南極産オキアミの筋肉蛋白質について

関 伸 夫・小沢竜太郎・新井 健 一

(1975 年 8 月 11 日受理)

Studies on Muscle Proteins of Antarctic Krill

Nobuo SEKI*, Ryutaro OZAWA*, and Ken-ichi ARAI*

The whole bodies of the Antarctic krill, *Euphausia superba*, were quickly frozen at -40°C in a contact freezer and stored at -20°C for 6-8 months. The total krill protein was solubilized with 1% SDS-8M urea-1% 2-mercaptoethanol-20 mM phosphate buffer (pH 7.2) at 25°C . Elution patterns of the total protein by gel filtration in the presence of SDS suggested that actomyosin was the main constituent of krill muscle proteins. The total protein in the whole krill was estimated as 13.0 g per 100 g. After 20-hr storage at 4°C , it decreased to 8.6 g per 100 g, and the ratio of the water-soluble to total protein increased markedly, suggesting the presence of an active protease in the homogenate.

Carp actomyosin added to the krill homogenate was also rapidly decomposed to lower molecular weight proteins during the incubation. The decomposition of actomyosin was effectively inhibited by a trypsin inhibitor. The actomyosin was successfully prepared from raw frozen krill by use of a trypsin inhibitor. A similar decomposition of krill muscle proteins may occur during handling and processing of raw frozen krill.

近年、南極産オキアミを新しい蛋白質資源として開発するための資源調査や漁獲方法についての研究が活発に行なわれており、^{1,2)} また利用加工面における基礎研究も進められている。³⁾ オキアミの体蛋白質は栄養価の点からは魚肉や獣肉などの動物性蛋白質にくらべて遜色はなく、^{3,4)} 冷凍品、すり身、食用ソリュブル等への利用も考えられているが、食品化への方向付けをするまでには至っていないようである。その原因の一つは、オキアミの体蛋白質の種類や性状に関する基礎的研究が少なく、加工適正への判定を困難にしているためと思われる。

著者らの研究室では、魚肉の品質に筋肉構成蛋白質の主成分であるアクトミオシンの性状がしばしば反映していることを明らかにしてきた。⁵⁾ そこでまずオキアミからアクトミオシンを調製して、その性状を明確にしたいと考えたが、オキアミから常法⁶⁾ によつてアクトミオシンを調製することは極めて困難であり、その理由の一端として、オキアミ体蛋白質に対するプロテアーゼ活性の影響があげられ、このプロテアーゼ活性を抑制することがアクトミオシン調製上必要なことが明らかにされたので、ここに報告する。

実 験 方 法

試料 供試したオキアミ (体長 3.5~4.5 cm) は海洋資源開発 センターが昭和 48 年度に南極海で実施した調査²⁾ で漁獲したものの一部で、漁獲場所は $56^{\circ}33'S$, $20^{\circ}68'E$ である。漁獲後全個体 (殻付き) のままコンタクトフリーザーにより -40°C 、6 時間ブロック凍結したのち、 -20°C に保蔵した (生凍結試料)。一部の試料は漁獲後 90°C の海水中で 2~3 分間煮熟したのち、同様に凍結保蔵した (煮熟凍結試料)。本

* 北海道大学水産学部生物化学教室 (Laboratory of Biochemistry, Faculty of Fisheries, Hokkaido University, Hakodate)

実験には 6~8 ヶ月間凍結保蔵されたものを使用した。

試薬 SDS (sodium dodecyl sulfate) は半井化学薬品の蛋白質研究用を, トリブシンインヒビターは Sigma の Type II-O (Ovomucoid) を使用した。

オキアミ蛋白質の可溶化と定量 生凍結試料 (通常 10 g) は, あらかじめ煮沸浴中で 2 分間加熱したのち, また煮熟凍結試料はそのまま 20 倍量の 8 M 尿素-20 mm リン酸バッファー (pH 7.2) を加え, 日本精機ユニバーサルホモジナイザーで 30 秒間ホモジナイズした。これに終濃度がともに 1% になるように, SDS と 2-メルカプトエタノールを添加し, 室温 (25~30°C) で一夜攪拌して蛋白質を可溶化した。ついで 20,000×g, 10 分間遠心分離して得られた上清を 0.1% SDS-5 mm リン酸バッファー (pH 7.2) に室温で透析した。透析後, 蛋白質量を牛血清アルブミンを標準にしてビュレット法によつて求めた。

蛋白質組成 オキアミ蛋白質のサブユニット組成を SDS-ゲル洩過法と SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法によつて分析したが, これらの方法については既報⁷⁾ にしたがった。

