魚肉の照射アクトミオシンとビタミン B₁ 類との反応性について

東京水産大学 平野敏行, 中田昌宏, 小林 浩

On the Reactivity of Thiamines with the Irradiated
Actomyosin of Fish

Toshiyuki HIRANO, Masahiro NAKATA and
Hiroshi KOBAYASHI

Department of Food Technology, Tokyo University of
Fisheries, Minato-ku, Tokyo, Japan

Summary

In the previous report¹⁾, effects of gamma-irradiation on the gelation of fish actomyosin were investigated. It has been demonstrated that a remarkable change from sol to gel of actomyosin solution differs among the various conditions such as the concentration of actomyosin or KCl as a solvent, the irradiation dosages, the presence of oxygen or nitrogen, and the addition of oxidants or an antioxidant. Moreover, from the results of polarographic observation of protein waves and the protein solubility in centrifugal preparation of irradiated actomyosin, it has been suggested that the gel formation is probably due to the interaction of sulfhydryl groups and a higher macromolecule of actomyosin formed during irradiation.

In this paper to obtain some aspects on the mechanism of the gel formation of irradiated actomyosin, the sulfhydryl-disulfide exchange reactions between thiamines and actomyosin were ascertained by paper chromatography, paper electrophoresis and fluorometry as follows.

1) The bound thiamine with protein and free thiamine were produced by the reaction of thiamine disulfide (TDS) with actomyosin at pH 7.3, 37°C for 60 minutes, but not formed by the reaction with the actomyosin treated with SH-masked reagents such as p-chloromercuribenzoate or iodo-acetic acid (Figs. 1 and 2). Therefore, it is supposed that the above reaction is caused by the SH-SS exchange between the sulfhydryl group of actomyosin and

the disulfide group of TDS.

2) Thiol-type thiamine was unreactive at pH 7.3 because of the probable uncleavage of thiol on the thiazole ring whereas TDS reacted easily with actomyosin regardless of irradiation dosages (Figs. 3 and 4).

3) In the pH ranges 8-9 the reactivity of irradiated actomyosin and thiol-type thiamine increased extremely with alkalifying pH and reached constantly above pH 10 (Fig. 5), while at pH 10 the amounts of bound thiamine increased almost linearly with increasing irradiation dosages up to about 100 KR (Fig. 6).

4) The reactivity of thiol-type thiamine with the irradiated actomyosin in the presence of oxygen, in which case the actomyosin was little gelled, was higher than that in the presence of nitrogen (Fig. 7).

From these results, it is suggested that the interchange from thiol to disulfide bond in the actomyosin molecule will occur, while it is doubtful if such interchange is of great importance for the maintenance of specific gel formation by irradiation.

前報¹⁾において、魚肉アクトミオシンの γ 線照射によるゲル化について、照射線量その他の照射条件による差異とその生因について若干の知見を述べ、そしてSH阻害剤やポーラログラフ的な挙動あるいは遠心分離によるゲルの沈降状態から、照射によるゲル化とアクトミオシンSHとの関連性およびアクトミオシン分子の巨大化を推測した。

今回は、さらにそのゲル化機構を明らかにしたいと考え、すでに熱変性あるいは尿素変性卵アルブミン等がビタミンB₁類とSH-SS交換反応を行なって、蛋白とB₁が結合する事実²⁾から、照射変性アクトミオシンについてもビタミンB₁類との反応性がみられるかどうかペーパークロマトおよび濾紙電気泳動による検索、あるいは蛍光光度法による結合B₁の定量を試みた。その結果disulfide型B₁は、アクトミオシンSHと結合することを見出し、さらにthiol型B₁については反応時のpHあるいは照射量によってアクトミオシンとの反応性を異にし、照射に伴うSH-SSの内部変化に関して若干の知見を得た。

実験方法

前報¹⁾と同じ方法で調製したコイ背肉アクトミオシン溶液(蛋白濃度3mg/ml, 0.6MKCl溶液)をアンブルに封入し、氷冷下で0~200KRの γ 線照射を行なった。これにthiol型B₁あるいはdisulfide型B₁(蛋白15.6mgに対してB₁0.25mg)をpH7.3, 37℃で60分反応させたのち、反応液のペーパークロマト(n-butanol/acetic acid/water, 4:1:5 v/vで15hrs上昇展開)あるいは濾紙電気泳動(ペロナール緩衝液pH8.6, μ =0.05で5mA, 1hr泳動)を行ない、それぞれについてNa₂S₂O₃還元処理したものと、しないものにアルカリ性赤血塩を噴霧し、結合型B₁あるいは遊離型B₁をチオクロームとしてその蛍光スポットを360m μ で検出した³⁾。

