魚の死後経過に伴うミオシン区蛋白の変性—Ⅲ.

ミオシン区蛋白のゲル化

鈴木たね子・神名孝一

(1963年7月5日受理)

POST-MORTEM CHANGE OF FISH MYOSINS—III.
GEL-FORMATION OF MYOSINS FRACTION

Taneko SUZUKI and Kōichi KANNA*

It was found that the myosin fraction of fish muscle in full rigor or post rigor extracted with a salt solution turned into gel. The present paper deals with the effect of various factors, such as species of fish, extractants and the water soluble components of the muscle, on the gel formation.

The species of fish was apparently one of the factors, as the extracts from white meat fish, such as carp, sea-bream and flatfish became gel, while those from yellowtail and mackerel did not (Fig. 1). The presence of K_2HPO_4 , on the other hand, seemed to be essential for the formation of gel as shown in Table 1.

Although the gel formation was never observed when the muscle was previously treated with water (Fig. 2), it was induced by the addition of the heat-stable fraction in the water extracts (Fig. 3).

When the gel-forming myosin and the supernatant solution separated from gel were respectively examined in regard to the ATP-sensitivity and ultracentrifuge pattern, the results indicated that the both fractions consisted of actomyosin and myosin (Figs. 5, 6). Although these experiments could not clarify characteristic differences between the gel-forming myosins and supernatant, interactive forces of the gel-myosins particle seemed stronger than the forces of the supernatant myosins.

死後経過時間の異なる魚肉（硬直前の肉，硬直の肉，解硬の肉）からミオシン区蛋白を抽出して，その物理化学的性質が死後どのように変化するかを，前報においては主として，粘度¹⁾およびATP-感度²⁾の変化から検討を行なった。ミオシン区蛋白のこのような物理化学的性質の変化のほかに，一定組成の塩類溶液で肉を抽出すると，死後ある時間経過した魚肉から抽出されるミオシン区蛋白がゲル化する現象を見出した。しかもこの現象は死後の変化につれて，非常に明瞭に現われることから，死後のミオシン区蛋白の変性をしらべる一つの有力な手がかりになると考え，種々の検討を行なった。

実験方法

(1) 実験材料 主として，コイを用い，この外，活魚として入手しうる海産魚を用いた。いずれも水からあげ直ちに断頭して殺した。2, 3の例では，水からあげて空气中に放置して自然死に至らせた。報文中前者を即殺，後者を苦悶死として区別した。

(2) 試料の保存方法 硬直前の肉としては，殺した直後の魚体からとった筋肉を用い，その魚体を3～

* 東海区水産研究所 (Tokai Reg. Fish. Res. Lab., Chuō-ku, Tokyo, Japan.)

** 東海区水産研究所業績 B 第 390.

Fig. 1. Gel-formation of salt-solution extracts from different fishes.

* Instantly killed by decapitation.

** Killed in struggle by leaving in air.

Fishmuscle were extracted with salt-solution (A...0.6 M KCl solution, B...Phosphate buffer solution) and centrifuged.

は、緩衝作用がないので、pH が変化する欠点があり、この改良のために、しばしば KCl-リン酸塩緩衝液 (A 液...0.5 M KCl に KH_2PO_4 を 0.1 M になるよう溶かす。B 液...0.5 M KCl に K_2HPO_4 を 0.1 M になるよう溶かす。A 液、B 液を合せて pH 6.9 に調整したイオン強度 0.8 の抽出剤を 0.6 M KCl に代用

5°C に冷蔵し、1 日経過したものは、完全に硬直を起こしているのので、この魚体から硬直期の試料を採取した。またこの状態で 3~4 日保存すると魚体はほとんど解硬し、この時期の筋肉を採取し、解硬後の試料とした。

(3) ミオシン区蛋白の抽出

肉に 10 ないし 20 倍量の、イオン強度 0.6~0.8, pH 6.9 の塩類溶液 (実験結果の項で詳細に記述する) を加え、1 分間ブレンダー抽出の後に、7000 回転で 30 分間遠心分離を行なった。蛋白濃度は、ビュレット法によつて測定したが、たびたびキエルダール法を併用しビュレット法による値に補正を加えた。