オキアミホモジネート貯蔵中の体蛋白質組成の変化 前記した生凍結試料に 10 倍量の低イオン強度リン酸バッファー ($I=0.05$, pH 7.5) を加え, 30 秒間ホモジナイズした。ホモジネートを一定量づつ分注して 4°C の冷蔵庫中に貯蔵した。一定時間毎に, ホモジネートの 1/10 量の 60% HClO₄ を加えたのち, これを透析チューブに移し, 水に透析して酸を除去した。以後の操作は室温で行なつた。透析外液を 8 M 尿素-1% SDS-1% 2-メルカプトエタノール-10 mm リン酸バッファー (pH 7.2) に交換して蛋白質を可溶化させ, さらに 0.1% SDS-5 mm リン酸バッファー (pH 7.2) に透析したのち, 蛋白質量を求め, これを全蛋白質量とした。一方別にホモジネートを一定時間毎に 20,000×g, 20 分間遠心分離し, 得られた上清のみを上述のように処理して蛋白質量を求めたものを水溶性蛋白質量とした。

オキアミ粗酵素液によるコイアクトミオシンの分解 生凍結試料を 10 倍量の 20 mm Tris-maleate (pH 7.0) でホモジナイズし, 20,000×g, 20 分間遠心分離して得た上清をプロテアーゼ粗酵素液とした。アクトミオシンはコイ背筋より常法⁸⁾ により調製した。酵素反応は反応液 1 ml 当りコイのアクトミオシン 5 mg, 粗酵素液 0.14 ml (粗酵素 0.5 mg 相当), 0.6 M KCl-20 mm Tris-maleate (pH 7.0), 25°C で行なつた。アクトミオシンの消化は溶液の粘度低下をオストワルド型粘度計により測定して求めた。トリブシンインヒビターは使用直前に 20 mm Tris-maleate (pH 7.0) で 3.0 mg/ml に調製して用いた。

オキアミアクトミオシンの調製 生凍結のオキアミの頭部を除去し (以下無頭個体と呼ぶが, 殻付きである), 5 倍量の 0.25% トリブシンインヒビターを含むリン酸バッファー (pH 7.5, $I=0.05$) を加え, 15 秒間ホモジナイズした。8,000×g, 5 分間遠心分離して得た残渣を 5 倍量の 0.1% トリブシンインヒビターを含むリン酸バッファーにサスペンドし, 遠心分離して洗浄した。この洗浄をさらに 2 回行なつた後, 始めのオキアミ重量の 3 倍量の 0.1% トリブシンインヒビターを含む 0.6 M KCl-リン酸バッファー (pH 7.5) を加えて攪拌し, 氷冷下で 2 時間抽出した。20,000×g, 20 分間遠心分離し, 上清を 10 倍量の水で稀釈し, 得られた沈殿を 0.05% トリブシンインヒビターを含む 0.6 M KCl に溶解し, 0.6 M KCl-20 mm Tris-maleate (pH 7.5) に透析した。20,000×g, 20 分間遠心分離して上清をアクトミオシンとみなした。得られたアクトミオシンについて Ca²⁺-ATPase 活性, ATP 感度の測定, および超沈殿の観察などを行なつた。⁹⁾

実験結果

オキアミのアクトミオシンを得るために, はじめは全個体から, 魚類筋肉アクトミオシンの調製法⁸⁾ にしたがつて, 0.6 M KCl によつて抽出したが, 稀釈沈殿後には極めて少量の蛋白質が得られるにすぎなかつた。この原因を明らかにするために, まずオキアミの蛋白質組成を SDS-ゲル洩過によつて検討した。生凍結試料の全個体と無頭個体につき, それぞれを既述の方法で可溶化したのち, SDS-ゲル洩過に供し, その結果を Fig. 1 に示した。8 M 尿素-1% SDS-1% 2-メルカプトエタノール-20 mm リン酸バッファー (pH 7.2) によつて可溶化された体蛋白質が, オキアミの全体蛋白質を代表しうるかどうかにについては問題が残

るが、本方法で可溶化された蛋白質量を測定すると、生凍結試料全個体については 13.0%, 煮熟凍結試料については 14.2% を占める。この量はケルダール法に基づく築瀬⁷⁾の分析結果と良く合うので、本方法により、オキアミの体蛋白質はほぼ完全に抽出されたと考えられる。

