肉類の貯蔵に関するポーラログラフ的研究 (第19報)

兎肉のトロポミオシン蛋白波に及ぼす γ 線照射の影響

小原哲二郎, 小笠原八十吉

(東京教育大学農学部農業化学科)

(昭和37年6月18日受理)

緒 言

著者らはすでに第18報¹⁾において、牛肉から分離したアクチン区分ならびにミオシン区分に総量 $297 \times 10^4 r$ の γ 線を照射して 15° で貯蔵し、ポーラログラフ蛋白波を検討したところ、アクチン区分のものでは 15° 貯蔵の進むにつれて、その波形や crossing point が著しく変化していったが、ミオシン区分のものでは、 15° 貯蔵中それらの波形にはそのような著しい変化が見られなかったことを明らかにした。けれども、この場合使用したミオシン区分は crude のものであったから、その区分中にはミオシン以外の蛋白質も含まれているものと考えられる。だからさらに純度の高いミオシンを精製分離して、その蛋白波の様相を検討することが望ましい。

幸い 1948 年に、K. Bailey 氏ら^{2), 3)}は、兎肉からトロポミオシンを結晶化することに成功し、さらにその化学的諸性質を詳細に報告している。そこで著者らは、氏らの方法²⁾に準拠して、兎肉からトロポミオシンを純化して、それに $660 \times 10^4 r$ にいたるまでの γ 線を照射してから、さらに 15° で 21 日間貯蔵したのち、照射や貯蔵によるそれら蛋白波の変化を比較検討した。その結果、ミオシン区分蛋白波の場合¹⁾と同様、ほとんど著しい変化のあらわれないことを見いだした。以下それらについて報告する。

実験方法

1. トロポミオシンの調製

兎(日本改良白色種)を屠殺、放血後、 0° で 12 時間経過したものを、Bailey の方法²⁾に準拠してトロポミオシンを純化した。

3 kg の兎肉を細切し、3,000 ml の水を加え、ブレンダーで 1 分間ホモジナイズしたのち、30 分間放置、ガーゼでしぼりとり、2.7 kg の残さを得た。これに 2,700 ml の 99.5% エタノールを加え、ガーゼでしぼりとり、1.5 kg の残さを得た。これに 6,000 ml の 50% エタノールを加え、吸引ろ過、その残さを 97% エタノールとエーテルでそれぞれ 2 回ずつ洗浄し、その残さを室内で乾燥し、501 g を得た。これを 3,500 ml の 1 M-KCl 溶液中に浸し、NaOH で pH 7.0 に調節後、室温 (15°) に 18 時間放置、モスリンでしぼり取る。得られた残さにふたたび 3,500 ml の 1 M-KCl 溶液 (pH 7.0) を加え、2 時間静置、モスリンでしぼり取る。かくして前後 2 回モスリンでしぼり取った 1 M-KCl 抽出液部分を合わせて、計 5,700 ml を得た。これを HCl で pH 4.3 に調節し、1 時間放置後遠心分離 (5,000 回転で 10 分) する。得られた 290 g の残さを 1,450 ml の水に浮遊させ、NaOH で pH 7.0 に調節する。さらに、1,225 ml の pH 7.0 飽和硫安溶液を攪拌しつつ混和、遠心分離 (4,000 回転で 10 分) する。得られた 2,500 ml の上澄液に 70% 飽和になるように固形硫安を加え、トロポミオシンを沈殿させ、自然ロ

過しつつ、12 時間放置する。得られた 330 g の沈殿物を水に溶解し、4° で 48 時間水に対して透析する。1 N・HCl で pH 4.5 に調節し、遠心分離 (5,000 回転で 10 分) する。得られた 252 g の沈殿物を水に浮遊させ、NaOH で pH 7.0 に調節して、290 ml のトロポミオシン溶液を得た。この溶液に γ 線を照射後 15° で 21 日間貯蔵する。貯蔵前と貯蔵後のそれらトロポミオシン溶液を 10 倍に希釈し、その希釈液から 0.5 ml ずつをとってポーラログラフ蛋白波を測定した。

