 739-747 (1997).
- 12) 李南赫, 加藤 登, 安永広作, 中川則和, 新井健一: 工場内におけるスケトウダラ冷凍すり身のゲル化特性の簡易な新評価法. 日本誌, 63, 977-984 (1997).
- 13) M. Ando, Y. Tsukamasa, and Y. Makinodan: Identification of 170 K component which appears in the setting process of surimi gel. *Fisheries Sci.*, 64, 497-498 (1998).
- 14) K. Konno, H. Naraoka, and K. Akamatsu: Suppressive effect of phosphatidylcholine on the thermal gelation of Alaska pollack surimi. *J. Agric. Food. Chem.*, 46, 1262-1267 (1998).
- 15) 今野久仁彦, 上田陽一: 加熱に伴うコイ筋原繊維 Mg-ATPase 活性の上昇. 日本誌, 55, 1457-1462 (1989).
- 16) 今野久仁彦, 加藤早苗, 江湖正育: コイ筋原繊維を出発材料としたミオシンサブフラグメント-1 の簡便な調製法. 日本誌, 56, 1885-1890 (1990).
- 17) 浜井昌志, 吉岡武也, 今野久仁彦, 新井健一: コイミオシンサブフラグメント-1 の加熱による構造変化. 日本誌, 55, 1283-1287 (1989).
- 18) H. Towbin, T. Staehelin, and J. Gordon: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 4350-4354 (1979).
- 19) Y. Kumano and N. Seki: Changes in α -connectin content during storage of iced, frozen, and thawed fish muscle. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 59, 559-564 (1993).
- 20) N. Seki, C. Nakahara, H. Takeda, N. Maruyama, and H. Nozawa: Dimerization site of carp myosin heavy chains by the endogenous transglutaminase. *Fisheries Sci.*, 64, 314-319 (1998).
- 21) Y. Kunioka and T. Ando: Innocuous labeling of the subfragment-2 region of skeletal muscle heavy meromyosin with fluorescent polyacrylamide nanobead and visualization of individual heavy meromyosin molecules. *J. Biochem.*, 119, 1024-1032 (1996).
- 22) T. Ojima, T. Higuchi, and K. Nishita: Reversibility of unfolding of walleye pollack light meromyosin by heat-treatment. *Fisheries Sci.*, 65, 459-465 (1999).

- 23) H. Takeda and N. Seki: Enzyme-catalyzed cross-linking and degradation of myosin heavy chain in walleye pollack surimi paste during setting. *Fisheries Sci.*, **62**, 462-467 (1996).
- 24) S. Kato, H. Koseki, and K. Konno: Oligomerization of carp myosin which retains its ATPase activity. *Fisheries Sci.*, **62**, 985-989 (1996).
- 25) 船津保浩, 加藤 登, 新井健一: 坐りに伴うスケトウダラ肉糊中の塩溶性タンパク質の凝集体形成. *日水誌*, **62**, 112-122 (1996).