

コイおよびマサバの筋肉基質構成タンパク質

誌名	日本水産學會誌
ISSN	00215392
著者名	吉中,禮二 佐藤,守 佐藤,健司 伊藤,慶明 藤田,眞夫 池田,静徳
発行元	日本水産學會
巻/号	51巻7号
掲載ページ	p. 1163-1168
発行年月	1985年7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



コイおよびマサバの筋肉基質構成タンパク質

吉中禮二・佐藤 守・佐藤健司
伊藤慶明・藤田眞夫・池田静徳

(1984年12月10日受理)

Constituent Proteins of Muscle Stromata from Carp
and Japanese Mackerel

Reiji YOSHINAKA,*¹ Mamoru SATO,*¹ Kenji SATO,*¹
Yoshiaki ITOH,*² Masao HUIITA,*² and Shizunori IKEDA*¹

Crude stromata were prepared as the residual fraction of salt-extraction of muscles from carp *Cyprinus carpio* and Japanese mackerel *Scomber japonicus*. They were divided into alkali-soluble (AL-S, 0.1 N NaOH- or 0.01 N NaOH-soluble), acid-soluble (AC-S, 0.5 M acetic acid-soluble), autocleave-extractable (AU-E, extraction at 120°C for 2h), and residual (RES) fractions.

Constituent proteins in each fraction were examined by the analyses of amino acid and SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. It was found in both species that AL-S consisted mainly of denatured myofibril proteins, and AC-S and AU-E mainly of collagen. In both species, the amino acid composition of RES was also found to be similar to connection.

筋肉基質タンパク質は筋肉から水溶性および塩溶性タンパク質を溶出除去した後に残る難溶性タンパク質の総称であり、生体では主として筋隔膜、筋繊維鞘、腱、血管、神経繊維などの結合組織を構成し、構造の維持や機械的エネルギーの伝達等に機能している。¹⁾ 食品学的にも筋肉基質タンパク質は肉質との関連で注目されている。¹⁻³⁾

これまでに、数多くの魚種について筋肉基質含量が求められている。^{2,6-9)} しかし、魚類の筋肉基質構成タンパク質に関する報告例は少ない。久保田および木村¹⁰⁾ および YAMAGUCHI⁴⁾ による筋隔膜コラーゲンに関する報告のほか、TSUCHIYA および TAKAHASHI²⁾ による筋肉の結合組織構成タンパク質に関する報告をみるにすぎない。TSUCHIYA および TAKAHASHI²⁾ は魚類筋肉を 5% KCl 溶液で抽出した残渣を結合組織とし、結合組織を水と共にオートクレーブで加熱したとき可溶化されるタンパク質をコラーゲン、その残渣をエラスチンとして、各種魚類のコラーゲンとエラスチン含量を求めた。

最近、筋原繊維から弾性タンパク質コネクチンが単離され、¹¹⁾ これが筋肉基質を構成するタンパク質の一種であることが指摘されている。¹¹⁻¹³⁾

本報では、魚類の筋肉基質タンパク質の構成成分を明

らかにすることを目的として、コイおよびマサバの筋肉基質タンパク質を溶解性によって分画し、各画分の性状を調べた。

実験材料および方法

供試魚 コイ *Cyprinus carpio* (平均体重 270 g) は当研究室で飼育していたものを即殺後直ちに実験に用いた。マサバ *Scomber japonicus* (平均体重 130 g) は西宮市沿岸で漁獲されたものを水詰めにして研究室に持ち帰り、死後 2 時間以内に実験に用いた。

粗筋肉基質の調製 操作はすべて 5°C で行った。

魚体側線上部の軀幹部から普通筋を取り、ナイフで十分細切した。細切肉を 30 倍量の HASSELBACH-SCHNEIDER 溶液 (0.6 M KCl, 20 mM リン酸緩衝液 pH 7.2)¹⁴⁾ と共に 2 日間攪拌した。粘稠な懸濁液を 10,000×g で 20 分間遠心分離し、さらに沈澱について同塩溶液による抽出操作を 2 回繰り返した。最後に得た沈澱を水洗し、次いでメタノール-クロロホルム (2:1) 混液で脱脂した。脱脂後、凍結乾燥したものを粗筋肉基質として以下の実験に用いた。