さらに、照射アクトミオシンとthiol型B₁とをpH7~10で同様に反応させたのち、10%メタリ

ン酸で除蛋白し、蛋白区分から $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 還元処理して結合型 B_1 を遊離させ、アルカリ性 BrCN 処理によって得られたチオクロームを $n\text{-BuOH}$ で抽出し、蛍光光度計によって蛋白に結合した B_1 相当量を定量した⁴⁾。

結果および考察

1. SH阻害剤処理アクトミオシンとビタミン B_1 類との反応性

塩溶性蛋白であるアクトミオシンが水溶性蛋白²⁾と同様 B_1 類と SH-S-S 交換反応を示すかどうかを調べるため、アクトミオシンをSH阻害剤、すなわち 10^{-3}M p-クロルマーキュリ安息香酸あるいは 10^{-2}M ヨード酢酸で前処理したのち、thiol 型 B_1 (B_1)あるいはdisulfide型 B_1 (TDS)を反応させ、反応生成物をペーパークロマトで検索した (Fig. 1)。

Fig. 1. Paper chromatograms showing the reactivity between thiamines and actomyosin treated with SH-masked reagents.
Developing solvent, n-butanol/acetic acid/water (4:1:5 v/v)
Thiamines, protein bound B_1 or thiamine disulfide (TDS) treated in a sodium thiosulfate and an alkaline ferricyanide solutions (A) and free B_1 in an alkaline ferricyanide treatment (A,B) after development were detected as a thiochrome, which exhibits a bluish fluorescence (●), while actomyosin as a yellowish absorption (○) in the ultraviolet.
AM; actomyosin, p-CMB; p-chloromercuribenzoate

B_1 との反応系では、アクトミオシンの前処理あるいは $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 還元処理のいかににかかわらず B_1 に相当する蛍光スポットのみが検出され、アクトミオシンとの反応性はみられなかった。

一方、TDSとの反応系では、対照において元のTDSのほか、反応生成物と思われる遊離の B_1 と、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 還元処理によって原点に、結合型 B_1 と思われるスポットが検出された。なお、その際透析内液についてペーパークロマトを行なったところ原点にのみ結合 B_1 に相当する蛍光スポットが認められた。これに対し、SH阻害剤にて処理したアクトミオシンとの反応系では、遊離 B_1 と原点における結合 B_1 の蛍光スポットはほとんどみられなかった。以上の結果は、さらにFig. 2に示す濾紙電気泳動によっても同様に確められた。たゞペーパークロマトの場合と異なることは、短時間の泳動で、(-)側に B_1 とTDSとの分離をよく行なうことができること、原点附近に結合 B_1 と思われるパターンがみられなかったことである。後者の現象は、アクトミオシンの(+)側への多少の泳動に伴って生じたパターンの拡散による影響が考えられる。

以上のことから、魚肉アクトミオシンにおいても変性卵アルブミン²⁾と同様、TDSがアクトミオシンSHに作用して SH-S-S 交換反応することが示唆される。

2. 照射アクトミオシンと B_1 類との反応性

Fig. 2. Paper electrophoretic patterns showing the reactivity between thiamines and actomyosin treated with SH-masked reagents.
Buffer; Veronal buffer (pH 8.6 μ =0.05)
Migration; 5 mA, 1 hr

照射によるアクトミオシンSHの変化を知るための手がかりとして、ゲル化しない程度の照射線量(0, 20, 40, KR)で処理したアクトミオシンに対するB₁類の反応性をペーパークロマトあるいは濾紙電気泳動で調べた結果(Fig. 3, 4), B₁との反応系では、いずれも反応性を見出すことはできなかった。これは後述のように、反応時のpHが関係するものと思われる。また、TDSとの反応系でも、反応

Fig. 3. Paper chromatograms showing the reactivity between thiamines and irradiated actomyosin.
Developing solvent; n-butanol/acetic acid/water (4:1:5 v/v)

生成物と思われるアクトミオシン結合B₁(原点)と遊離B₁(Rf 0.26~0.28)のスポットがみられたが、照射による定量的な差異はとくにみられなかった。これはこのような定性的な観察では、照射量の少ないところでの反応性の差異を見極めることが困難であると考えられる。

3. 照射アクトミオシンとthiol型B₁との反応性におよぼすpHおよび照射線量の影響

ビタミンB₁のthiazole環は酸性側で閉環し、アルカリ性側で開環することが知られている⁵⁾。した

Fig. 4. Paper electrophoretic patterns showing the reactivity between thiamines and irradiated actomyosin.
Buffer; Veronal buffer (pH 8.6 $\mu=0.05$) Migration; 5 mA, 1 hr

がって、前述の実験はいずれも pH 7 附近の反応条件で行なっているので、thiol 型 B₁ との反応系では、thiazole 環が十分開環されず、活性のある B₁SH とならなかったため反応が進行しなかったとも考えられる。そこで本実験では、各種 pH における thiol 型 B₁ と照射アクトミオシンとの反応性を蛍光光度法によって定量的に検討した。

Fig. 5. Effect of pH on the reactivity between irradiated actomyosin and thiol-type thiamine.

