

魚類筋肉構成たんぱく質に関する研究 XI

誌名	日本水産學會誌
ISSN	00215392
著者	新井, 健一 高十, 令二
巻/号	39巻5号
掲載ページ	p. 533-541
発行年月	1973年5月

魚類筋肉構成たんぱく質に関する研究—XI

コイ筋肉アクトミオシン ATPase の冷凍変性について*

新井健一・高士令二

(1972年9月20日受理)

Studies on Muscular Proteins of Fish—XI
Effect of Freezing on Denaturation of Actomyosin
ATPase from Carp Muscle

Ken-ichi Arai and Reiji Takashi**

The effect of freezing on the denaturation of actomyosin prepared from carp dorsal muscle was investigated by measurement of Ca^{2+} -ATPase and by solubilities.

Factors involved in the denaturation, *i. e.*, salt (KCl) concentration, pH of the solution and presence of sugar compounds, were tested.

1. The denaturation of actomyosin Ca^{2+} -ATPase by freezing accelerated as the protein concentration decreased below 4 mg/ml, while it proceeded at a uniform rate as protein concentration increased above 5 mg/ml.

2. To obtain a uniform protective effect of sugar compounds on the denaturation of actomyosin Ca^{2+} -ATPase by freezing, it was necessary to add sugar compounds at 20 times the actomyosin content (w/w).

3. On freezing in higher KCl concentration (ref. 0.6 M KCl), sorbitol exerted a remarkable protective effect and sucrose, a lesser effect on the denaturation of actomyosin Ca^{2+} -ATPase. On freezing in lower KCl concentration (ref. 0.13 M KCl), remarkable protective effects by sucrose as well as sorbitol were observed.

4. In comparing the protective effect of some sugar compounds on the denaturation of actomyosin Ca^{2+} -ATPase in 0.6 M KCl, pH 6.8 by freezing, it was found that the order of effectiveness was sorbitol~xylitol>sucrose~glucose~fructose>mannitol.

5. The protective effect of sugar compounds on the denaturation of actomyosin Ca^{2+} -ATPase by freezing was observed to be most efficient at neutral pH. In tests conducted pH 6, 7, and 8, the order of effectiveness of sorbitol on the denaturation was pH 7>8>6.

筋肉構成たんぱく質の低温における変性に関する研究は、従来哺乳動物の中で、特に家兎の骨格筋については、非常に良く行なわれている¹⁻⁴⁾。その理由は家兎の骨格筋から筋肉構成たんぱく質が高純度に調製され、それら各構成たんぱく質の性質が良く解明されているからにほかならない。魚類の筋肉構成たんぱく質の低温における変性に関する研究についても多数の研究報告が提出されてはいるが⁵⁻⁸⁾、これらたんぱく質の調製法およびそれらの特異性に関する知識があまり進展しなかつたせいもあつて、変性の質的な面における研究が十分ではなかつた。著者らは従来、魚類筋肉構成たんぱく質の調製法および生物活性の研究法について研究を続けており⁹⁻¹²⁾、コイ肉からえたアクトミオシン Ca^{2+} -ATPase の冷凍変性における糖類化合物の効果について一部報告した¹³⁾。しかし、良く知られているように、アクトミオシン Ca^{2+} -ATPase の低温

* 本報告は昭和 45 年 4 月 日本水産学会年会において講演発表した。

** 北海道大学水産学部生物化学教室 (Laboratory of Biochemistry, Faculty of Fisheries, Hokkaido University, Hakodate, Japan)

における変性においては、塩濃度、pH、温度、たんぱく質濃度、添加物など多くの要因が影響しているのである*。本報告では、コイ肉のアクトミオン Ca^{2+} -ATPase の冷凍変性に影響する塩濃度、pH、たんぱく質濃度と糖類化合物の効果について、検討を加えたのでその結果について述べる。

