

コイ筋原線維Ca-ATPaseの酸変性とKCl濃度の関係

誌名	日本水産學會誌
ISSN	00215392
著者	舩津, 保浩 橋本, 昭彦 今野, 久仁彦
巻/号	56巻1号
掲載ページ	p. 133-137
発行年月	1990年1月

コイ筋原線維 Ca-ATPase の酸変性と KCl 濃度の関係

船津 保浩, 橋本 昭彦, 今野久仁彦, 新井 健一

(1989 年 8 月 28 日受付)

Acid-induced Denaturation of Carp Myofibrillar Ca-ATPase
in Connection with KCl ConcentrationYasuhiro Funatsu,*¹ Akihiko Hashimoto,*² Kunihiko Konno,*¹
and Ken-ichi Arai*¹

Denaturations of carp myofibrils and myosin induced by changing pH and KCl concentration were studied. Myofibrils and myosin suspension was mixed with maleate-NaOH buffer to set the pH between 4.81 and 6.14 in the presence of various concentrations of KCl (0.1~1.0 M) and stored at 2°C. The first order rate constant (K_D) for inactivation of Ca-ATPase caused by the above treatment was then estimated.

It was thus found that the K_D of myofibrillar Ca-ATPase increased with lowering the pH as well as with increasing KCl concentration. On the other hand, the K_D of myosin Ca-ATPase remained practically unchanged with changing the KCl concentration but increased with lowering the pH, in the same manner as in the case of myofibrils. In addition, the K_D of myosin Ca-ATPase agreed closely with that of myofibrillar Ca-ATPase in the presence of 1.0 M KCl. These results strongly suggested that the actin part of carp myofibrils was denatured by acid treatment in the presence of 1.0 M KCl, and lost its protective activity against thermal inactivation of myosin Ca-ATPase.

1977 年に 200 カイリ漁業専管水域が実施されて以来、サバ・イワシの有効利用を計るために必要な技術の開発への関心が高まっている。しかし、イワシを含む多獲性赤身魚肉を加工食品として利用する際に起こる問題点は、魚肉中の筋原線維 (以下 Mf と略称) タンパク質が極めて不安定で変性し易いことにあると言われている。¹⁻³⁾ その例として実際に、橋本らは死後における筋肉の pH の低下が Mf タンパク質の変性を速め、かまぼこのゲル形成能を劣化させる最も大きな要因であることを示した。⁴⁾ しかし、酸性下におけるタンパク質の変性にかかわる分子レベルでの説明は未だ充分とはいえない現状にある。

本研究では、コイ Mf を用い、氷蔵下で、微酸性の pH (4.81~6.14) で処理したときに起こる Mf Ca-ATPase の変性速度定数 (K_D) を指標とし、さらに Mf を酸処理する際に共存する KCl 濃度の影響から変性の分子機構を解明する試みを行った。

実験方法

筋原線維およびミオシンの調製 コイ *Carp Cyprinus*

carpio の Mf は、加藤らの報じた方法⁵⁾ を一部修正して、新鮮な背肉より調製し、0.1 M KCl-20 mM Tris-HCl (pH 7.5) 溶液に懸濁させた。また、ミオシンは、碓谷らが報じた方法により調製した。⁶⁾

筋原線維およびミオシンの酸処理と停止 Mf は緩衝液を含まない 0.1 M KCl 溶液 (pH 7.0) で数回洗浄し、同溶液に懸濁させた。また、ミオシンも 0.1 M KCl 溶液 (pH 7.0) に透析して懸濁液とした。この Mf およびミオシンの 0.1 M KCl 懸濁液に KCl を加えて 0.1~1.0 M に調節し、氷蔵下で、50 mM maleate-NaOH 緩衝液を加えて懸濁液の pH を微酸性 (pH 4.81~6.14) の一定値に調節し 2°C で保持した。また、その pH はガラス電極で測定した (以上の操作を酸処理と称する)。酸処理中に Mf タンパク質に起こる変化を停止するには、氷蔵下で 5 倍量の Tris-HCl (pH 7.5) 緩衝液を加えて KCl 濃度を 0.1 M に希釈すると同時に、pH を中性に戻すことによって行った。中和後すみやかに Mf Ca-ATPase 活性の測定に供した。

Mf Ca-ATPase 活性の測定と変性速度定数の算出 Mf Ca-ATPase は、500 mM KCl, 5 mM CaCl₂, 25 mM

*¹ 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).

