貯蔵中の家兎筋肉から調製した筋原繊維におよぼす CASF (Ca^{2+} -activated sarcoplasmic factor) 処理の影響

鈴木 敦士*, 野 並 慶 宣*

* 新潟大学農学部畜産製造学教室

Effects of CASF (Ca^{2+} -activated sarcoplasmic factor) Treatment on Myofibrils Prepared from Rabbit Skeletal Muscles during Storage

Atsushi SUZUKI*, Yoshinobu NONAMI*

* *Laboratory of Biochemistry and Technology of Animal Products,
Faculty of Agriculture, University of Niigata, Niigata*

Effects of CASF (Ca^{2+} -activated sarcoplasmic factor) treatment on myofibrils prepared from rabbit skeletal muscles during storage were investigated. In this report, myofibrils prepared from at death and 7 days stored muscles were named 0-MF and 7-MF, respectively.

The amount of products released from 7-MF by CASF was less than that from 0-MF, and this observation indicates that the amount of substrate available for CASF in 7-MF is less than that in 0-MF. Acrylamide gel electrophoresis showed that the amount of α -actinin, one of main constituents of Z-line, released from 7-MF was less than that from 0-MF. CASF treatment on 0-MF for 30 min caused the increase of Mg-ATPase activity, and CASF treatment on 7-MF for same period caused the decrease of Mg-ATPase activity.

The obtained results in this report suggest an important role of CASF on the changes in myofibrils caused by postmortem storage of the muscle.
(Received February 2, 1977)

近年、骨格筋の死後硬直の解硬は、筋原繊維の基本構造の一つである Z-帯の崩壊がそのはじまりであると、考えられるようになってきた^{1)~3)}。Z-帯の崩壊の原因の一つは、 Ca^{2+} イオンによって活性化される筋肉中に存在する酵素 CASF (Ca^{2+} -activated sarcoplasmic factor) であると考えられる⁴⁾。著者らは、屠殺直後の家兎筋肉から調製した筋原繊維に CASF を作用させ、Z-帯の消長、遊離物質の定量および電気泳動、また筋原繊維の ATPase 活性の受ける変化を研究して、CASF 処理によって筋原繊維に起こる変化は、筋肉貯蔵中に筋原繊維に生じる変化と類似していることを報告した⁵⁾⁶⁾。

本報告は、家兎を用い、屠殺直後の筋肉および死後 1 週間貯蔵した筋肉から調製した筋原繊維に CASF を作用させ、遊離物質の定量ならびに電気泳動を行ない、また、筋原繊維の ATPase の受ける変化を測定して、死後貯蔵中に筋原繊維に起こる変化と CASF との関係の

明確にしようと試みたものである。

実験方法

1. CASF と筋原繊維の調製

家兎の静脈に、sodium pentobarbital (90 mg) と *d*-tubocurarine chloride (1.5 mg) を注射して麻酔したのち、頸動脈を切って放血屠殺し、背部と脚の筋肉をとり、氷冷後、肉挽きにかけて、先に報告した方法⁴⁾に従い、CASF と筋原繊維を調製した。背最長筋の一部は、1 mM NaN_3 に浸したラッピング・フィルムにつつま、低温 (3°C) で 1 週間貯蔵後、同様な方法で筋原繊維を調製した。本論文では、屠殺直後の筋肉から調製した筋原繊維を 0-MF、1 週間貯蔵した筋肉より調製した筋原繊維を 7-MF とよぶ。

2. 筋原繊維からの遊離物質の定量

前報⁵⁾に従い、0-MF および 7-MF を CASF と Ca^{2+} イオン存在下、25°C で反応させ、EDTA で反応を止め、遠心分離 (8,000 $\times g$ 15 分) 後、上清の 280 m μ におけ

Fig. 1. Phase micrographs of myofibrils ($\times 670$).

- (a) Myofibrils prepared from rabbit skeletal muscle immediately after death.
 (b) Myofibrils prepared from rabbit skeletal muscle stored for 7 days at 3°C .