実験方法

コイ筋肉からアクトミオンを調製する方法については先に報告した¹⁰⁾。この方法によつて高濃度のたんぱく質溶液(約 20 mg/ml)を調製した。溶液は 0.6 M KCl (5 mM Tris-maleate buffer を含む, pH 6.8) と 0.4 M KCl (5 mM Tris-maleate buffer を含む, pH 6.8) とし、冷室で同溶液に 1-2 日間透析した。このアクトミオンの 0.6 M KCl と 0.4 M KCl 溶液を、小試験管内で同じ溶媒かまたは 5 mM Tris-maleate buffer, pH 6.8 溶液を加えて 3 倍に稀釈すると KCl 濃度がたとえば 0.60, 0.40, 0.20, 0.13 M で pH および、たんぱく質濃度が一定の溶液 (5-8 mg/ml) を作る事ができる。これらの試料を使つて冷凍による変性に対する塩濃度の効果を検討した。また、pH の効果を検討する実験では、緩衝液として、Tris-maleate を採用し pH の保持を確実にするため 20 mM 濃度とし pH 6, 7, 8 について検討を加えた。本実験では、冷凍変性を行なうに当り、アクトミオンのたんぱく質濃度を普通 5-8 mg/ml に調節したが、とくにたんぱく質濃度と変性の相互関係を明らかにする目的の実験では 1-12 mg/ml の濃度範囲で変性を検討した。なお、糖類化合物としてはソルビトール、シュクロース、キシリトール、マンニトール、グルコースを使用して冷凍変性に対する保護作用を検討した。とくに述べる以外では、糖類化合物の添加量は、アクトミオンたんぱく質量の 20 倍重量とし、粉末で加えて溶解させた。このようにして各種の条件に調節したアクトミオン溶液の一定容量(通常 4-5 ml)を -20°C の冷凍庫中で冷凍した。一定期間貯蔵後これらを取り出して室温で融解し、セロファンチューブ中に洗い出して移し、0.6 M KCl (5 mM Tris-maleate, pH 6.8) 溶液に対して一夜透析した。十分透析した後、この溶液を $20,000\times g$ で 60 分間遠心分離して上澄と沈澱に分け、上澄についてはその容量、たんぱく質量および Ca^{2+} -ATPase 比活性を測定した。沈澱は 0.5 N NaOH を適量加えて十分溶解したことを確かめてから容量とたんぱく質量を測定した。なお、 Ca^{2+} -ATPase 活性は凍結する前の比活性 ($\mu\text{moles Pi 生成/分/mg}$, アクトミオン) を測定しておいてこの値に対する相対活性として表わした。たんぱく質量については上澄液と沈澱を NaOH によつて再溶解した液の両方について得られた値を合計し、その合計値に対する上澄区分が占めるパーセントを計算して(未変性)アクトミオンたんぱく質を表わした。アクトミオンの変性は、このようにして求めた Ca^{2+} -ATPase 相対活性と未変性たんぱく質の百分率を乗じてあらわしてある。

Ca^{2+} -ATPase 活性の測定は 0.060 M KCl, 0.005 M CaCl_2 , 0.025 M Tris-maleate, pH 7.0, 0.001 M ATP, 0.2-0.5 mg/ml アクトミオンの反応組成液で行ない、 25°C における無機りん酸の遊離を比色定量し、一次反応式から比活性を求めた。

アクトミオンたんぱく質量はビュレット法で比色定量した¹⁵⁾。なお、超沈澱の測定は濁度法の簡便法で行ない、試験管中に 0.060 M KCl で、約 0.4 mg/ml アクトミオン懸濁液を作り、これに 0.001 M ATP を加え攪拌しながら濁りの増加を $660 m\mu$ における吸収の増加として測定した。

実験結果

アクトミオン Ca^{2+} -ATPase の冷凍変性とたんぱく質濃度の関係 まずコイ筋肉アクトミオンの 0.6 M KCl-5 mM Tris-maleate pH 6.8 溶液をたんぱく質濃度が 1 から 12 mg/ml の間の各種濃度になるようにつくり、 -20°C で 3 日間貯蔵した後 Ca^{2+} -ATPase の変性がたんぱく質濃度と、どのような関係にあるかを検討した。その結果を Fig. 1 に示した。Fig. 1 の結果によれば、アクトミオン Ca^{2+} -ATPase は -20°C 、3 日間の冷凍によつて、その 75-90% が変性するのであるが、たんぱく質濃度が 5 mg/ml より高くなれば変性の割合はほぼ一定で 78% となつており、4 mg/ml より低くなれば Ca^{2+} -ATPase の変性

* 安井 勉：日本食品工業第 15 回大会シンポジウム講演集 (1968)。

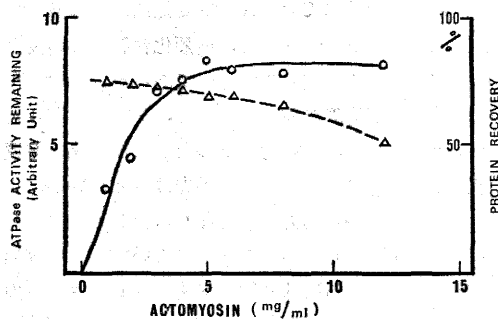


Fig. 1 Effect of protein concentration on the denaturation of actomyosin Ca^{2+} -ATPase by freezing.

