ATP によるマグロミオシンサブフラグメント-1 の 酸性 pH における熱変性抑制

緒方由美,¹ 木村郁夫^{1,2*}

(2018 年 9 月 2 日受付, 2018 年 10 月 17 日受理, 2018 年 12 月 20 日 J-STAGE 早期公開)

¹鹿児島大学水産学部, ²鹿児島大学大学院連合農学研究科

Suppressive effect of ATP on acidic-thermal denaturation of tuna myosin subfragment-1

YUMI OGATA¹ AND IKUO KIMURA^{1,2*}

¹Faculty of Fisheries, Kagoshima University, Shimoarata, Kagoshima 890-0056, ²The United Graduate School of Agricultural Sciences Kagoshima University, Korimoto, Kagoshima 890-0065, Japan

The high body temperature and acidic pH of tuna muscle during the postmortem period due to the effects of struggling during capture are the causes of “burnt” meat. A rapid decrease in the concentration of ATP in burnt meat during postmortem has been reported. We examined the protective effect of ATP on fish muscle proteins. There is no report on the effect of ATP on the denaturation of myosin in burnt meat, so we examined the effect of ATP on the acidic-thermal denaturation of tuna myosin subfragment-1 by measuring the changes in turbidity of myosin subfragment-1 solution and Ca-ATPase activity. The increase in turbidity of myosin subfragment-1 solution and the inactivation of myosin subfragment-1 Ca-ATPase during acidic-heat treatment were suppressed strongly in the presence of physiological concentration of ATP. The rapid reduction of ATP during the early postmortem stage may act as a trigger for the acceleration of acidic-thermal denaturation of tuna myosin in burnt meat.

キーワード：ATP, 酸性 pH 変性, 変性抑制, ミオシン S-1, ミナミマグロ, ヤケ肉

マグロ類やブリ類の品質価値を著しく低下させる現象としてヤケ肉の発生がある。ヤケ肉は延縄、旋網や一本釣漁業および養殖漁業のいずれでも起こり問題となっている。ヤケ肉が発生すると、マグロ類の赤身肉やブリ類の筋肉が透明感のない白色に変わり、時間が経過するとさらに褐色へと変化する。同時に肉質は水っぽい食感となり商品価値を著しく低下させる。こうしたヤケ肉は解体して初めて分かることから、卸や仲買業者の大きなリスクとなるとともに、信頼を損ねる一因となる。高品質マグロ肉の安定供給のためにヤケ肉発生機構の解明および防止法の開発が重要な課題となっている。ヤケ肉の発生は、魚体の体温上昇および筋肉の pH 低下が原因とされている。1978 年に小長谷らは、モデル実験でマグロヤケ肉の原因は高体温と低 pH の相乗作用であることを提唱し、^{1,2)} その後、多くの研究者によってヤケ肉の研究は続けられ成書³⁾として報告された。

赤身魚は高速で遊泳するため筋収縮で多量のアデノシン三リン酸 (ATP) を消費するが、生きているあいだは酸素供給によって効率的に ATP を再生産している。しかし、漁獲時の激動や致死後酸素供給が停止すると、筋肉中は嫌気状態となりグリコーゲンの分解により乳酸が生成され、同時に ATP 分解にともなう H⁺ の生成により筋肉 pH の低下が起きる。さらに、漁獲時に激動することで魚体の体温が上昇し、魚肉タンパク質の変性が促進する。特に、マグロ類などの大型魚では魚体の中心部まで冷却されるまでに時間がかかるため、魚肉タンパク質は高温で酸性 pH に曝露される時間が長くなり、ミオシンやミオグロビンの変性が促進される。³⁻⁵⁾

本研究では、生きている筋細胞内に約 5 から 10 mM の濃度で含まれる ATP⁶⁾ の作用に着目した。ATP は生体内高エネルギー物質であり筋収縮のエネルギー源であるが、筋肉タンパク質に対する食品化学的な視点で

ATP の作用をみると、ミオシンの低塩濃度下における溶解作用⁷⁾やミオシン ATPase の熱変性抑制^{8,9)}、ミオシンの凝集変性抑制作用¹⁰⁾あるいは筋原線維タンパク質の冷凍変性抑制作用¹¹⁾などについて報告がなされている。ATP はミオシン ATPase 酵素の基質であるのと同時に、ミオシンタンパク質の熱変性と冷凍変性抑制作用などを有することが明らかにされている。さらに、ATP はミオグロビンのメト化の進行を抑制することも報告されている。^{12,13)} 生物が生きている間は効率的に ATP の生合成がなされており、生理的な活動により消費されても常にほぼ一定の濃度を維持している。また、死後の一定期間は生きていた時と同程度の濃度を維持するが、その後低下し始め、低 ATP 濃度下で死後硬直を起こし、種々の品質低下を引き起こす。一方、マグロやブリのヤケ肉では、致死直後に ATP のほとんどは消失することが報告されている。^{14,15)} ATP の消失が酸性 pH 下におけるミオシンの熱変性にどの程度影響するかについては、まだ、研究がなされていない。