*² 現住所: 株式会社森下仁丹 (MORISHITA, Co. Ltd. Tamatukuri, Chyuo-ku, Osaka 540, Japan).

Tris-maleate (pH 7.0), 1 mM ATP, 0.08~0.15 mg/ml の Mf タンパク質を含む混液を 25°C で反応させ、経時的に一部を取り出して 1/2 容量の 15% HClO₄ を加えて反応を停止させ、濾液中に遊離する無機リン酸を比色定量した。⁷⁾ 比活性は、 $\mu\text{mol}\cdot\text{Pi}/\text{min}\cdot\text{mg}$ で表した。また酸処理中における Mf およびミオシンの Ca-ATPase の経時的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) を次式によって算出した。 $K_D = (\ln C_0 - \ln C_t) \cdot 1/t$, ここで C_0 および C_t は t 時間 (秒) 処理する前と後における Ca-ATPase 活性である。なお、タンパク質濃度は牛血清アルブミン分画 V を標準とし、ビュレット法によって比色定量した。⁸⁾

実験結果

微酸性の pH における Mf Ca-ATPase の経時的失活 0.1 M KCl 溶液に懸濁した Mf を、氷藏下で、種々の pH において酸処理し、そのとき起こる Ca-ATPase の経時的な失活を Fig. 1 に示した。この結果によると検討を加えた pH が 5.08~6.14 の範囲では、コイの Mf Ca-ATPase の失活は一次反応に従い、pH が低いほど失活が速いことが示された。以下に述べる実験では、pH は 4.81 から 6.14, KCl 濃度は 0.1 から 1.0 M にわたる範囲で Mf およびミオシン Ca-ATPase 活性を測定した

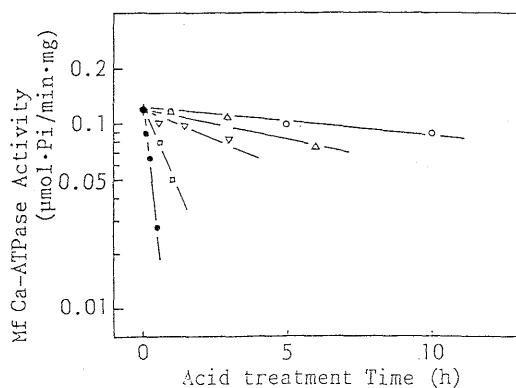


Fig. 1. Decrease in myofibrillar Ca-ATPase activity during acid treatment.

Carp myofibrils suspension (in 0.1 M KCl) was treated with acid in the range of pH 5.08-6.14 on mixing with 50 mM maleate-NaOH buffer, at a protein concentration of 2 mg/ml and at 2°C. The acid treatment was stopped by adding five volumes of 40 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) to Mf suspension at 2°C. The ATPase assay was carried out at 25°C in a reaction medium containing 0.5 M KCl, 5 mM CaCl₂, 25 mM Tris-maleate (pH 7.0), 1 mM ATP and 0.08 mg/ml of Mf protein. The pH values for treatment were 5.08 (●), 5.24 (□), 5.37 (▽), 5.78 (△), and 6.14 (○), respectively.