粗筋肉基質タンパク質の分画 粗筋肉基質タンパク質を次の A, B 2 法により分画した。操作はすべて 5°C で

*¹ 京都大学農学部水産学科 (Department of Fisheries, Faculty of Agriculture, Kyoto University, Sakyo, Kyoto 606, Japan).

*² 近畿大学農学部水産学科 (Department of Fisheries, Faculty of Agriculture, Kinki University, Kowakae, Higashiosaka 577, Japan).

行った。

A法では、200 mg の粗筋肉基質を 0.1 N NaOH 100 ml と共に 2 日間攪拌した後、10,000×g, 20 分間遠心分離した。沈澱について同様の抽出操作をさらに 2 度繰り返した。抽出液と洗液を合わせ、これをアルカリ可溶性画分とした。NaOH 抽出残渣を 0.5 M 酢酸 100 ml と共に 2 日間攪拌した後、10,000×g, 20 分間遠心分離した。沈澱について同様の抽出操作をさらに 2 度繰り返した。最後に得た沈澱を 0.5 M 酢酸および水で洗浄した。抽出液と洗液を合わせ、これを酸可溶性画分とした。酢酸抽出残渣を水 50 ml と共にオートクレーブで 120°C で 2 時間加熱した。この処理によって溶出したものをオートクレーブ抽出画分とし、不溶物をオートクレーブ抽出残渣とした。各画分の一部をタンパク質の定量に用いた。残りを水に対して透析した後、凍結乾燥し、各種の分析に用いた。オートクレーブ抽出残渣は直ちに凍結乾燥しその重量を測定した後、分析に用いた。

B法では、A法で用いた 0.1 N NaOH に代えて 0.01 N NaOH を用いたほか、操作はすべて A法に準じた。

コネクチンの調製 KIMURA らの簡易法¹³⁾に従ってコイ普通筋よりコネクチンを調製した。

アクトミオシンの調製 HASSELBACH および SCHNEIDER の方法¹⁴⁾に従ってコイ普通筋よりアクトミオシンを調製した。

エラスチンの調製 コイの肝臓周囲の血管から RASMUSSEN らの方法¹⁵⁾を一部改変した方法でエラスチンを単離した。その概要は次のとおりである。細切組織を 1% 2-メルカプトエタノールを含む 5 M 塩酸グアニジン溶液を用いて抽出した。抽出残渣を水と共にオートクレーブで 120°C で 2 時間加熱した。さらに、その残渣を RICHMOND の方法¹⁶⁾に準じて 1% ドデシル硫酸ナトリウム (SDS), 1% 2-メルカプトエタノールおよび 6 M 尿素を含むトリス-塩酸緩衝液 (pH 7.7) で抽出した。その残渣をよく水洗し、凍結乾燥したものをエラスチンとした。

タンパク質の定量 LOWRY らの方法¹⁷⁾に従ってタンパク質を定量した。酸可溶性画分およびオートクレーブ

抽出画分にはコイ酸可溶性コラーゲンを、その他の画分には牛血清アルブミンをそれぞれの標準物質としてタンパク質を定量した。

窒素の定量 ミクロケルダール法により窒素を定量した。

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 試料を 1% SDS, 1% 2-メルカプトエタノール, および 20% グリセリンを含む 10 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 6.8) 中で 50°C で 1 時間処理した。可溶化試料は LAEMMLI の方法¹⁸⁾に従い、10% ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行った。各タンパク質バンドの分子量を推定するために分子量既知のタンパク質を同時に泳動した。タンパク質はクマシーブリリアントブルー-R 250 を用いて FAIRBANKS らの方法¹⁹⁾に従って染色した。この色素でコラーゲンは赤紫色に、その他のタンパク質は青色に染色されることが MICKO および SCHLAEPFER²⁰⁾ によって報告されている。

