

コイ背肉およびウサギ骨格筋筋原線維の Ca 脱感作の比較について

今 野 久 仁 彦

(1977年9月7日受理)

A Comparative Study of the Ca Desensitization of Myofibrils from Carp Dorsal and Rabbit Skeletal Muscles

Kunihiko KONNO*

Myofibrils were prepared from frozen and fresh carp dorsal and rabbit skeletal muscles using the original method of YANG *et al.* The Ca sensitivity was estimated by measuring the Mg-ATPase activity in the presence and absence of Ca.

1) It was found that a desensitization of myofibrils to the action of Ca was successfully achieved by repeated washings with dilute buffer solution.

2) Desensitized myofibrils suspended in 0.1 M KCl, pH 7.5, were only slightly converted into Ca-sensitive ones upon the addition of relaxing protein, while relaxing protein was capable of binding with desensitized myofibrils under the same conditions. But the myofibrils previously dissolved in 0.6 M KCl, were effectively converted into Ca sensitive ones in the presence of relaxing protein, except for the combinations of desensitized myofibrils from rabbit frozen muscle and carp relaxing protein.

3) The desensitized myofibrils from rabbit frozen skeletal muscle can be made equally responsive to carp and rabbit relaxing proteins either by heating at 35°C or by treating with 1 M urea at 25°C.

著者らは魚類筋肉の特性を明らかにする目的から、筋肉の収縮系蛋白質はもとより、調節系蛋白質に関する研究を行ってきた¹⁻⁴⁾。特に、コイ背肉とウサギ骨格筋について、比較生化学的な視野からの研究を進めたが⁴⁾その結果、凍結した筋肉と新鮮な筋肉から調製したアクトミオソンの生化学的性質の差異をrelaxing protein(弛緩蛋白質=活性トロポミオソニン=トロポニン-トロポミオソニン複合体)の生理的活性(Ca感受性を賦与する性質)を比較することによつて明らかにできることを報じた⁴⁾。すなわち、ウサギ凍結肉から調製したCa脱感作アクトミオソニンに対して、ウサギのrelaxing proteinは生理的活性(Ca感受性を与える)を示すにもかかわらず、コイのrelaxing proteinは生理的活性を示すことができなかつた。一方、このコイのrelaxing proteinはコイの新鮮および凍結肉脱感作アクトミオソニンやウサギ新鮮肉脱感作アクトミオソニンには生理的活性を示すため、上述の現象はまさにウサギ凍結肉脱感作アクトミオソンの、あるいはコイのrelaxing proteinの特異性で

あるように思われた。そこで、本研究ではアクトミオソニンよりもさらに生筋に近い性質を保持する筋原線維についてそのCa脱感作とrelaxing proteinによるCa感受性の回復について比較生化学的な研究を行うことを目的とした。また、このような研究を進めることは冷凍すり身製造におけるおとし身の水さらし工程に関する理解を深めることにも通ずるので食品学上の見地からも意義があると考えている。

実 験 方 法

筋原線維の調製とそのCa脱感作の方法 コイ(背筋)およびウサギ(骨格筋)の新鮮肉および凍結肉(-20°C, 一週間~数ヶ月)からPERRYの方法⁵⁾およびYANGらの方法⁶⁾に準じて筋原線維を調製した。Caに対する脱感作法はアクトミオソンのCa脱感作に採用された方法¹⁾に準じて低濃度緩衝溶液でよく洗浄して行つた。方法の詳細は結果の項において述べる。

Relaxing proteinの調製 relaxing proteinの調製

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

本研究では次の略語を使用する。

EGTA, ethyleneglycol bis (β -aminoethylether) N, N' tetraacetate; SDS, sodium dodecyl sulfate.

は前報⁴⁾のとおり行つた。すなわち、ひき肉を 0.1 M KCl-39 mm borate (pH 7.2) でよく洗浄した後、残渣を 10 mm 2-メルカプトエタノールで冷所で二日間抽出し、遠心分離して上澄を得た。さらに、上澄の 45~65% 飽和硫酸画分を relaxing protein として使用した。筋原線維の Mg-ATPase 活性の測定ならびに Ca 感受性の算出法はアクトミオンについて先に採用した方法⁵⁾に準じて行い、調製した蛋白質のサブユニット組成は SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法⁷⁾によつて検討した。また筋原線維 Ca-ATPase の熱変性は 0.6 M KCl-20 mm Tris-maleate (pH 7.5) に溶解した後、新井らの方法⁸⁾により測定した。