が、稀に反応初期に規則性のない活性値の変動が起こる場合が見られた。しかしその変化は微小であったので失活の大部分を表す速度を重視することにした。

微酸性の pH における Mf Ca-ATPase の失活に及ぼす KCl 濃度の影響 0.1 から 0.7 M の間の種々の濃度の KCl と 50 mM maleate-NaOH 緩衝液 (pH 5.6) の混液中で、Fig. 1 の場合と同様に Mf を酸処理し、その Ca-ATPase の経時的な失活を測定し、結果を Fig. 2 に示した。この結果より、検討を加えた濃度の KCl の共存下において酸処理中に起こるコイ Mf Ca-ATPase の失活はいずれも一次反応に従い、また共存する KCl 濃度が高いほど失活が速いことが示された。なお、Fig. 2 に示した実験は pH 5.6 で Mf を処理した場合であるが、同様の実験を微酸性の他の pH でも行ったところ、いずれの pH でも Mf Ca-ATPase の失活が一次反応に従い、KCl 濃度が高いほど失活が速くなる傾向は同じであった。ただし pH が低いほど失活は速くなった。

微酸性の pH におけるミオシン Ca-ATPase の経時的失活 Fig. 1 に示した Mf の場合と同様に、0.1 M KCl 溶液にミオシンを懸濁し、氷藏下で、種々の pH において酸処理し、その Ca-ATPase の経時的な失活を測定し、結果を Fig. 3 に示した。これによると、ミオシンの場合も Mf と同様に、ここで検討を加えた pH の範囲ではその Ca-ATPase の失活は一次反応に従い、pH が低いほど失活が速いことが示されている。

酸処理 Mf およびミオシン Ca-ATPase の変性速度に

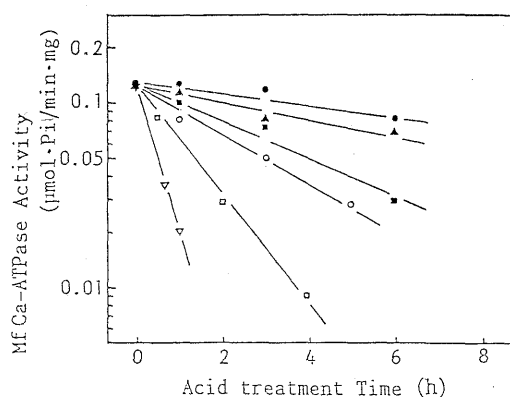


Fig. 2. Decrease in myofibrillar Ca-ATPase activity during acid treatment in the presence of various KCl concentrations.

The acid treatment of carp myofibrils was conducted as in Fig. 1, except that KCl concentration for the treatment was varied among 0.1~1.0 M. The stop of acid treatment and the ATPase assay were also conducted as in Fig. 1. The KCl concentrations for acid treatment of Mf were 0.1 (●), 0.2 (▲), 0.3 (■), 0.4 (○), 0.5 (□), and 0.7 (▽) M KCl, respectively.

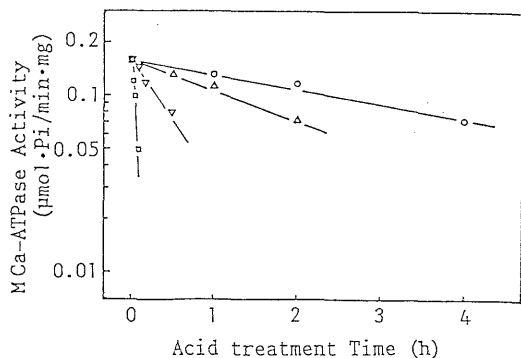


Fig. 3. Decrease in myosin Ca-ATPase activity during acid treatment.

The acid treatment of carp myosin (in 0.1 M KCl) and the ATPase assay were conducted as in Fig. 1. The pH values for the treatment were (□) pH 5.18, (▽) pH 5.46, (△) pH 5.72, and (○) pH 6.08, respectively.

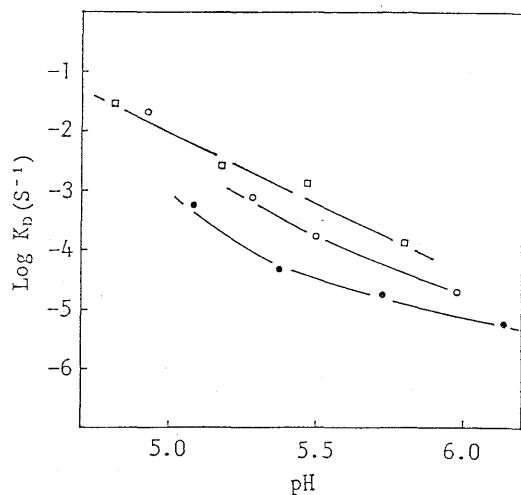


Fig. 4. Effect of KCl concentration on pH dependency of rate constants for acid-induced denaturation of carp myofibrillar Ca-ATPase.