Various protein concentration of actomyosin in 0.6M KCl, pH 6.8 was frozen at -20°C for 3 days.

After thawing specimen was dialyzed against cold 0.6M KCl, pH 6.8 overnight, centrifuged at 20,000 \times g for 60 minutes, and supernatant was used for measurement of Ca^{2+} -ATPase activity and protein.

Ca^{2+} -ATPase activity measurement was conducted in the following mixture at 25°C and pH 7.0; 0.060 M KCl, 0.025 M Tris-maleate buffer, 0.005 M CaCl_2 , 0.001 M ATP, and 0.2-0.5 mg/ml of actomyosin.

solid line, Ca^{2+} -ATPase activity remaining (μ moles Pi liberated/min)
dashed line, the amount of protein recovered (%)

この結果によると、8.7 mg/ml 溶液ではたんぱく質量に対して 15 倍重量、2.2 mg/ml 溶液では 5-10 倍重量のソルビトールの添加が最良の保護効果を示すことがわかる。2.2 mg/ml 溶液ではソルビトールによる保護作用は弱く、8.7 mg/ml の場合の約 40% にすぎない事実は Fig. 1 の結果と同じ傾向である。そしてこの図中には示されていないが変性は Ca^{2+} -ATPase 比活性の減少として認められており、たんぱく質量は 2.2, 8.7 mg/ml のいずれの場合も 80% 前後残存しており、余り差異はなかつた。また、5-8 mg/ml 濃度でこの実験をくりかえしてみると、たんぱく質量の 5-10 倍重量のソルビトールの添加が最高の効果を示すような場合もえられている (C)。その理由としては、いくつかの要因が影響していると考えられるのであるが、いずれにしても冷凍変性に対して十分な効果を期待するために、本実験ではアクトミオン量に対して 20 倍重量のソルビトールを添加することを原則とした。なお、アクトミオン量と糖の添加量の関係はソルビトール以外の糖化合物の場合も同じ結果である。

アクトミオン Ca^{2+} -ATPase の冷凍変性に対する糖の保護作用と KCl 濃度との関係 アクトミオンをたんぱく質濃度および pH を一定になるようにしながら KCl 濃度だけを変化させるように調整した。(方法の項を参照されたい) これらを -20°C で冷凍貯蔵して変性の進行を検討した。添加物としてはソルビトールとシュクロースをアクトミオン量の 20 倍重量添加溶解させた。その結果を Table 1 に示した。Table 1 の結果によると、KCl 濃度の高低に関係なくアクトミオンは冷凍によつて著しい変性をうける

は早くなり、特に 1 mg/ml では 90% の変性がみられた。この変性は Ca^{2+} -ATPase 比活性の劣化であつたたんぱく質の溶解性の減少によるものではなかつた。すなわち、同じ実験条件下におけるアクトミオンのたんぱく質量の変化だけをプロットしてみると (点線)、たんぱく質量で測定される変性は Ca^{2+} -ATPase の場合ほどたんぱく質濃度による依存性を示さず、むしろ両者の関係は反比例的で、たんぱく質濃度が大きくなればやや変性は早くなる傾向が認められる。この事実は、たんぱく質濃度が低いときは Ca^{2+} -ATPase の失活が早く高くなれば分子会合が早くなるというタラのミオンに関する知見と一致している¹⁵⁾。したがつて、アクトミオンの変性を測定する実験では変性の尺度として採用する性質と、たんぱく質濃度との関連をあらかじめ検討しておく必要があることがわかる。本研究の目的は Ca^{2+} -ATPase (ATPase 相対活性 \times 未変性たんぱく質量 (%)) による変性の追究をすることにあるから、たんぱく質濃度は 5-8 mg/ml に調節して以下の大部分の実験を行なつた。

アクトミオン Ca^{2+} -ATPase の冷凍変性とソルビトール添加量との関係 次に、アクトミオン Ca^{2+} -ATPase の冷凍変性に対するソルビトールの保護作用とソルビトール添加量との関係を検討し、その結果を Fig. 2 に示した。アクトミオン Ca^{2+} -ATPase の変性に対するソルビトールの保護作用を検討するに当り、たんぱく質濃度は 8.7 mg/ml (A) と 2.2 mg/ml (B) 溶液について実験を行なつた。

