

魚肉たん白質抽出液のゲル区分II

誌名	日本水産學會誌
ISSN	00215392
著者	梅本, 滋
巻/号	37巻12号
掲載ページ	p. 1182-1186
発行年月	1971年12月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



魚肉たん白質抽出液のゲル区分—II.*

ゲル区分たん白質の性質

梅 本 滋

(1971年6月28日受理)

Studies on Gel Fraction in Fish Muscle Protein Extracts—II.
Some Properties of Gel Fraction Protein

Shigeru UMEMOTO**

It was previously reported that the turbid protein extracts from fish muscle contained a gel fraction. In order to investigate the relationship between the gel fraction and myofibrillar protein, some properties of the former were examined. The gel fraction was prepared from frozen- or ice-stored muscles of both the flatfish, *Kareius bicoloratus*, and Alaska pollack, *Theragra charcogramma*, by extraction using KCl-phosphate buffer ($I=0.5$, pH 7.2) and centrifugal sedimentation at $30,000\sim 40,000\times g$.

The absorption curve of the gel fraction was similar to that of actomyosin. The gel fraction did not show streaming birefringence by OKADA's apparatus. On addition of ATP to the gel fraction at low ionic strength, superprecipitation occurred forming a loose slurry-like precipitate. The viscosity of the redispersed solution ($I=0.5$) of the gel fraction fell sharply on addition of ATP, but the ATP sensitivity values were not very high. The gel fraction had Mg-ATPase activity at low ionic strength (0.03 M KCl). These properties of the gel fraction are similar to that of actomyosin with the exception of streaming birefringence. As a result, the author considers that the gel fraction may contain an aggregated protein which involves myofibrillar protein and that the shape of the aggregate may not be so thread-like.

前報¹⁾で魚肉たん白質抽出液は往々にして白濁することがあり、白濁成分は数万 $\times g$ の遠心で容易に沈降し、多量のたん白質を含み、いわゆるゲル区分(Gと略記)に相当すると報告した。このGは魚肉たん白質の aggregation や不溶性の変性を理解する上で有用な手がかりを与えてくれそうに思われる。Gが筋原繊維たん白質とどのような関連をもつものなのかを知るため、Gの紫外部吸収、流動復屈折、ATPとの相互作用などの性質について検討した。その結果、Gはアクトミオンン(AM)に似た性質をもっていることを知ったので、その概要を報告する。

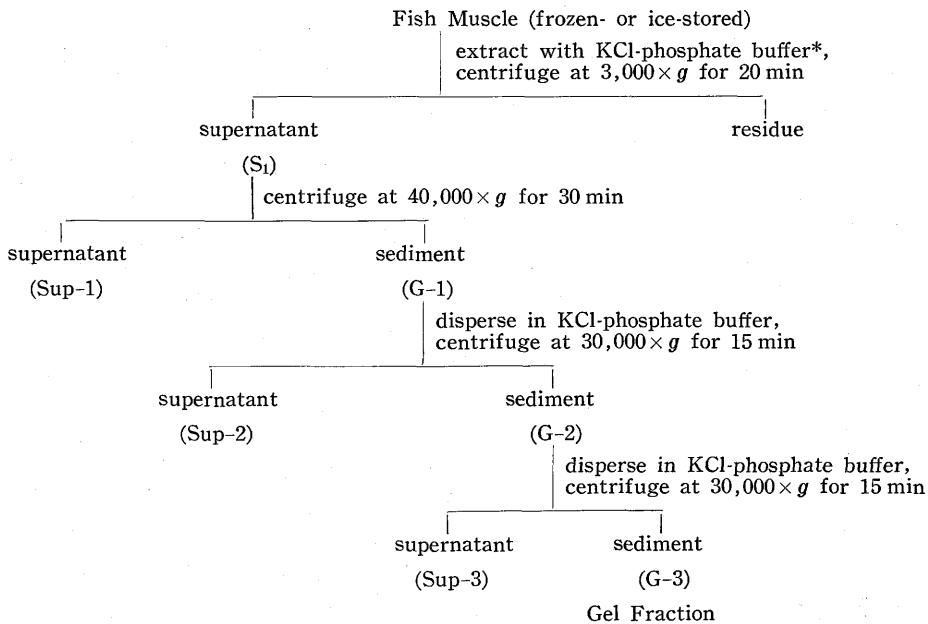
実験方法

試料 イシガレイ *Kareius bicoloratus*, スケトウダラ *Theragra charcogramma* の肉をポリエチレン袋に入れて氷蔵、または凍結貯蔵 (-20°C) した。

