

魚肉冷凍保存中におけるリン脂質の分解 — 南米産淡水魚ペヘレイについて —

坂口 昌充*¹・平田 真通*・平野 薫*・里内 清*

Degradation of phospholipid during the frozen storage of fish muscle
— a case of the freshwater fish, Pejerrey —

Masamitsu SAKAGUCHI, Masamichi HIRATA, Kaoru HIRANO
and Kiyoshi SATOUCHI

ABSTRACT

Lysophosphatidylcholine (LPC) was not detected in the fresh muscle of a freshwater fish, Pejerrey. However, LPC was gradually produced during the storage of the muscle at -20°C . At the one month of storage, $0.04\ \mu\text{mole}$ of LPC was detected, and then continued to increase to $0.31\ \mu\text{mole}$ at 12 months. The major fatty acid esterified in LPC were highly unsaturated fatty acids, such as docosaheptaenoic and eicosapentaenoic acids. In PC of the Pejerrey muscle, these fatty acids occupied at C-2 position of glycerol. As LPC is derived from PC by releasing one fatty acid, accordingly, it is concluded that the form of LPC detected in the Pejerrey muscle during the frozen storage was mainly composed of 1-lyso-2-acyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (1-LPC).

キーワード：魚肉、冷凍保存、リン脂質、リゾレシチン、ホスホリパーゼA₁

1. はじめに

魚肉を長期にわたって凍結貯蔵するとその間に脂質が分解を受けることが知られている¹⁾。この際生じた脂肪酸は自動酸化して過酸化脂質となり、さらに分解してアルデヒド等の二次生成物を生じる。これらは魚肉の香りに悪影響を及ぼすばかりではなく、筋肉タンパク質、アクトミオシンの重合変性を起こして食品としてのテクスチャーを劣化させることになる²⁾。したがって魚肉の冷凍保存中の脂質の動態およびその原因を明らかにすることはその保蔵上非常に大切な研究課題となる。すでに我々はカツオ筋肉の凍結保存中の脂質分析を行い、短期間のうちにリン脂質、特にホスファチジルコリンが加水分解を受けること、またその原因が筋肉中に存在するリン脂質分解酵素、ホスホリパーゼA₁活性によることを明らかにしている^{3) 4)}。

本研究では南米産淡水魚ペヘレイを用い、 -20°C で凍

結貯蔵した際の脂質の経時的変動について検討した。

2. 材料及び方法

2-1 試料並びに試薬の調整

ペヘレイ (*Odonthestes buariensis*) は山口県の漁業組合より購入し、一部はすぐに筋肉を分析し、残りについては -20°C で冷凍貯蔵し、経時的に筋肉の脂質分析を行った。

ハブ毒ホスホリパーゼA₂ [EC 3.1.4.1, *Trimeresurus flavoviridis*] は大分医科大学上田博士より恵与された熱処理したものをを用いた。リン脂質の標準品としてホスファチジルイノシトール (PI) (大豆由来) 及びホスファチジルセリン (PS) (牛脳) はSigma社の製品を用いた。コレステロール定量ための内部標準、コレスタンはSigma社より、また脂肪酸同定のための標準高度不飽和脂肪酸、アラキドン酸、エイコサペンタエン酸およびドコ

*食品工学科、*¹工学研究科生物工学

サヘキサエン酸はフナコシ(株)よりそれぞれ購入した。脂肪酸およびコレステロールの誘導化試薬である10%メタノール-塩酸は東京化成より、また $tert$ -ブチルジメチルシリルクロロシラン/イミダゾール/ジメチルホルムアミド (t -BDMCS) 試薬はジーエルサイエンスよりそれぞれ購入した。