実験結果

低濃度緩衝溶液での洗浄による筋原線維の Ca 脱感作コイまたはウサギの新鮮肉と凍結肉の各筋原線維をアクトミオンの場合¹⁾と同様に低濃度緩衝溶液 (2 mm Tris-HCl, pH 7.6) でくり返し洗浄し Ca に脱感作しようとした。まず、ひき肉を日本精機製のホモジナイザーを使用し、氷冷した 0.1 M KCl-20 mm Tris-HCl, pH 7.5 により 30 秒づつ二回ホモジナイズした。一層のガーゼで濾過後、同上緩衝溶液でよく洗浄して筋原線維標品を得た。つづいて筋原線維を 20 倍量の 2 mm Tris-HCl (pH 7.6) に懸濁、遠心分離 (20,000×g, 20 分間)

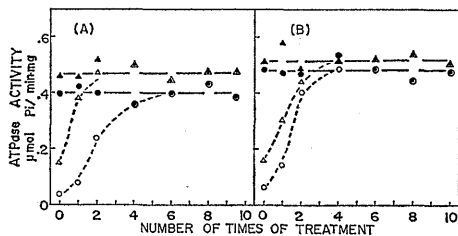


Fig. 1. Effect of repeated washings on the Mg-ATPase activity of myofibrils.

Myofibrils were prepared from fresh (A) and frozen (B) rabbit muscles by the original method of YANG *et al.* The washing of myofibrils was repeated 10 times with 20 volumes of 2 mm Tris-HCl (pH 7.5). On every washing step, a portion of myofibrils were suspended in 0.1 M KCl (▲, △) and dissolved in 0.6 M KCl (●, ○), respectively. The Mg-ATPase activity of both myofibrils preparations was assayed in the mixture of 30 mm KCl, 20 mm Tris-maleate (pH 7.5), 2 mm MgCl₂, 2 mm ATP and 0.1 mm CaCl₂ (closed symbol) or 0.5 mm EGTA (open symbol). ATPase activity was shown as μmol Pi liberation/min·mg of protein.

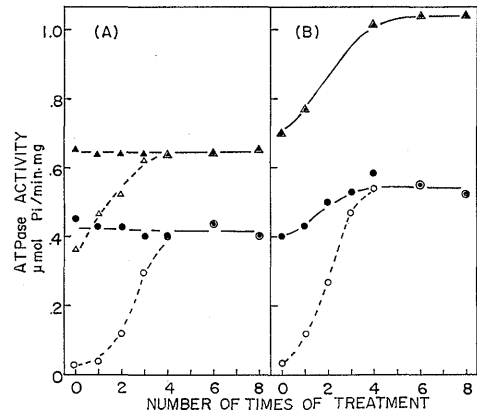


Fig. 2. Effect of repeated washings on the Mg-ATPase activity of carp myofibrils.

The experimental methods and symbols used were same as in Fig. 1, except the myofibrils from fresh (A) and frozen (B) carp muscles were prepared and washed.

をくり返し洗浄した。各洗浄ごとに筋原線維の一部を採取し、Ca のある時とない時の Mg-ATPase を測定して Ca 感受性の変化を追跡した。なお、筋原線維の Ca 感受性は 0.1 M KCl-20 mm Tris-maleate, pH 7.5 あるいは 0.6 M KCl-20 mm Tris-maleate, pH 7.5 の二つの条件下において測定し、Fig. 1 と Fig. 2 にその結果を示した。

Fig. 1A, B に示すように、まず、ウサギ骨格筋の筋原線維 Mg-ATPase 活性は筋原線維懸濁液 (0.1 M KCl) のまま、あるいは一度可溶化した (0.6 M KCl) 後のいずれの条件下で測定しても EGTA で Ca を除去した時の阻害が見られ Ca 感受性は高かつた。しかし、筋原線維を洗浄するに伴つて Ca 感受性は低下した。また、新鮮肉 (Fig. 1A) および凍結肉 (Fig. 1B) いずれの筋原線維も洗浄を 5~6 回くり返すと同様に脱感作されることを認めた。すなわち、Ca を除去した時の Mg-ATPase 活性の阻害が弱くなり Ca のある場合の活性と同じ水準になつていた。一方、コイの筋原線維の場合を Fig. 2 に示す。まず、Fig. 2A はコイ新鮮肉筋原線維についてである。ウサギ筋原線維の場合と同様に、筋原線維は最初は高い Ca 感受性をもつが、5~6 回の洗浄によつて完全に脱感作された。しかし、Fig. 2B に示すように、コイ凍結肉の筋原線維の洗浄の場合は明らかに異なる結果が得られ、0.1 M KCl に懸濁した筋原線維の Mg-ATPase を測定すると、その活性は Ca の影響を受けず Ca 感受性は認められなかつた。このとき、Mg-ATPase 比活性の水準はウサギの場合よりも明らかに高く 0.7-1.0 μmol Pi/min·mg であつた。一方、この筋原線維を

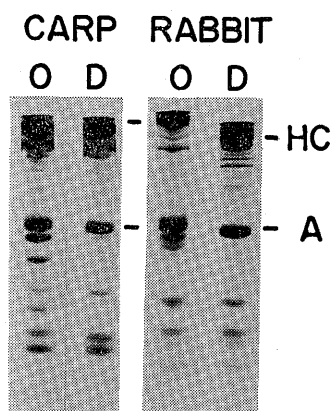


Fig. 3. SDS polyacrylamide gel electrophoretic patterns of intact myofibrils and desensitized myofibrils.