アミノ酸分析 各試料 1 mg を 6 N HCl 1 ml と共に封管し、110°C で 24 時間加水分解した。アミノ酸分析は日立高速アミノ酸分析計 835 形を用いて行った。

結 果

粗筋肉基質タンパク質の分画 コイおよびマサバの普通筋から乾重量でそれぞれ 11.1 および 26.2% の粗筋肉基質を得た。これらはそれぞれの筋肉粗タンパク質の 13.3 および 29.7% に相当した。

コイおよびマサバの粗筋肉基質タンパク質を A, B 2 法により分画した結果を Table 1 に示す。両魚種共 A 法で分画した方がアルカリ可溶性画分の割合が高かった。その他の画分の割合は B 法で分画した方が高かった。

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 Fig. 1 にはコイアクトミオシンおよびコイの粗筋肉基質ならびに A, B 2 法による各画分の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動の結果を、また Fig. 2 にはマサバについての同様の結果を示す。主要なタンパク質バンドはその相対移動度から推定した分子量およびバンドの色調により同

Table 1. Fractionation of proteins in crude stromata from carp and Japanese mackerel

(%)

	Carp				Japanese mackerel			
	AL-S* ¹	AC-S* ²	AU-E* ³	RES* ⁴	AL-S	AC-S	AU-E	RES
Method A	88.2	4.7	5.4	1.7	89.0	4.6	3.7	2.7
Method B	68.2	5.4	20.7	5.7	63.8	11.6	18.4	6.2

*1 Alkali-soluble fraction.

*2 Acid-soluble fraction.

*3 Autoclave-extractable fraction.

*4 Residual fraction.

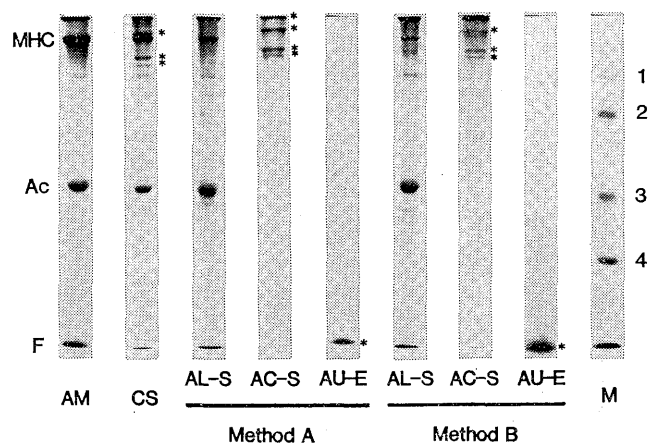


Fig. 1. SDS-polyacrylamide gel electrophoretic patterns of various fractions of carp muscle. Actomyosin (AM), crude stroma (CS), alkali-soluble fraction (AL-S), acid-soluble fraction (AC-S), autoclave-extractable fraction (AU-E), and marker proteins (M) were analyzed. MHC means myosin heavy chain, Ac actin, and F the buffer front. The band marked with asterisk (*) showed the metachromasy of collagen. Marker proteins: 1, rabbit muscle phosphorylase b (molecular weight; 94,000); 2, bovine serum albumin (67,000); 3, ovalbumin (43,000); 4, bovine erythrocyte carbonic anhydrase (30,000).

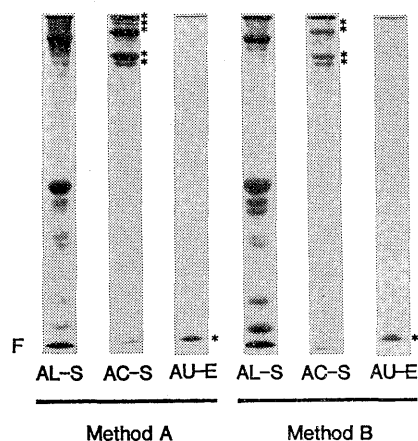


Fig. 2. SDS-polyacrylamide gel electrophoretic patterns of various fractions of Japanese mackerel. Refer to the legend of Fig. 1 for abbreviations and mark.