る吸光値を測定した。

3. 電気泳動

前述の CASF による筋原繊維からの遊離物の一部をとり、Davis らの方法⁷⁾により、ポリアクリルアミドゲルによる電気泳動を行なった。アミドブラックで染色後、Ozmur デンシトメーターで濃度を測定した。

4. ATPase 活性の測定

0-MF および 7-MF を、25 mM Tris-HCl, pH 7.0 中で、100 mM KCl, Ca^{2+} 存在下、 25°C 、30 分、CASF と反応させ、EDTA で反応を止めた後、CASF 処理した筋原繊維を稀釈し (0.25 mg/ml)、10 mM Tris-HCl pH 8.0 中で、1 mM Mg^{2+} 、0.17 mM EDTA、0.07 mM Ca^{2+} 、Fig. 5, 6 に示した濃度の KCl 存在下、1 mM ATP と 25°C 、5 分間反応させ、トリクロロ酢酸で反応を止め、遊離してきたリンを Allen の変法⁸⁾により比色定量した。反応液中に存在する Ca^{2+} および EDTA は、筋原繊維を Ca^{2+} 存在下で CASF 処理した際の Ca^{2+} および反応を止めるときに用いた EDTA が稀釈されてはいたものである。

5. たん白質濃度の測定

マイクロケルダール法により標準化した Biuret 法⁹⁾によりたん白質濃度を定量した。

結果と考察

1. CASF 処理による筋原繊維からの遊離物質

Fig. 1 に、0-MF と 7-MF の位相差顕微鏡写真を示す。7-MF は、0-MF にくらべると fragmentation を激しく起こしている。

0-MF と 7-MF を基質にして、CASF を作用させたときの遊離物質の経時的变化を Fig. 2 に示す。7-MF からの遊離物質は、0-MF からの遊離物質にくらべて少なく、約 1/3 である。CASF の基質になるのは、筋原繊維中の Z-帯と考えられるので、Fig. 1 に示したよう

Fig. 2. Release of soluble materials from myofibrils by CASF.

Myofibrils (7.50 mg/ml) were incubated with CASF (0.375 mg/ml) in the presence of 100 mM KCl, 25 mM Tris-HCl, pH 7.0, 1 mM NaN_3 and 1 mM Ca^{2+} at 25°C . Reaction was stopped by adding EDTA to a final concentration of 4.6 mM. —○—, released materials from 0-MF. --○--, released materials from 7-MF.

に、7-MF には 0-MF にくらべて、基質となるべき Z-帯が少ないことが推測される。このことは、筋肉貯蔵中に CASF の作用により、Z-帯の部分がもろくなったことの反映であり、7-MF 調製の際に、fragmentation を激しく起こしたことと一致している。

2. 筋原繊維からの遊離物質の電気泳動

0-MF と 7-MF を基質にして、CASF を作用させ、経時的に遊離してきた物質のディスク電気泳動像ならびにデンシトメーターによる濃度測定の結果を、それぞれ Fig. 3, 4 に示す。繊維から、CASF によって遊離してくる物質のうち、主要なもの (Fig. 4 の Band I) は、すでに報告したとおり⁸⁾、Z-帯の構成成分の一つとされている α -アクチニンと考えられる。7-MF からの α -アクチニンに相当する物質の遊離量は、0-MF からのそれに

Fig. 3. Polyacrylamide gel electrophoresis of the products released from myofibrils by CASF.

A : Released products from 0-MF.

- (a) control containing 1 mM Ca^{2+} but EDTA was added before CASF.
- (b) incubated for 30 min in the presence of 1 mM Ca^{2+} .
- (c) incubated for 1 hr in the presence of 1 mM Ca^{2+} .
- (d) incubated for 3 hr in the presence of 1 mM Ca^{2+} .
- (e) incubated for 6 hr in the presence of 1 mM Ca^{2+} .
- (f) α -actinin prepared from porcine skeletal muscle.

B : Released products from 7-MF.

- (a)-(e) : same conditions shown in the A.

Fig. 4. Densitometric scans of the polyacrylamide gels shown in Fig. 3.

- (a) control containing 1 mM Ca^{2+} but EDTA was added before CASF.
- (b) incubated for 1 hr in the presence of 1 mM Ca^{2+} .
- (c) incubated for 6 hr in the presence of 1 mM Ca^{2+} .

—, released products from 0-MF.

----, released products from 7-MF.

くらべて少なく、経時的な変化も小さい。これも、7-MF 中の Z-帯の数が 0-MF にくらべて少ないために、その構成成分である α -アクチニンの量が少ないことの反映である。

3. ATPase 活性への影響

0-MF と 7-MF に CASF を作用させた場合、Mg-ATPase の受ける変化を Fig. 5, 6 に示す。0-MF を基質にして、基質と酵素の割合を 20 : 1 (重量比) で 30 分間反応させた場合、Mg-ATPase 活性の増加が最大に

Fig. 5. Effect of CASF treatment on Mg-modified ATPase activity of 0-MF.