Myofibrils were prepared from the frozen muscles of carp and rabbit and desensitized. Approximately 50 μg of intact myofibrils (O) or desensitized myofibrils (D) were loaded on each gels. Electrophoresis was performed by the usual method of WEBER and OSBORN. Protein migration is from top to bottom in the direction to anode. The arrows indicate heavy chain (HC) and actin (A).

0.6 M KCl として溶解した後に Mg-ATPase を測定すると明らかに Ca 感受性が認められるようになる。0.1 M KCl に懸濁した筋原線維 Mg-ATPase 活性の挙動から洗浄効果を追跡すると、洗浄のくり返しに伴い、Ca 感受性が認められないままで Mg-ATPase 活性は 1.0 μmol Pi/min·mg 以上に上つてゆく。一方、0.6 M KCl に溶解した筋原線維 Mg-ATPase 活性は洗浄に伴い、最初認められた Ca 感受性が消失してゆき 5~6 回の洗浄で完全に脱感作されるという経過をたどっている。

次に、洗浄前の筋原線維と洗浄して脱感作した筋原線維の SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動図を Fig 3 に示す。すなわち、コイおよびウサギいずれの筋原線維も洗浄により筋原線維蛋白質のうち relaxing protein (トロポニンとトロポミオンに相当するバンド) が除去されていることが確かめられる。Fig. 3 には凍結肉からの標品についてのみ示したが、新鮮肉からの標品も全く同様である。

Relaxing protein による脱感作筋原線維の Ca 感受性の回復 調製したコイおよびウサギの脱感作筋原線維に対して relaxing protein を再添加し Ca 感受性の回復を比較検討しようとした。その結果は Table 1A に示すように、まず、コイおよびウサギの新鮮または凍結肉の脱感作筋原線維について、その 0.1 M KCl-20 mm

Table 1. Cross reaction of desensitized myofibrils and relaxing protein between carp and rabbit

Desensitized myofibrils were prepared by the same method as described in Fig. 1. A) Desensitized myofibrils were suspended in 0.1 M KCl-20 mm Tris-maleate (pH 7.5) and used for ATPase assay. B) Desensitized myofibrils were previously dissolved in 0.6 M KCl-20 mm Tris-maleate (pH 7.5) and used for ATPase assay. C) Desensitized myofibrils dissolved as in B), were resuspended in 0.1 M KCl-20 mm Tris-maleate (pH 7.5) and used for ATPase assay. Mg-ATPase activity of myofibrils was assayed in the mixture as shown in Fig. 1, except that carp and rabbit relaxing protein was added in the weight ratio of 40% of myofibrils present. Ca sensitivity was calculated by the equation as follows:

$$\text{Ca sensitivity} = \left(1 - \frac{\text{ATPase without Ca}}{\text{ATPase with Ca}}\right) \times 100$$

Desensitized myofibrils	Carp relaxing protein			Rabbit relaxing protein			
	ATPase activity		Ca sensitivity	ATPase activity		Ca sensitivity	
	with Ca	without Ca		with Ca	without Ca		
A	carp fresh muscle	0.423	0.377	11	0.486	0.381	22
	carp frozen muscle	0.808	0.801	1	0.718	0.669	7
	rabbit fresh muscle	0.542	0.444	18	0.444	0.288	35
	rabbit frozen muscle	0.407	0.333	18	0.455	0.361	21
B	carp fresh muscle	0.316	0.062	80	0.279	0.012	96
	carp frozen muscle	0.380	0.062	84	0.331	0.047	86
	rabbit fresh muscle	0.593	0.100	83	0.567	0.030	95
	rabbit frozen muscle	0.621	0.522	16	0.527	0.142	73
C	carp fresh muscle	0.324	0.146	56	0.325	0.042	87
	carp frozen muscle	0.340	0.153	55	—	—	—
	rabbit fresh muscle	0.647	0.223	66	0.503	0.097	81
	rabbit frozen muscle	0.621	0.494	20	0.544	0.167	70