2. ^{60}Co γ 線照射の方法

調製した 290 ml のトロポミオシン溶液を四等分してアンプルに密封し、15° で 20 時間 ^{60}Co の γ 線を照射した。この場合、1,000 curie の ^{60}Co 線源を使用し、総照射量は 0, 105 $\times 10^4$, 253 $\times 10^4$ ならびに 660 $\times 10^4$ r の 4 種類であった。

3. 蛋白波の測定方法

別に指示のないかぎり、ポーラログラフ蛋白波の測定はつぎのような操作によった。

0.25 ml の $10^{-3}\text{M}\cdot\text{CoCl}_2$, 0.25 ml の $1\text{M}\cdot\text{NH}_4\text{Cl}$, 0.5 ml の $1\text{M}\cdot\text{NH}_4\text{OH}$ ならびに 10 倍に希釈したトロポミオシン溶液の 0.5 ml を順々に加え、さらに総量 2.5 ml になるように蒸留水を加えた。この混合液の終濃度は $10^{-3}\text{M}\cdot\text{CoCl}_2$, $0.1\text{M}\cdot\text{NH}_4\text{Cl}$ ならびに $0.2\text{M}\cdot\text{NH}_4\text{OH}$ であり、また電解温度は 25° であった。滴水水銀電極の特性は、25° で試料を含まない支持電解液中の零 V において、 $m=1.107\text{ mg/sec}$, $t=4.2\text{ sec/drop}$ で

あった。波高は既報の方法^{4)~6)}によって、コバルト波の極大部分から第 1 波ならびに第 2 波の極大までの距離を測定し、mm であらわした。

実験結果ならびに考察

1. 蛋白質濃度と蛋白波との関係

CoCl_2 (10^{-3}M), NH_4Cl (0.1M) および NH_4OH (0.2M) 濃度ならびに電解温度 (25°) をそれぞれ一定にし、トロポミオシン濃度だけを変化させた場合のポーラログラムを測定して、Fig. 1~Fig. 4 を得た。ただし、この場合のトロポミオシン溶液中の含有蛋白量は、Cu-Folin 呈色法⁷⁾⁸⁾で測定した値を、電解液 1 ml 当りの γ 数で表示した。

これによれば、貯蔵前および 15° 貯蔵 21 日後の非照射ならびに照射トロポミオシンのいずれの蛋白波の場合にも、第 1 波の極大は -1.38 V 付

Fig. 1 Polarograms of non-irradiated tropomyosin estimated at 25°C with the buffer solutions containing $10^{-3}\text{M}\cdot\text{CoCl}_2$, $0.1\text{M}\cdot\text{NH}_4\text{Cl}$, $0.2\text{M}\cdot\text{NH}_4\text{OH}$, and various concentrations of tropomyosin
A: Before 15°C storage B: After 21 days storage at 15°C

Fig. 2 Polarograms of irradiated (105×10^4 r) tropomyosin estimated at 15°C with the buffer solutions containing $10^{-3}\text{M} \cdot \text{CoCl}_2$, $0.1\text{M} \cdot \text{NH}_4\text{Cl}$, $0.2\text{M} \cdot \text{NH}_4\text{OH}$, and various concentrations of tropomyosin

A: Immediately after gamma-ray irradiation

B: After 21 days storage at 15°C

近に, また第2波の極大は -1.59V 付近に位し, 第1波の波高は第2波のそれよりもつねに高かった。ただし, 非照射トロポミオシン溶液を 15° で 21 日貯蔵後のものでは, 電解液 1ml 当り 200γ 以上の蛋白量を含む濃厚液で測定すれば, 第2波のほうが高くなり, 著しく異なった波形を示すようになった (Fig. 1 参照)。けれども, それ以外の蛋白波では, 貯蔵の有無や照射量の大小にかかわらず, いずれもその波形に著しい差異を生じなかった。

Fig. 1~Fig. 4 のポーラログラムから, さらに蛋白波の波高とその蛋白質濃度との関係を図示して, Fig. 5 を得た。これによれば, 貯蔵前の $660 \times 10^4\text{r}$ 照射のものでは, きわめて低い蛋白質濃度付近に, また 15° 貯蔵 21 日後の非照射のものでは, 高い蛋白質濃度 ($180\gamma/\text{ml}$) 付近に, それぞれ