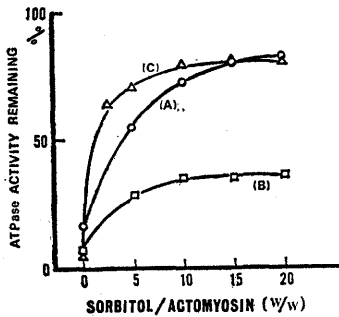


Fig. 2 Protective effect of sorbitol on the denaturation of actomyosin Ca^{2+} -ATPase by freezing.

Various weight ratios of sorbitol were added to protein present and kept frozen for 2 weeks. Added sorbitol was removed by dialysis before Ca^{2+} -ATPase assay. The methods of Ca^{2+} -ATPase and protein measurement and other experimental conditions were the same as in Fig. 1.

Two different concentrations of same actomyosin in 0.6 M KCl, pH 6.8 were tested. (A)...8.7 mg/ml, (B)...2.2 mg/ml. Another Actomyosin preparation was kept frozen for 6 weeks with various weight of sorbitol added. (C)...8.0 mg/ml.

アクトミオシンだけが超沈澱し、シュクロース添加のものは超沈澱力を示さない事実を認めている¹⁶⁾。

アクトミオシン Ca^{2+} -ATPase の冷凍変性と糖の種類による保護効果の差異について アクトミオシン Ca^{2+} -ATPase の冷凍変性に際して、糖類化合物の種類が異なればその保護効果も異なるという事実が Table 1 の結果によつてわかつたので、さらに数種の糖類化合物の保護効果について検討してみた。その結果を Table 2 に示した。この結果によると、試験した糖類化合物の中で著しい保護効果を示したものはソルビトールとキシリトールであつて、シュクロース、グルコースは効力が弱く前の 2 者に比べて 40-50% の効力を示すだけであつた。いずれも、たんぱく質の溶解量に対してではなく Ca^{2+} -ATPase 比活性の劣化を阻止することができないことがわかる。一方、ソルビトールの異性体であるにもかかわらずマンニトールはほとんど保護効果がなくて、糖を全く含まない対照に比べわずかに優れているだけであつた。マンニトールの場合は ATPase 比活性だけではなく、たんぱく質の溶解性をも保持することができないことがわかつた。なお、マンニトールが変性に対して保護作用がないのは、その溶解度が非常に低いため、凍結に際してマンニトールが晶出してしまったためである。この現象は肉眼で判断できる。マンニトールが溶解状態にあるとき、たとえば、加熱変性の場合には変性保護作用をいちじるしく示す*。また、冷凍貯蔵後、ここでえられたアクトミオシンの超沈澱性を検討し、その結果を Fig 3 に示した。すなわち、この結果によると、ソルビトールとキシリトールを添加して冷凍したアクトミオシンだけは、つよい超沈澱を行なうが、シュクロースとグルコースは非常に弱い超沈澱がおこるだけであつて、この結果は Table 2 でえられた Ca^{2+} -ATPase 比活性の強さに関する結果と良く一致するものであつた。すなわち、アクトミオシンの冷凍変性に対して、

が、そのとき特に Ca^{2+} -ATPase 比活性が激減していることがわかる。そして、糖類化合物はこの変性を非常に有効に抑制しているのであるが、その効果は低い塩濃度溶液において著しく、ソルビトールとシュクロースは同じ効力であつた。しかし高い塩濃度になると、ソルビトールの効力は変わらないが、シュクロースは余り効力がなくなり、見かけ上ソルビトールの 1/3 くらいの効力となつていた。この高塩濃度溶液における冷凍変性に対するシュクロースの効力の弱さは非常に興味ある事実であるが、 Ca^{2+} -ATPase 比活性の劣化を阻止できないと言う点に特徴があつた。Table 1 には 2 種のアクトミオシンについて 2 週間、および 12 週間冷凍貯蔵した結果を紹介してあるが、いずれの結果も全く同一の傾向を示しており、冷凍貯蔵中には余り大きな変化が無いことも予想される。また、高・低 2 種の塩濃度溶液のアクトミオシンの冷凍変性において、ソルビトールとシュクロースの変性保護効果が異なつていと言ふ事実を確かめるために、冷凍後回収したアクトミオシンの超沈澱性を濁度法によつて検討してみると、それらの超沈澱力はほぼ Ca^{2+} -ATPase 比活性の強さと比例しており、低い塩濃度でソルビトールまたはシュクロースを添加して冷凍したアクトミオシンはいずれも超沈澱したのに対して、高い塩濃度で冷凍したアクトミオシンではソルビトール添加の

* 昭和 45 年度日本水産学会秋季大会で発表

Table 1. Effect of KCl concentration on the denaturation of actomyosin Ca^{2+} -ATPase by freezing in the presence of sugar compounds.