Gの調製 調製法の概要を Fig. 1 に示す。細切肉 (1部) にたん白質抽出剤として KCl-phosphate buffer (0.45 M KCl-3.38 mM KH_2PO_4 -15.5 mM Na_2HPO_4 , $I=0.5$, pH 7.2)²⁾ (19部) を加え、泡どめ板つきブレンダー³⁾に 1.5 分間かけたあと、 $3,000\times g$ で 20 分間遠心分離して上澄液を得、これを肉たん白質抽出液 (S_1) とした。Gは前報¹⁾で述べたように、数万 $\times g$ の遠心分離で容易に沈降するので、この性質

* 第1報¹⁾の主題を標記のように変更する。東海区水産研究所業績 B 546 号

** 東海区水産研究所 (Tokai Reg. Fish. Res. Lab., Kachidoki, Chuo-ku, Tokyo, 104)



* 0.45 M KCl-3.38 mM KH₂PO₄-15.5 mM Na₂HPO₄ (I=0.5, pH 7.2).

Fig. 1. Method of preparing the gel fraction from fish muscle.

を利用して上に得た S₁ から G を分けた。すなわち、日立分離用超遠心機 55 PA 形を用い、S₁ を $40,000 \times g$ で 30 分間遠心分離して上澄液区分 (Sup-1) と沈降区分 (G-1) とに分けた。G-1 は精製のため前記抽出剤に再分散、遠心分離 ($30,000 \times g$) の処理を 2 回行なつて沈降区分 (G-3) を得た。ここに得られる G-3 は G の濃厚な分散液 (KCl-phosphate buffer, I=0.5) の状態になつている。この G-3 を適宜希釈、イオン強度の調整、あるいはりん酸除去などの処理を行ない、以下に述べる各種試験の G 試料とした。しかし、遠心分離で G を分けているため、G-3 には不純物として Sup-3 の一部が残存し、G-3 のたん白質の 5~20% を Sup-3 のたん白質が占めることがわかつた。そこで、この不純物の影響を調べるため、Sup-3 についても試験した。

流動復屈折 岡田ら⁴⁾の装置を用い流動復屈折 (SB) を定性的に観察した。この装置では、ミオシンでは SB が検出できず、AM では prot. N 0.27 mg/ml 以上の濃度で SB を明瞭に観察できる⁵⁾。

超沈殿 試料を小形試験管にとり、I=0.1, 1 mM ATP, 室温, 約 15 分間での超沈殿生成の有無を、ATP 無添加試料を対照にして肉眼的に観察した。Mg⁺⁺ は特に添加しなかつた。

ATP 感度 ATP 1 mM 添加前後の G 分散液 (I=0.5) の粘度変化を 25°C でオストワルド粘度計によつて測定し、ATP 添加による粘度の低下から ATP 感度^{6,7)}を算出した。Mg⁺⁺ は特に添加しなかつた。

AM の調製 S₁ から G を除いた Sup-1 について、希釈沈殿 (I=0.2) によつて AM を調製し、同時にりん酸も除去した。この AM を 0.6 M KCl の溶液とし、ATPase 活性測定の試料とした。

Mg-ATPase 活性 G 試料中のりん酸を除くため、G-3 を 0.2 M KCl 溶液で洗つたのち、G の 0.6 M KCl 分散液とし、これを ATPase 活性測定の試料とした。丸山ら⁸⁾、藤巻ら⁹⁾が AM について報告している反応条件を参考にして、低イオン強度での Mg-ATPase 活性を測定した。反応液の組成は、試料たん白質 0.04~0.08 mg/ml, 10 mM tris-HCl buffer (pH 8.0), 1 mM ATP, 1 mM MgCl₂, 0.03 M KCl である。25°C で 1~4 分間反応させたのち、3% 三塩素酢酸で反応を停止、P_i は ALLEN 法の中村による変法¹⁰⁾で測定した。発色は 25°C で 20 分、測定波長は 720 mμ である。

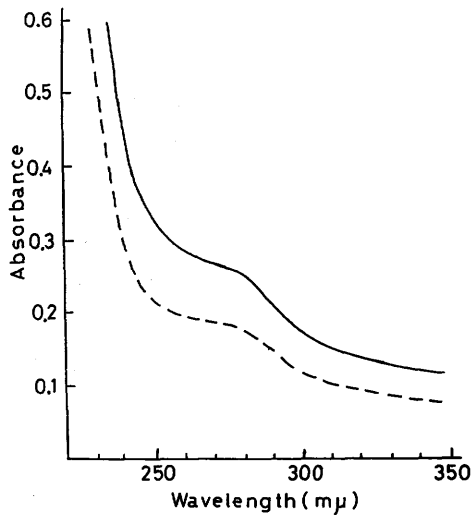


Fig. 2. Absorption curves of the gel fraction.