2-2 脂質の抽出と分画

脂質の抽出はBligh-Dyer法で行った⁹⁾。中性脂質と複合脂質の分画はケイ酸カラムクロマトグラフィーを用い、クロロホルムで中性脂質を、メタノールで複合脂質をそれぞれ溶出した。中性脂質画分は石油エーテル：エーテル：酢酸 (80：30：1, v/v) の溶媒を用いた調整用薄層クロマトグラフィー (TLC) で展開し、トリグリセリド、遊離脂肪酸およびコレステロールの各スポットに既知量の内部標準品、すなわちトリグリセリドおよび遊離脂肪酸についてはノナデカン酸、コレステロールについてはコレスタン塗布した。コレステロールエステルを含めた各スポットよりの抽出はBligh-Dyer法で行った⁹⁾。複合脂質画分についてはクロロホルム：メタノール：水 (65：35：6, v/v) の溶媒を用いた調整用TLCで展開し、ホスファチジルエタノールアミン (PE)、ホスファチジルコリン (PC) およびリゾホスファチジルコリン (LPC) を抽出した。脂肪酸およびコレステロールの定量は内部標準を用いたガスクロマトグラフィーで、またリン脂質の定量はBartlett法によった⁹⁾。なおケイ酸カラムクロマトグラフィーによるリン脂質の回収率は95%以上であった。

2-3 二次元薄層クロマトグラフィーによるリン脂質の分離と定量

複合脂質画分を分析用TLCにて二次元展開を行った⁷⁾。1次元の展開溶媒は、クロロホルム：メタノール：28%アンモニア水 (65：35：5 v/v) で、2次元の溶媒はクロロホルム：アセトン：メタノール：酢酸：水 (5：2：1：1.3：0.5 v/v) の混液で展開させた。各スポットの同定は標準リン脂質の位置との比較より行い、定量についてはBartlett法⁹⁾によった。

2-4 誘導化

1) メチルエステル化

中性脂質ではトリグリセリド、遊離脂肪酸およびコレステロールエステル、リン脂質では10 μ gP相当のPC、PEおよびLPCに5%メタノール性塩酸を加え、45分間還流を行った。冷却後、ヘキサンおよび水を加え、激しく攪拌し脂肪酸のメチルエステルをヘキサン抽出した。なおコレステロールエステルのメチルエステル化を行う

際には3時間還流を行い、中性脂質のための溶媒を用いたTLCで展開した。脂肪酸メチルエステル部分に既知量のノナデカン酸を塗布後抽出、定量した。

2) $tert$ -ブチルジメチルシリル化

コレステロールについては t -BDMCS試薬約100 μ lを加え、160 $^{\circ}$ C、10分間反応させた。反応後、ヘキサン抽出、水による洗浄を行った⁹⁾。

2-5 ガスクロマトグラフィー

メチルエステルおよび t -BDMS誘導体とした試料は脂肪酸については条件①で、コレステロールについては条件②でガスクロマトグラフ (GC) 分析を行った。脂肪酸およびコレステロールは標準品の保持時間との比較で同定した⁹⁾。

GC条件① 脂肪酸分析

機種	Shimadzu GC-14A
キャピラリーカラム	CBP20(直径0.22mm, 長さ30m) (ポリエチレングリコール, PEG)
キャリアーガス	N ₂
注入/水素炎イオン化検出器の温度	250 $^{\circ}$ C
昇温プログラム	170 $^{\circ}$ C \rightarrow 225 $^{\circ}$ C (5 $^{\circ}$ C/min)

GC条件② コレステロール分析

機種	Shimadzu GC-14A
キャピラリーカラム	CBJ1(直径0.25mm, 長さ30m) (ジメチルシリコン, OV-1)
キャリアーガス	N ₂
注入/水素炎イオン化検出器の温度	290 $^{\circ}$ C
昇温プログラム	260 $^{\circ}$ C (一定)

2-6 リン脂質サブクラス定量

弱アルカリおよび弱酸加水分解によりジアシル型、アルキルアシル型およびアルケニルアシル型の各サブクラスを分離し¹⁰⁾、Bartlett法にて各サブクラスを定量した⁹⁾。

2-7 リン脂質の脂肪酸分子内分布

アルミナカラムを通したPC、31 μ gP相当に、ジエチルエーテル約3ml、50mMトリス-塩酸緩衝液 (pH 6.9) 0.2ml、0.02M NaCl 0.22M CaCl₂ 0.1ml、ホスホリパーゼA₂ 0.1mlを加え、2時間反応した¹¹⁾。反応生成物はケイ酸カラムクロマトグラフィーにより遊離脂肪酸とリン脂質画分に分け、クロロホルム溶出画分については直接メチルエステル化を行った。メタノール溶出画分は一度TLC (展開溶媒, C:M:W 65:35:6 v/v) でLPCを精製し、メチルエステル化した。試料は適量のヘキサソに溶解しなおし、GC分析を行った。

