

## 筋原繊維タンパク質とソルビトールなど添加物の濃度が冷凍変性に及ぼす影響

誌名	日本水産學會誌
ISSN	00215392
著者	松本, 行司 新井, 健一
巻/号	53巻12号
掲載ページ	p. 2195-2199
発行年月	1987年12月

## 筋原繊維タンパク質とソルビトールなど添加物の濃度が 冷凍変性に及ぼす影響

松本行司\*, 新井健一\*

(1987年3月29日受理)

### Influence of Concentration Ratio of Myofibrillar Protein and Additive like as Sorbitol on the Freeze Denaturation of Myofibrils

Ikushi Matsumoto\* and Ken-ichi Arai\*

The protective effect of some additives, such as sorbitol, Na-glutamate, and Na-acetate against freeze denaturation of carp myofibrillar protein was investigated by measuring change in first order rate constant ( $k_D$ ) for inactivation of its Ca-ATPase as a function of protein concentration (M) for frozen storage with additive.

Myofibrils were mixed with either one of the above mentioned additives in a medium of 0.16 M KCl, 40 mM Tris-maleate (pH 7.5) to give the final concentrations of additives and myofibrillar protein between 0-0.24 M and 2-20 mg/ml, respectively.

During frozen storage, decrease in myofibrillar Ca-ATPase activity was measured with a laspe of time and the  $k_D$  was calculated.

It was thus found that the  $k_D$  of the mixture were almost identical where the molar concentration of each additive was kept the same but that of myofibrillar protein however varied considerably.

From the results mentioned above, a possible mechanism for the protection of freeze denaturation of myofibrillar protein by sorbitol, and the like, was discussed.

著者らは、従来魚類の筋原繊維 (以下 Mf と略す) を  $-20^{\circ}\text{C}$  で凍結貯蔵し、その際に起こる Mf Ca-ATPase の冷凍変性速度 ( $k_D$ ) を求める試みを行った。さらに、糖やカルボン酸類の保護効果を冷凍変性速度に及ぼす影響度を指標として、熱変性に対する場合と比較検討した。<sup>1-3)</sup> その結果、冷凍変性の場合も  $k_D$  の対数値と糖やカルボン酸などの化合物のモル濃度の間比例関係が成立するため、熱変性の場合と同様に各種化合物の保護効果を数値で表わすことが可能であった。また上記化合物の冷凍変性に対する効果は熱変性に対する場合より約 10 倍強かった。しかし、同効果の強さの順序を各種化合物間で比べると、両変性に対する場合共に、ほとんど同じとなることが知られた。さらに、糖とカルボン酸を同時に添加するとき、冷凍変性に対するその保護効果を  $k_D$  の対数値の減少度で示すと、見かけ上加算値となり、熱変性に対する場合と同様に、これら二種類の化合物が協調的に作用していることを示す結果となった。

以上の事実から、加熱および冷凍によって起こる変性に対する糖やカルボン酸類の保護作用は原理的に同じであるように推定された。すなわち、上平<sup>4,5)</sup>や月向<sup>6,7)</sup>ら

は、タンパク質の熱変性に対する糖類など各種化合物の作用は、単にタンパク質分子表面の結合水と置き換って結合してその効力を現わすのではなく、自由水を含め溶媒中の全ての水分子の構造と状態を安定化することによって効力を発揮すると述べている。本研究では、異なる濃度の Mf タンパク質と各種化合物 (ソルビトール、グルタミン酸塩、および酢酸塩など) を組合せて、種々の組成の混合系を作り、それらの冷凍変性速度を比較することにより、Mf タンパク質の変性に対する上記化合物の作用機序を検討することを目的とした。

### 実験方法

**Mf 懸濁液の調製** Mf は前報<sup>1)</sup>と同様に、養殖コイ *Cyprinus carpio* の背筋より調製し、タンパク濃度が 11.5 mg/ml, あるいは 22 mg/ml になるように 0.16 M KCl, 40 mM Tris-maleate, pH 7.5 (以下 0.16 M KCl-buffer と略す) 溶液に懸濁した。

各種添加物存在下における Mf 懸濁液の冷凍変性 Mf 懸濁液に、高濃度のソルビトール、グルタミン酸 Na, または酢酸 Na 溶液 (中和して使用) を終濃度で 0~0.24 M

\* 北海道大学水産学部生物化学教室 (Laboratory of Biochemistry, Faculty of Fisheries, Hokkaido University, Hakodate 041, Japan).