その crossing point が認められた。しかし, それ以外のものでは, いずれも第1波と第2波の交叉は認められず, とくに貯蔵前および 21 日貯蔵後の $105 \times 10^4\text{r}$ ならびに $253 \times 10^4\text{r}$ 照射のものである, いずれも, 貯蔵前の非照射のものに類似した波高曲線を示した。このような傾向は, 著者らが第18報¹⁾で報告した牛肉のミオシン区分蛋白波のそれによく一致している。

一般に, 蛋白波の波高と蛋白質濃度との間には直線関係は成立しないが, 蛋白質の濃度が増加するにつれてそのさいの蛋白波の波高も次第に高くなっていくことが報告

されている^{9)~13)}。けれども, Fig. 5 から明らかのように, 本実験のトロポミオシン蛋白波の場合には, いずれも $50\gamma/\text{ml}$ 付近以上の蛋白質濃度に及べば, その波高は増加の傾向をとらずに, むしろ減少傾向を示すものさえあらわれた。これらはトロポミオシン蛋白波の大きな特徴であって, ほかの種類蛋白波と著しく異なっている。 $660 \times 10^4\text{r}$ のような高線量に及べば, そのトロポミオシン蛋白波の波高そのものは低くなって, 照射の影響がめだつようになった。

2. CoCl_2 濃度と蛋白波との関係

NH_4Cl (0.1M), NH_4OH (0.2M) およびトロポミオシン (10 倍希釈液の 0.5ml) の濃度ならびに電解温度 (25°) をそれぞれ一定にし, CoCl_2 濃度だけを変化させた場合のポーラログラムを測定した。得られたポーラログラムから, その蛋白波の

Fig. 3 Polarograms of irradiated ($253 \times 10^4 r$) tropomyosin estimated at $15^\circ C$ with the buffer solutions containing $10^{-3} M \cdot CoCl_2$, $0.1 M \cdot NH_4Cl$, $0.2 M \cdot NH_4OH$, and various concentrations of tropomyosin

A: Immediately after gamma-ray irradiation

B: After 21 days storage at $15^\circ C$

波高とその $CoCl_2$ 濃度との関係を図示して、Fig. 6 を得た。

これによれば、貯蔵前および 15° 貯蔵 21 日後の非照射ならびに照射トロポミオシンのいずれの場合にも、 $CoCl_2$ 濃度の増加するにつれて、その蛋白波の波高もほぼ直線的に増大した。この点もトロポミオシン蛋白波の大きな特徴であって、直線関係の成立しなかったほかの肉類蛋白波^{11, 15)}と著しく異なっている。ただし、照射しないトロポミオシン溶液を 15° で 21 日間貯蔵したものでは、かならずしも直線関係が成立するとはかぎらなかった。

いずれの条件下における蛋白波の場合にも、その crossing point は認められず、つねに第 1 波の波高よりも第 2 波のそれが低く、それらの波高

曲線はいずれも類似していた。この点は、牛肉のミオシン区分蛋白波のそれに¹¹⁾よく一致している。けれども、照射しないトロポミオシン溶液を 15° で 21 日間貯蔵すれば、著しく異なった波高曲線を示すようになって、 $CoCl_2$ 濃度の低い位置で第 1 波と第 2 波が交叉した。また、 $660 \times 10^4 r$ のような高線量に及べば、照射の影響がめだつようになって、その波高は低くなった。

3. NH_4Cl 濃度と蛋白波との関係

$CoCl_2$ ($10^{-3} M$),

NH_4OH ($0.2 M$) およびトロポミオシン (10 倍希釈液の $0.5 ml$) の濃度ならびに電解温度 (25°) をそれぞれ一定にし、

NH_4Cl 濃度だけを変化させた場合のポーログラムを測定した。得られたポーログラムから、その蛋白波の波高とその NH_4Cl 濃度との関係を図示して、Fig. 7 を得た。

これによれば、貯蔵前および貯蔵後の非照射ならびに照射トロポミオシンのいずれの蛋白波の場合にも、その crossing point は認められず、第 1 波の波高よりも第 2 波のそれが低く、それらの波高曲線はいずれも類似していた。この点は、牛肉のミオシン区分蛋白波のそれに¹¹⁾よく一致している。けれども、照射しないトロポミオシンを 15° で 21 日間貯蔵すれば、異なった波高曲線を示すようになった。