Fig. 5 に示す如く、まず native な状態にある非照射アクトミオシンに対しては、反応時の pH による B₁ の結合量の差異はほとんどみられなかったが、照射変性アクトミオシンでは、pH 8~9 に亘り、急激な反応性を示し、pH 10 以上ではほぼ一定に達する。この傾向は酸化型卵アルブミンの場合と似ている⁶⁾。そして、照射による影響も、50KR より 100KR の方が大きいので、さらに照射量と結合 B₁ 量との関係を一定の pH (pH 10) において調べてみた。(Fig. 6)。

照射線量の増加と共に、B₁ 結合量はほぼ直線的に比例して増加して行くが、100KR をこえると減少する。これは照射によるアクトミオシンのゲル化のため、B₁ との反応が十分均一に行なわれなかったものと推察される。

以上の結果から、照射アクトミオシンに対し、thiol 型 B₁ も反応時の pH をかえることによりアクトミオシンと結合することを見出し、照射変性をうけたアクトミオシンの内部変化は thiol 型 B₁ との定量的な SH-S 交換反応から、r 線照射による SS 結合への酸化が示唆される。そしてそのことが照射アクトミオシンのゲル化と直接関係があるかどうか次の実験でさらに問題にされよう。

Fig. 6. Effect of irradiation doses on the reactivity between actomyosin and thiol-type thiamine at pH 10.

Fig. 7. Effect of oxygen and nitrogen gases on the reactivity of irradiated actomyosin and thiol-type thiamine at each pH.

4. 酸素あるいは窒素共存下で照射したアクトミオシンに対する thiol 型 B₁ の反応性

前報¹⁾と同様の方法で、アクトミオシン溶液に O₂ あるいは N₂ ガスを 10 分間通気したのち、それぞれを 50 KR 照射して、pH 7~10 で thiol 型 B₁ との反応を試み、結合 B₁ 量を測定した。

Fig. 7 に示すように、前報¹⁾の酸素効果によるゲル化と関連させながら反応性を比較してみると、N₂ 共存によってゲル化し易い状態では B₁ との反応性は低く、O₂ 共存によってゲル化し難い状態では反応性は高い。

照射によるゲル化がアクトミオシン SH → S-S 結合によるならば、ゲル化し易いもののほど、B₁SH との反応性は増大してもよい筈であり、上記結果から、この前提について矛盾があるように思われる。したがって、照射アクトミオシンのゲル化機構には、S-S 以外の他の結合様式の関与、あるいはアクトミオシン SH の酸化形態の相違、例えば O₂ 共存下では、システインのヨウ素酸化⁷⁾の如く -SO₂H、-SO₃H への酸化なども考慮されなければならない。

要 約

魚肉アクトミオシンの γ 線照射によるゲル化機構を明らかにしたいと考え、照射アクトミオシンに対するビタミン B₁ 類との SH-S-S 交換反応を試みた。

① アクトミオシンを SH 阻害剤で封鎖することによりビタミン B₁ 類との反応性はほとんど認められなかった。

② disulfide 型 B₁ は照射、非照射アクトミオシンのいずれに対しても結合性を示すが、thiol 型 B₁ は pH 7.3 では反応性を示さなかった。

③ thiol 型 B₁ は、反応系の pH を 8~9 にすると急激な反応性を示し、pH 10 以上では一定になる。そして、100 KR までは線量増加とともに、結合 B₁ 量も直線的に比例して増加する。

④ O₂, N₂ 共存下で照射したアクトミオシンに対する thiol 型 B₁ の反応性は、O₂ 共存よりゲル化し易い N₂ 共存の方が低い。

以上のことから、魚肉アクトミオシンについて、γ 線照射による SH-S-S の内部変化が示唆されるが、それがゲル化機構の支配的な因子であるかどうかについてはなお検討の余地が残されている。

最後に、本実験に際して種々と御指導をいただいた東京水産大学高橋豊雄教授、菊地武昭助教授に対して感謝いたします。

文 献

- 1) 平野敏行, 菊地武昭: 食品照射, 3, 49 (1968)
- 2) 内海 勇: ビタミン, 35, 175 (1967)
- 3) 内海 勇, 原田 清, 河野啓一: ビタミン, 26, 128 (1962)
- 4) 内海 勇, 原田 清, 河野啓一, 平尾宏子: ビタミン, 26, 134 (1962)
- 5) 稲垣長典: ビタミン, p57, 光生館 (1967)
- 6) 内海 勇, 原田 清, 河野啓一: ビタミン, 27, 140 (1963)
- 7) Shinohara, K.: J. Biol. Chem., 96, 285 (1932)