Tris-maleate (pH 7.5) 懸濁液に対して relaxing protein を添加するとき Ca 感受性は回復しなかつた。この場合、脱感作筋原線維と relaxing protein を 0.1 M KCl 懸濁液中において 0°C で 24 時間放置し、結合の時間を長くしたがその効果は現れなかつた。次に同じ脱感作筋原線維を 0.6 M KCl-20 mm Tris-maleate (pH 7.5) として溶解させ、24 時間 (0°C) 後に relaxing protein を加えて Ca 感受性を検討した。その結果を Table 1B に示すが、コイの場合は新鮮、凍結肉いずれの脱感作筋原線維においても、また、ウサギの場合は新鮮肉脱感作筋原線維においてのみコイの relaxing protein によって Ca 感受性が 80% 以上の高い値を示すまで回復した。しかし、ウサギ凍結肉の脱感作筋原線維においてはウサギの relaxing protein によつては Ca 感受性が回復したが (80%), コイ relaxing protein によつて Ca 感受性はほとんど回復しなかつた (16%)。すなわち、コイの relaxing protein はウサギ凍結肉の脱感作筋原線維に対して特異的に作用しないことを知つたが、この事実は先に脱感作アクチンについて著者らが見出した現象と全く一致している⁴⁾。なお、Table 1C に示すように脱感作筋原線維を一度 0.6 M KCl に溶解した後、稀釈して再び 0.1 M KCl にもどし、そこで relaxing protein を加えて Ca 感受性の回復を測定すると、コイの場合は 0.6 M KCl 中の脱感作筋原線維に直接 relaxing protein を作用させた場合に比べ、Ca 感受性の回復は劣つていた (50~55)。なお、relaxing protein についてはコイ、ウサギとも新鮮、凍結肉からの標品に差異は認められないことを確かめた。

脱感作筋原線維と relaxing protein の結合 本実験で調製したコイおよびウサギの脱感作筋原線維と relaxing protein の再結合の可否を遠心分離法により検討を加えた。コイおよびウサギの relaxing protein はいずれの脱感作筋原線維 (0.1 M KCl 懸濁液) に対しても Ca 感受性を回復させないことは先に述べた。そこでこの場合の両蛋白質の結合の可否を検討した。すなわち、上述の条件下の relaxing protein と脱感作筋原線維の混合懸濁液を 0°C で 24 時間放置して結合させた後、20,000×g で 20 分間遠心分離して得られた沈殿を集め SDS ゲル電気泳動に供した。この結果を Fig. 4 に示すが脱感作筋原線維にはアクチンとミオンに相当するバンドだけが、また relaxing protein を混合した後は、他に relaxing protein に由来するバンドが明らかに検出される。このことはコイおよびウサギの relaxing protein はどちらの脱感作筋原線維に対してもよく結合していることを示している。Fig. 4 は凍結肉からの脱感作筋原線維の場合を示したが、新鮮肉の場合も同様である。また、この条件下では relaxing protein そのも

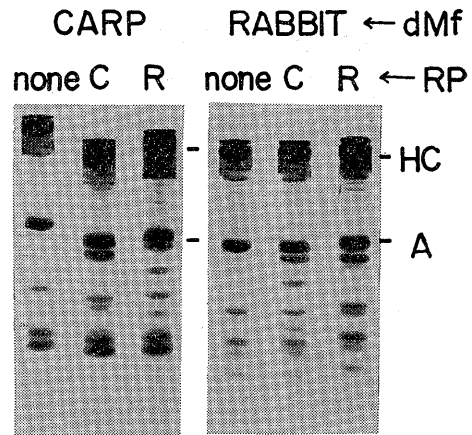


Fig. 4. Test for binding of relaxing protein to desensitized myofibrils.

Relaxing protein (2 mg/ml) and desensitized myofibrils (5 mg/ml) were mixed in 0.1 M KCl-20 mm Tris-maleate (pH 7.5) and kept for 24 hours at 0°C. After centrifugation of the mixture at 20,000 g for 20 minutes, the pellet obtained was dissolved in 1% SDS and 1% 2-mercaptoethanol. Approximately 50 µg of protein was loaded on each gel. The desensitized myofibrils (d-Mf) were prepared from the frozen muscles of carp and rabbit and relaxing proteins (RP) from the fresh muscles of carp (C) and rabbit (R) were used.