(4) ATP 感度の測定 前報²⁾

にもとづき蛋白濃度を種々変化させて、それぞれの濃度における ATP の感度をもとめ、濃度 C を 0 に外挿したときの ATP 感度をもつて表わした。

(5) 沈降分析 日立分析用超遠心機を用い一定濃度 (1 ml 中窒素として約 1 mg) の蛋白溶液を 1 分間 5 万回転で遠心し、約 60 分の間 5 分間隔で沈降をしらべた。沈降定数は SVEBEG の単位 S_{20} で示した。

実験結果

(I) ミオシン区分がゲル化する条件

a. 魚種および鮮度の影響……

われわれは、従来まで、ミオシン区蛋白の抽出に、0.6 M KCl を用い、1 分間ブレンダー抽出を行なっていたが、この抽出剤において

した。しかし、この緩衝溶液を用いて、死後ある時間経過した肉を抽出すると、抽出液の1部がゲル状になる。この現象を、死後経過時間の異なる種々の魚種について、しらべた結果、Fig. 1 のようになった。この図で明らかなことは、0.6 M KCl で抽出した場合は、ゲルが生成しない。また磷酸緩衝液を用いて抽出すると、苦悶死のタイを除いて、硬直前の肉では、ミオシン区分のゲル化は起こらない。しかし、硬直、解硬肉では、ある魚種のものは、ゲル化を起こし、ある魚種では、ゲル化を起こさない。ゲル化を起すものは、コイ、タイ、ヒラメ、アジであり、ゲル化しないものはイナダ、サバである。タイの場合、苦悶死させたものは硬直前でも、ゲル化現象が起こっている。

b. 抽出剤の影響……このようなミオシン区分のゲル化の原因を検討するために、まず考えられるのは、0.6 M KCl はイオン強度 $I=0.6$ であるが、KCl-磷酸緩衝液は $I=0.8$ となるので、ゲル化するのは、抽出剤のイオン強度の差ではなかろうかと考えられる。これを検討するために、同じくイオン強度 0.8 の KCl 溶液を用いて、硬直期のコイ肉を抽出したところ、Table 1 で明らかなように、0.8 M KCl で抽出してもゲル化が起こっていない。それでは磷酸緩衝液でゲル化が起こるのは、 HPO_4^{--} または H_2PO_4^- の作用と考え、Table 1 に示したような種々の磷酸塩と KCl または NaCl との混液 ($I=0.8$, pH 6.9 に HCl または KOH を用いて

Table 1. Gel-formation of the extracts by different solution (pH 6.9) from carp.

No.	Salt solution	Gel-formation
1	0.6 M KCl	—
2	0.8 M KCl	—
3	0.5 M KCl+0.1 M K_2HPO_4	+
4	0.5 M KCl+0.1 M KH_2PO_4	—
5	0.6 M NaCl	—
6	0.8 M NaCl	—
7	0.5 M KCl+0.1 M Na_2HPO_4	—
8	0.5 M KCl+0.1 M NaH_2PO_4	—
9	0.5 M NaCl+0.1 M K_2HPO_4	+
10	0.5 M NaCl+0.1 M KH_2PO_4	—

Fig. 2. Procedures followed to test for the effects of water extracts from full rigor muscle on gel-formation of KCl- K_2HPO_4 extracts.

Fig. 3. Procedure followed to test for the effects of water extracts and boiled water extracts from rigor muscle on gel-formation of KCl- K_2HPO_4 extracts.

調整)を作つて、抽出を行なつた。その結果、 K_2HPO_4 が存在する溶液で抽出したときのみゲル化が起こることが明らかとなつた (Table 1)。

c. 水溶性区分の影響……硬直期のコイをあらかじめ水で抽出して、その残渣に $KCl \cdot K_2HPO_4$ の混液を加えブレンダーで抽出するとゲル化が起きない (Fig. 2)。しかし、Fig. 3 のように水で抽出した残渣を3つにわけて、1つは対照として、残渣に $KCl \cdot K_2HPO_4$ 混液を、他は $KCl \cdot K_2HPO_4$ 混液と水抽出液を加え、残りの1つには水抽出液を $100^\circ C$ で2分間加熱して、蛋白質を凝固させ、汙過した汙液を加えた。各々をブレンダーで抽出すると、肉の水抽出液およびその加熱したものを水抽出残渣に加えたものは、ゲル化現象がみられた。すなわち、ミオシン区蛋白のゲル化には、肉の水溶性区分の存在が必要であり、しかも、水溶性区分を加熱して加えても有効であるところから、ゲル化を起こすに必要なものは水溶性区分の中の加熱によつて凝固するような高分子物質ではない。そこで $KCl \cdot K_2HPO_4$ 溶液で抽出して、ゲル化を起こさないよ

Corp muscle (pre rigor), 20 g
add S_1^* , 100 cc and 1.0 M KCl
+0.2 M K_2HPO_4 , 100 cc,
Homogenize, 1 min.
Centrifuge, 7000 r.p.m. 30 min.