本研究では、より単純な系で ATP による魚肉タンパク質の熱変性抑制作用を測定するために、ミオシンの ATPase アクティブサイトであるミオシンサブフラグメント-1 (S-1) に対する ATP の熱変性抑制効果について検討した。マグロのヤケ肉は漁獲時の高体温と酸性 pH が原因とされ、その発生には個体差はあるが、体温は 30℃ 付近まで上昇し pH は 6 以下になる場合が多い。¹⁴⁾ そこで、酸性 pH に調整したマグロミオシン S-1 の 30℃ における熱変性に対する ATP の作用について測定を行った。

材料と方法

材料 ミオシン S-1 の調製にはミナミマグロ *Thunnus maccoyii* の高鮮度冷凍赤身肉を使用した。約 200 g に柵取りされた冷凍品を新洋水産有限会社より 3 kg を購入し、実験に供するまで -80℃ の冷凍庫で保管した。この冷凍品は急速解凍をすると解凍硬直を起こすことを確認したので、魚肉中に高濃度の ATP を含有した高鮮度冷凍品であると推定し使用した。

マグロ筋原線維からミオシン S-1 の調製 ミオシン S-1 の調製は、今野らの方法¹⁶⁾ に準じて筋原線維から調製したが、 α -キモトリプシン（ナカライテスク製）消化の条件については検討を行った。筋原線維の調製は以下に示す方法で行った。すなわち、氷水中で約 3 時間保持して半解凍した高鮮度ミナミマグロを細切後、氷冷下で 3 倍量の 0.1 M KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) 溶液を添加してホモジナイズし、5,000 rpm 15 分間遠心分離し沈殿を得た。これに同溶液を加えて沈殿を懸濁攪拌後、同様に遠心分離をした。この操作を 3 回繰り返して水溶性画分を除き、得られた沈殿画分を筋原線維と

した。筋原線維は α -キモトリプシン消化のために 0.05 M KCl, 20 mM Tris-maleate (pH 7.0) に懸濁し、1 mM ethylenediaminetetraacetate (EDTA) および 0.1 mM dithiothreitol (DTT) 共存下で筋原線維を α -キモトリプシンで 20℃ にて 30 分間消化し、ミオシン分子を S-1 とロッドの接続部位で選択的に切断した。キモトリプシン消化は終濃度 0.3 mM の phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF) を添加して停止し、10,000 rpm で 20 分間遠心分離を行い沈殿に S-1 を含む画分を集めた。得られた沈殿に終濃度 10 mM ピロリン酸 (PPi) Na - MgCl₂ を含む 0.05 M KCl 20 mM Tris-maleate (pH 7.0) 溶液を加えてよく攪拌し、10,000 rpm で 30 分間遠心分離してアクチンから解離した S-1 を上清に回収した。得られた上清の 40-50% 飽和硫酸画分を 10,000 rpm 20 分間遠心分離し S-1 を沈殿に集め、0.1 M KCl 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) 溶液に透析して硫酸を除き 10,000 rpm 20 分間遠心分離し上清画分を S-1 として使用した。筋原線維からミオシン S-1 の調製過程におけるタンパク質組成を Laemmli の方法¹⁷⁾ に従い、10% アクリルアミドゲルを使用した SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (SDS-PAGE) により分析した。

pH 調整および ATP-Mg 共存下におけるミオシン S-1 の加熱処理 ミオシン S-1 の pH の調整は、pH 5.5-7.0 の場合は 0.1 M KCl, 20 mM Tris-maleate を、pH 7.5 の場合は 0.1 M KCl, 20 mM Tris-HCl の溶液を使用して行った。タンパク質濃度 1 mg/mL のミオシン S-1 (0.1 M KCl, pH 5.5-7.5) に終濃度 1 mM MgCl₂ および最大 7.5 mM の ATP を添加して 30℃ に保持し、経時的に取り出し氷冷して加熱を止めた後、ミオシン S-1 の濁度を測定した。その後、0.1 M KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) 溶液に透析し MgCl₂ と ATP, ATP 分解物を除去した S-1 を加熱処理 S-1 とした。

ミオシン S-1 の熱変性分析 ミオシン S-1 の熱変性の経時変化は、ミオシン S-1 の加熱処理時の濁度と Ca-ATPase 活性を指標にして測定した。S-1 の濁度は 350 nm での吸光値を測定した。濁度の経時変化については、濁度が最大となったときの吸光度の値の 1/2 に達するまでの時間 (sec) を $\tau_{1/2}$ として濁度増加速度の解析を行った。Ca-ATPase 活性は以下の反応液組成で 25℃ で測定した。Ca-ATPase 活性：0.5 M KCl, 5 mM CaCl₂, 25 mM Tris-maleate (pH 7.0), 1 mM ATP, 0.05-0.1 mg/mL S-1。ミオシン S-1 の各 pH における加熱処理時の ATP 分解速度を比較するために、Mg-ATPase 活性の測定を以下の反応液組成で 30℃ で測定した。Mg-ATPase 活性：0.1 M KCl, 1 mM MgCl₂, 20 mM Tris-maleate (pH 5.5-7.0) または 20 mM Tris-HCl (pH 7.5-9.0), 1 mM ATP, 0.2 mg/mL S-1。それ