From the data shown in Figs. 1 and 2, the first order rate constant (K_D) for inactivation of myofibrillar Ca-ATPase was estimated using the relation, $K_D = (\ln C_0 - \ln C_t) \cdot 1/t$, where C_0 and C_t are the activities before and after t seconds of acid treatment. The KCl concentrations for acid treatment were 0.1 (●), 0.5 (○), and 1.0 (□) M, respectively.

及ぼす KCl 濃度の影響 Fig. 2 の実験に習って、種々の濃度の KCl 共存下の酸処理に伴う Mf Ca-ATPase の変性速度定数 (K_D) を算出した。pH は 5.08~6.14, KCl 濃度は 0.1~1.0 M までの範囲であるが、その対数

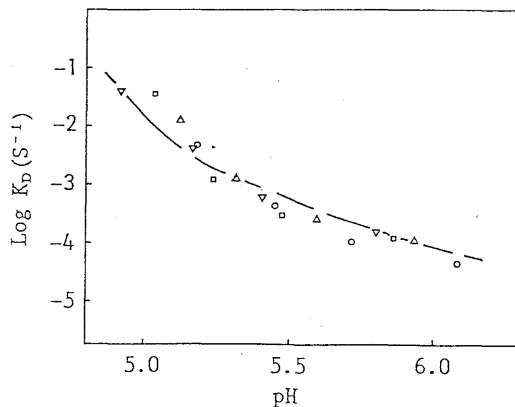


Fig. 5. Effect of KCl concentration on pH dependency of rate constants for acid-induced denaturation of myosin Ca-ATPase.

The acid treatment of carp myosin and its ATPase assay were conducted as in Fig. 1. The first order rate constant for acid-induced denaturation of myosin Ca-ATPase was estimated as in Fig. 4. The KCl concentrations for acid treatment were 0.1 (○), 0.3 (△), 0.6 (□), and 1.0 (▽) M, respectively.

値 ($\text{Log } K_D$) と pH との関係を Fig. 4 に示した。この図によると、pH が低いほど $\text{Log } K_D$ が大きな値となること、また、同一 pH ならば KCl 濃度が高いほど $\text{Log } K_D$ が大きな値になる傾向が示された。

Fig. 5 には、Mf の代わりにミオシンを用いて Fig. 4 の場合と同じ実験を行った結果を示した。これによると、ミオシン単独の場合は、pH が低くなるに伴って $\text{Log } K_D$ が大きくなる点は Mf の場合と同じであるが、 $\text{Log } K_D$ と pH との関係が KCl 濃度の影響をほとんど受けない点は Mf の場合と明らかに異なっている。

そこで比較のために、同じ濃度の KCl 共存下における酸処理による Mf とミオシンの K_D を同じ図中にまとめ、Fig. 6 に示した。まず 0.1 M KCl 共存下における Mf とミオシンの $\text{Log } K_D$ を比較 (A) してみると、いずれの pH においてもミオシンに比べ Mf の $\text{Log } K_D$ は小さく、 K_D の差から約 10 倍くらい安定であることが示された。次に、KCl 濃度が 0.5 M における Mf とミオシンの $\text{Log } K_D$ を比較 (B) してみると Mf の $\text{Log } K_D$ がミオシンのそれよりもいずれの pH でも小さい値を示す点は 0.1 M KCl 共存下の場合と同じであるが、両者の差は 0.1 M KCl 共存下の場合よりも小さくなり、Mf の K_D はミオシンのそれよりもいずれの pH においても約 5 倍小さい値を示すにとどまった。なお、0.5 M KCl 共存下の Mf の K_D は KCl 濃度が 0.1 M の場合よりもいずれの pH でも全体に大きい値であった。続いて、共存する KCl 濃度が 1.0 M における Mf とミオシンの $\text{Log } K_D$