---- Gel fraction from the flatfish muscle stored in ice for 1 day and then at -20°C for 6 days (prot. N: 0.0053 mg/ml).

— Gel fraction from the Alaska pollack muscle stored at -20°C for 9 days (prot. N: 0.0072 mg/ml).

向がみられた。これは AM について知られている傾向に似ている。ATP 感度は Table 1 に示した値が得られた。コイ鮮肉 AM について報告されている ATP 感度 (125~140)^{7,15,16)} に比べ、G の ATP 感度は低値である。Sup-3 では ATP 添加による粘度低下は微小であつた。

Mg-ATPase 活性 G について、0.03 M KCl での Mg-ATPase 活性を測定し、Table 2 に示す結果を

Table 1. Properties of the gel fraction and Sup-3* from the flatfish and the Alaska pollack muscle.

	Flatfish-1		Flatfish-2		Alaska pollack-1		Alaska pollack-2	
	Gel fraction	Sup-3	Gel fraction	Sup-3	Gel fraction	Sup-3	Gel fraction	Sup-3
Streaming birefringence	—	—	—	—	—	—	—	—
Super-precipitation	≡	+	≡	±	≡	—	≡	—
ATP sensitivity	65	/	66	/	42	/	36	/

* See Fig. 1.

Flatfish-1: stored in ice for 6 days and then at -20°C for 1 day.

Flatfish-2: stored in ice for 1 day and then at -20°C for 6 days.

Alaska pollack-1: stored at -20°C for 36 days.

Alaska pollack-2: stored at -20°C for 9 days.

Test conditions (final concentration): Superprecipitation: $I=0.1$, ATP 1 mM. ATP sensitivity: KCl-phosphate buffer ($I=0.5$), ATP 1 mM, at 25°C .

たん白質の定量 ミクロ・ビュレット法^{11,12)}で定量した。吸光度測定には日立分光光度計 124 形を用い、吸収曲線はこの光度計に記録計をつけ自記させた。

結果および考察

紫外部吸収 G-3 の希釈液について得た紫外部吸収曲線を Fig. 2 に示す。G の吸収曲線を、著者ら^{12,13)} がゲルろ過で分画した魚肉 AM、ミオシンの吸収曲線と比べると、前者の吸収曲線に似ている。試料 G-3 に残存する Sup-3 の影響は無視できる程度に小さかつた。

SB, 超沈殿, ATP 感度 得られた結果を Table 1 に示す。

G では SB は全く認められなかつた。したがつて G の形状は AM のような糸状とは考えられない。

G はゆるいかゆ状沈殿の超沈殿を示したが、コイ鮮肉の AM で報告されている栓状沈殿の生成¹⁴⁾ はみられなかつた。Sup-3 では超沈殿が微弱か、または全くみられなかつた。

G の ATP 添加による粘度変化として、Fig. 3 に示す結果を得た。ATP 添加直後に粘度が急激に低下、その後粘度がある程度まで徐々に回復する傾向

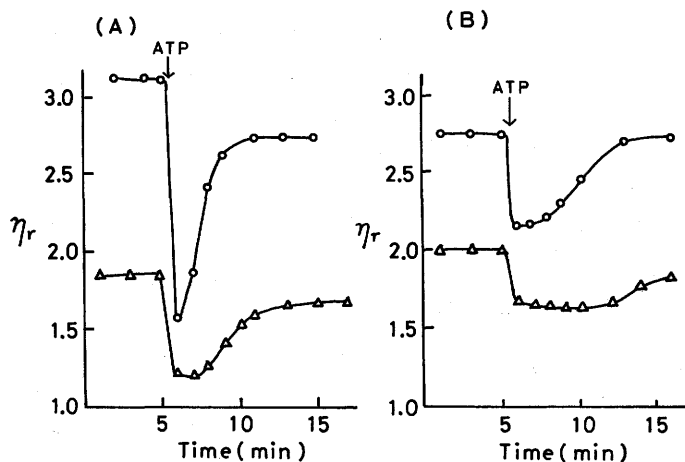


Fig. 3. Changes in viscosity of the gel fraction on addition of ATP.

(A): Gel fraction from the flatfish muscle stored in ice for 6 days. Protein concentration: —○— 0.585%, —△— 0.439%.

(B): Gel fraction from the Alaska pollack muscle stored at -20°C for 9 days. Protein concentration: —○— 0.399%, —△— 0.329%.

Test condition: 1 mM ATP, at 25°C .

Table 2. Mg-ATPase activity of the gel fraction and of the actomyosin from the flatfish and the Alaska pollack muscle (P_i : $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ protein).