Four ml of each actomyosins in the solution of various KCl concentrations were kept frozen at -20°C in the presence of sorbitol or sucrose. Weight ratio of sorbitol or sucrose added to actomyosin present was 20:1.

Other experimental conditions were the same as in Fig. 1.

Preparation 1, actomyosin 8.0 mg/ml frozen for 2 weeks.

Preparation 2, actomyosin 10.1 mg/ml frozen for 3 months.

	Conc. of KCl	Additive	Protein recovery	Relative Ca^{2+} -ATPase activity	Remaining Ca^{2+} -ATPase activity
Before freezing			100%	1.00	100%
Preparation 1	0.13 (M)	none	60.2	0.236	41.2
		sorbitol	89.7	0.937	84.0
		sucrose	87.0	1.000	87.0
	0.20	none	72.1	0.152	10.9
		sorbitol	87.6	0.942	82.5
		sucrose	87.7	0.596	52.3
	0.40	none	74.4	0.096	7.1
		sorbitol	85.8	0.958	82.2
		sucrose	88.8	0.507	45.0
	0.60	none	70.5	0.128	9.0
		sorbitol	86.4	0.958	82.8
		sucrose	86.6	0.439	38.0
Preparation 2	0.16	none	66.2	0.082	5.4
		sorbitol	85.5	0.888	75.9
		sucrose	87.0	0.898	78.1
	0.28	none	73.8	0.046	3.4
		sorbitol	83.9	0.911	76.4
		sucrose	87.1	0.846	73.7
	0.40	none	74.1	0.064	4.7
		sorbitol	84.8	0.936	79.4
		sucrose	86.1	0.578	49.8
	0.60	none	70.9	0.019	1.3
		sorbitol	85.1	0.955	81.3
		sucrose	83.7	0.311	26.1

ソルビトール、キシリトールは非常に強い保護効果を示し、いかなる KCl 濃度下における変性に対してもその効力を示すが、シュクロース、グルコースは低い塩濃度においてのみ有効で、高塩濃度では、特にアクトミオシンの超沈澱性（収縮能力）を保持する効力が弱いとすることができる。

アクトミオシン Ca^{2+} -ATPase の冷凍変性と pH との関係 まず、アクトミオシン溶液の pH を 6, 7 および 8 に保持するために 20 mM Tris-maleate を使用した。本実験においてはここに至るまで冷凍変

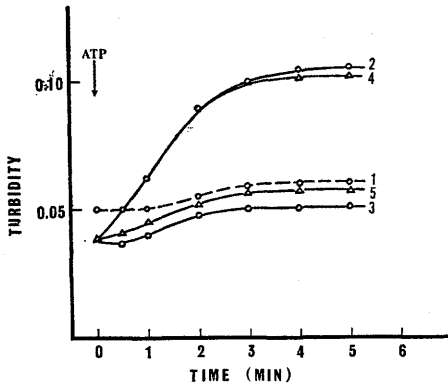


Fig. 3 Protective effect of sugar compounds on the rate of superprecipitation of actomyosin during frozen storage.

The same actomyosins obtained in the experiment of Table 1, were used.

Superprecipitation was measured as the increase in optical density at $660\text{ m}\mu$ at 25°C and pH 7.0 of following mixture; 0.06 M KCl, 0.001 M ATP, 0.4 mg/ml of actomyosin.

- 1...actomyosin frozen without sugar
- 2...actomyosin frozen with sorbitol added
- 3...actomyosin frozen with sucrose added
- 4...actomyosin frozen with xylitol added
- 5...actomyosin frozen with glucose added

Table 2. Protective effect of sugar compounds on the denaturation of actomyosin Ca^{2+} -ATPase by freezing.