一般に、ある濃度付近にいたるまでは、その NH_4Cl 濃度が増加するにつれて、蛋白波の波高

Fig. 4 Polarograms of irradiated ($660 \times 10^4 r$) tropomyosin estimated at $15^\circ C$ with the buffer solutions containing $10^{-3} M \cdot CoCl_2$, $0.1 M \cdot NH_4Cl$, $0.2 M \cdot NH_4OH$, and various concentrations of tropomyosin

A: Immediately after gamma-ray irradiation
B: After 21 days storage at $15^\circ C$

Fig. 5 Relation between protein concentrations and heights of protein waves of non-irradiated or irradiated tropomyosin graphed from polarograms in Fig. 1 to Fig. 4

A: Immediately after gamma-ray irradiation
B: After 21 days storage at $15^\circ C$
I: First waves II: Second waves

Fig. 6 Relation between CoCl_2 concentrations and heights of protein waves of non-irradiated or irradiated tropomyosin estimated at 25°C with the buffer solutions containing CoCl_2 of various concentrations, $0.1\text{ M}\cdot\text{NH}_4\text{Cl}$, $0.2\text{ M}\cdot\text{NH}_4\text{OH}$, and 0.5 ml of each diluted tropomyosin solution

A: Immediately after gamma-ray irradiation

B: After 21 days storage at 15°C

I: First waves

II: Second waves

Fig. 7 Relation between NH_4Cl concentrations and heights of protein waves of non-irradiated or irradiated tropomyosin estimated at 25°C with the buffer solutions containing $10^{-3}\text{ M}\cdot\text{CoCl}_2$, NH_4Cl of various concentrations, $0.2\text{ M}\cdot\text{NH}_4\text{OH}$, and 0.5 ml of each diluted tropomyosin solution

A: Immediately after gamma-ray irradiation

B: After 21 days storage at 15°C

I: First waves

II: Second waves

も増加していくが、それ以上の NH_4Cl 濃度では著しい波高の変化が認められないことが報告されている^{1), 4) ~ 6), 12) ~ 15)}。けれども、Fig. 7 から明らかなように、本実験のトロポミオシン蛋白波の場

合には、いずれも NH_4Cl 濃度が増加してもその蛋白波の波高はほとんど増大しないで、著しい変動は見られなかった。この点もトロポミオシン蛋白波の大きな特徴であって、ほかの蛋白波^{1), 13) ~}

¹⁵⁾ と著しく異なっている。

4. NH_4OH 濃度と蛋白波との関係

CoCl_2 (10^{-3}M), NH_4Cl (0.1M) およびトロポミオシン (10 倍希釈液の 0.5ml) の濃度ならびに電解温度 (25°) をそれぞれ一定にし, NH_4OH 濃度だけを変化させた場合のポーラログラムを測定した。得られたポーラログラムから, その蛋白波の波高とその NH_4OH 濃度との関係を図示して, Fig. 8 を得た。

Fig. 8 Relation between NH_4OH concentrations and heights of protein waves of non-irradiated or irradiated tropomyosin estimated at 25°C with the buffer solutions containing $10^{-3}\text{M}\cdot\text{CoCl}_2$, $0.1\text{M}\cdot\text{NH}_4\text{Cl}$, NH_4OH of various concentrations, and 0.5ml of each diluted tropomyosin solution

A: Immediately after gamma-ray irradiation

B: After 21 days storage at 15°C

I: First waves

II: Second waves

これによれば, 貯蔵前および貯蔵後の非照射ならびに照射トロポミオシンのいずれの蛋白波の場合にも, NH_4OH 濃度の増加するにつれて, その蛋白波の波高も増大していったが, かならずしも比例的関係が成立するとはかぎらなかった。いずれの条件下の蛋白波の場合にも, その crossing point は 0.08M 付近のほぼ一定した NH_4OH 濃度に位しており, この濃度以上ではつねに第1波の波高よりも第2波のそれが低く, またいずれの蛋白波の波高曲線も類似した傾向を示した。これらは, 牛肉のミオシン区分蛋白波のそれに¹⁾よく一致している。けれども, 照射しないトロポミオ

