

魚肉たん白質抽出液のゲル区分VII

誌名	日本水産學會誌
ISSN	00215392
著者名	梅本,滋 田口,修
発行元	日本水産學會
巻/号	38巻12号
掲載ページ	p. 1411-1415
発行年月	1972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—VII.

ゲル区分中のアクチン成分*

梅 本 滋・田 口 修

(1972年7月21日受理)

Studies on Gel Fraction in Fish Muscle Protein Extracts—VII.

Actin Component in the Gel Fraction

Shigeru UMEMOTO and Osamu TAGUCHI**

It has been reported that a myosin-like protein component was found in the dissociation products of the gel fraction treated with ATP or pyrophosphate. In order to determine whether the gel fraction contains actin, some properties of the aqueous extracts of the acetone-treated gel fraction were examined.

The gel fraction and actomyosin prepared from frozen or ice-stored muscles of the flatfish, *Kareius bicoloratus* were treated with acetone and extracted with cold water respectively. When 0.1 M KCl and 1 mM MgCl₂ were added to the aqueous extracts of the acetone-treated gel fraction, an increase in viscosity and a development of flow birefringence were observed. Furthermore, superprecipitation occurred when ATP was added to the combined system of myosin and the aqueous extracts of the acetone-treated gel fraction. The actin solution prepared from fresh muscle and the aqueous extracts from the acetone-treated actomyosin had similar viscosity, flow birefringence and superprecipitation properties. These results indicate that the gel fraction contains actin. From the results obtained in the series of the studies, it may be concluded that the gel fraction is an aggregated actomyosin, in which actin and myosin-like components are hypothesized to exist in a similar bound state.

凍結貯蔵または氷蔵魚肉のたん白質抽出液にみられるゲル区分 (Gf と略記) は、ATP による粘度低下、超沈澱、ATPase 活性などアクトミオシン (AM) に似た性質を示す¹⁾。そこで Gf に筋原繊維系のたん白質が含まれているかどうかについて検討した結果、ミオシン (M) 様成分が存在することを知り、その概要をさきに報告した^{2,3)}。

本研究では引き続き Gf 中のアクチン (A) の存否について検討した。すなわち、筋肉をアセトンで処理すると、A は水で抽出できるようになるので、アセトン処理した Gf に、水で抽出されるたん白質が含まれるかどうか、その水抽出液は A の性質を示すかどうかなどについて検討した。以下それらの結果について報告する。

実験方法

試料肉 イシガレイ *Kareius bicoloratus* の即殺後約1時間の普通肉、およびこれをポリエチレン袋に入れて凍結貯蔵、または氷蔵したものをを用いた。

M の調製 高士らの方法⁴⁾により、ATP を含む KCl 溶液で鮮肉から抽出・調製し、これを 0.6 M

* 東海区水産研究所業績 B558 号

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

Table 1. Some properties of the acetone-treated powders and of their aqueous extracts from flatfish muscle.

Sample No.	Source of acetone-treated powder	Water-soluble protein*	Flow birefringence**	Superprecipitation†	Polymerizable protein††
1	Gel fraction from:				
2	Frozen-stored muscle (-10°C, 12 days)	7.4%	++	++	63.5%
3	" (-10°C, 20 days)	8.3	++	++	62.2
4	" (-20°C, 41 days)	8.9	+	+	56.9
5	Ice-stored muscle (2 days)				
6	" (3 days)				
7	" (3 days)				
	" (4 days)	6.5	+	++	51.5
8	Actomyosin from:				
9	Frozen-stored muscle (-20°C, 35 days)	4.2	+	++	63.4
10	" (-20°C, 41 days)				
11	Ice-stored muscle (3 days)	6.1	++	++	65.1
12	" (4 days)	6.5	++	++	50.5
	Fresh muscle (pre-rigor)				
13	Actin for control from:				
	Fresh muscle (pre-rigor) after rough removal of myosin	8.2	+++	++	71.4
14	Fresh muscle (pre-rigor) after washing with 0.4% NaHCO ₃ soln.	9.5	++		68.8

* Figures are given as percent of the water soluble protein to protein in the powder.