になる様に添加し、一夜氷蔵した後冷凍貯蔵に供した。なお、このとき Mf タンパク質と添加物の比率と変性との関係を調べるため、Mf タンパク濃度とソルビトール濃度を変えた組成の混合液を  $-20^{\circ}\text{C}$  で冷凍貯蔵し、添加物の保護効果を解析する試みをした。たとえば、Mf タンパク濃度が  $10\text{ mg/ml}$  とソルビトールが  $0.1\text{ M}$  共存している Mf 懸濁液の系を A-1 とする。さらに、この系に 4 倍容量の  $0.16\text{ M KCl}$ -buffer を加えて懸濁液を希釈した系を A-2 とする。この A-2 の系では Mf タンパク質とソルビトールの濃度比は A-1 と同じとなるが、両方共その濃度は減少しており、タンパク質は  $2\text{ mg/ml}$  で、ソルビトール濃度は  $0.02\text{ M}$  となっている。そこで、次に、A-2 系を作る際に、 $0.16\text{ M KCl}$ -buffer の代わりに、 $0.1\text{ M}$  ソルビトールを含む  $0.16\text{ M KCl}$ -buffer を 4 倍量加えると、A-1 の系に比べ、タンパク質濃度だけが希釈されてソルビトール濃度は同じとなる混合液が作られる。これを A-3 系とするが、タンパク質濃度は  $2\text{ mg/ml}$  でソルビトールは  $0.1\text{ M}$  の Mf 懸濁液となる。すなわち、A-2 は A-1 に比べて、タンパク質およびソルビトール濃度がいずれも  $1/5$  となるが、タンパク質とソルビトールの濃度比は同じである。一方、A-3 はタンパク濃度は A-1 の  $1/5$  であるがソルビトール濃度は A-1 と同じとなり、タンパク質に対するソルビトールの濃度比は、A-1 に比べて 5 倍高い混合液となっている。これら Mf タンパク濃度とソルビトール濃度の組成が異なる混合液を  $-20^{\circ}\text{C}$  で冷凍貯蔵し、ほぼ 90 日間に至る間経時的にその一部を解凍し、前報にならって均質な懸濁液を調製し、Ca-ATPase 活性の測定に供した。<sup>1)</sup>

なお、ソルビトールの場合と全く同様に操作して、酢酸 Na とグルタミン酸 Na の保護効果を、 $\log k_D$  の減少度を指標として、Mf タンパク質の濃度との関わりにおいて検討した。Mf タンパク質と添加物の濃度組成を一括して Table 1 に示した。

**Mf Ca-ATPase 活性の測定** Mf Ca-ATPase 活性 (EC 3.6.1.3) は、 $0.1\text{ M KCl}$ ,  $5\text{ mM CaCl}_2$ ,  $25\text{ mM Tris-maleate}$  (pH 7.0), および  $1\text{ mM ATP}$  の組成液を  $25^{\circ}\text{C}$  において反応させ、遊離する無機リン酸を Gomori の方法によって比色定量し、<sup>8)</sup> 比活性 ( $\mu\text{mol}\cdot\text{Pi}/\text{min}\cdot\text{mg}$  タンパク質) を求めた。なお、対照試料にも同濃度の添加物を加えて測定した冷凍前の比活性を基準とした。

**Mf Ca-ATPase の冷凍変性速度定数の算出** 冷凍貯蔵中における Mf Ca-ATPase の失活を一次反応式に従って解析し、見かけの変性速度定数 ( $k_D$ ) を次式によって計算した。 $k_D = (\ln C_0 - \ln C_t) \cdot 1/t$ , ここで、 $C_0$  および  $C_t$  は  $t$  日間貯蔵前および後における Ca-ATPase 活性 (相対値) である。