のは沈殿しないことを確かめた。

KCl による脱感作筋原線維の可溶化と relaxing protein による Ca 感受性の回復 先の実験により、脱感作筋原線維を高濃度 KCl (0.6 M) で溶解すると relaxing protein の作用を受けやすくなることを知つたので、次に KCl による処理について検討を加えた。まず、脱感作筋原線維 (0.1 M KCl-20 mm Tris-maleate, pH 7.5) に 3 M KCl を加えて 0.6 M KCl とする。これを 0°C で一定時間保存した後 5 倍量の冷水を加え再び 0.1 M KCl にもどしてから relaxing protein による Ca 感受性の回復を検討した。その結果を Fig. 5 と Fig. 6 に示す。Fig. 5A はコイ新鮮肉の脱感作筋原線維を KCl で処理した場合である。KCl で処理する前はコイおよびウサギ relaxing protein を加えても Ca 感受性は回復しなかつたが KCl を加えた後、15 分くらいから 2 時間くらいまでの間に relaxing protein の作用を受けて Ca 感受性を示すようになっていた。ただし、Ca が存在する時もしない時も、relaxing protein 共存下の Mg-ATPase 活性はいずれも低くなるが Ca を除去した時の活性が著しく阻害を受けるため結果として Ca 感受性が高まるのである。また、コイの relaxing protein

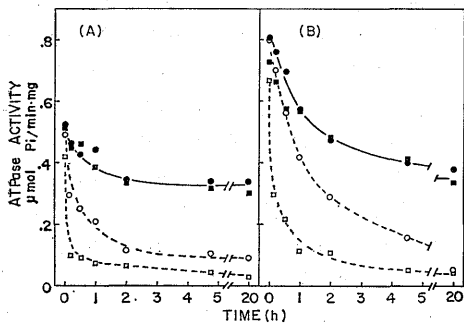


Fig. 5. KCl treatment of desensitized myofibrils of carp and resensitization by relaxing proteins.

Desensitized myofibrils from fresh (A) and frozen (B) carp muscles were treated with 0.6 M KCl at 0°C for various periods. Treatment was stopped by the addition of 5 volumes of cold water, and used for ATPase assay. The reaction mixture of ATPase assay and symbols (open and closed) used were same as in Fig. 1. Relaxing proteins of carp (●, ○) and rabbit (■, □) were added in the weight ratio of 40% to myofibrils present.

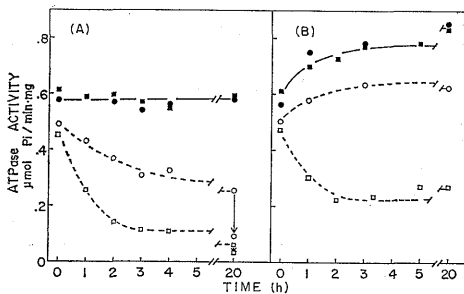


Fig. 6. KCl treatment of desensitized myofibrils of rabbit and resensitization by relaxing proteins.

The experimental methods and symbols used were same as in Fig. 5, except desensitized myofibrils from fresh (A) and frozen (B) rabbit muscles were treated. Arrows indicate the ATPase activities assayed using the desensitized myofibrils, dissolved in 0.6 M KCl, directly.

に比べてウサギ relaxing protein は短時間の KCl 処理 (15 分) で Ca 感受性を回復させる (80%)。また Fig. 5B はコイ凍結肉脱感作筋原線維の KCl 処理の場合を示しているが、処理前の Mg-ATPase 比活性が高いのが特徴である (0.8 μmol Pi/min·mg)。relaxing protein の共存下で Ca 感受性を示さないが KCl を加えて溶解すると、新鮮肉脱感作筋原線維と全く同じように、15 分から 2 時間くらいの処理で relaxing protein

の作用を受け、高い Ca 感受性を示すようになる。この際、Mg-ATPase 比活性は新鮮肉脱感作筋原線維を KCl で溶解した場合と同じ水準まで低下した。なお、この場合もウサギ relaxing protein の方がコイ relaxing protein よりも早く Ca 感受性を回復させる傾向にあった。

次に、Fig. 6A にはウサギ新鮮肉脱感作筋原線維の KCl 処理の結果を示した。すなわち、KCl を加えてからはば 2 時間後にはウサギ relaxing protein の作用により高い Ca 感受性を回復する (80%)。すなわち、relaxing protein と Ca の存在下の Mg-ATPase 活性は KCl によつてほとんど影響をうけないが Ca を除去した時の活性は著しく低下するため結果として Ca 感受性が高くなる。コイの relaxing protein はウサギ relaxing protein に比べ一般に活性が弱いようにみえるが、KCl で溶解した脱感作筋原線維を水で稀釈することなく Mg-ATPase の測定に供した場合はウサギと同じ水準の Ca 感受性を示すことを認めた (Fig. 6A 中に矢印で示す)。この現象は Table 1C で述べた結果と全く同じであるようにみえる。次に、ウサギ凍結肉脱感作筋原線維の KCl 処理の場合の結果を Fig. 6B に示す。この場合は KCl 処理後の脱感作筋原線維はウサギ relaxing protein によつては Ca 感受性を回復するようになるが、コイ relaxing protein では回復しないという興味深い結果になった。すなわち、コイおよびウサギいずれの relaxing protein を加えた時も Ca 存在下の Mg-ATPase 活性は 0.6 から 0.8 μmol Pi/min·mg くらいまで上昇する。そして、Ca のない条件下ではウサギの relaxing protein が共存する時 Mg-ATPase は強く阻害されるため Ca 感受性の値も 70% を越える。一方、コイの relaxing protein を用いる場合は KCl による処理時間を長くしても Mg-ATPase の阻害は起こらず Ca 感受性は回復しないことがわかる (20% 以下)。この結果は Table 1B で得た結果とよく一致しており、また、先に著者らがウサギ凍結肉から調製した脱感作アクトミオシンについて知った結果と全く同じであつた。