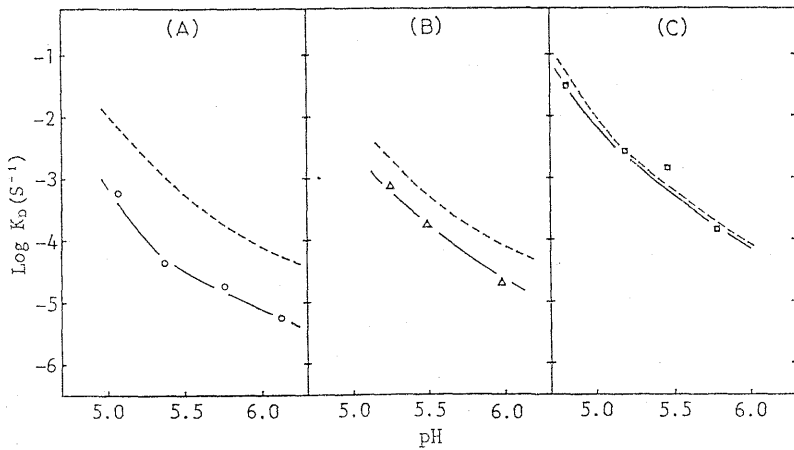


Fig. 6. pH-Dependencies of first order rate constants for denaturation of myofibrillar and myosin Ca-ATPases in the presence of different concentrations of KCl.

The first order rate constants for inactivation of myofibrillar and myosin Ca-ATPases were quoted from the data shown in Figs. 4 and 5. The KCl concentration for acid treatment were 0.1 (A), 0.5 (B), and 1.0 (C) M, respectively.

Myofibrils (solid line), Myosin (dotted line).

K_D を比較 (C) した。これによると, Mf の $\text{Log } K_D$ は同じ pH における 0.1 および 0.5 M KCl 共存下の値よりもさらに大きくなり, また Mf とミオシンの $\text{Log } K_D$ が近似することが示された。

Mf の Ca-ATPase はその中のミオシンの ATPase 活性を表すものである。したがって, 1.0 M KCl 共存下の Mf 中のミオシンは, 検討を加えた 4.81~6.14 の pH の範囲では Ca-ATPase の変性速度から判断する限り, 共存しているアクチンの保護作用¹⁰⁾を受けておらず, あたかもアクチンと解離状態にあること, あるいはこの条件下の Mf 中のアクチンは酸処理によって変性し易くなり, ミオシンとの相互作用を喪失 (又は劣化) している可能性が示唆された。一方, KCl 濃度が低い条件下では, いずれの pH においてもアクチンは安定に変性しにくいから, Mf Ca-ATPase の K_D はアクチンによる保護作用によってミオシンのそれよりもはるかに小さい値を示すものと推定される。

考 察

本研究の結果から, Mf Ca-ATPase の変性の速さは, 氷藏下においてさえも, 周囲の pH によって著しく影響を受けるが, 共存する KCl 濃度によっても影響を受けることが明らかになった。実際に赤身肉は白身肉に比べ筋肉の pH の低下が著しく, それが Mf タンパク質の変性を速める原因になると報じられており, 一方サバやイ

Table 1. The rate constants for acid-induced inactivation of myofibrillar Ca-ATPase at different KCl concentrations.