ぞれ S-1 を添加して ATPase 反応を開始し, 生成する無機リン酸を Gomori 法で測定した。¹⁸⁾ なお, タンパク質濃度は牛血清アルブミンを標準物質としたビウレット法によって比色定量した。¹⁹⁾

ミオシン S-1 ATPase の変性速度恒数の算出 各 pH および ATP 共存下で加熱処理したミオシン S-1 の Ca-ATPase 活性の失活の経時変化を下記の一次反応式に従って解析し, 変性速度恒数 (K_D) を算出した。

$$K_D = (\ln C_0 - \ln C_t) / t$$

ここで, C_0 および C_t は加熱前と t 時間加熱後の活性の相対値である。

ATP 濃度の測定 0.5 mM ATP 存在下で 30℃ で処理したときのミオシン S-1 溶液中 (0.1 M KCl, 1 mM $MgCl_2$, 20 mM Tris-maleate pH 6.0, 1.0 mg/mL S-1) の ATP 濃度を測定した。すなわち, ATP 存在下, 30℃ でそれぞれ一定時間処理したミオシン S-1 溶液に終濃度 5% の過塩素酸溶液 (PCA) を添加し除タンパク後, 水酸化カリウム溶液で中和した溶液を 5,000 rpm で 5 分間遠心分離し, 得られた上清を 0.45 μ m メンブレンフィルター処理した濾液を分析試料とした。ATP 濃度の分析は, 島津製作所製 HPLC システムを用い, Murata らの方法に従って行った。²⁰⁾ 分析カラムは Shodex Asahipak GS-320HQ を用い, リン酸緩衝液 (pH 2.9) のアイソクラティック法で ATP 関連化合物を分離し, 検出波長は 260 nm で測定した。

統計処理 測定は 3 検体で行い, 得られた実験結果はエクセル統計 (株式会社社会情報サービス社製) を用

い, 多群間の有意差については Tukey 法で解析した ($p < 0.05$)。

結 果

マグロ筋原線維からミオシン S-1 の調製 筋原線維の α -キモトリプシン消化条件を SDS-PAGE パターンにより検討した結果, 1/500 (w/w) の α -キモトリプシンを用いて 20℃ で 30 分間消化することでミオシンはほとんど消失し, S-1 とロッドに切断されることを確認した (Fig. 1a)。上記条件で筋原線維タンパク質をキモトリプシン消化した後, 今野らの方法に準じてミオシン S-1 を調製した。最終的に得られたミオシン S-1 は, アクチンを含まず, 純度の高いものであった (Fig. 1b)。また, 出発材料として使用した冷凍ミナマグロの柵が異なっても, 得られたミオシン S-1 の Ca-ATPase 比活性は約 0.5–0.6 μ mol Pi/min/mg と安定して高い値を示した。

各 pH における ATP-Mg 共存下でのミオシン S-1 の加熱による濁度変化 溶液の pH を 5.5–7.5 に調整したミオシン S-1 に 1 mM $MgCl_2$ および最大 7.5 mM の ATP を添加し, 30℃ で加熱したときのミオシン S-1 溶液の濁度変化を 350 nm の吸光値を指標として測定した。pH 6.0 と pH 7.0 の結果を Fig. 2(a, b) に示す。ATP を添加しないで加熱した場合に比べて, ATP- Mg^{2+} 存在下で加熱した場合では濁度の上昇が緩やかになる傾向を示した。また, 酸性の pH 6.0 よりも中性の pH 7.0 のほうが濁度の上昇は遅い傾向を示した。図には示さない

Fig. 1 SDS-PAGE pattern of the α -chymotryptic digest of tuna myofibrils and preparation of myosin S-1 from tuna myofibrils. (a) Tuna myofibrils were digested in a medium of 0.05 M KCl, 20 mM Tris-maleate (pH 7.0), 1 mM EDTA and 0.1 mM DTT by using 1/500 (w/w) of chymotrypsin at 20℃. (b) Tuna myofibril (A), α -chymotryptic digest of myofibrils (digestive condition: 1/500 (w/w), 20℃, 30 min) (B), soluble fractions of the digest (C), insoluble fractions of the digest (D), crude S-1 released from the digest (E), S-1 purified by $(NH_4)_2SO_4$ fractionation (F) and molecular weight markers (M). MHC, Rod, S-1 and A indicate myosin heavy chain, myosin rod, subfragment-1 and actin, respectively.