シンを 15° で 21 日間も貯蔵すれば, その蛋白波の crossing point は 0.16M 付近のかなり高い位置に移動した。これらの結果から見れば, 照射や貯蔵によって, トロポミオシン蛋白質の構造上に大きな変化が起こっているものとは考えられない。ただし, 照射しないトロポミオシンの場合には, 貯蔵するにつれて, その蛋白質がかなり変性していくものと考えられる。

5. 電解温度と蛋白波との関係

CoCl_2 (10^{-3}M), NH_4Cl (0.1M), NH_4OH (0.2M) ならびにトロポミオシン (10 倍希釈液の 0.5ml) の濃度をそれぞれ一定にし, 電解温度だけを変化させた場合のポーラログラムを測定した。得られたポーラログラムから, その蛋白波の波高とその電解温度との関係を図示して, Fig. 9 を得た。

これによれば, 貯蔵前および貯蔵後の非照射ならびに照射トロポミオシンのいずれの蛋白波の場合にも, 電解温度 35° にいたるまで, その波高に

著しい変化は見られなかった。また $253 \times 10^4\text{r}$ 以下のものでは, それら蛋白波の crossing point は, 7° 付近のほぼ一定した電解温度に位し, さらにまたそれら蛋白波の波高曲線も類似した傾向をあらわした。これらは, 牛肉のミオシン区分蛋白波のそれに¹⁾よく一致している。これらの結果から見れば, $253 \times 10^4\text{r}$ 以下のものでは, 照射や貯蔵によって, トロポミオシンに大きな変化が起こっているものとは考えられない。けれども, 照射しないトロポミオシンを 15° で 21 日間貯蔵すれば, その蛋白波の crossing point は 17° 付近のかなり高い位置に移動した。また, $660 \times 10^4\text{r}$ のよう

Fig. 9 Relation between electrolyzing temperatures and heights of protein waves of non-irradiated or irradiated tropomyosin estimated at 0° to 35°C with the buffer solutions containing $10^{-3}\text{M}\cdot\text{CoCl}_2$, $0.1\text{M}\cdot\text{NH}_4\text{Cl}$, $0.2\text{M}\cdot\text{NH}_4\text{OH}$, and 0.5ml of each diluted tropomyosin solution

A: Immediately after gamma-ray irradiation

B: After 21 days storage at 15°C

I: First waves

II: Second waves

な高線量に及べば、貯蔵の有無にかかわらず、照射の影響があらわれるようになって、その crossing point の位置は 12° 付近へと上昇した。これらの位置の移動は、貯蔵または照射によって、それら蛋白質に変化の起こっていることを示すものである。

要 約

(1) 兎肉から分離したトロポミオシン蛋白波の波高曲線、波形ならびに crossing point に及ぼす γ 線照射や 15° 貯蔵の影響を比較検討した。

(2) 電解液中の蛋白質、 CoCl_2 ならびに NH_4Cl 濃度に対するトロポミオシン蛋白波は、特徴ある波高曲線をあらわして、ほかの肉類蛋白波と著しく異なっていた。

(3) $253\times 10^4\text{r}$ にいたるまでの照射量では、トロポミオシン蛋白波の波高曲線、波形ならびに crossing point は、照射や 15° 貯蔵によって、著しい変化を生じなかった。これは、トロポミオシンに大きな変化が起こっていないことを示すものである。また、これらの結果は、牛肉のミオシン区分蛋白波の傾向とよく一致していた。

(4) 照射しないトロポミオシンを 15° で 21 日間貯蔵すれば、その蛋白波の特性はかなり変動した。これは、照射しないトロポミオシンでは、 15° 貯蔵によって、かなり変化していくことを示すものである。

(5) $660\times 10^4\text{r}$ のような高線量に及べば、そのトロポミオシン蛋白波の波高や crossing point に、ある程度の変化が認められ、照射の影響があらわれるようになった。