Four ml of each actomyosins in 0.6 M KCl, pH 6.8 were kept frozen for 2 weeks at -20°C in the presence of various kind of sugar compounds. Weight ratio of sugar compound added to actomyosin present was 20 : 1. 10.1 mg/ml of actomyosin was used.

Other experimental conditions were the same as in Fig. 1.

	Conc. of KCl	Additive	Protein recovery	Relative Ca^{2+} -ATPase activity	Remaining Ca^{2+} -ATPase activity
Before freezing			100%	1.00	100%
After freezing	(M)				
	0.60	none	55.6	0.090	5.0
	0.60	sorbitol	85.0	0.947	80.5
	0.60	sucrose	81.5	0.402	32.8
	0.60	xylitol	80.7	0.995	80.3
	0.60	glucose	85.0	0.463	39.4
	0.60	mannitol	54.9	0.221	12.1

性に対する緩衝液の影響をなるべく少なくするために緩衝液としてはうすい 5 mM Tris-maleate を使用してきた。そこで緩衝液濃度を 5 mM から 20 mM (最終濃度) まで増加することによつてアクトミオシン Ca^{2+} -ATPase の変性に対してなにか特異な影響が現われるかどうかについて検討を加えた。結果を Table 3 に示す。ここでは緩衝液の濃度だけが異なる同じ 0.6 M KCl 溶液のアクトミオシンが冷凍変性したときの比較結果を示してあるが、20 mM Tris-maleate を含むアクトミオシンと 5 mM Tris-maleate を含むアクトミオシンの間には著しい差異は認められず、ソルビトールによる変性に対する保護効果もほとんど同じレベルであつた。したがつて、緩衝液濃度を高くしたための特別な影響はないと判断した。そこで、アクトミオシン Ca^{2+} -ATPase の冷凍変性に対する pH の影響を検討した。まず、調製したアクトミオシンを一定容量ずつ分注してとり、これに同容量の 0.6 M KCl を含む 40 mM Tris-maleate 緩衝液をそれぞれ加えて、pH を 6, 7 および 8 に調節してから冷凍した。1 ヶ月冷凍貯蔵した後変性の進行を検討した。その結果を Table 4 に示した。この結果によると、異なつた pH の下におけるアクトミオシン Ca^{2+} -ATPase の冷凍変性には、かなり明瞭な差異があらわれていることがわかる。すなわち、アクトミオシン Ca^{2+} -ATPase の冷凍変性は pH 7 の場合がもつともおそく安定で、変性に

Table 3. Protective effect of sugar compounds on the denaturation of actomyosin Ca^{2+} -ATPase by freezing in different concentration of Tris-maleate.

Actomyosin solution was divided in two parts, one of which was dialyzed against 0.6 M KCl containing 5 mM Tris-maleate buffer, pH 6.8 and another was dialyzed against 0.6 M KCl, containing 20 mM Tris-maleate buffer, pH 6.8 overnight, separately. Weight ratio of sugar compound added to actomyosin present was 20 : 1.

Other experimental conditions were the same as in Fig. 1.

Preparation 1, actomyosin 7.3 mg/ml frozen for 2 weeks

Preparation 2, actomyosin 6.0 mg/ml frozen for 3 weeks

	Conc. of buffer	Additive	Protein recovery	Relative Ca^{2+} -ATPase activity	Remaining Ca^{2+} -ATPase activity
Before freezing			100%	1.00	100%
After freezing	(mM)				
Preparation 1	5	none	62.9	0.085	5.3
		sorbitol	81.9	0.997	81.7
		sucrose	80.3	0.252	20.2
	20	none	66.6	0.146	9.7
		sorbitol	84.3	0.979	82.5
		sucrose	81.5	0.266	21.7
After freezing					
Preparation 2	5	none	57.3	0.074	4.2
		sorbitol	84.0	0.914	76.8
		sucrose	87.6	0.197	17.3
	20	none	82.9	0.095	7.9
		sorbitol	88.3	0.816	72.1
		sucrose	89.0	0.197	17.5

Table 4. Effect of pH values on the denaturation of actomyosin Ca^{2+} -ATPase activity by freezing in the presence of sugar compounds.

Five ml of each actomyosins in 0.6 M KCl, pH 6, 7, or 8 were separately kept frozen for a month at -20°C . Weight ratio of sugar compound added to actomyosin present was 20 : 1. 7.4 mg/ml of actomyosin was used.