** To the aqueous extracts, 0.1 M KCl and 1 mM MgCl₂ (final concn.) were added. Observation of flow birefringence was made with the aqueous extract of 0.2-0.4 mg protein N/ml using the OKADA's apparatus. Before adding the salts, no sample showed flow birefringence.

† Composition of the system: protein, 1 mg/ml; KCl, 0.1 M; ATP, 1 mM; MgCl₂, 1 mM; protein of the aqueous extract : myosin = 1:4.

†† To the aqueous extracts, 0.1 M KCl and 1 ml MgCl₂ (final concn.) were added for polymerization, and then the solutions were centrifuged at 130,000 × g for 2h. Figures are given as percent of the sedimented protein to protein in the aqueous extract.

KCl 溶液に溶かした。

A の調製 鮮肉から M を抽出した筋肉残渣 (MR), または肉ひき機にかけた鮮肉を 0.4% NaHCO_3 溶液で洗った MR を, 水で 2-3 回洗い, つぎに約 5 倍量の冷アセトンに浸す処理を 3-4 回くりかえしたのち, 減圧下でアセトンを除去して MR のアセトン処理粉末を得た。この粉末に予め冷却した蒸溜水を加え, ときどき振とう, 氷浴中 30 分-1 時間抽出, 遠心分離 ($10,000 \times g$, 30 分) して A 抽出液を得た。低温で抽出したのは, トロポミオシンの溶出を避けるためである⁵⁾。

F-アクチン (F-A) 含量の測定 REES ら⁶⁾ の方法に準じ, A 抽出液に重合のため塩を加えて 0.1 M KCl-1 mM MgCl_2 の溶液となし, 25°C に 2 時間保つたのち, $130,000 \times g$ で 2 時間遠心分離し, このときの沈降たん白質を F-A とみなし, その含量を求めた。

Gf, AM の調製, およびアセトン処理 VI 報⁷⁾ に述べた方法に準じて調製した。Gf, AM について, 上記 MR の場合と同様にして, 水洗, アセトン処理, 冷水抽出を行なつた。

粘度の測定 オストワルド粘度計を用い, 25°C で測定した。

流動複屈折の観察 岡田ら⁸⁾ の装置を用い, 0.2-0.4 mg protein N/ml の試料溶液 10 ml について定性的に観察した。

超沈澱 新井ら⁹⁾ の方法に準じ, ATP 添加による室温での超沈澱生成の有無を肉眼観察した。反応液の濃度は, たん白質 0.9-1 mg/ml, 0.1 M KCl, 1 mM MgCl_2 , 1 mM ATP である。

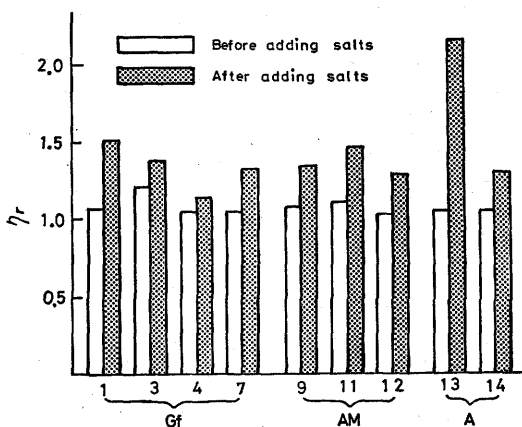
たん白質の定量 ミクロ・ビュレット法^{10,11)} によつた。

結 果

アセトン処理 Gf の水可溶たん白質含量 アセトン処理 Gf, AM および MR について, 水可溶たん白質含量を測定した。その結果は Table 1 にみられるように, アセトン処理 Gf には水可溶たん白質が含まれている。アセトン処理 Gf および AM 中の含量は, 対照の A 抽出の材料としているアセトン処理 MR にくらべ低値のものもみられる。

アセトン処理 Gf 水抽出液の粘度および流動複屈折 アセトン処理 Gf, AM および MR の水抽出液について, 塩の添加前および添加後 (最終濃度 0.1 M KCl, 1 mM MgCl_2) に粘度の測定, および流動複屈折の観察を行なつた。粘度の測定結果を Fig. 1 に示す。対照のアセトン処理 MR 水抽出液の粘度は, 塩の添加で高くなつている。この粘度上昇は, G-アクチン (G-A) が塩の存在下で重合し, F-A になつたことを示すものと解釈される。アセトン処理 Gf および AM の水抽出液でも, 塩の添加による粘度上昇がみられ, A 溶液に似た性質を示している。