Fig. 2 Changes in the turbidity of tuna myosin S-1 by heat treatment at 30°C with or without ATP. S-1 (1 mg/mL) was treated at 30°C in a medium containing 0.1 M KCl, 1 mM MgCl_2 , 20 mM Tris-maleate (pH 6.0, 7.0), and various concentrations of ATP. The final concentration of ATP added was 0 (●), 0.5 (□), 1 (△) and 7.5 (○) mM, respectively. The heat treatment was stopped by cooling in iced water and then the turbidity of myosin S-1 solution was measured at an absorbance of 350 nm: (a) pH 6.0, (b) pH 7.0.

が、他の pH におけるミオシン S-1 の濁度変化も Fig. 2 の結果と同様に ATP 濃度依存性を示し、pH が低くなるほど濁度の上昇が速く、中性 pH で濁度の上昇は緩やかとなった。さらにそれぞれの濁度変化について、濁度が最大となったときの吸光度の値の 1/2 に達するまでの時間を $\tau_{1/2}$ (sec) とし、その逆数を濁度増加速度 (sec^{-1}) として解析した結果を Fig. 3 に示す。ATP 無添加の場合、濁度の上昇速度は pH 5.5, $33.33 \times 10^{-2} \text{ sec}^{-1}$; pH 6.0, $22.22 \times 10^{-2} \text{ sec}^{-1}$; pH 6.5, $20.00 \times$

Fig. 3 pH dependency of the rate of turbidity formation of tuna myosin S-1 by heat treatment at 30°C with or without added ATP. S-1 (1 mg/mL) was treated at 30°C in a medium containing 0.1 M KCl, 1 mM MgCl_2 , 20 mM Tris-maleate (pH 5.5–7.0) or 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), and various concentrations of ATP. The final concentration of ATP added was 0 (●), 0.5 (□), 1.0 (△) and 7.5 (○) mM, respectively. The heat treatment was stopped by cooling in iced water and then the turbidity of myosin S-1 solution was measured at an absorbance of 350 nm.

10^{-2} sec^{-1} ; pH 7.0, $12.50 \times 10^{-2} \text{ sec}^{-1}$; pH 7.5, $5.80 \times 10^{-2} \text{ sec}^{-1}$ と pH に依存し、pH が酸性で速く、中性から微アルカリになるほど遅る傾向を示した。0.5 mM および 1 mM ATP を添加した場合、pH 5.5 の濁度増加速度はそれぞれ $28.57 \times 10^{-2} \text{ sec}^{-1}$ と $25.00 \times 10^{-2} \text{ sec}^{-1}$ を示し ATP 無添加に近い値を示したが、pH 6.0 以上では $8.33 \times 10^{-2} \text{ sec}^{-1}$ から $2.30 \times 10^{-2} \text{ sec}^{-1}$ と強い濁度増加抑制効果が認められた。また、生体内の ATP 濃度に近い 7.5 mM ATP を添加した場合は、いずれの pH においても加熱による濁度の上昇が $10.00 \times 10^{-2} \text{ sec}^{-1}$ から $2.08 \times 10^{-2} \text{ sec}^{-1}$ と非常に遅く、特に、pH 5.5 で ATP による熱変性抑制効果は顕著であった。以上の結果から、ミオシン S-1 の加熱による濁度変化は pH に影響されると同時に ATP 濃度依存性を示し、特に、酸性 pH 下において ATP によりミオシン S-1 の熱変性が顕著に抑制されることが明らかとなった。

各 pH における ATP- Mg^{2+} 共存下でのミオシン S-1 ATPase 活性の加熱変性速度 溶液の pH を 5.5–7.5 に調整したミオシン S-1 に 1 mM MgCl_2 および各濃度の ATP を添加し、30°C で加熱処理したときのミオシン S-1 の Ca-ATPase 活性の経時変化を測定し、一次反応式に従い解析した結果を Fig. 4(a)–(e) に示す。ATP 未添加のミオシン S-1 は、いずれの pH においても加熱により一次反応式に従って失活したが、変性速度は pH

Fig. 4 Thermal inactivation of Ca-ATPase activity of tuna myosin S-1 in the presence of various concentrations of ATP at pH 5.5–7.5. Tuna myosin S-1 (1 mg/mL) was treated at 30°C in a medium containing 0.1 M KCl, 1 mM MgCl₂, various concentrations of ATP and (a) 20 mM Tris-maleate (pH 5.5), (b) 20 mM Tris-maleate (pH 6.0), (c) 20 mM Tris-maleate (pH 6.5), (d) 20 mM Tris-maleate (pH 7.0) and (e) 20 mM Tris-HCl (pH 7.5). The final concentration of ATP added was 0 (●), 0.5 (□), 1 (△) and 7.5 (○) mM, respectively. Treatment was stopped by cooling in iced water and then dialyzed against 0.1 M KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) to remove ATP and its related materials and Mg²⁺. Ca-ATPase activity of tuna myosin S-1 was assayed at 25 °C in reaction medium containing 0.5 M KCl, 5 mM CaCl₂, 25 mM Tris-maleate (pH 7.0), 1 mM ATP and 0.05–0.1 mg/mL myosin S-1.