本実験は当研究室員草間正夫氏ほか 10 名の助力によって遂行し得たものであり、また γ 線照射は理化学研究所応用化学研

究室滝沢正男先生のご協力により達成し得たものである。なお研究費の一部はロックフェラー財団の援助によったものである。あわせて感謝の意を表す。

文 献

- 1) 小原哲二郎, 小笠原八十吉, 草間正夫: *Radioisotopes*, **11**, 46 (1962)
- 2) K. Bailey: *Biochem. J.*, **43**, 271 (1948)
- 3) K. Bailey, H. Gutfreund, A. G. Ogston: *Biochem. J.*, **43**, 279 (1948)
- 4) 館 勇: ポーラログラフィ, p. 385~410 (1954)
- 5) 秦 忠夫: 京都大学食糧科学研究所報告, **6**, 45 (1951)
- 6) 伊藤昌英: 三重県立大学研究年報, **3**, 35~133 (1959)
- 7) O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951)
- 8) 赤堀四郎: 酵素研究法, **1**, 164 (1956)
- 9) R. Brdicka: Collection Czechoslov. Chem. Commun., **11**, 614 (1939)
- 10) E. Jürka: Collection Czechoslov. Chem. Commun., **11**, 243 (1939)

- 11) J. Klumpar: Collection Czechoslov. Chem. Communs., 13, 11 (1948)
- 12) 小笠原八十吉: 食糧化学研究報告, 5, 23 (1958)
- 13) 小原哲二郎, 小笠原八十吉: 農化誌, 33, 762 (1959)
- 14) 小原哲二郎, 小笠原八十吉, 小野文夫: 食品衛生学雑誌, 1, 84 (1960)
- 15) 橋本英子, 小原哲二郎, 小笠原八十吉: 食糧化学研究報告, 5, 28, 32 (1958)

Polarographic Studies on Storage of Meats. Part XIX

Influence of Gamma-Ray Irradiation on Protein Wave of Rabbit Tropomyosin

By

Tetsujiro OBARA and Yasokichi OGASAWARA

(Dept. of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture,
Tokyo University of Education, Japan)

(Received June 18, 1962)

In a previous report we have examined influences of the gamma-ray irradiation and 15°C storage on the protein waves of the actin fraction and the myosin fraction separated from beef. The result of the above experiments has shown that the shapes and crossing points of protein waves of irradiated actin fraction deviated profoundly as days going by during 15°C storage, whereas the shapes of protein waves of irradiated myosin fraction did not change very much. The myosin fraction used in the above experiment was so crude that the myosin fraction contained not only myosin but also the other proteins. Therefore, it is desirable to examine behaviors of the protein waves by using the more purified myosin fraction. Fortunately, Bailey was successful to obtain tropomyosin as crystalline form from rabbit muscle. For this reason we

isolated the tropomyosin from rabbit muscle by a Bailey's method and examined a change in protein waves of the purified tropomyosin after gamma-ray irradiation and 21 days storage at 15°C.

3 kg of rabbit muscle was minced, mixed with an equal volume of water, and homogenized for 1 minute in a Waring Blendor. The juice obtained was purified with ethanol, potassium chloride, ammonium sulfate, and so on. 290 ml of the isolated tropomyosin solution was sealed tightly in four ampoules. These were exposed to gamma-rays of ^{60}Co for 20 hours at 15°C which dosages were 0, 105×10^4 , 253×10^4 , and 660×10^4 roentgens. After irradiation, each sample was stored for 21 days at 15°C and the protein waves were estimated.

Each protein wave was estimated in buffer solutions with protein, CoCl_2 , NH_4Cl , and

NH₄OH of various concentrations at 25°C.

The results of the above experiment are as follows:

(1) When the protein waves of the irradiated tropomyosin were estimated in buffer solutions with protein, CoCl₂, and NH₄Cl of various concentrations, there was a characteristic tendency in the heights of the protein waves.

(2) In the case of the tropomyosin irradiated with dosages up to 253×10^4 roentgens, there was no prominent change in the heights, shapes, and crossing points of the protein waves before and after 15°C storage. This indicates that the tropomyosin-protein is little affected by gamma-ray irradiation

and 15°C storage. This was the same result as in the case of the protein waves of the myosin fraction from beef.

(3) When the non-irradiated tropomyosin was stored for 21 days at 15°C, there was a change in the height and the crossing point of the protein wave. This indicates that the non-irradiated tropomyosin-protein is considerably affected by 15°C storage.

(4) In the case of the protein wave of the tropomyosin irradiated with a high dosage, such as 660×10^4 roentgens, there was a slight change in the height and the crossing point of the protein wave.

This indicates that the tropomyosin-protein is influenced by gamma-ray irradiation.