Ppt. Supernatant
 solution

* See Fig. 2

Fig. 4. Procedures followed to test the effects of water extracts from full rigor muscle on gel-formation of $KCl \cdot K_2HPO_4$ extract.

うな硬直前の肉でも、硬直中の肉の水抽出物が存在したらあるいはゲル化を起こすのではないかと考えられるので、Fig. 4 に示すような抽出方法を行なつた。すなわち、硬直肉のミオシン区分をゲル化させる1つの要因である硬直肉の水抽出物を硬直前の肉に加え、 $KCl \cdot K_2HPO_4$ 溶液で抽出した。しかしながらミオシン区分は硬直肉の水抽出物を加えても全くゲル化を起こさなかつた。

(II) 生成したゲルの性質

a. 流動復屈折および ATP 感度……硬直、お

Fig. 5. ATP-sensitivity of gel like sediment and supernatant solution of $KCl \cdot K_2HPO_4$ extract from carp.

よび解硬後のコイ肉（いずれも即殺）を $\text{KCl} \cdot \text{K}_2\text{HPO}_4$ 混液で抽出し、えられたゲル状の部分と澄明な部分とをわけて、これを各々蒸留水に対して一昼夜 0°C 近辺で透析を行なった。透析により、上澄液は透明寒天状になり、これと同量の 1.2 M KCl にすみやかにとけ、さらに 0.6 M KCl を追加して、一定濃度の蛋白溶液をつくつた。ゲルの区分はこれを透析すると、不透明乳白色の寒天状となり、これを同量の 1.2 M KCl にとかし、さらに 0.6 M KCl を追加して均質な溶液をつくつた。これらの試料について流動複屈折(SB)を測定するとともに ATP-感度を測定した。Fig. 5 は、ATP-感度測定のためそれぞれの溶液に ATP を添加して還元粘度を測定したものである。Fig. 5 から、上澄液の固有粘度 $\left(\frac{\ln \eta_r}{c}\right)_{c \rightarrow 0}$ は 1.64 、これに ATP を加えると、固有粘度 $\left(\frac{\ln \eta_r}{c}\right)_{c \rightarrow 0}^{\text{ATP}}$ は、 1.0 となるので、次の計算から $\frac{1.64-1.00}{1.00} \times 100 = 64$ となり、ATP 感度は 64 、同様な計算によつて、ゲル区分の ATP 感度は 54 となる。いずれの区分も ATP の添加によつて、相当につよい反応があることがみとめられた。Fig. 5 から、ゲル区分では $\frac{\ln \eta_r}{c}$ が c

Fig. 6. Ultracentrifugal pattern of gel like sediment and supernatant solution of $\text{KCl} \cdot \text{K}_2\text{HPO}_4$ extract from carp.

50,000 r.p.m. for 16 min.

S...Supernatant solution

G...Gel like sediment

Fig. 7. Ultracentrifugal pattern of gel like sediment and supernatant solution and $\text{KCl} \cdot \text{K}_2\text{HPO}_4$ extract from carp.
40,000 r.p.m. for 1 min.
S...Supernatant solution G...Gel like sediment

に依存する度合いが、上澄区分とくらべて、はるかに強いことがみられた。

SB は測定した濃度ではゲル区分にも上澄液にも明瞭にみられた。

b. 沈降分析……Fig. 6 は、5 万回転で 16 分回転したときの沈降分析図である。主な成分は、図中 1 および 2 のピークを示すもので、この外、g は *gel-fraction* と呼ばれるもので、粒子が非常に大きく、回転短時間で沈降する。1 および 2 の成分はどの区分にもみられる。Fig. 7 は、*gel-fraction* だけを明らかに示すために 1 分間 4 万回転になつたときの沈降分析図でスタートから約 5 分後のものである。図中 g は *gel-fraction* を示し、S すなわち生成するゲル状部分を抽出液からのぞいた上澄液では *gel-fraction* が少ないが、ゲル状部分には *gel-fraction* が非常に多量にみられるのが特徴である。