3. 結果

3-1 ペヘレイ筋肉中の脂質含量及びリン脂質組成

ペヘレイ筋肉の脂質含量を測定した。中性脂質では筋肉1g当り、コレステロール1.13 μmol 、トリグリセリド0.43 μmol 、コレステロールエステル0.33 μmol が検出された。しかしながら遊離脂肪酸は0.04 μmol と新鮮な筋肉からはほとんど検出されなかった(表1)。一方、複合脂質ではリン脂質が4.61 μmol 検出され、各脂質の中で最も含量が多かった。主成分はPC77.8%、ついでPE13.4%であり、この2種のリン脂質で全体の91.2%を占めていた。他にはスフィンゴミエリン(Sph)、PIおよびPSが検出された。しかしながらLPCは新鮮な筋肉からは検出されなかった(表2)。

表1 ペヘレイ筋肉の中性脂質の含量

	($\mu\text{mol/g}$ 筋肉)
コレステロール	1.13 \pm 0.11
トリグリセリド	0.43 \pm 0.02
遊離脂肪酸	0.04 \pm 0
コレステロールエステル	0.33 \pm 0.06

平均 \pm 標準偏差(n=3)

表2 ペヘレイ筋肉のリン脂質含量及びその組成

	($\mu\text{mol/g}$ 筋肉)
リン脂質	4.61 \pm 0
	(%)
LPC	-
Sph	4.2 \pm 0.17
PI	3.4 \pm 0.46
PS	1.3 \pm 0.36
PC	77.8 \pm 0.78
PE	13.4 \pm 0.22

平均 \pm 標準偏差(n=3)

3-2 リン脂質のサブクラス組成

ペヘレイ筋肉においてリン脂質の主成分であるPCおよびPEのサブクラス組成を検討した(表3)。PCの主なクラスはジアシル型であり、組成の96.6%を占めており、2.4%のアルキルアシル型が存在した。一方PEにおいても主なクラスはジアシル型であったがその比率は91.5%で、7.1%のアルケニルアシル型が含まれていた。

表3 ペヘレイ筋肉のリン脂質のサブクラス組成

	PC	PE
	(%)	
ジアシル	96.6 \pm 1.32	91.5 \pm 1.25
アルキルアシル	2.4 \pm 0.66	1.3 \pm 0.52
アルケニルアシル	0.9 \pm 0.64	7.1 \pm 0.70

平均 \pm 標準偏差(n=3)

3-3 中性脂質の脂肪酸組成

トリグリセリドおよびコレステロールエステルの脂肪酸組成を検討した(表4)。トリグリセリドを構成する主な脂肪酸はパルミチン酸19.8%、オレイン酸31.0%であり、飽和脂肪酸、モノエン酸が全脂肪酸の66.2%を占めており、対して高度不飽和脂肪酸はドコサヘキサエン酸9.5%、ドコサペンタエン酸2.2%、エイコサペンタエン酸1.6%と全体でも15%以下であった。コレステロールエステルでは逆に主な脂肪酸はドコサヘキサエン酸43.3%であり、アラキドン酸以上の高度不飽和脂肪酸が脂肪酸組成の56.8%を占めており、対して飽和脂肪酸およびモノエン酸は25%以下であった。

3-4 リン脂質の脂肪酸組成

リン脂質の脂肪酸組成を検討した(表5)。PCを構成する主な脂肪酸はパルミチン酸とドコサヘキサエン酸であり、それぞれ31.2%、35.1%であった。PEではPCよりもパルミチン酸の比率が下がり、逆にドコサヘキサエン酸の比率が上がって、それぞれ11.1%、47.4%であった。またアルケニルアシル型リン脂質の1位のアルケニル基に由来するジメチルアセタール(DMA)がPEで検出され、16:0、18:1および18:0のビニールアルコール鎖よりなることが判った。