Conditions of CASF treatment: myofibrils (3.75 mg/ml) were incubated with CASF (0.1875 mg/ml) in the presence of 100 mM KCl, 25 mM Tris-HCl, pH 7.0, 1.0 mM Ca^{2+} , 1 mM NaN_3 at 25°C for 30 min. Reaction was stopped by adding EDTA to a final concentration of 2 mM. Conditions of ATPase assay: 0.25 mg/ml of CASF treated myofibrils, 10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM Mg^{2+} , 0.17 mM EDTA, 0.07 mM Ca^{2+} , 1 mM ATP, KCl as indicated on the abscissa, 25°C.

—○—, untreated; —●—, treated for 30 min.

Fig. 6. Effect of CASF treatment on Mg-modified ATPase activity of 7-MF.

Conditions of CASF treatment and ATPase assay are the same as given for Fig. 5.

--○--, untreated; --●--, treated for 30 min.

なることは、すでに報告したので⁵⁾、本論文においても、反応時間を 30 分にして、0-MF と 7-MF の Mg-ATPase の受ける変化を測定した。無処理の場合、すでに知られているように¹⁰⁾、fragmentation を起こしている 7-MF の Mg-ATPase は 0-MF にくらべて高

かった。CASF 処理後の 0-MF の Mg-ATPase は増加したが (Fig. 5)、7-MF の ATPase は減少する傾向にあった (Fig. 6)。0-MF を CASF で短時間処理すると Mg-ATPase は増加するが、処理時間が長くなるにつれて減少するので⁵⁾、7-MF の Mg-ATPase の CASF 処理による変化は、0-MF が長時間 CASF 処理を受けた場合の Mg-ATPase の変化に対応すると考えられる。

0-MF の、CASF の短時間処理による Mg-ATPase 活性の一時的な増加は、トロポニンが破壊されたためであり¹¹⁾、さらに処理時間が長くなると Mg-ATPase 活性の低下がはじまるのは、筋原繊維から Z-帯が除去されることにより筋原繊維の構造がくずれていくためであると考え^{5,6)}、CASF が筋肉貯蔵中に作用していたことが 7-MF の Mg-ATPase 活性の変化からも推測できる。

要 約

屠殺直後および 1 週間低温で貯蔵した家兎筋肉から調製した筋原繊維 (0-MF と 7-MF) に、同じ家兎筋肉から分離したたん白分解酵素 CASF (Ca^{2+} -activated sarcoplasmic factor) を作用させ、遊離物質の定量ならびに電気泳動を行なった。また、CASF 処理によって筋原繊維の Mg-ATPase 活性の受ける変化を測定した。

1. 7-MF から CASF 処理によって遊離する物質の量は、0-MF にくらべると小さく、CASF の基質になりうる物質が少ないことを示している。

2. 電気泳動の結果、Z-帯の主要な構成成分である α -アクチニンの 7-MF からの遊離量は、0-MF からのそれにくらべて少なく、経時的変化も小さかった。

3. 30 分間 CASF 処理した 0-MF の Mg-ATPase 活性は増加したが、7-MF の Mg-ATPase 活性は減少した。

以上、7-MF が CASF によって受ける変化は 0-MF が受ける変化にくらべて小さかった。これは、筋肉を 1 週間貯蔵している間に、CASF の作用が続いていることの反映であり、筋肉の死後貯蔵中の変化に果たす CASF の役割の重要性を示している。

文 献

- 1) Stromer, M.H., Goll, D.E. and Roth, L.E.: *J. Cell Biol.*, **34**, 431 (1967)
- 2) Davey, C.L. and Gilbert, K.V.: *J. Food Technol.*, **2**, 57 (1967)
- 3) Takahashi, K., Fukazawa, T. and Yasui, T.: *J. Food Sci.*, **32**, 409 (1967)
- 4) Busch, W.A., Stromer, M.H., Goll, D.E. and Suzuki, A.: *J. Cell Biol.*, **52**, 367 (1972)
- 5) Suzuki, A. and Goll, D.E.: *Agr. Biol. Chem.*, **38**, 2167 (1974)

- 6) Suzuki, A., Nonami, Y. and Goll, D.E. : *ibid.*,
39, 1461 (1975)
- 7) Davis, B.J. : *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 121, 404
(1964)
- 8) 中村道徳 : 日農化, 24, 1 (1950)
- 9) Gornall, A.G., Bardawill, C.S. and David,
M.M. : *J. Biol. Chem.*, 177, 751 (1949)
- 10) Goll, D.E. and Robson, R.M. : *J. Food Sci.*,
32, 323 (1967)
- 11) Dayton, W.R., Reville, W.J., Goll, D.E. and
Stromer, M.H. : *Biochem.*, 15, 2159 (1976)

(昭和52年2月2日受理)