ウサギ凍結肉脱感作筋原線維の加熱または尿素処理と Ca 感受性の回復 先に著者らはウサギ凍結肉から調製した脱感作アクトミオシンはコイの relaxing protein によつて Ca 感受性を回復しないが、脱感作アクトミオンを加熱や尿素処理すると容易に Ca 感受性を回復するようになることを認めている⁴⁾。本実験におけるウサギ凍結肉の脱感作筋原線維は全く同じ性質を示すため、脱感作アクトミオシンの場合と同じ処理を行つてみた。すなわち、脱感作筋原線維を 0.6 M KCl に溶解後、加熱または尿素で処理し Ca 感受性の回復の検討を行つた。まず、ウサギ凍結肉の脱感作筋原線維 (0.6 M KCl-

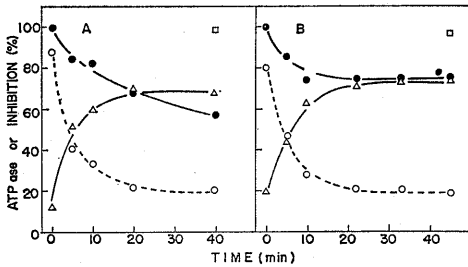


Fig. 7. Thermal and urea treatments of desensitized myofibrils from rabbit frozen muscle.

A) Desensitized myofibrils dissolved in 0.6 M KCl were treated with 1 M urea at 25°C for various periods. Reaction was stopped by the addition of 20 volumes cold water. B) Desensitized myofibrils dissolved in 0.6 M KCl were heated at 35°C for various periods and cooled in ice. Mg-ATPase activity was assayed in the presence (●) and absence (○) of Ca and Ca sensitivity (Δ) was calculated by the equation as shown in Table 1. Relaxing protein of carp was added in the weight ratio of 40% to myofibrils present. The squares (□) show the change in Mg-ATPase of myofibrils alone during the same treatments and activity was assayed in the same mixture without relaxing protein.

20 mM Tris-maleate, pH 7.5) を 1 M 尿素と共存させて 25°C で一定時間処理し、次に 20 倍量の 20 mM Tris-maleate pH 7.5 (relaxing protein を含む) を加えて稀釈し尿素との反応をとめると同時に Mg-ATPase 活性を測定して Ca 感受性を求めた。その結果を Fig. 6A に示す。これによると、0.6 M KCl に溶解しただけの脱感作筋原線維は Ca 感受性を回復しないが、約 20 分間の尿素処理によつてコイ relaxing protein によつても Ca 感受性を回復しやすくなる (10% から 70% へ) ことを認めた。次に、同じく 0.6 M KCl-20 mM Tris-maleate, pH 7.5 に溶解したウサギ凍結肉脱感作筋原線維を 35°C で一定時間加温した後、氷冷して加温をとめ、ただちにコイの relaxing protein の共存下で Mg-ATPase 活性を測定した。その結果を Fig. 7B に示す。これによると、尿素処理の場合と同様に約 20 分後には Ca 感受性は最初の 10% から 70% まで上昇することを認めた。また加温中における脱感作筋原線維だけの Mg-ATPase 活性はほとんど失活していないことを認めた (Fig. 7 中の□)。従つて relaxing protein と Ca が存在する時にみられる Mg-ATPase 活性の低下は脱感作筋原線維の変性のためではなく、生理的活性の変化と考えることができる。

脱感作筋原線維 Ca-ATPase の加熱変性について 本実験で調製した筋原線維と脱感作筋原線維をそれぞれ 0.6 M KCl に溶解し加熱変性を行い、Ca-ATPase の熱変性曲線の解析を行った。Fig. 8A に示すように、コイ (35°C) 筋原線維の Ca-ATPase は一次反応に従い失活した。一方、洗浄して脱感作した筋原線維については、ウサギ (40°C) の場合はほぼ一次反応に従うが、コイ (35°C) の場合は新鮮肉、凍結肉いずれの場合も二段階の一次反応となり、初めは急で後は緩やかな二つの直線から成ることを認めた。この事実は、すでに安井ら⁹⁾ や室塚ら¹⁰⁾ が報じているように、ミオシンと結合するアクチンが不十分な時のアクトミオシン Ca-ATPase の熱変性の結果と酷似している。従つてコイの筋原線維については洗浄によつて relaxing protein とともにアクチンの一部が流出している可能性が大きい。このアクチンの流出は魚類筋肉のアクトミオシンを同じ方法で脱感作す