3-5 凍結貯蔵中の各脂質含量の変動

次に凍結貯蔵中の各脂質含量の変動を検討した(表6)。新鮮な時点でのLPCと遊離脂肪酸はそれぞれ存在しないか、0.04 μmol という微量であったが、貯蔵中徐々に蓄積していき、LPCは12カ月後には0.31 μmol 、遊離脂肪酸については2.09 μmol に達した。これらLPCおよび遊離脂肪酸のもととなるリン脂質およびトリグリセリドについては多少の増減はあるものの大きな変動はみられなかった。またコレステロールについても貯蔵期間を通して一定であった。

表4 ペレレイ筋肉の中性脂質の脂肪酸組成

	トリグリセリド (%)	コレステロールエステル (%)
14:0	2.4±0.05	0.4±0.12
15:0	-	0.2±0.05
16:0	19.8±0.78	7.2±0.38
16:1(n-7)	6.0±0.57	1.0±0.43
17:0	0.7±0.05	0.2±0.05
18:0	3.0±0.29	1.3±0.14
18:1(n-9)	31.0±0.96	11.3±0.21
18:1(n-7)	3.3±0.17	1.3±0.05
18:2(n-6)	13.3±0.25	5.0±0.12
20:3(n-9)	0.1±0.19	0.7±0.08
20:4(n-6)	0.2±0.24	2.4±0.09
20:4(n-3)	0.1±0.19	0.7±0.29
20:5(n-3)	1.6±0.22	7.4±0.25
22:5(n-3)	2.2±0.12	3.0±0.05
22:6(n-3)	9.5±0.62	43.3±1.40
平均±標準偏差(n=3)		

表5 ペレレイ筋肉のリン脂質の脂肪酸組成

	PC (%)	PE (%)
14:0	0.4±0.05	-
16:0DMA	-	1.2±0.05
16:0	31.2±0.26	11.1±0.46
16:1(n-7)	0.6±0	0.1±0.14
17:0	0.4±0.08	0.4±0.05
18:0DMA	-	2.2±0.08
18:1DMA	-	1.0±0.05
18:0	5.3±0.12	11.1±0.56
18:1(n-9)	9.9±0.33	4.9±0.05
18:1(n-7)	1.0±0	1.4±0.05
18:2(n-6)	4.3±0.12	2.8±0.09
20:3(n-9)	-	0.2±0
20:4(n-6)	3.0±0.05	2.2±0.12
20:4(n-3)	0.4±0.05	0.7±0.05
20:5(n-3)	4.9±0.05	2.2±0.14
22:5(n-3)	1.6±0.08	3.0±0.83
22:6(n-3)	35.1±0.25	47.4±2.56
平均±標準偏差(n=3)		

表6 ペレレイ凍結保存中の各脂質含量の変動

貯蔵期間 (月)	0	1	3	6	12
	(μmol/g 筋肉)				
コレステロール	1.13±0.11	1.06±0.12	1.15±0.04	1.28±0.04	1.22±0.09
トリグリセリド	0.43±0.02	0.47±0.05	0.46±0.03	0.31±0.01	0.51±0.12
遊離脂肪酸	0.04±0	0.25±0.03	0.54±0.01	0.80±0.06	2.09±0.36
リン脂質	4.61±0	5.59±0.26	5.60±0.24	5.74±0.05	6.04±0.44
LPC	-	0.04±0	0.11±0	0.15±0.01	0.31±0.03

平均±標準偏差(n=3)

3-6 凍結貯蔵中のLPCの脂肪酸組成

貯蔵中蓄積のみられたLPCについて脂肪酸組成の経時的な変動を検討した(表7)。構成脂肪酸の主成分はドコサヘキサエン酸であり、およそ50%以上を占めていた。LPCはPCが加水分解を受けることによって生成するが、もとなるPCに対してLPCはエイコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸などの高度不飽和脂肪酸を多く含んだ組成をしていた。なお貯蔵、1カ月以降12カ月

までLPCは増加していくが、その脂肪酸組成はあまり変動しなかった。

3-7 PCの脂肪酸分子内分布

一般に動物のリン脂質では高度不飽和脂肪酸はグリセロールの2位に結合している¹⁰⁾。このことはペレレイのPCについても当てはまるのか、そのことを明らかにするためペレレイ筋肉PCの分子内分布を検討した(表8)。