Fig. 1 の全個体および無頭個体の溶出図は、ともに 3 つのピークから成る。それらの量比は溶出順に、全個体については 42, 24, 34%, 無頭個体では 60, 20, 20% となっていた。続いて Fig. 2 は煮熟凍結試料について全個体と無頭個体の SDS-ゲル透過図を示したものである。Fig. 1 と Fig. 2 に示されているように、両者のそれぞれのパターンは良く似ており、特に無頭個体の溶出図は生凍結、煮熟凍結試料ともに、魚肉について得られたアクトミオシン型のパターン⁷⁾と酷似しており、オキアミ筋肉蛋白質の主成分がアクトミオシンであることを示唆している。最初のピークは主としてミオシンのサブユニットである heavy chains に由来するのであるが、全個体では無頭個体にくらべて、このピークが小さく、最後のピークの比率が高くなっており、これらのことはアクトミオシン以外の低分子量の蛋白質も可成り存在することを示唆している。

生凍結試料中にアクトミオシンが存在することはそのサブユニット組成から明らかと思われるが、次にオキアミのホモジネート中の体蛋白質組成の経時的变化を検討し、Table 1 の結果を得た。ホモジネートとした直後のオキアミ全個体の蛋白質の全量は 100 g 当り 13.0 g であり、このうち 34% が水溶性蛋白質であつた。残りはほぼ塩溶性蛋白質と考えられる

ので、アクトミオシンの量は全蛋白質量の 60% 程度と推定される。このホモジネートを 4°C で 5 時間放置しておく、全蛋白質量は始めの 87% に低下し、20 時間後には 66% となつた。一方水溶性蛋白質の全蛋白質量に占める割合は時間とともに増加し、20 時間後には全蛋白質量の約 70% に及んだ。以上の結果はオキアミホモジネート中の蛋白質が

Fig. 1. Elution patterns of the body protein from raw frozen krill by Sephadex G-200 gel filtration in the presence of SDS.

The frozen krill was homogenized and solubilized with 8M urea-1% SDS-1% 2-mercaptoethanol-20 mM phosphate buffer (pH 7.2) at 25°C. The amount of protein applied was 30 mg each. A column (2×90 cm) was equilibrated with a 0.1% SDS-5 mM phosphate buffer (pH 7.2) and eluted with the same solution at 25°C. Fractions of 4.8 ml were collected. Voil volume indicated by the arrow. ●—●, protein from whole body; ○---○, protein from be-headed body; △—△, protein from whole body which was homogenized in phosphate buffer (pH 7.5, $I=0.05$) and left for 5 hr at 4°C, and then solubilized as above.

Fig. 2. Elution patterns of the body protein from pre-cooked frozen krill by Sephadex G-200 gel filtration in the presence of SDS.

Krill samples were boiled in sea water at 90°C and then frozen. The other experimental conditions were the same as shown in Fig. 1. ●—●, protein from whole body; ○---○, protein from be-headed body.

Table 1. Changes in amount of protein in krill homogenate*¹ during storage at 4°C

Storage time (hr)	Total protein* ² (g/100 g of whole body)	Percent of water soluble protein* ³ (%)
0	13.0	34.4
5	11.3	54.4
20	8.6	69.5

*¹ Prepared by homogenizing whole bodies of krill in 10 volumes of phosphate buffer (pH 7.5, $I=0.05$).

*² Estimated by biuret reaction after solubilization with 1% SDS-8M urea-1% 2-mercapto-ethanol-10mM phosphate buffer (pH 7.2) and dialysis against 0.1% SDS-5mM phosphate buffer (pH 7.2).

*³ The protein in the supernatant obtained from the homogenate, as estimated by biuret reaction.

Fig. 3. Digestion of carp actomyosin with krill protease.

Whole bodies of raw frozen krill were homogenized in 20mM Tris-maleate (pH 7.0) and centrifuged at 20,000 $\times$ g for 20 min. The supernatant was used as crude protease solution. The reaction mixture contained 5mg of actomyosin, 0.14ml of crude krill protease solution (equivalent to 0.5mg crude enzyme) per ml of 0.6M KCl-20mM Tris-maleate (pH 7.0). The digestion was carried out at 25°C with or without trypsin inhibitor. The enzyme to trypsin inhibitor ratios were 100:1 (Δ — Δ), 10:1 ($\bullet$ — $\bullet$), 1:1 ($\circ$ — $\circ$), and 1:2 ($\times$ — $\times$). The extent of digestion was estimated with a 2ml-Ostwald type viscometer (outflow time = 36 sec for solvent). $\blacktriangle$ — $\blacktriangle$, without inhibitor; $\blacksquare$ — $\blacksquare$, control; $\square$ — $\square$, with the supernatant from carp muscle homogenate.

