低イオン強度領域における魚類筋肉からの タンパク溶出パターン^{*1}

志 水 寛・柄 多 哲・西岡不二男

(1976 年 3 月 31 日受理)

Extractability of Proteins from Fish Skeletal Muscle at Low Ionic Strengths

Yutaka SHIMIZU^{*2}, Satoshi KARATA^{*2}, and Fujio NISHIOKA^{*2}

The extractability of proteins from fish muscle homogenates was investigated at ionic strengths ranging between μ 0 and 0.3 (pH 6.8~7.0; ratio of muscle to extractant, 1 : 30) with 18 species of teleosts. Species variations were observed in the extraction patterns obtained between μ 0 and 0.05. As the ionic concentration was raised from μ 0 to 0.05, the amount of extractable protein increased rapidly in dark meat fish (migratory fish) such as sardine or chub mackerel and increased slowly in fish such as horse mackerel or lizard fish which are considered to be intermediate between dark and white meat fish. In white meat fish (bottom fish) such as Alaska pollack or nemipterid, however, the extractabilities more or less decreased in the range of μ 0.025~0.05. Such differences between dark and white meat fish are attributable to a fraction eluting at K_{av} 0.2~0.3 on Sephadex G 200 filtration which is abundant in the sarcoplasm of the former (chub mackerel), and the greater solubilization of myofibrils from the latter (Alaska pollack) at ionic strengths of μ 0.025. From the results, μ 0.05 was recommended as the optimum concentration for extracting sarcoplasmic proteins from either dark or white meat fish. The values of 0.05 μ extractable protein nitrogen obtained in this study closely corresponded with those of non-protein nitrogen, the latter being an accepted marker for distinguishing between the two groups of fish.

魚の筋形質（以下 Sp と略記）タンパク質の組成が魚種特異的であることはよく知られているが、¹⁾ その抽出、分離条件は研究者によつて必ずしも一定しておらず、特に抽出溶媒のイオン強度については μ 0~0.15 のかなり広い範囲が用いられている。²⁾ これは Sp タンパクの抽出条件についての基礎的研究が少ないこともあるが、研究材料としてよく用いられる cod のような白身の魚の筋肉の場合、溶出するタンパク質の量^{3,4)}や組成⁵⁾がこのイオン強度範囲内であればあまり変わらないということにもよるのであろう。

しかしながら、著者らは今回赤身魚種を含む硬骨魚 18 種についてこの領域における溶出タンパクの量と組成を調べたところ、魚種によつてその溶出パターンが異なることを見出したので報告する。

実 験 方 法

供試魚 Table 1 に記載した 18 魚種、いずれも死後硬直中の成魚を用いた。そのうち、スケウタラは網走近海で釣りによつて漁獲されたもの、フナは高知市近郊の池で採取されたもの、その他は高知県手結および御豊瀬漁港に水揚げされたものである。

^{*1} 本報を魚肉の原科学的特性に関する研究、第 5 報とする。

^{*2} 高知大学農学部 (Dept. of Agric., Kochi Univ., Nankoku, Kochi, Japan)

Fig. 1. Extraction patterns of protein from muscle homogenates of 18 species of teleosts. Extracting-determining procedures were as follows: 20 g of dorsal muscle free from dark muscle was chopped with a knife and homogenized with 30 ml of chilled water in a Nihon-Seiki homogenizer for 2 min at a half speed. To 4.4 g of the homogenate 50 ml of 0~0.30 M NaCl was added (ultimate muscle/extractant ratio: 1/30), and the mixture was adjusted to pH 6.8~7.0, kept at 10°C for 6 hr and centrifuged at $11,000\times g$ for 15 min at 0°C. Total extractable nitrogen was determined in the supernates, and non-protein nitrogen was determined in the supernates deproteinized with 8% trichloroacetic acid, using the standard micro-kjeldahl technique respectively, and the difference was estimated as the extractable protein nitrogen. The extractability was shown as % of total protein nitrogen.