PCの1位に結合した脂肪酸の主成分はパルミチン酸76.2%であった。1位の組成には飽和脂肪酸、モノエン酸が多く89.0%を占めており、他にはドコサヘキサエン酸が7.3%であった。対して2位に結合した脂肪酸はアラキドン酸5.0%、エイコサペンタエン酸9.2%、ドコサペンタエン酸3.1%及びドコサヘキサエン酸58.0%などの高度不飽和脂肪酸が組成の大半を占めていた。PCの2位に結合した脂肪酸組成は表7に示したLPCの脂肪酸組成に類似していた。

表7 ペヘレイ凍結貯蔵中のLPCの脂肪酸組成

貯蔵期間 (月)	3	6 (%)	12
14:0	0.8±0.12	0.6±0.42	0.4±0.31
16:0	10.1±0.69	7.8±0.76	8.4±0.92
16:1(n-7)	1.3±0.42	0.8±0.22	1.0±0.22
18:0	1.3±0.12	1.4±0.17	1.2±0.05
18:1(n-9)	8.5±0.45	8.1±0.33	9.7±0.50
18:1(n-7)	-	0.8±0.05	0.5±0.38
18:2(n-6)	4.7±0.09	5.4±0.05	6.7±0.25
20:4(n-6)	3.5±0.19	3.9±0.12	4.4±0.12
20:5(n-3)	9.2±0.36	9.9±0.37	8.3±0.56
22:5(n-3)	3.0±0.05	2.7±0.08	2.5±0.29
22:6(n-3)	54.4±1.59	56.4±1.35	48.6±1.37

平均±標準偏差(n=3)

表8 ペヘレイPCの脂肪酸分子内分布

	C-1	C-2 (%)
14:0	0.7	0.3
16:0	76.2	3.7
16:1(n-7)	0.7	0.4
18:0	5.0	0.5
18:1(n-9)	5.3	9.3
18:1(n-7)	1.1	0.8
18:2(n-6)	1.9	5.2
20:4(n-6)	-	5.0
20:5(n-3)	1.0	9.2
22:5(n-3)	0.8	3.1
22:6(n-3)	7.3	58.0

4. 考察

魚肉を凍結貯蔵するとその間にリン脂質が分解していくことがよく知られており、この分解にはホスホリパーゼ及びリゾホスホリパーゼが関与していると考えられる。

生きた細胞内ではLPCは毒性を示すため、これらを消去する系が存在する。従って生体内ではLPCはほとんど検出されない。しかしながら細胞が障害を受けたり、死んだ後ではしばしば検出される。現在までよく知られているLPCの蓄積は虚血後の心筋であり¹³⁾、凍結貯蔵中の魚肉においてである¹⁾。魚肉におけるLPCの蓄積はその量が多いのが特徴であるが、生成機構についてはまだ完全には明らかにされていない¹⁴⁾。

ペヘレイ筋肉の凍結貯蔵による経時的な変動を検討するにあたり、まず基準となる新鮮な筋肉の各脂質含量を測定した結果、コレステロールエステルが検出された。これはカツオ筋肉ではあまり検出されなかった脂質である。中性脂質は一般に飽和脂肪酸、モノエン酸が組成を構成する主な成分だが、コレステロールエステルの構成脂肪酸の主成分はドコサヘキサエン酸43.3%であり、高度不飽和脂肪酸が多い組成をしていた。コレステロールエステルはアシルCoA-コレステロールアシルトランスフェラーゼ (ACAT) によって形成されるが、ACATは肝臓で合成され血しょう中に存在する酵素でPCの2位のアシル基を転移する。一般にドコサヘキサエン酸などの高度不飽和脂肪酸はグリセロールの2位に結合していることから、PCの2位に結合した高度不飽和脂肪酸がACATによってコレステロールに転移したためコレステロールエステルにはTGと異なり高度不飽和脂肪酸が多い組成をしているもの考えられる。