Fig. 4. Elution patterns of krill actomyosin by Sephadex G-200 gel filtration in the presence of SDS.

Actomyosins were prepared from be-headed krill in the presence (A, $\circ$ — $\circ$) and absence (B, $\bullet$ — $\bullet$) of trypsin inhibitor, respectively. Conditions for gel filtration were the same as shown in Fig. 1. The inserted figures are the SDS-polyacrylamide gel electrophoretic patterns using 0.1% SDS-10% gels.

4°C に放置中、消化分解され、まず水溶性の蛋白質に変り、さらに低分子化の進んだ一部は透析膜を通過して失われたことを示唆している。4°C で5時間放置した後のホモジネートの蛋白質組成を SDS-ゲル透過で調べると (Fig. 1. Δ — Δ)、明らかにミオシン heavy chains の含量の低下と低分

子化がわかる。また全体的に低分子量の蛋白質への移行増大が認められた。以上の事実はオキアミの体蛋白質がおそらく消化管に由来するプロテアーゼによつて分解されたことを示唆している。そこで次に、生凍結試料のホモジネートをプロテアーゼ粗酵素液とみなして、コイのアクトミオシンに加えその分解能を調べた。その結果はFig. 3 に示すように、コイのアクトミオシンはオキアミの粗酵素液によつて極めて速やかに消化分解され粘度低下を起こすことが認められた。またカゼインの分解活性⁹⁾はオキアミ頭部に強く、筋肉ではほとんど検出されない。したがつて、オキアミのアクトミオシンは試料をホモジネートにしたときに、消化管より混入するプロテアーゼにより分解される可能性が強い。またオキアミプロテアーゼの活性は、トリプシンインヒビターにより阻害されることも確かめられた。

以上の結果を総合すれば、全個体からではなく、あらかじめ頭部を除去したオキアミからアクトミオンを抽出すれば消化管由来のプロテアーゼの混入を少なくできるので、アクトミオンが収量よく得られると考えられるが、実際に試みた結果、得られたアクトミオンは可成りの分解をうけていることを知つた (Fig. 4, B)。そこでアクトミオシンの調製に用いる溶媒中にトリプシンインヒビターを添加した。この方法により頭部を除去したオキアミ全個体 10 g から、およそ 120 mg の蛋白質が得られた。このものは SDS-ゲル濾過および SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によると Fig. 4, A に示したように、典型的なアクトミオシンのパターンを示した。このゲル濾過から求めたアクチンとミオシン heavy chains の重量比は約 1:3.7 であつた。また Ca^{2+} -ATPase の比活性は弱く $0.02 \mu\text{moles Pi/min/mg}$ 、かつ固有粘度は $0.1\text{M KCl-20 mm Tris-maleate (pH 7.5)}$ 中 10°C で 1.2 dl/g であつた。しかし、ATP 感度は 5、超沈殿性は陰性で、 Mg^{2+} -ATPase の活性は検出されなかつた。これらの生理活性の測定結果はアクトミオンとしての特性を欠くものであつた。

考 察

オキアミ筋肉の主要構成蛋白質が、他の動物筋肉と同様にアクトミオンであることは、各種条件下の抽出液の SDS-ゲル濾過、および SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によつて得られた蛋白質のパターンから明らかである。生凍結オキアミを解凍しホモジネートにしたときには、 4°C の低温下でも 5 時間でアクトミオン由来のパターンが失われ、水溶性蛋白質区分が増大してくることが示されたが、このことは、生凍結試料の方が煮熟凍結試料にくらべてドリップの生成量が多いこと、およびアミノ態窒素含量が高いこと⁹⁾にも関連があろう。これらの現象はオキアミのプロテアーゼによつて体蛋白質が分解されることを示すものである。本来甲殻類の中腸腺にはトリプシン様酵素が汎く存在していることが知られている。¹⁰⁾ オキアミの場合も、トリプシンインヒビターでアクトミオシンの分解が可成り阻害されるので、トリプシン様酵素の存在が予想される。甲殻類のトリプシン様酵素は弱アルカリ溶液中では極めて安定であり、また至適 pH も中性～弱アルカリ域にあることが知られている。¹¹⁻¹³⁾ オキアミの肉質の pH は弱アルカリ性であり、¹⁴⁾ したがつてこの種の酵素は安定で、しかも作用しやすい条件にあるといえる。またトリプシン様酵素は $50^\circ\sim 60^\circ\text{C}$ で変性失活を始めるので、煮熟凍結はオキアミプロテアーゼによる蛋白質の分解損失を防止する上から有効な方法である。今後加熱変性した蛋白質を利用加工に供するための検討も必要であらう。一方オキアミのソリュブル化¹⁴⁾も試みられているので、この目的からもオキアミプロテアーゼについての詳細な研究が望まれる。