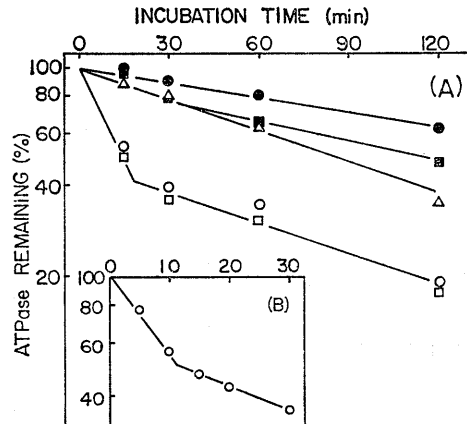


Fig. 8. Thermal inactivation of Ca-ATPase of intact myofibrils, desensitized myofibrils and myofibrils from "SURIMI".

A) Myofibrils from carp fresh muscle (Δ), desensitized myofibrils from fresh (□) and frozen (○) carp muscles, were dissolved in 0.6 M KCl-20 mM Tris-maleate (pH 7.5) and inactivated at 35°C for various periods. Desensitized myofibrils from fresh (■) and frozen (●) rabbit muscles were inactivated at 40°C in the same manner. B) Myofibrils were prepared from Alaska pollack "SURIMI" by repeated homogenization and washing with 0.16 M KCl (pH 7.5) and dissolved in the same medium described above. The inactivation was performed at 30°C. After the heating was stopped in ice, Ca-ATPase activity was assayed in the mixture of 60 mM KCl, 25 mM Tris-maleate (pH 7.0) 5 mM CaCl₂, and 1 mM ATP at 25°C.

る時にも起こることが認められているが¹¹⁾、このようなアクチンが不足していると思われる魚の脱感作アクトミオシンや脱感作筋原線維はコイ relaxing protein を加えることによって Ca 感受性はよく回復するのに対し、正常な量を保っているウサギ (凍結肉) の脱感作筋原線維とアクトミオシンにおいてのみ Ca 感受性の回復が不完全であるという結果はウサギ凍結肉脱感作筋原線維が Ca 感受性を回復しにくい原因はアクチン量の不足によるものではないことが明らかである。一方、食品学的な視野からみると、冷凍すり身の製造におけるおとし身の水晒しの工程は本実験における筋原線維の脱感作の方法とよく似ている。そこで、市販のスケトウダラのすり身から筋原線維をとり出し、Ca-ATPase の熱変性 (30°C) を行つてみると (Fig. 8B)、熱変性は二段の一次反応的直線となり、コイ脱感作筋原線維の場合のようにアクチン流出の可能性が示唆された¹¹⁾。また、Ca 感受性も失なわれていることも同時に確認した。

考 察

筋原線維を調製し、低濃度緩衝溶液で洗浄をくり返しながらその Mg-ATPase 活性 (0.1 M KCl および 0.6 M KCl の両条件下の筋原線維の Mg-ATPase 活性) と Ca 感受性の変化について検討した。それによると、ウサギの新鮮肉および凍結肉またコイの新鮮肉の筋原線維は Ca 感受性を有しているが、洗浄によって Ca 感受性を失い脱感作された。一方、コイ凍結肉筋原線維では、0.1 M KCl の懸濁状態で測定するとその Mg-ATPase 比活性は他の場合に比べ著しく高く、見かけ上、Ca 感受性を示さない。しかし、0.6 M KCl に溶解した後測定すると、Ca 感受性が認められるようになる。この際 Mg-ATPase 比活性も著しく低下することから、コイの筋原線維は凍結によって、なんらかの変化をうけアクチンとミオシンの相互作用が著しく強められ、それが原因となつて relaxing protein による調節をうけにくくなるのではないかと推定される。Ca に対する脱感作のされかたを比べてみると、コイ、ウサギの新鮮肉または凍結肉いずれの場合も、そのアクトミオシンの脱感作の場合とはほぼ同じ洗浄回数 (5~6 回) で充分であり、洗浄による relaxing protein の除去は構造的性を有する筋原線維からでも特に困難であるとは思われなかつた。この時、筋原線維の顕微鏡的観察によると、ウサギの脱感作筋原線維ははつきりとした横紋構造が認められるが、コイの脱感作筋原線維 (0.1 M KCl) では膨潤しており、またはつきりとした横紋は観察しにくくなつていた。すなわち、この洗浄条件ではコイの横紋構造 (すなわち、アクチン、ミオシンの配置) は不安定で弱いように推定されるのであるが、その生理活性はウサギの場合とほぼ