考 察

(I) ゲルのできる条件について

(1) ミオシン区蛋白がゲル状となることの条件について整理してみると、第 1 にゲル状となるのは、自身の魚といわれているものに多く、サバ、ブリなどではできない。肉がかまぼこになるものはゲル状となる

が、かまぼこができないような魚種の肉では、ゲルを生成しない傾向があるともいえる。死んですぐのいわゆる未硬直肉ではゲルができない。すなわち、硬直、解硬肉にのみ生成する。

(2) Table 1 から、ゲル化が起こるには、0.5 M KCl に K_2HPO_4 を 0.1 M とかした溶液、または、0.5 M NaCl に K_2HPO_4 を 0.1 M 加えた溶液で抽出した場合のみ、ゲル化が起つてることがわかる。おもしろいことに、 K_2HPO_4 の代りに KH_2PO_4 を代用したり、あるいは、 Na_2HPO_4 または NaH_2PO_4 を代用してもゲル化は起こらない。このような事実は、 K_2HPO_4 の存在の必要は、その K^+ や HPO_4^{--} の作用のためではないように思われる。その理由について納得のゆく説明はしにくい、 K_2HPO_4 は分子として作用し、ゲル化を起こす要因となつてゐるのではないかと思われる。すなわち K_2HPO_4 の分子効果と推定したい。

(3) あらかじめ肉を水で抽出しておいて、その残渣に $KCl \cdot K_2HPO_4$ を用いて抽出してもゲル化が起きない。このことは次のように考えられる。(i) 水にとけてくるものすなわち水溶性蛋白がゲル化する。(ii) 水にとけるものに、ミオシン区蛋白をゲル化させる要素Xが存在している。(i) については、生成するゲルの沈降分析、SB、ATP 感度をしらべて、ゲル状区分はミオシン系蛋白であることが証明されたので水溶性蛋白がゲル化するのではないことがわかる。(ii) については、これにさらに2つの考え方がある。水で抽出されるゲル生成要素Xは、高分子のもの、たとえば、硬直中、解硬後の時期に変性して水にとけるようになった蛋白、あるいは低分子のもの、たとえば肉の解糖作用によつて生成される物質かである。しかしながら水抽出液を、100°C に加熱し、蛋白を熱凝固させて、汙別し、その汙液を水抽出残渣に加えてもゲルが生成するので、ゲル生成要素Xは蛋白質以外の低分子のものと考えられる。

(4) の条件……もし以上の推論から、硬直中、あるいは解硬後の肉にミオシン区分をゲル化させる要素Xが生成するとすれば、硬直前のゲル化を起こさない肉に、硬直、解硬肉の水抽出物を加えて、 $KCl \cdot K_2HPO_4$ 溶液で抽出するとミオシン区蛋白のゲル化が起こつてもよいが実際には起こらない。このことはただ単にゲル化には要素Xの存在だけではなくて、ゲルとなるミオシン区蛋白自体も硬直、解硬時にある変性を起こしていることが推察される。そのようにある変性を起こしたミオシン区蛋白が、要素X、 K_2HPO_4 の存在によつて、ゲル状となり、未変性蛋白（ゲルを起こさない方の蛋白をかりにこう呼べば）と分離するのであろう。

苦悶死した魚（タイの例）は、死直後の未硬直肉でもゲルの生成がみられるのは、生前の状態が、死後の蛋白変性に影響をおよぼすためであろう。著者ら³⁾ はすでに、ミオシン区蛋白の粘度の変化が苦悶死魚と、即殺魚と違つてゐることを報告しており、また右田、大竹⁴⁾ は、苦悶死コイと、即殺コイの、ミオシン区蛋白の塩析分析図が明らかに違つてゐることをみている。