本実験では、生凍結試料からアクトミオンをトリプシンインヒビターの存在下で抽出してはじめて SDS-ゲル濾過および SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動的に典型的なアクトミオシンのパターンを示すものが得られた。特に SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動のパターンは、即殺したトヤマエビから調製したアクトミオン*、あるいはイセエビのアクトミオン¹⁵⁾のパターンと極めて良く似ていた。一方、アクトミオシンの Ca^{2+} -ATPase 活性、ATP 感度、超沈殿性など、生理活性的には極めて劣っていたが、

* 関 伸夫・小沢竜太郎：未発表

このことについては、アクトミオシンの凍結変性および残存するプロテアーゼによるアクトミオシンの分解によることが一因としてあげられる。しかし甲殻類筋肉のアクトミオシンが魚類筋肉や、哺乳動物骨格筋のアクトミオシンの性状とは本来異なっていることも考えられる。事実、即殺したトヤマエビから調製したアクトミオシンは高い Ca^{2+} -ATPase 活性を示すが、ATP 感度は 30 程度、超沈殿性を示さないなど、魚類筋肉のアクトミオシンの性状とは異なっていたので、このようなオキアミのアクトミオシンの特性についても今後十分に検討されねばならない。

SDS は蛋白質の高次構造を破壊するが、ペプチド結合は切断しないので、SDS-ゲル洩過や SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法ではアクトミオシンの変性の程度についての情報は得られないが、プロテアーゼなどによつてアクトミオシンのペプチド結合が切断された場合には、明らかに異なるパターンを示すものと思われる。生凍結試料と煮熟凍結試料のそれぞれの SDS-ゲル洩過のパターン (Fig. 1 と 2) は近似していた。このことは生凍結試料の凍結保蔵中は、アクトミオシンのプロテアーゼによる分解が抑制されていることを示すものであろう。

魚肉の場合は利用・加工への適性は、主として筋肉アクトミオシンの変性の問題と関連して論議されてきたが、オキアミの場合は、魚体が小さいこと、および体組織が脆弱なことから、オキアミの全個体（殻付）を原料とすることが多いと思われる。したがつて生凍結オキアミを利用・加工する場合、組織中に混在するプロテアーゼによる蛋白質の分解について特に考慮されねばならない。また魚肉冷凍すりみのように、アクトミオシンの生理活性と品質とが強い相関性を示すようなもの¹⁶⁾への加工原料として、オキアミを利用・加工することについては、可成りの困難性が予想される。

試料の入手にあたり御援助いただいた東海区水産研究所藤井豊博士、井関重夫氏、ならびに御校閲を賜わつた本学部秋場総教授に深甚なる謝意を表する。

文 献

- 1) 小山武夫：さかな，11，28-46 (1973).
- 2) 中村 悟：水産界，1073 号，37-45 (1974).
- 3) 築瀬正明：New Food Industry, 16 (11)，6-11 (1974).
- 4) 須山三千三・中島喜久一・野中順三九：本誌，31，302-306 (1965).
- 5) 新井健一：魚の品質（日本水産学会編），恒星社厚生閣，東京，1974，pp. 55-73.
- 6) 新井健一：水産生物化学・食品学実験書（斉藤恒行ら編），恒星社厚生閣，東京，1974，pp. 179-202.
- 7) 関 伸夫・新井健一：本誌，40，1187-1194 (1974).
- 8) 築瀬正明：東海区水研報，77，97-102 (1974).
- 9) M. LASKOWSKI: in "Methods in Enzymology" (ed. by S.P. COLOWICK and N.O. KAPLAN), vol. 2, Academic Press, New York, 1955, pp. 26-36.
- 10) E. DEVILLEZ and K. BUSCHLEN: Comp. Biochem. Physiol., 21, 541-546 (1967).
- 11) 矢後長純：生化学，31，722-726 (1959).
- 12) 矢後長純：同誌，32，138-141 (1960).
- 13) B.J. GATES and J. TRAVIS: Biochemistry, 8, 4483-4489 (1969).
- 14) 築瀬正明：東海区水研報，65，59-66 (1971).
- 15) J.M. REGENSTEIN and A.G. SZENT-GYÖRGYI: Biochemistry, 14, 917-925 (1975).
- 16) 川島孝省・大場明子・新井健一：本誌，39，1201-1209 (1973).