依存性を示し、pH 5.5 の失活速度 ($838.04 \times 10^{-5} \text{ sec}^{-1}$) は pH 7.5 ($87.25 \times 10^{-5} \text{ sec}^{-1}$) の約 10 倍であった。一方、0.5 および 1 mM の ATP を添加したミオシン S-1 では、加熱初期の変性速度は遅く、その後、急速に失活する 2 段階の変性様式を示した。0.5 mM ATP 添加における 2 段目の失活開始時間は、pH 5.5 で加熱 5 分後、pH 6.0 で加熱 10 分後、pH 6.5 で加熱 15 分後、pH 7.0 と pH 7.5 で加熱 20 分後となり、pH に依存して 2 段目の失活開始時間が遅れる結果となった。また、1 mM ATP 添加における失活開始時間は、pH 5.5 で加熱 15 分後、pH 6.0 で加熱 20 分後、pH 6.5 で加熱 25 分後、pH 7.0 で加熱 40 分後、pH 7.5 で加熱 45 分後であり、pH 5.5–6.5 までは 0.5 mM ATP 添加のミオシン S-1 と同様に pH に依存して 5 分ずつ失活開始時間が遅れる結果となった。また、生体内の ATP 濃度に近い 7.5 mM ATP を添加すると、いずれの pH においても加熱 60 分後まで活性の急速な低下は起こらなかった。以上の結果は、加熱時にミオシン S-1 溶液に添加する ATP の濃度を増加することに伴い、Ca-ATPase 活性の急速な失活が始まるまでに要する時間が長くなり、また、失活速度も僅かながら小さくなる傾向を示した。Ca-ATPase 活性が急速に低下する原因は添加した ATP が分解されるためと推察される。そこで、pH 6.0 で 0.5 mM ATP を添加したミオシン S-1 溶液を 30°C にて加熱処理した後、5% PCA にて除タンパクし、溶液の pH を KOH 溶液で中性に調整し ATP 濃度を HPLC で測定したところ、加熱 5 分後では 0.225 mM、10 分後では 0.152 mM の ATP が残っていたが、加熱 15 分では ATP はほとんど分解し 0.031 mM であった。Ca-ATPase 活性の低下結果と対応させてみると、加熱処理中に ATP 濃度が低下する時間と Ca-ATPase 活性が急速な低下を始める時間はほぼ一致していた。Fig. 5 にマグロミオシン S-1 の 30°C における Mg-ATPase 活性を示す。Mg-ATPase 活性は酸性 pH で高く、中性 pH で低い pH 依存性を示した。各 pH における Mg-ATPase 活性の違いが 30°C 加熱処理時に添加した ATP の濃度低

下速度に影響し、変性様式が 1 次反応式で折れ曲がる時間に差が認められる原因であることが示された。以上の結果から、マグロミオシン S-1 の Ca-ATPase 活性の加熱による失活は、添加した ATP の作用により抑制され、抑制する時間は ATP 濃度に依存することが明らかとなった。

ミオシン S-1 の Ca-ATPase 変性速度恒数 (K_D) による ATP の変性抑制効果の解析 各濃度の ATP を存在させて 30°C で加熱処理したマグロミオシン S-1 について、加熱時間にもなう Ca-ATPase 活性の低下の経時変化を一次反応式で解析したところ、Fig. 4 に示したように加熱初期の Ca-ATPase 活性の低下が遅い変性とそれに続く速い低下の 2 段階の変化様式を示した。後期の速い変性は ATP の濃度低下に伴うものである。これらの結果から、Ca-ATPase 活性の加熱初期の低下速度を ATP が存在し変性抑制を示しているときの変性速度恒数 (K_D) として求め、結果を Table 1 に示す。ATP を添加していないミオシン S-1 の pH 5.5 における K_D は $838.04 \times 10^{-5} \text{ sec}^{-1}$ であり、他のいずれの pH、

Fig. 5 pH dependency of Mg-ATPase activity of tuna myosin S-1. The ATPase assay was carried out at 30°C in a medium containing 0.1 M KCl, 1 mM MgCl_2 , 20 mM Tris-maleate (pH 5.5–7.0) or 20 mM Tris-HCl (pH 7.5–9.0) and 0.1 mg/mL myosin S-1.