タンパク質濃度はビウレット法によって比色定量し、

標準として牛血清アルブミン画分 V を用いた。<sup>9)</sup>

### 結果および考察

**Mf タンパク質とソルビトールの濃度比率が同じでソルビトール濃度が異なる場合の冷凍変性** 著者らは先に、一定濃度の Mf タンパク質に対して異なる濃度のソルビトールを共存させた場合の Mf Ca-ATPase の冷凍変性の反応様式を検討したが、<sup>1)</sup> ATPase の失活は一般に遅く、一段階の一次反応に従って進行することを示した。本研究では、Mf タンパク質が  $10\text{ mg/ml}$  でソルビトールが  $0.1\text{ M}$  共存する Mf の場合 (A-1) を対照とし、タンパク質濃度が  $2\text{ mg/ml}$  でソルビトールが  $0.02\text{ M}$  共存する Mf の場合 (A-2), さらにタンパク質濃度が  $20\text{ mg/ml}$  でソルビトールが  $0.2\text{ M}$  共存する Mf の場合 (A-5) について、冷凍中の Ca-ATPase の失活様式を Fig. 1 に示した。その結果によると、いずれの混合系 (A-1, A-2, および A-5) の場合も冷凍による Ca-ATPase の失活は見かけ上一段階の一次反応に従って進行した。また、各々の直線の傾きから冷凍変性の一次反応速度 ( $k_D$ ) を求めると、速度は小さい方から A-5, 続いて A-1, A-2 の順となることを示した。したがって、Mf タンパク質の変性に対するソルビトールの保護効果は、Mf タンパク質とソルビトールの濃度比が同じでも同一ではなく、また、共存するタンパク質濃度の高低にも関わりなく、ソルビトール濃度が高いほど強くなる傾向が認められた。

グルタミン酸 Na, および酢酸 Na を用いて、ソルビトールの場合と同じ考え方に立ち、それらの濃度とタンパク質濃度の比率を変化させ、冷凍貯蔵中に起こる Mf Ca-ATPase の失活の反応様式と  $k_D$  を検討した。その結果は図示しないが、ソルビトールの場合と同様、グルタミン酸 Na と酢酸 Na による Mf タンパク質の冷凍変性に対する保護作用の強さは、これらの混合系中の上記化合物の濃度によって決定され、化合物と Mf タンパク質の濃度比や、Mf タンパク質の濃度の高低によって相違することはないことを示した。なお、以上述べた種々の混合系が示した  $k_D$  を一括して Table 1 に示した。ただし、酢酸 Na をタンパク質濃度が  $20\text{ mg/ml}$  の Mf 懸濁液に加えた場合だけは、混合系の粘性が著しく高まるため検討が不能であった。このように、Mf タンパク質の濃度が余り高くなると、添加物を加えた混合系の粘性が高くなりすぎるため冷凍変性の速度を正確に求めることができず、より高濃度の場合の検討ができなかった。この原因についてはまだ明らかではないが、添加物を加えることにより Mf 懸濁液中のイオン強度が上昇する上、Mf のタンパク質濃度が高いためにゲル化反応が起こったと考えられる。

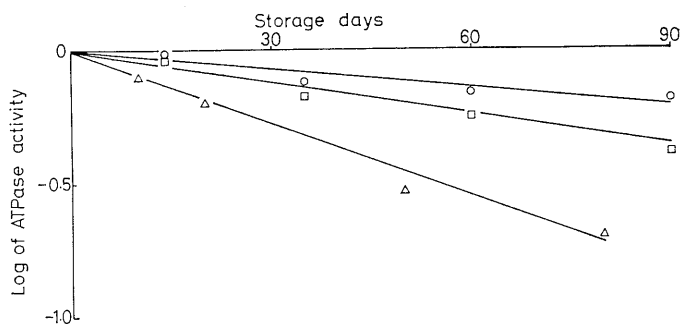


Fig. 1. Effect of various concentrations of sorbitol on change in Ca-ATPase activity of carp myofibrils during frozen storage.

Carp myofibrils were suspended in a medium containing 0.16 M KCl, 40 mM Tris-maleate (pH 7.5), various concentrations of sorbitol (0.02–0.2 M), and of myofibrillar protein (2–20 mg/ml).