流動複屈折の観察結果は Table 1 に示した。対照のアセトン処理 MR 水抽出液では, 塩の添加前は流動複屈折が全くみられないが, 添加後は明瞭に認められる。この変化は, 前述の粘度変化と同様に, G-A が塩の存在下で F-A になつたことを示すものと解釈される。アセトン処理 Gf および AM の水抽出液



Aqueous extracts of acetone-treated powder
Fig. 1. Changes in viscosity of the aqueous extracts of acetone-treated powder from flatfish muscle by addition of salts (0.1 M KCl+1 mM MgCl_2) at 25°C . Gf, gel fraction; AM, actomyosin; A, actin for control.

Sample number in the figure corresponds to that shown in Table 1.

でも、塩の添加前は流動復屈折が全くみられないが、添加後は認められるようになり、A溶液に似た性質を示している。

アセトン処理 Gf 水抽出液に M を加えた系での超沈澱 アセトン処理 Gf, AM および MR の水抽出液に塩 (0.1 M KCl, 1 mM MgCl₂) を加えたのち、これに M 溶液 (0.6 M KCl) を混ぜた。混合割合は、水抽出液中のたん白質:M を 1:4 とした。混合液のたん白質濃度、塩濃度を所定の濃度に調節したのち、ATP 添加による超沈澱生成の有無を観察した (Table 1)。対照のアセトン処理 MR 水抽出液に M を加えた系で、超沈澱が認められ、これは F-A と M とで AM が形成されたことを示すものと解釈される。アセトン処理 Gf または AM の水抽出液に M を加えた系でも超沈澱がみられ、上記 A 溶液についての結果に似ている。

アセトン処理 Gf 水抽出液中の重合性たん白質含量 上記のように、アセトン処理 Gf 水抽出液は A に似た性質を示したので、この成分の含量の目安として、F-A に相当する塩添加で重合するたん白質の含量を測定した (Table 1)。対照のアセトン処理 MR 水抽出液には及ばないが、アセトン処理 Gf 水抽出液中のたん白質の過半は塩添加で重合するたん白質で占められるといえる。

考 察

上述の実験で、アセトン処理 Gf は水可溶たん白質を含み、その水抽出液は塩の添加で粘度の上昇、流動復屈折がみられ、水抽出液に M を加えた系は超沈澱を示すことを知った。これらの性質は、いずれも A 溶液でみられるものであることから、アセトン処理 Gf の水抽出液中には A が溶出している、つまり Gf 中には A が含まれるといえる。

III, IV 報^{2,3)}で、ATP またはピロリン酸塩 (PP) を作用させた Gf を Sepharose 2B でゲルろ過すると、K_{av} 約 0.5 に M 様成分の溶出が認められると報告したが、K_{av} 0.8-1.0 でもたん白質がいくらか溶出しており、これについては未検討のまま残されていた。このため、本報で A を含むことが明らかとなったアセトン処理 MR, Gf の水抽出液について、同様な条件でゲルろ過を試みたところ、たん白質が K_{av} 0.8-1.0 で単一のピークをなして溶出することを知った。したがって、III, IV 報でのゲルろ過の溶出パターンは、ATP または PP の作用をうけて Gf が A および M 様成分に解離することを示しているものと解釈できる。

CONNELL¹²⁾ は、タラ肉を -14°C で長期間貯蔵すると、G-A が重合して F-A になる性質がいくぶん低下すると報告している。前述の実験で、アセトン処理 Gf 水抽出液は、アセトン処理 MR のそれにくらべ、塩添加による流動復屈折の発現の程度がいくぶん低目で、F-A 含量も多少低値のように見受けられる (Table 1)。したがって、Gf 中に含まれる A は、鮮肉中のそれにくらべ、いくらか変性している可能性がある。