定した。

コイから調製した粗筋肉基質の泳動像ではミオシン重鎖およびアクチンに相当するバンドが濃く染色された。この結果は粗筋肉基質に変性筋原繊維タンパク質が混入していることを示している。

A法により分画したとき、両魚種共アルカリ可溶性画分では筋原繊維タンパク質由来のバンドが、また酸可溶性画分ではコラーゲンの α , β および γ 鎖に相当する赤紫色のバンドのみが認められた。オートクレーブ抽出画分では泳動先端にのみ赤紫色のバンドが見られた。これ

はコラーゲンが熱分解により低分子量のゼラチンに変化したものと考えられる。

B法により分画したとき、両魚種共アルカリ可溶性画分ではA法と同様の泳動像が認められたが、酸可溶性画分ではコラーゲン由来のバンド以外に筋原繊維タンパク質由来と考えられるバンドが認められた。この結果は0.01N NaOHでは粗筋肉基質中の変性筋原繊維タンパク質は完全に溶出されず酸可溶性画分にもそれらが混入していることを示している。また、オートクレーブ抽出画分では泳動先端にのみバンドが認められたが、その色調はA法で見られた赤紫色よりも青色に近い色調を呈していた。この色調はコラーゲン以外のタンパク質が混入していることを示している。

アミノ酸組成 Table 2にはA, B各法によりコイおよびマサバの粗筋基質から分画した各画分のアミノ酸組成を示す。またTable 3には比較のためにコイから調製したアクトミオシン, 筋隔膜コラーゲン,¹⁰⁾ コネクチン,¹³⁾ および血管エラスチンのアミノ酸組成を示す。

A法で分画したコイ粗筋基質のアルカリ可溶性画分はアクトミオシンとよく類似したアミノ酸組成を、また酸可溶性画分およびオートクレーブ抽出画分は共にコラーゲンとよく類似したアミノ酸組成を示した。オートクレーブ抽出残渣のアミノ酸組成はエラスチンのアミノ酸組成と明らかに異なり、むしろコネクチンかアクトミオシンのそれに類似していた。

B法で分画したとき、アルカリ可溶性画分はアクトミオシンと類似したアミノ酸組成を示したが、酸可溶性画分

Table 3. Amino acid composition of carp actomyosin, myocommata collagen, connectin, and blood vessel elastin

Amino acid	(residues/1,000 total residues)			
	Muscle actomyosin	Myocommata collagen ¹⁰⁾	Connectin ¹³⁾	Blood vessel elastin
Hydroxyproline	0	73	0	10
Aspartic acid	80	50	97	43
Threonine	60	26	61	58
Serine	54	33	52	48
Glutamic acid	179	87	121	77
Proline	33	108	59	94
Glycine	59	309	72	239
Alanine	86	109	75	109
Half-cystine	10	0	9	0
Valine	58	25	73	75
Methionine	32	15	25	2
Isoleucine	50	17	61	38
Leucine	89	31	78	81
Tyrosine	30	6	31	28
Phenylalanine	31	15	32	31
Lysine	87	33	77	29
Histidine	16	6	18	10
Arginine	46	51	49	27

およびオートクレーブ抽出画分はA法で得た画分と異なり典型的なコラーゲンのアミノ酸組成を示さなかった。後者2画分にはコラーゲン以外のタンパク質が混入していることがこれらの結果からもよくわかる。B法で得たオートクレーブ抽出残渣のアミノ酸組成はA法で得たものと類似していた。