During storage at  $-20^{\circ}\text{C}$  for 90 days, a portion of myofibrils suspension was thawed, homogenized, and diluted to a fixed volume with the same medium at adequate intervals. The Ca-ATPase activity was assayed at  $25^{\circ}\text{C}$  in a reaction medium containing 5 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0.1 M KCl, 25 mM Tris-maleate (pH 7.0), 1 mM ATP, and 0.2–0.25 mg/ml of myofibrillar protein.

- (○): A-5; 20 mg/ml myofibrillar protein and 0.2 M sorbitol.  
(Mf protein/Sorbitol=100, by weight)
- (□): A-1; 10 mg/ml myofibrillar protein and 0.1 M sorbitol.  
(Mf protein/Sorbitol=100, by weight)
- (△): A-2; 2 mg/ml myofibrillar protein and 0.02 M sorbitol.  
(Mf protein/Sorbitol=100, by weight)

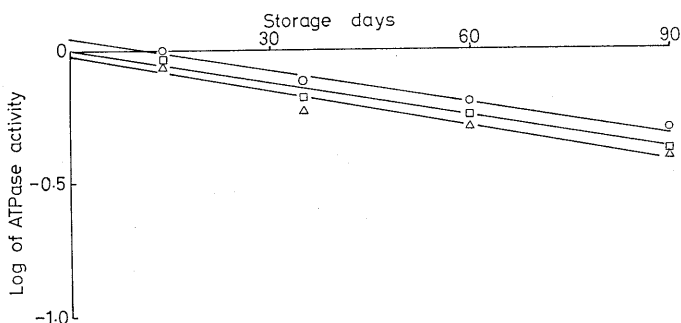


Fig. 2. Effect of a fixed concentration (0.1 M) of sorbitol on change in Ca-ATPase activity of carp myofibrils during frozen storage.

The frozen storage of carp myofibrils suspension and the Ca-ATPase assay were conducted as described in Fig. 1, except that the concentration of sorbitol was fixed at 0.1 M but that of myofibrillar protein was varied.

Mf タンパク質とソルビトールの濃度比が異なりソルビトール濃度が一定の場合の冷凍変性 次に、ソルビトール濃度が全て一定の 0.1 M になるようにし、一方 Mf タンパク質濃度が 2 mg/ml (A-3 とする)、10 mg/ml (A-1 とした)、および 20 mg/ml (A-4 とする) に変化させた Mf 混合系を作り、これらを  $-20^{\circ}\text{C}$  で冷凍し、貯蔵中に起こる Ca-ATPase の失活様式を検討し、その結果を Fig. 2 に示した。その結果によると、以上述べた 3 種の

混合系、すなわち A-3、A-1、および A-4 の Ca-ATPase の失活は、いずれも一段階の一次反応に従って進行し、しかもその速度もほとんど一致することが示された。したがって、この結果は、Mf タンパク質の冷凍変性に対するソルビトールの保護効果の強さは、混合液中のその濃度によって定まり、そこに共存する Mf タンパク質の濃度の高低には無関係であるという先の結論を支持しているものであった。

**Table 1.** The composition of myofibrillar protein and additives in the medium for frozen storage at  $-20^{\circ}\text{C}$  for 90 days.

Myofibrils were mixed with either one of additives, such as sorbitol, Na-glutamate, and Na-acetate, in a medium of 0.16 M KCl, 40 mM Tris-maleate (pH 7.5) to give the final concentration of additives and myofibrillar protein between 0-0.24 M and 2-20 mg/ml, respectively.

The frozen storage of carp myofibrils and Ca-ATPase assay were conducted as in Fig. 1.

First-order rate constants for freeze inactivation of myofibrillar Ca-ATPase in the presence of various additives, (such as sorbitol, Na-glutamate, Na-acetate) and various concentrations of myofibrillar concentrations were estimated.