Other experimental conditions were the same as in Fig. 1.

	pH value of system	Additive	Protein recovery	Relative Ca^{2+} -ATPase activity	Remaining Ca^{2+} -ATPase activity
Before freezing			100%	1.00	100%
After freezing					
	6	none	77.1	0.000	0.0
		sorbitol	83.5	0.359	30.0
		sucrose	83.9	0.135	11.3
	7	none	80.0	0.220	17.6
		sorbitol	82.8	0.960	79.5
		sucrose	84.4	0.347	29.3
8	none	71.8	0.205	14.7	
	sorbitol	84.6	0.513	43.4	
	sucrose	85.1	0.199	16.9	

対するソルビトールの保護効果も非常に著しくなっている。そして pH 8 の場合がこれにつぐ安定性を示していた。pH 6 では変性は早くソルビトールの保護効果もあまり強くあらわれていないことがわかる。このような pH の変化によつておこる冷凍変性の差異は アクトミオシン Ca^{2+} -ATPase 比活性の減少として観察され、たんぱく質の溶解性に対しては pH の変化はあまり影響していることがわかった。

考 察

本実験において十分立証されたように筋肉構成たんぱく質アクトミオシンの変性に関しては、非常に多くの要因たとえば、たんぱく質濃度、塩濃度（イオン強度）添加物、変性の方法などが複雑に影響しあっているものである。添加物については著者らが行なつた糖類化合物の他にアミノ酸、有機酸などが効果を及ぼしている¹⁷⁾。また、変性の方法についても冷凍、加熱¹⁶⁾、乾燥、凍結乾燥¹⁸⁾について検討が加えられるべきである。そして、その上、変性の進行をどのような手段（方法）で追究してゆくかと言うことが大切な焦点となる。著者らがここで採用した Ca^{2+} -ATPase 全活性は一つの試みであるが、粘性を見てゆくときは 0.1% たんぱく質濃度以上では一定の変化を示すとも言われている。高分子化合物としてのアクトミオシンの変性を研究してゆくためには、数多くの研究手段が採用されてゆくと思われるが、上述した理由から基礎的な研究を十分行なう必要があると考えている。本報告で行なつたアクトミオシンの冷凍変性に関する実験は、すべて低いイオン強度 (0.06 M KCl) における Ca^{2+} -ATPase 活性を測定することによつてなされたのであるが、このような条件下ではアクトミオシンは超沈澱をおこし、そのとき、ATPase も活性化されることが知られている。したがつて、この条件下で Ca^{2+} -ATPase 活性の変化を追究することは、ミオシンに比べてアクトミオシンの特性が一層強く反映されているだろうと予想している。しかし、ミオシンについて広く採用されている高イオン強度 (0.5 M KCl) における Ca^{2+} -ATPase 活性を測定しながら本報告の内容を再検討してみたのであるが、得られた結果は低イオン強度下の Ca^{2+} -ATPase の結果と全く変らないものであつた。

本研究において行なつたコイ筋肉アクトミオシンの冷凍変性に関する実験は、言うまでもなく、筋肉内におけるたんぱく質の変性を予想した試験管内におけるモデル実験である。さらに、著者らが他の魚類（ティラピア、ホッケ、ニジマス）筋肉について行なつたモデル実験の結果もコイ筋肉の場合と本質的に変つているものではなかつた。一方著者らが実際の魚肉（スケトウタラ冷凍すり身）中のアクトミオシンを Ca^{2+} -ATPase 全活性によつて定量して見ると^{18,19)}、得られる結果は本研究において得られた冷凍変性に関するモデル実験の結果と極めて良く一致するものであつて全く矛盾することが無かつた。たとえば、塩濃度と冷凍変性の関係は、無塩すり身と加塩すり身中のアクトミオシンの安定性の上に、そして高い塩濃度における変性に対してシュクロースの保護効果が弱い事実は、加塩すり身にシュクロースを添加したときのアクトミオシンの不安定性と減量の上に、反映して見ることができる。また、pH が 7 付近のアクトミオシンが冷凍変性に対して良い安定性を保つ事実は、すり身に重合りん酸塩が添加されると pH が 7.1-7.3 に調節されることに良く一致しているようである。したがつて、十分配慮された実験条件の下で行なうモデル実験は、魚肉中のアクトミオシンの状態を良く想像させうるものと信ずることができる。