(II) 生成したゲルの性質

ゲル状部分および上澄液の SB はいずれもプラスでありまた両者とも明らかな ATP 感度を示す。両区分の沈降分析図から、成分1の山はアクトミオシン、成分2の山はミオシンと思われるが、山の高さはそれぞれの区分によつて大きく相違している（使用した蛋白濃度は近似している）がこれらの論議については、さらに実験の回数を重ねてからにしたい。各々成分の沈降定数Sは試料によつてみな多少相違している。用いる試料の蛋白濃度が一定であつても、蛋白濃度Cと沈降定数Sとの関係は、試料によつて違う⁵⁾ ので濃度Cを0に外挿した S_{20} を求めて、その S_{20} について論じなければならないので、ここでSの大小相違について考えるのはさけたい。いずれにしてもここに得られるゲル区分と上澄区分はいずれもミオシン系蛋白すなわちミオシン、アクトミオシンを含有していることを疑う余地はない。ELLIS および WINCHESTER⁶⁾ が解硬魚肉の沈降分析図で4つの成分とその他に *gel-fraction* と呼んでいる非常に速く沈降する成分をみている。Fig. 4 でわかるように、上澄液にくらべ、ゲル区分には、いわゆる *gel-fraction* が多い。ELLIS⁶⁾ らによるとこの *gel-fraction* はアクトミオシンを含有しているといわれているが、われわれが分離したゲル状部分の主な成分がこの *gel-fraction* の方にあるかどうかの問題は今後検討したい。抽出液の上澄液部分にも ELLIS らのいう *gel-fraction* は相当にみられている。

またゲル状部分の蛋白と上澄液の蛋白との性質の相違は、今回の実験でたしかめられなかつたが、その一端をうかがい知るものとして、ATP 感度を測定した際に、 $\frac{\ln \eta_r}{c} \sim c$ の関係が、ゲル状部分と上澄液とで

相達し、ゲル状部分では $\frac{\ln \eta_r}{c}$ の濃度依存性が大で、これは粒子間の相互作用の強いことを示していると考えられる。

む す び

死後一定時間経過した魚肉から2種類のアオシン区蛋白を分離できた。ゲル状とならないところのいわゆる上澄液のアオシン区蛋白が、死直後のゲル化しないアオシン区蛋白と同じであるかどうかはわかつていない。もし、死後変性をしたものだけがゲルとなつて分離されてくるものとすれば、変性蛋白と未変性蛋白の性質の相達をしらべるることによつて、死後のアオシン区蛋白の変性の問題についてもつと明瞭な答が得られるであろう。なぜならば従来までこの種の研究においては、いわゆる未変性蛋白と、いわゆる死後変性した蛋白の混合物の性質を追つていたからである。

要 約

1. 魚肉を $\text{KCl-K}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ 緩衝液 ($I = 0.8$ pH 6.9) で抽出すると、抽出液がゲル状となることがあり、このような現象を起こすのは、いわゆる白身の魚コイ、タイ、ヒラメなどの硬直ならびに解硬肉である。
2. ゲル化を起こすには、 K_2HPO_4 の存在が必要で、抽出剤として KCl と K_2HPO_4 の混液、または NaCl と K_2HPO_4 の混液を使用しなければならない。 Na_2HPO_4 あるいは KH_2PO_4 を K_2HPO_4 に代用してもゲル化は起こらない。
3. 硬直(解硬)肉をあらかじめ水で抽出して、その残渣に $\text{KCl-K}_2\text{HPO}_4$ 溶液を加えて抽出しても、ゲル化は起きない。
4. 硬直(解硬)肉をあらかじめ水で抽出して、その残渣に、水抽出液、あるいは、水抽出液を加熱して濾過したものを加え $\text{KCl-K}_2\text{HPO}_4$ で抽出するとゲル化が起る。ゲル化の生成には水で抽出されるある種の低分子物質が必要である。
5. 硬直(解硬)肉の水抽出物を未硬直肉に加え、 $\text{KCl-K}_2\text{HPO}_4$ で抽出してもゲル化は起こらない。肉の蛋白自身もある変性を起こしていることがゲル化の生成に必要なである。
6. ゲル区分と上澄液をそれぞれ水に対して透析し、透析したものをそれぞれ ATP 感度、流動複屈折を測定した結果、両区分に明瞭に流動複屈折がみられ、また強い ATP 感度を示した。
7. ゲル区分および上澄液区分の沈降分析図から、両区分は、アクトアオシンおよびアオシンを含有していることが明らかとなつた。

本研究を行なうにあたり御指導をいただいた日本女子大学教授右田正男先生に厚く御礼申上げる。

文 献

- 1) 鈴木たね子・右田正男: 本誌, 28, 61 (1962).
- 2) 鈴木たね子: 本誌, 29, 161 (1963).
- 3) 右田正男・鈴木たね子: 本誌, 27, 774 (1961).
- 4) 右田正男・大竹茂夫: 本誌, 26, 140 (1960).
- 5) 神名孝一: (未発表).
- 6) D. G. ELLIS and P. M. WINCHESTER: *J. Fish. Res. Bd. Canada*, 16, 33 (1959).