マサバの各画分のアミノ酸組成はコイの相当画分のそれとよく類似していた。マサバの場合もA法で得た酸可溶性画分およびオートクレーブ抽出画分はほぼ純粋なコラーゲンからなると考えられ、B法で得た両画分にはコラーゲン以外のタンパク質が存在すると考えられる。オートクレーブ抽出残渣のアミノ酸組成はエラスチンのそれとは異なっていた。

コネクチンの分画 アミノ酸分析の結果からオートクレーブ抽出残渣にコネクチンの存在することが示唆された。この点を明らかにするために、KIMURAらの簡易法¹³⁾により調製したコネクチンを先のA、B2法で分画し、各画分に溶出されるコネクチンを定量した。結果をTable 4に示す。

A法で分画したときコネクチンの約47%が0.1N NaOHに溶けたが、その他の処理ではほとんど溶けず約49%が不溶性画分に存在した。一方、B法で分画したときにはどの処理によってもほとんど溶けなかった。

使用したコネクチン標品の10% SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動像においてゲル内にタンパク質バンドが見られず、標品に筋原繊維タンパク質やコラーゲンなどに由来する不純物が含まれていないことを認めた。ま

Table 4. Fractionation of connection by Method A and B

	(%)			
	AL-S*	AC-S*	AU-E*	RES*
Method A	47.2	2.5	1.5	48.8
Method B	0.0	1.5	0.7	97.8

* Refer to the legend of Table 1 for abbreviations.

たコネクチンの0.1N NaOH可溶性画分の同様の電気泳動像においてもゲル内にタンパク質バンドが認められなかった。これらの結果はコネクチンの一部が0.1N NaOHに溶解することを示しているが、溶解性の異なるコネクチンに構造上どのような違いがあるのかは不明である。

考 察

筋肉基質調製時に起泡や付着等による回収損失をなくすために、組織をホモジナイザーで磨砕せずナイフを用いて手で細切した。本法では筋肉基質はほぼ完全に回収できたと考えられるが、得られた粗筋肉基質の収量は既報^{2,6-9)}の値よりかなり高かった。これは組織細切に時間を費やしタンパク質が変性したことに基因するかあるいは磨砕が不十分のためにタンパク質が塩溶液に分散、溶解しにくかったことに基因すると考えられる。

粗筋肉基質中の筋原繊維由来のタンパク質は0.1N NaOHで完全に溶出された。それ故、A法のアルカリ可溶性画分を除いた残りの画分は既報^{2,6-9)}の筋肉基質に相当すると考えてよい。0.1N NaOH不溶性画分か

ら計算したコイおよびマサバの筋肉基質含量は筋肉乾重量当りそれぞれ 1.3 および 2.9%, 筋肉粗タンパク質当り 1.6 および 3.3% であり, これらは既報の値とよく一致している。

A法で得た酸可溶性画分およびオートクレーブ抽出画分にはコラーゲン以外のタンパク質は認められなかった (Figs. 1 および 2, Table 2)。また, HASSELBACH-SCHNEIDER 溶液および 0.1 N NaOH 可溶性画分の電気泳動像においてコラーゲン由来の変染色を示すバンドは認められなかったため, 筋肉中のコラーゲンは前記 2 画分にはほぼ完全に回収されていると考えられる。一方, B法では酸可溶性画分およびオートクレーブ抽出画分には筋原繊維由来と考えられるタンパク質が混入していた。

TSUCHIYA および TAKAHASHI²⁾ は魚類筋肉の 5% KCl 溶液に不溶な画分を結合組織とし, さらに結合組織のオートクレーブ抽出画分をコラーゲン, 抽出残渣をエラスチンとして各種魚類についてそれらを定量した。本報の方法で得たオートクレーブ抽出残渣は TSUCHIYA および TAKAHASHI²⁾ によるエラスチン画分に相当すると考えられる。しかしアミノ酸分析およびコネクチンの溶解性の結果 (Table 2-4) からオートクレーブ抽出残渣がエラスチンからなるとは考え難く, コネクチンがその主成分であると考えられる。オートクレーブ抽出残渣にエラスチンが存在するとしてもその含量はわずかであると考えられ, 相当画分をエラスチンとして定量した TSUCHIYA および TAKAHASHI²⁾ の結果は再検討を要する。