Table 1 The apparent first-order rate constant (K_D) for early-stage inactivation of Ca-ATPase activity of tuna myosin S-1 in the presence of ATP

$K_D \times 10^5 (\text{sec}^{-1})$					
ATP (mM)/pH	pH 5.5	pH 6.0	pH 6.5	pH 7.0	pH 7.5
0	838.04 ± 115.79^a	196.01 ± 17.57^{bcd}	143.11 ± 30.34^{cdf}	115.64 ± 22.78^{dfg}	87.25 ± 6.84^{ef}
0.5	49.63 ± 4.46^{eg}	15.45 ± 11.40^e	12.33 ± 10.42^e	6.53 ± 1.60^e	6.50 ± 2.30^e
1	37.36 ± 6.49^{eg}	12.39 ± 4.31^e	11.13 ± 3.23^e	7.13 ± 3.17^e	5.05 ± 1.80^e
7.5	16.96 ± 11.41^e	11.51 ± 6.17^e	10.78 ± 4.26^e	7.16 ± 2.16^e	5.29 ± 2.73^e

The apparent first-order rate constant (K_D) for inactivation of Ca-ATPase activity in the presence of ATP was calculated using the data shown in Fig. 4 (a)–(e).

Values are mean $\pm$ standard deviation ($n=3$). Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$).

ATP 添加における K_D 値に対して有意差を示した ($p < 0.05$)。pH 5.5 において、各濃度の ATP を添加した場合の K_D は小さくなり、0.5 mM ATP の添加で K_D は $49.63 \times 10^{-5} \text{ sec}^{-1}$ であった。これは、0.5 mM ATP 存在下で pH 5.5 および 30°C における熱安定性が約 16 倍になったことを示している。いずれの pH においても ATP を添加することで K_D は小さくなり、ATP による変性抑制効果は ATP 濃度 0.5–7.5 mM 間で有意差は見られなく、pH に関わりなくその安定性は約 12–16 倍になることが示された。ATP が 0.5 mM 存在することにより酸性 pH 下でのミオシン S-1 の 30°C における熱変性は抑制され、酸性 pH 下であっても ATP が存在すれば、あたかも pH が中性域における熱変性に匹敵する熱変性速度となることが示唆された。

考 察

マグロ類やブリ類で発生するヤケ肉は、身質が水っぽくなり、色調は白く、酸味の強い味となり商品価値は大きく低下する。特に、夏場の高水温期の水揚げ時に激動した魚体で発生頻度が高くなることから、高水温期での水揚げを制限したり、激動しにくい水揚げや魚肉の急速冷却法の工夫などの取り組みがなされている。ヤケ肉の発生メカニズムは、水揚げ時の激動による魚体温の 30°C におよぶ上昇と魚体深部の冷却速度が遅く高温状態が続くこと、同時に嫌気的な高温状態でのグリコーゲン分解酵素の活性化による乳酸生成量の増加および ATP 分解による H^+ 生成により魚肉 pH の酸性化が起り、酸性 pH 下における筋原線維タンパク質やミオグロビンの熱変性が原因であることが明らかにされている。¹⁻⁵⁾ 一方、私たちはヤケ肉の発生が水揚げ直後の数時間以内に認められることと魚肉中の ATP の消失が急速に進行する現象に注目した。試験的に調製したヤケ肉の発生条件となる陸上苦悶死サンプルでは、漁獲後 3 時間以内に ATP は完全に消失し、pH も 5.5 付近まで急速に低下することが報告されている。^{14,15)} ATP は生体内エネルギー物質であり、生きている細胞内の濃度は 5–10 mM で一定に保たれているが、⁶⁾ エネルギー物質としての機能以外に筋肉内タンパク質の変性抑制作用が報告されている。すなわち、ミオシンの凝集変性抑制作用、¹⁰⁾ ミオシンの熱変性抑制作用、^{8,9)} 筋原線維タンパク質の冷凍変性抑制作用、¹¹⁾ ヒラメ *Paralichthys olivaceus* 筋肉タンパク質の冷凍変性抑制作用、²¹⁾ 筋小胞体 Ca-ATPase の熱変性・冷凍変性抑制作用、²²⁾ ミオグロビンメト化抑制作用^{12,13)} などである。ヤケ肉発生時における ATP の濃度変化に関するデータは報告されているが、筋肉タンパク質、特に、ミオシンの酸性 pH 下での熱変性に及ぼす ATP の影響については研究例が報告されていないので本研究で取り組んだ。ATP の影響を確認するために