Additive	Systems No.	Mf protein concentration	Additives concentration	$k_D$ ( $10^{-4}$ )
Sorbitol	A-1	10 (mg/ml)	0.1 (M)	48 (day $^{-1}$ )
	A-2	2	0.02	200
	A-3	2	0.1	52
	A-4	20	0.1	45
	A-5	20	0.2	24
Na-Glutamate	B-1	10	0.05	53
	B-2	2	0.01	190
	B-3	2	0.05	53
	B-4	20	0.05	50
	B-5	20	0.1	20
Na-Acetate	C-1	10	0.12	71
	C-2	2	0.024	315
	C-3	2	0.12	71
	C-4	20	0.12	—
	C-5	20	0.24	—

なお、酢酸 Na およびグルタミン酸 Na を用いて、その濃度を一定に保持しながら Mf タンパク質を 2 mg/ml および 10 mg/ml の混合系を作り、冷凍変性速度を検討したところ、結果はソルビトールの場合と全く同じく、添加物の濃度が同じであれば、保護効果は同じになった。そこで、以上述べた Fig. 2 の結果も含めて、種々の混合系における冷凍変性速度を Table 1 に一括して示した。

著者らは先に、冷凍変性に対する糖類およびカルボン酸類の保護効果を Mf Ca-ATPase の変性速度を減少させる度合で比較した結果について報じた。<sup>2,3)</sup> 本研究では、同じ考え方に立ち、タンパク質と添加物の濃度が Mf の冷凍変性にどの程度影響を及ぼすかを、Mf Ca-ATPase の変性速度の減少の度合から検討した。その結果、変性の速度は混合系中の添加物のモル濃度に依存する一定値を示し、その系中に存在する Mf タンパク質の濃度が 2 から 20 mg/ml までの間で変っても変化せず、上記の一定値を保つことが明らかとなった。これは、大泉が同じ Mf Ca-ATPase の熱変性について明らかにした実験結果と一致している。<sup>10)</sup>

Mf タンパク質の冷凍変性に対するソルビトール、グルタミン酸 Na、酢酸 Na などの添加物の保護作用は、熱変性に対する場合の作用と共通している点が多く、熱

変性に対して強い保護効果を示す化合物は、糖類、アミノ酸類、カルボン酸類の別なく(僅かな例外がある)、そのほとんどが冷凍変性に対しても強い保護効果を示し、かつ、化合物の種類による効果の強さの順位は、両方の変性に対してほぼ同じであった。<sup>2,3)</sup> また、本研究の成果として、これらの化合物の保護効果が、その濃度によって定まり、共存する Mf タンパク質濃度に関わりがない事実が明らかになったが、これも両方の変性について共通している。それ故、Mf タンパク質の変性に対して、これらの化合物は単にタンパク質高分子の表面の結合水と置き換って結合し、その作用を示すのではなく、溶媒中の水分子の構造や状態を安定化することを介して、タンパク質を変性から保護するという上平<sup>4,5)</sup> や月向<sup>6,7)</sup> の考え方を支持しているものと考えられる。

なお、本研究は、Mf の懸濁液を用いた試験管内のモデル実験にすぎないが、糖の効果はタンパク質の濃度に関係なく発揮される上、冷凍すり身中の水分が 80% 前後、糖が約 5% 含まれているとすれば、すり身中の糖濃度はソルビトールとして概算 0.4 M に相当する。この事実を考慮すると、冷凍すり身中の糖濃度はその中にある Mf タンパク質の冷凍変性を十分抑制できることを示唆している。<sup>1,2)</sup>

本研究は、文部省科学研究補助金によって行われたので、ここに記して感謝致します。

### 文 献

- 1) 松本行司, 大泉 徹, 新井健一: 日水誌, **51**, 833-839 (1985).
- 2) 松本行司, 新井健一: 日水誌, **52**, 2033-2038 (1986).
- 3) 松本行司, 新井健一: 日水誌, 投稿中
- 4) 上平 恒: 蛋白質 核酸 酵素, **21**, 575-582 (1976).
- 5) 上平 恒: 化学総説, **11**, 191-206 (1976).
- 6) 月向邦彦: 蛋白質 核酸 酵素, **30**, 1115-1126 (1985).
- 7) 月向邦彦: *New Food Industry*, **26**, 53-66 (1984).
- 8) 高橋泰常: 生化学の領域における光電比色法, 各論 2 (関根隆光編), 南光堂, 東京, 1962, pp. 13-14.
- 9) A. G. Gornall, C. T. Bardwill, and M. M. David: *J. Biol. Chem.*, **177**, 751-766 (1949).
- 10) 大泉 徹: 昭和 59 年度, 北海道大学博士論文 (水産学) 1984, pp. 38-39.