同様であり、Ca 感受性の回復のしかたも正常であつた。

次に、脱感作筋原線維に relaxing protein を再び添加して Ca 感受性を回復させるにあつて、脱感作筋原線維の 0.1 M KCl 懸濁液に relaxing protein を混合しても効果がないにもかかわらず、SDS ゲル電気泳動図によると両蛋白質は結合していることは確実であるから Ca 感受性の回復は単なる蛋白質の結合の問題ではなく、結合のしかた (分子の構造配置) が問題となつていよう想像される。高塩濃度 (0.6 M KCl) に溶解した場合は、ウサギ凍結肉の脱感作筋原線維に対するコイの relaxing protein の組み合わせ以外は、よく Ca 感受性を回復させた。これは、おそらく、高塩溶液中でアクチンとミオシンの結合が relaxing protein の調節をうけやすいように変化したためであるように思われる。しかし、ウサギ凍結肉の脱感作筋原線維は、ウサギ凍結肉脱感作アクトミオシンについて先に報じたように、0.6 M KCl 溶液中でもコイ relaxing protein の作用を受けない点は全く特異的な現象である。それは、凍結により筋原線維中のミオシンに対応するアクチンの構造になんらかの異常が生じ、relaxing protein の作用をうけにくくなつたためであろう。そして、その構造の変化は、加温 (35°C) や尿素 (1 M) など短時間 (約 20 分) 処理することによつて正常な状態にもどり、結果としてコイの relaxing protein による Ca 感受性の回復がおこるのであるから、あまり大きな構造変化ではないであろう。また、もう一つ別な考え方として、脱感作筋原線維を 0.6 M KCl で可溶化する時の relaxing protein による Ca 感受性の回復の速度を比べるとコイとウサギの relaxing protein の間で差が認められる事実から、relaxing protein の比較生化学的な特異性の差を反映している現象であるのかもしれない。

ウサギの筋原線維とは異なり、コイおよびスケトウダラの筋原線維が低濃度緩衝溶液で洗浄する時、比較的多量のアクチンを流出する可能性については、食品学的になんらかの注意が払われるべきであろう。現時点では、その事実が、たとえば冷凍すり身の品質にどのような影響を与えるのかなどの問題が生じてくるように思われる。また、アクチンの流出は 0.16 M KCl 溶液などの洗浄によつてはおこらないことをすでに確かめている¹²⁾ が、多量の水を使用する水晒しの工程では避けられない事実である。

今後は、relaxing protein の分子的作用機序を明らかにする目的から、さらに多くの魚種間で比較検討してゆくつもりであり、また、これらの問題を解決してゆくことは食品学的な視野からすれば筋原線維中のアクチンとミオシンの存在状態、特に、冷凍など特定の条件下で

おこる状態変化を明らかにしてゆくためにも役立つと考えている。

本研究の実行にあたり、懇切な御指導を賜った東京工業大学、渡辺静雄教授ならびに、本学部新井健一助教授、関伸夫博士に謝意を表します。また、本研究の一部は文部省科学研究費補助金によつたので記して感謝致します。

文 献

- 1) 今野久仁彦・関伸夫：日水誌，**40**，1277-1284 (1974).
- 2) 今野久仁彦・関伸夫：日水誌，**41**，1322-1333 (1975).
- 3) 関伸夫・今野久仁彦：日水誌，**41**，1135-1141

- (1975).
- 4) K. KONNO, K. ARAI, and S. WATANABE: *J. Biochem.*, **82**, 931-938 (1977).
- 5) S.V. PERRY: *Biochem. J.*, **48**, 257-264 (1951).
- 6) R. YANG, A. OKITANI, and M. FUJIMAKI: *Agr. Biol. Chem.*, **34**, 1765-1772 (1970).
- 7) K. WEBER and M. OSBORN: *J. Biol. Chem.*, **244**, 4406-4412 (1969).
- 8) 新井健一・川村久美子・林千恵子：日水誌，**39**，1077-1085 (1973).
- 9) T. YASUI, H. KAWAKAMI, and F. MORITA: *Agr. Biol. Chem.*, **32**, 225-233 (1968).
- 10) 室塚剛志・新井健一：日水誌，**42**，65-70 (1976).
- 11) 新井健一：魚肉タンパク質（変性の指標と測定法）（日本水産学会編），p. 75-90，恒星社厚生閣，東京。
- 12) 加藤登・内山均・塚本志朗・新井健一：日水誌，**43**，857-867 (1977).