生理的な塩濃度に近い条件下で研究を行うこととしたが、ミオシンは生理的塩濃度下ではフィラメントを形成するので扱いにくいいため、ミオシンの ATPase サイトであり生理的塩濃度下で溶解するミオシン S-1 を使用した。また、ミオシン S-1 を使用することにより、Ca-ATPase 活性と溶液の濁度を変性の指標とすることができた。マグロミオシン S-1 の調製は、生きた状態で漁獲され高濃度の ATP を含んだ状態で超低温下で急速凍結されたミナミマグロ冷凍品を試験材料として使用することができ、Ca-ATPase 比活性が高く安定したミオシン S-1 で試験を行うことができた。マグロミオシン S-1 は、今野らの方法に準じて、マグロ筋原線維に対する α -キモトリプシン消化条件を決定した後、ミオシン S-1 の PPi-Mg^{2+} によるアクチンからの解離と硫酸分画を組み合わせた方法で純度の高い標品として調製し使用した (Fig. 1)。マグロミオシン S-1 の各 pH 下での 30°C における加熱処理に対する各濃度 (0.5–7.5 mM) の ATP の影響をミオシン S-1 溶液の濁度と Ca-ATPase 活性を指標に測定した結果、いずれの場合も酸性下における熱変性を強力に抑制することが明らかとなった (Fig. 2–4)。また、添加した ATP 濃度が 0.5 あるいは 1.0 mM の場合、Ca-ATPase 活性の変性様式は、1 次反応式による解析で初期の遅い変性とその後速い変性の 2 段階を示した。これは加熱処理時に ATP がミオシン S-1 の Mg-ATPase により分解され、ATP 濃度がほぼ消失した時に急激な変性が進むことが確かめられた (Figs. 4, 5)。本研究で使用したミオシン S-1 の加熱変性条件下における溶液条件と ATP 濃度の関係から、0.5 mM の ATP が存在すれば酸性 pH 下での熱変性は強力に抑制されることも明らかになり、ヤケ肉発生時における ATP の急速な消失はミオシンの酸性下での熱変性の急激な進行の引き金となることが示された (Fig. 4, Table 1)。

ATP による魚類筋原線維タンパク質の変性抑制作用の分子機序について今後詳細に検討を行う必要があるが、私たちは ATP 結合によって引き起こされるミオシンやアクチン分子の構造変化やタンパク質周辺の水和状態の変化に注目している。化学量論的なミオシン S-1 と ATP の結合比は 1 : 1 であるが、本実験条件ではミオシン S-1 に対して ATP が大過剰に存在している。すなわち、0.5 mM の ATP を添加した実験条件では、用いたミオシン S-1 (分子量 10 万 Da) の濃度を基にして計算すると、モル比としてミオシン S-1 の約 50 倍に相当する過剰量である。本試験系では、添加した ATP はミオシン S-1 の熱処理中に ATPase により分解され濃度低下が進行し、濃度がかなり低下した時に急激な変性が進行することが示された。したがって、ATP による変性抑制効果に必要なミオシン S-1 と ATP の化学量論

的な量の検討は本試験結果からだけでは明らかにすることができない。松浦らおよび大泉らはミオシンおよび筋原線維の熱変性におよぼす糖類の保護効果を Ca-ATPase 活性を指標として検討し、糖類の効果は加熱処理に供するタンパク質濃度の影響を受けず、糖のモル濃度によって決定されることを見出した。^{23,24)} これは、糖類はタンパク質と直接結合してその効果を現すのではなく、溶媒中の水の構造および性質に影響をおよぼしその効果を現すと推察されている。一方、ATP はミオシン S-1 と結合する性質をもつことから、ATP の保護効果がミオシン S-1 と ATP の結合とは無関係であるとは考えにくい、ミオシン S-1 と ATP の結合に加えて、溶液中の遊離の ATP のなんらかの作用によって保護効果も発現しているものと推察している。例えば、ATP はミオシンに非共有結合ではあるが強固に結合してミオシンのコンフォーメーションをある一定に保つこと、あるいはミオシン S-1 の ATPase サイクルにおける水和量とのエントロピー変化に関する測定結果からミオシンタンパク質分子周囲の水分子との相互作用について報告がなされている。²⁵⁾ また、単離したミオシンは 2 mM ATP 溶液に溶解することも報告されており⁵⁾、これらのことから ATP はミオシン分子表面の水和構造に影響を及ぼしている可能性がある。さらに、最近、ATP は hydrotrope として疎水性タンパク質の溶解性維持に関与していることが報告され、ATP 分子の特徴と ATP が有する生理的な機能について新しい一面が報告された。^{26,27)}

以上の結果から、筋肉中に存在する ATP は筋原線維タンパク質の安定性に大きく寄与することが明らかとなった。これらのことは、ATP を筋肉中に残した状態とするための水揚げ方法の検討や加工処理に関する研究を進めるための理論的背景を示すものである。