またペヘレイ筋肉において、凍結貯蔵中に生成されたLPCの脂肪酸組成を検討した結果、LPCの脂肪酸も高度不飽和脂肪酸が大半を占め、主成分はドコサヘキサエン酸で約50%ほどであった。サブクラス組成においても組成の98%以上がアシル型であり、LPCのもととなるPCのサブクラス組成もジアシル型が高比率であった。一般に高度不飽和脂肪酸はグリセロールの2位に結合しており、実際、筋肉PCを用いた分子内分布の分析においても、2位の脂肪酸組成は75.3%が高度不飽和脂肪酸であった(表8)。したがってジアシル型PCの1位が加水分解され1-LPCが生成したと考えられた。

カツオ筋肉中ではLPC、遊離脂肪酸共に新鮮な筋肉にさえ検出され、凍結貯蔵することでさらに蓄積していった。そして4カ月間の蓄積の後、それ以降はさらに分解されて逆に減少していった³⁴⁾。だがペヘレイ筋肉においては新鮮な時点では遊離脂肪酸はごくわずか、LPCに至っては検出されなかった。しかし貯蔵することによりLPC、遊離脂肪酸ともに蓄積してい

たが、その蓄積度合もカツオと異なり長期間にわたり徐々に蓄積していった。カツオにおいては貯蔵4カ月がピークであったのに対し、ペヘレイでは貯蔵12カ月まで蓄積が続いており、蓄積量もLPCではカツオの30%、遊離脂肪酸でも60%程度であった(表6)。LPCに対し遊離脂肪酸の蓄積量の方が遙かに多いのはPC以外の他の脂質も貯蔵中分解をうけ、遊離脂肪酸が生成されているためと考えられる。結果には示していないが、遊離脂肪酸において最も蓄積が顕著であったのはオレイン酸であり、オレイン酸を最も多く含む脂質はトリグリセリドであった(表4)。しかしトリグリセリドの含量は貯蔵期間中変動が少なく(表6)、脂肪酸組成にも変化はなかった。したがって、LPCと遊離脂肪酸の蓄積量に大きな差ができた原因については現在のところ明かでない。

以上ペヘレイ筋肉においても凍結貯蔵中にLPCと遊離脂肪酸が蓄積していったが、その経時的な変動はカツオ筋肉と大きく異なった。しかし生成されたLPCの脂肪酸組成及びPCの脂肪酸分子内分布(表7、8)の結果から、おそらくカツオと同様にLPCの生成にはホスホリパーゼA₂活性が関与しているものと考えられた。

参考文献

- 1) E.G. Bligh, M.A. Scott: J. Fish Res. Bd. Canada 23, 1025 (1966)
- 2) 小泉千秋: 水産物利用学(鴻巣章二、橋本周久編) II 魚介類の化学 3. 脂質 p. 75 (1992) 恒星社厚生閣
- 3) K. Satouchi, M. Sakaguchi, M. Shirakawa, K. Hirano, T. Tanaka: Biochim. Biophys. Acta 1214, 303 (1994)
- 4) 里内 清、坂口昌充、福島秀規、平野 薫、田中 保: 脂質生化学研究 37, 171 (1995)
- 5) E.G. Bligh, W.J. Dyer: Can. J. Biochem. Physiol. 37, 911 (1959)
- 6) G.R. Bartlett: J. Biol. Chem. 234, 466 (1959)
- 7) T. Sugiura, M. Nakajima, N. Sekiguchi, Y. Nakagawa, K. Waku: Lipids 18, 125 (1983)
- 8) K. Satouchi, R.N. Pinckard, L.M. McManus, D.J. Hanahan: J. Biol. Chem. 256, 4425 (1981)
- 9) K. Satouchi, K. Hirano, M. Sakaguchi, H. Takehara, F. Matsuura: Lipids 28, 837 (1993)
- 10) J. Sugatani, K. Fujimura, M. Miwa, K. Satouchi, K. Saito: Lipids 26, 1347 (1991)
- 11) K. Satouchi, M. Oda, K. Yasunaga, K. Saito: Biochem. Biophys. Res. Commun. 128, 1409 (1985)
- 12) F. Snyder, T-C Lee, M.L. Blank: Prog. Lipid Res. 31, 65 (1992)
- 13) 矢ノ下良平、工藤一郎: 蛋白質核酸酵素 31, 435 (1991)
- 14) T. Oshima, S. Wada, C. Koizumi: Bull. Japan Soc. Sci. Fish. 50, 2091 (1984)