KCl conc.	$K_D (10^{-5} \cdot \text{s}^{-1})$		
	pH		
	5.3	5.8	6.0
0.1 M	7.9	1.6	0.7
0.5 M	70.8	7.1	1.8
1.0 M	251.0	15.8	5.0

From the data shown in Figs. 4 and 5. K_D values were quoted in this table

ワシの場合は筋肉の pH は死後 2~5 時間以内に 5.8 まで下がり, 塩ざりした魚肉のゲル形成能も著しく低下することが知られている。また, 本実験では中性塩として KCl を用いているが, NaClの方が KCl よりも Mf タンパク質の変性を強く引き起こすという報告がある。^{*} それゆえ, ねり製品の生産における塩ざり過程でも Mf タンパク質の変性がより強く起こる可能性がありうる。なお, 本研究では Ca-ATPase の K_D を Mf タンパク質の変性の指標として用いたのはこれが冷凍すり身のゲル形成能と相関が強くその品質を良く表すからである。^{10,11)}

一方, 既に若目田らはコイ Mf Ca-ATPase の失活は, pH が中性では 0.1 M KCl 付近で最も遅く, KCl 濃度がそれ以上に高くなると速くなることを報じている

* 熊沢義之, 新井健一: 中性塩と糖により起こるコイミオシン B の変化, 昭和 63 年度日本水産学会秋季大会講演要旨集, p. 161 (1988).

が,¹²⁾ これは pH が酸性になった本実験の場合でも同じであった。ただし pH が低下するとそれだけで Mf Ca-ATPase の変性は速くなるため、KCl 濃度の増加に伴う変性速度の増加は一層顕著となる傾向を示した。すなわち、Fig. 6 に示した結果から異なる pH と KCl 濃度下の Mf Ca-ATPase の K_D を引用して比較してみると、Table 1 に示すように、pH が 6.0 のときは 1.0 M KCl 存在下の K_D は 0.1 M KCl 存在下のそれより約 7.0 倍大きいのに対し、pH が 5.3 では約 32 倍大きくなっている。また、共存する KCl 濃度が高くなり仮に 1.0 M に至ると、Mf Ca-ATPase の K_D がミオシン Ca-ATPase の K_D に近似するようになる事実が認められたが、その分子機構としてはミオシンに結合している状態のアクチンが変性して Ca-ATPase 活性に対する保護効果のみを失ったためであるのか、又はアクチンが変性してミオシンから解離し、そのため遊離状態となったミオシンが変性し易くなったためであるのか、いずれかであるように考えられる。しかし、そのいずれにせよ本研究の実験条件下（氷蔵、微酸性、高塩濃度）では Mf 中のアクチンが速やかな変性を受けることは明らかであるので、アクチンの変性について研究することが必要でありその成果については近く報ずる。

魚肉が 1.0 M 以上に至るような中性塩と接触し反応する可能性は、塩漬又は塩蔵の場合に実際にあり得ると思われる。しかし、塩濃度は同じであっても、魚肉中の MJ タンパク質の濃度は本実験の場合のような低い (2.0 mg/

ml) 状態ではないので、その点についても現在検討中である。

文 献

- 1) 新井健一：多獲性赤身魚の有効利用，（日本水産学会編）水産学シリーズ 35，恒星社厚生閣，東京，1981，pp. 20-32.
- 2) 橋本昭彦，新井健一：日水誌，44，1389-1393 (1978).
- 3) 橋本昭彦，小林章良，新井健一：日水誌，48，671-684 (1982).
- 4) 橋本昭彦，加藤 登，野崎 恒，新井健一：日水誌，51，425-432 (1985).
- 5) 加藤 登，内山 均，塚本志朗，新井健一：日水誌，36，169-172 (1970).
- 6) 碓谷俊紀，木村郁夫，新井健一：日水誌，47，947-955 (1981).
- 7) 高橋泰常：生化学領域における光電比色法，各論 2（関根隆光他 編集）南光堂，東京，1962，pp. 13-149.
- 8) A. G. Gornall, C. T. Bardawill, and M. M. David: *J. Biol. Chem.*, 177, 751-765 (1949).
- 9) 室塚剛志，高士令二，新井健一：日水誌，42，57-63 (1976).
- 10) 川島孝省，大場明子，新井健一：日水誌，39，1201-1209 (1973).
- 11) 加藤 登，野崎 恒，小松一富，新井健一：日水誌，45，1027-1032 (1979).
- 12) 若目田 篤，野澤誠子，新井健一：日水誌，49，237-243 (1983).