文 献

- 小長谷史郎, 小長谷康夫. 常温における赤身魚の筋原線維タンパク質の変性: “ヤケ肉” 発生の要因. 東海区水産研究所研究報告 1978; **96**: 67-74.
- Konagaya S, Konagaya T. Acid denaturation of myofibrillar protein as the main causes of formation of “yake-niku”, a spontaneously done meat, in red meat fish. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1979; **45**: 245.
- 今野久仁彦, 落合芳博, 福田 裕 編. 「水産学シリーズ 165 生鮮マグロ類の高品質管理—漁獲から流通まで」 恒星社厚生閣, 東京. 2010.
- Konno Y, Konno K. Myosin denaturation in “Burnt” bluefin tuna meat. *Fish. Sci.* 2014; **80**: 381-388.
- Huang M-C, Cho S-C, Ochiai Y, Watabe S. Evaluation of biochemical properties of burnt and normal meat in Pacific bluefin tuna (*Thunnus orientalis*). *Int. J. Nutr. Food Sci.* 2017; **6**: 203-210.
- Nelson D. L, Cox M. M. (山科郁男 監修, 川崎敏祐, 山中和久 編) 「レーニンジャー新化学 (上)」第 4 版. 廣川書店, 東京. 2006; 704-714.
- Asai H. Chromatography of myosin. *Biochemistry* 1963; **2**: 458-461.
- Yoshioka T, Arai K. Protective effect of ATP-MgCl₂ on thermal denaturation of myosins from rabbit and tilapia muscles. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1986; **52**: 1829-1836 (in Japanese with English abstract).
- Yoshioka T, Hamai M, Konno K, Arai K. Re-examination of protective effect of ATP on thermal inactivation of myosin Ca-ATPase. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1991; **57**: 143-147 (in Japanese with English abstract).
- Mackie IM. The effect of adenosine triphosphate, inorganic pyrophosphate and inorganic tripolyphosphate on the stability of cod myosin. *Biochim. Biophys. Acta* 1966; **115**: 160-172.
- Ogata Y, Shindo J, Kimura I. Suppression effect of ATP on freeze denaturation of fish myofibrillar protein. *Nippon Suisan Gakkaishi* 2012; **78**: 461-467 (in Japanese with English abstract).
- Inohara K, Kimura I, Yuan C. Suppressive effect of ATP on autooxidation of tuna oxymyoglobin to metmyoglobin. *Fish. Sci.* 2013; **79**: 503-511.
- Inohara K, Kurogi S, Onoue Y, Hamada M, Tamotsu S, Kimura I. Suppressive effect of ATP contained in muscle on the browning of amberjack *Seriola dumerili* dark muscle during frozen storage. *Nippon Suisan Gakkaishi* 2014; **80**: 965-972 (in Japanese with English abstract).
- 福島英登, 田中竜介, 福田 裕. 養殖マグロでみられるヤケ肉の発生要因とその肉質性状. 「水産学シリーズ 165 生鮮マグロ類の高品質管理—漁獲から流通まで」(今野久仁彦, 落合芳博, 福田 裕 編) 恒星社厚生閣, 東京. 2010; 43-53.
- 塩谷 格, 田代 高. ストレス緩和によるマグロ類ヤケ肉防止. 「水産学シリーズ 165 生鮮マグロ類の高品質管理—漁獲から流通まで」(今野久仁彦, 落合芳博, 福田 裕 編) 恒星社厚生閣, 東京. 2010; 118-127.
- Konno K, Kato S, Eko M. Rapid method for isolation of myosin subfragment-1 from carp myofibrils. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1990; **56**: 1885-1890 (in Japanese with English abstract).
- Laemmli UK. Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; **227**: 680-685.
- Gomori G. A modification of the colorimetric phosphorus determination for use with a photoelectric colorimeter. *J. Lab. Clin. Med.* 1942; **27**: 955-960.
- Gornall AG, Bardwill CJ, David MM. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.* 1949; **177**: 751-766.
- Murata Y, Henmi H, Nishioka F. Extractive components in the skeletal muscle from ten different species of scombroid fishes. *Fish. Sci.* 1994; **60**: 473-478.
- Ogata Y, Iwane R, Kimura I. Properties of muscle protein of freeze-thawed olive flounder containing high concentration of ATP when being frozen. *Nippon Suisan Gakkaishi* 2018; **84**: 835-842 (in Japanese with English abstract).
- Yuan C, Takeda Y, Nishida W, Kimura I. Suppressive effect of ATP on the denaturation of sarcoplasmic reticulum (Ca²⁺)-ATPase from southern bluefin tuna *Thunnus maccoyii* and its biochemical properties. *Fish. Sci.* 2016; doi: 10.1007/s12562-015-0940-1.
- Matuura M, Oozumi T, Arai K. The protective effect of sugar against thermal denaturation of biochemical proper-

- ties of carp myosin. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1984; **50**: 521–529 (in Japanese with English abstract).
- 24) Ooizumi T, Hashimoto K, Ogura J, Arai K. Quantitative aspect for protective effect of sugar and sugar alcohol against denaturation of fish myofibrils. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1981; **47**: 901–908 (in Japanese with English abstract).
- 25) Suzuki M, Shigematsu J, Fukunishi Y, Harada Y, Yanagida T, Kodama T. Coupling of protein surface hydrophobicity change to ATP hydrolysis by myosin motor domain. *Biophys. J.* 1997; **72**: 18–23.
- 26) Patel A, Malinowska L, Saha S, Wang J, Alberti S, Krishnan Y, Hyman AA. ATP as a biological hydrotrope. *Science* 2017; **356**: 753–756.
- 27) Rice AM, Rosen MK. ATP controls the crowd. *Science* 2017; **356**: 701–702.