Sample	Gel fraction	Actomyosin prepared from Sup-1*
Flatfish-1	0.5	/
Flatfish-2	0.8	0.6
Alaska pollack-1	2.5	2.0
Alaska pollack-2	1.8	1.1

* See Fig. 1.

Flatfish-1: stored at -20°C for 53 days.

Flatfish-2: stored in ice for 7 days and then at -20°C for 38 days.

Alaska pollack-1: stored at -20°C for 9 days.

Alaska pollack-2: stored in ice for 4 days.

Test condition (final concentration): protein 0.04~0.08 mg/ml, 10 mM tris-HCl buffer (pH 8.0), 1 mM MgCl_2 , 1 mM ATP, 0.03 M KCl, at 25°C .

得た。比較のため、Sup-1 から調製した AM についても同様に測定した。G は同じ試料肉の AM と比べ、同程度または高めの Mg-ATPase 活性を示した。岩田ら¹⁷⁾が報告しているスケトウダラ肉 AM の Mg-ATPase 活性の値 1.7~2.5 $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$ protein (反応条件は本報と同じ) に比べると、G の Mg-ATPase 活性は同程度または低値である。

前報¹⁾ および上述の結果から、G の主な性質としては、1) 数万×g の遠心で容易に沈降するので粒子は非常に大きい、2) たん白質を多量に含む、3) SB がみられない、4) 反応の強さに程度の差はあるが ATP との相互作用の点で AM に似た性質を持つ、などの諸点をあげることができる。上記の諸性質から、G のたん白質は筋原繊維たん白質を含む粒子の大きい凝集物で、球状に近い (SB がみられない程度に) 形状の protein aggregate と考えられる。BUTTKUS¹⁸⁾ はミオシンが重合するとき、ミオシン分子の側面での結合が起こると推論している。このような結合による凝集物では、ミオシン分子が本来もっている棒状の形状は失われる傾向があろう。

要 約

1. 氷蔵または凍結貯蔵インガレイ、スケトウダラ肉のたん白質抽出液からゲル区分 (G) を調製し、その性質について検討した。
2. G は超沈殿を示し、低値ながら ATP 感度をもち、Mg-ATPase 活性を示すなどアクトミオシンに似た性質を持っていた。しかし、流動復屈折は認められなかった。
3. G のたん白質は筋原繊維たん白質を含む球状に近い形状の protein aggregate と考えられる。

本研究に御教示をいただいた右田正男先生、岡田稔利用部長、試料魚入手に便宜を図っていただいた福島県水産試験場柳井直一主任研究員に厚く謝意を表します。

文 献

- 1) 梅本 滋・神名孝一: 東海水研報, **65**, 81~89 (1971).
- 2) L. MACKIE and J. J. CONNELL: *Biochim. Biophys. Acta*, **93**, 544~552 (1964).
- 3) 右田正男・松本重一郎: 本誌, **22**, 561~568 (1957).
- 4) 岡田 稔・多田節子: 同誌, **20**, 224~231 (1954).
- 5) 岡田 稔・神名孝一: 同誌, **36**, 1088~1091 (1970).
- 6) H. H. WEBER and H. PORTZEHL: in "Advances in Protein Chemistry (M. L. ANSON, K. BAILEY, and J. T. EDSALL, ed.), Vol. 7, 236, Academic Press, New York (1952).
- 7) 新井健一・高士令二・齋藤恒行: 本誌, **36**, 237~240 (1970).
- 8) K. MARUYAMA and Y. ISHIKAWA: *Biochim. Biophys. Acta*, **77**, 682~685 (1963).
- 9) N. ARAKAWA, A. OKITANI, and M. FUJIMAKI: *Agr. Biol. Chem.*, **29**, 574~580 (1965).
- 10) 大村京生: 実験化学講座 (日本化学会編), Vol. 23, 532~533, 丸善, 東京 (1957).
- 11) R. F. ITZHAKI and D. M. GILL: *Anal. Biochem.*, **9**, 401~410 (1964).
- 12) 梅本 滋・神名孝一: 東海水研報, **56**, 109~116 (1968).
- 13) 梅本 滋・神名孝一: 本誌, **35**, 555~558 (1969).
- 14) 新井健一・高士令二・齋藤恒行: 同誌, **36**, 487~490 (1970).
- 15) 新井健一・高士令二・齋藤恒行: 同誌, **36**, 165~168 (1970).
- 16) 高士令二・新井健一・齋藤恒行: 同誌, **36**, 169~172 (1970).
- 17) 岩田和士・岡田 稔: 昭和 45 年度日本水産学会年会講演 (1970).
- 18) H. BUTTKUS: *J. Food Sci.*, **35**, 558~562 (1970).