Gf 中で A はどのような状態で含まれているのであろうか。アセトン処理 Gf 水抽出液に M を混ぜると AM 特有の性質である超沈澱を示すようになる (Table 1) ので、Gf 中の A は M と結合する能力をもつこと、Gf に ATP または PP を作用させるときには、A および M 様成分が解離生成すること^{2,3)}などから考えて、Gf 中の A 成分は AM に似た結合状態で存在すると推定される。この推定は、Gf は AM に似て ATP との相互作用を示すこと¹⁾、およびアセトン処理 Gf 水抽出液の性質が、アセトン処理 AM の水抽出液のそれとも似ていること (Fig. 1, Table 1) からも支持される。

Gf について、これまでに得た主な知見を列挙してみると、次のようになる。Gf は、(1) 数万×g の遠心で容易に沈降し¹³⁾、(2) 流動復屈折がみられず、粘度も低い⁷⁾、(3) ATP との相互作用を示す¹⁾、(4) Gf のたん白質成分として、A および M 様成分が含まれ、これらは AM に似た結合状態で存在する^{2,3)}、(5) 魚肉を凍結貯蔵または氷蔵すると、筋原繊維たん白質の不溶化が進行し^{14,15)}、貯蔵初期にその溶出量は減少、Gf 量は増大するという逆の関係がみられる¹⁶⁾*。これらの知見を総合して考えると、Gf は AM の aggre-

* 昭和 47 年度日本水産学会春季大会講演。

gate で、AM にくらべて非常に大きな粒子で、非対称性の低い形状のものであろう。

ANDERSON ら¹⁷⁾は、凍結貯蔵タラ肉のたん白質抽出液に、たん白質 aggregate が存在すると報告している。彼女らのいう aggregate は、その消長、超遠心沈降パターンなどからみて、Gf に相当するもののように思われる。

要 約

1. 凍結貯蔵または氷蔵肉のゲル区分 (Gf) にアクチンが含まれるかどうかについて検討した。
2. Gf のアセトン処理粉末の水抽出液は、KCl 添加で粘度が上昇し、流動復屈折を示し、水抽出液とミオシンとの混合液は ATP 添加で超沈澱をおこすなど、アクチンに似た性質を示した。したがって、Gf にはアクチンが含まれる。
3. Gf はアクトミオシンの aggregate で、この中に含まれるアクチンおよびミオシン様成分は、アクトミオシンに似た結合状態で存在しているものであろうと考察した。

御教示をいただいた右田正男先生、岡田稔利用部長、上智大学松本重一郎教授に謝意を表します。

文 献

- 1) 梅本 滋: 本誌, **37**, 1182-1186 (1971).
- 2) 梅本 滋・神名孝一: 同誌, **38**, 239-245 (1972).
- 3) 梅本 滋・神名孝一: 東海水研報, **68**, 71-79 (1971).
- 4) 高士令二・新井健一・斎藤恒行: 本誌, **36**, 165-168 (1970).
- 5) W. DRABIKOWSKI and J. GERGELY: in "Biochemistry of Muscle Contraction" (J. GERGELY ed.), 125-131, Little Brown, Boston (1964).
- 6) M. K. REES and M. YOUNG: *J. Biol. Chem.*, **242**, 4449-4458 (1967).
- 7) 梅本 滋・田口 修: 東海水研報, **70**, 53-56 (1972).
- 8) 岡田 稔・多田節子: 本誌, **20**, 224-231 (1954).
- 9) 新井健一・高士令二・斎藤恒行: 同誌, **36**, 487-490 (1970).
- 10) R. F. ITZHAKI and D. M. GILL: *Anal. Biochem.*, **9**, 401-410 (1964).
- 11) 梅本 滋・神名孝一: 東海水研報, **56**, 109-116 (1968).
- 12) J. J. CONNELL: *J. Sci. Food Agric.*, **11**, 515-519 (1960).
- 13) 梅本 滋・神名孝一: 東海水研報, **65**, 81-89 (1971).
- 14) 梅本 滋・神名孝一: 本誌, **36**, 798-805 (1970).
- 15) 梅本 滋・神名孝一・岩田和士: 同誌, **37**, 1100-1104 (1971).
- 16) 梅本 滋: 東海水研報, **68**, 81-85 (1971).
- 17) M. L. ANDERSON and E. M. RAVESI: *J. Food Sci.*, **35**, 199-206, 551-558 (1970).