なお、モデルによる冷凍変性に際してもつとも重要な因子は、溶液の冷凍に関して塩に濃縮が不可避に起ることである。本実験では pH を保持するためなるべく希薄な緩衝液を使用しているが、このとき KHCO_3 などによつて pH の調節を行なうと、冷凍変性の結果がかなり異なつてくる。すなわち KHCO_3 の濃縮のため pH が異常に高くなることが考えられよう。著者らが先に発表したコイ肉アクトミオシンの冷凍変性に関する報告では¹³⁾、pH の調節を KHCO_3 に依存していること、および Ca^{2+} -ATPase の測定に際して反応液に 0.1 M Tris 緩衝液を使用したこと（Tris 緩衝液は高濃度で使用すると、ATPase 活性を阻害することがわかつた）の 2 つの理由のために、高塩濃度においてソルビトールとシュクロースの保護作用に差異を認めることができなかつたと報じた。しかし実際に魚類の生筋の中を想像してみると、本報告で行なつた実験方法がより妥当で、良い結果を与えていると思われる。

要 約

コイ筋肉から得たアクトミオシン Ca^{2+} -ATPase の冷凍変性に関するいくつかの条件について検討を加えた。

- 1) アクトミオシン Ca^{2+} -ATPase の冷凍変性とたんぱく質濃度の関係を検討したところ、たんぱく質濃度が 4-5 mg/ml 以上では変性は一定であるが、4 mg/ml 以下では変性が早く、不安定であることがわかった。
- 2) アクトミオシン Ca^{2+} -ATPase の冷凍変性に対する糖（ソルビトール）の保護作用について検討した。変性を保護するためにはアクトミオシン量に対して 20 倍重量以上の糖を加えることが必要であつた。
- 3) アクトミオシン Ca^{2+} -ATPase の冷凍変性に対する KCl 濃度の影響を糖の保護作用との関係において検討した。KCl 濃度が低いときはソルビトールとシュクロースが強い効力を示したが、KCl 濃度が高くなるとシュクロースの効力が弱くなることがわかった。
- 4) 0.6M KCl 溶液での効力だけを比べてみると、ソルビトール=キシリトール>シュクロース=グルコース=フラクトース>マンニトールの順序であつた。
- 5) アクトミオシン Ca^{2+} -ATPase の冷凍変性に対する pH の影響を、糖の保護作用との関係において検討した。pH 6, 7 および 8 における冷凍変性を比べると pH 6<8<7 の順にアクトミオシンは安定となりソルビトールの変性に対する保護作用もこの順序に強くなっている。

謝 辞

本研究を遂行するに当り深い御理解と御援助を賜つた相山忠男氏および斎藤恒行教授に感謝します。

文 献

- 1) T. YASUI and Y. HASHIMOTO: *J. Food Agr.*, **31**, 293-299 (1966).
- 2) 安井 勉: *New Food Industry*, **13**, 36-47 (1971).
- 3) 花房尚史: 北大低温科学研究所業績, **623**, 81-94 (1962).
- 4) 花房尚史: 北大低温科学研究所業績, **687**, 119-131 (1964).
- 5) 右田正男: 本誌, **28**, 456-470 (1962).
- 6) 鈴木たね子: 同誌, **30**, 792-799 (1964).
- 7) 鈴木たね子: *New Food Industry*, **9**, 9-13 (1967).
- 8) 松本重一郎: *ibid.*, 14-19 (1967).
- 9) 高士令二・新井健一・斎藤恒行: 本誌, **36**, 165-168 (1970).
- 10) 高士令二・新井健一・斎藤恒行: 同誌, **36**, 169-172 (1970).
- 11) 新井健一・高士令二・斎藤恒行: 同誌, **36**, 237-240 (1970).
- 12) 新井健一・高士令二・斎藤恒行: 同誌, **36**, 487-490 (1970).
- 13) 新井健一・高橋英明・斎藤恒行: 同誌, **36**, 232-236 (1970).
- 14) A. G. GORNALL, C. S. BARDWILL and M. M. DAVID: *J. Biol. Chem.*, **177**, 751-766 (1949).
- 15) J. J. CONNELL: *Biochem. J.*, **75**, 530-538 (1960).
- 16) 新井健一: *New Food Industry*, **13**, 48-55 (1971).
- 17) 野口 敏: *ibid.*, **13**, 56-60 (1971).
- 18) 川島孝省・新井健一・斎藤恒行: 本誌, **39**, 207-214 (1973).
- 19) 川島孝省・新井健一・斎藤恒行: 同誌, **39**, 289-293 (1973).