粗筋肉基質中のコネクチンはA法で分画したとき, 約半分がアルカリ可溶性画分に, 残り約半分がオートクレーブ抽出残渣に回収されたと考えられる。一方, B法ではコネクチンはオートクレーブ抽出残渣にほぼ完全に回収されたと考えられ, 残渣のアミノ酸組成もコネクチンの組成に類似していた。しかしオートクレーブ抽出残渣にコネクチン以外のタンパク質の存在が予想され, それらについてなお検討を必要とする。また最近, 中性塩溶液に溶解するコネクチンのあることが報告されているので,²¹⁾ 本報の方法で調製した粗筋肉基質に筋肉中のコネクチンのすべてが回収されていないと考えられる。コネクチンに関してさらに詳細な検討が必要である。

文 献

1) 久保田 穰: 魚肉タンパク質 (日本水産学会

- 編), 恒星社厚生閣, 東京, 1977, pp. 59-74.
- 2) Y. TSUCHIYA and I. TAKAHASHI: *Tohoku J. Agr. Res.*, **1**, 209-213 (1950).
 - 3) A. ASGHAR and N. T. M. YEATES: *Agr. Biol. Chem.*, **38**, 1851-1858 (1974).
 - 4) K. YAMAGUCHI, J. LAVÉTY, and R. M. LOVE: *J. Food Technol.*, **11**, 389-399 (1976).
 - 5) P. E. McCLAIN, A. M. PEARSON, J. R. BRUNNER, and G. H. CREVASSE: *J. Food Sci.*, **34**, 115-119 (1969).
 - 6) W. J. DYER, H. V. FRENCH, and J. M. SNOW: *J. Fish. Res. Bd. Can.*, **7**, 585-593 (1950).
 - 7) 志水 寛・清水 亘: 日水誌, **26**, 806-809 (1960).
 - 8) K. HASHIMOTO, S. WATABE, M. KONO, and K. SHIRO: *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **45**, 1435-1441 (1979).
 - 9) S. WATABE, Y. OCHIAI, S. KANO, and K. HASHIMOTO: *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **49**, 265-268 (1983).
 - 10) 久保田 穰・木村 茂: 皮革化学, **21**, 80-85 (1975).
 - 11) K. MARUYAMA, R. NATORI, and Y. NONOMURA: *Nature (London)*, **262**, 58-59 (1976).
 - 12) K. MARUYAMA, S. MATSUBARA, R. NATORI, Y. NONOMURA, S. KIMURA, K. OHASHI, F. MURAKAMI, S. HANDA, and G. EGUCHI: *J. Biochem.*, **82**, 317-337 (1977).
 - 13) S. KIMURA, Y. AKASHI, and M. KUBOTA: *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **45**, 237-240 (1979).
 - 14) W. HASSELBACH and G. SCHNEIDER: *Biochem. Zeitschr.*, **321**, 462-475 (1951).
 - 15) B. L. RASMUSSEN, E. BRUENGER, and L. B. SANDBERG: *Anal. Biochem.*, **64**, 255-259 (1975).
 - 16) V. RICHMOND: *Biochim. Biophys. Acta*, **351**, 173-177 (1974).
 - 17) O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR, and R. J. RANDALL: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951).
 - 18) U. K. LAEMMLI: *Nature (London)*, **227**, 680-685 (1970).
 - 19) G. FAIRBANKS, T. L. STECK, and D. F. WALLACH: *Biochemistry*, **10**, 2606-2616 (1971).
 - 20) S. MICKO and W. W. SCHLAEPFER: *Anal. Biochem.*, **88**, 566-572 (1978).
 - 21) S. KIMURA and K. MARUYAMA: *J. Biochem.*, **94**, 2083-2085 (1983).