Table 1. Contents of non-protein, total protein and extractable protein nitrogen at μ 0, 0.05, and 0.1 in dorsal muscle from 18 species of teleosts. For conditions of extraction and determination of proteins, see Fig. 1.

Fish species	Non-protein nitrogen, mg/100 g	Protein nitrogen, mg/100 g					C/A %	(C-B)/A %
		Total (A)	Extractable at			(C-B)		
			$\mu=0$ (B)	$\mu=0.05$ (C)	$\mu=0.1$			
Sardine	650	3324	556	1285	1461	729	38.7	23.8
Chub mackerel	570	3275	410	1100	1215	690	33.6	21.1
Dolphin fish	543	3283	503	954	1157	451	29.1	13.7
Round herrieg	568	3279	613	986	1128	373	30.1	11.4
Puffer	370	2990	524	858	1002	334	28.7	11.2
Round scad	514	3306	681	1014	1135	333	30.7	10.1
Grey mullet	430	3138	660	945	1034	285	30.1	9.1
Spanish mackerel	391	3149	640	896	952	256	28.5	8.1
Horse mackerel	395	3012	542	732	879	190	24.3	6.3
Round-nose flounder	300	2993	559	725	879	166	24.2	5.5
Left-eyed flounder	326	3034	570	733	904	163	24.2	5.4
Japanese barracuda	385	3087	705	844	868	139	27.3	4.5
Lizard fish	400	3012	666	740	795	74	24.6	2.5
Red branchiostegus fish	359	2901	630	604	615	-26	20.8	-0.9
Nemipterid	413	2961	685	644	691	-41	21.7	-1.4
Anglerfish	235	1925	366	338	420	-28	17.6	-1.5
Crucian carp	294	2525	715	623	715	-92	24.7	-3.6
Alaska pollack	372	2490	597	496	557	-101	19.9	-4.1

Sardine (マイワシ): *Sardinops melanosticta*, Chub mackerel (マサバ): *Scomber japonicus*, Dolphin fish (シイラ): *Coryphaena hippurus*, Round herring (ウルメイワシ): *Etrumeus micropus*, Puffer (サバフグ): *Lagocephalus lunaris*, Round scad (マルアジ): *Decapterus maruadsi*, Grey mullet (ボラ): *Mugil cephalus*, Spanish mackerel (サワラ): *Scomberomorus niphonius*, Horse mackerel (マアジ): *Trachurus japonicus*, Round-nose flounder (ムシガレイ): *Eopsetta grigorijewi*, Left-eyed flounder (ガンゾウビラメ): *Pseudorhombus cinnamomeus*, Japanese barracuda (アカカマス): *Sphyrna pinguis*, Lizard fish (マエソ): *Saurida undosquamis*, Red branchiostegus fish (アカアマダイ): *Branchiostegus japonicus*, Nemipterid (キイトヨリ): *Nemipterus virgatus*, Anglerfish (ホンアンコウ): *Lophius litulon*, Crucian carp (ギンブナ): *Carassius longsdorffii*, Alaska pollack (スケトウダラ): *Theragra chalcogramma*

タンパク溶出度の測定 背側筋の前から約 1/3 部位の筋節数個を採取し、ナイフで細切、その 20 g に冷脱イオン水 30 ml を加え、日本精機製 HD 型ホモジナイザー (目盛 2 で 2 分間) で磨砕、得られたホモジネート 4.4 g づつを精秤し、所定濃度の NaCl 溶液 (0, 0.025, 0.05, 0.075, 0.10, 0.20, 0.30 M) 各 50 ml を加え (最終抽出比, 肉: 溶媒 = 1: 30), 0.2 N NaOH または 0.2 N HCl で pH を 6.8~7.0 に調節しながら 10°C で 6 時間抽出した。11,000×g で 15 分間遠心分離して得た上澄中の全 N 量と非タンパク態量をキエルダール法で定量して溶出タンパク量を求め、供試ホモジネート全タンパク量に対する割合で表わして溶出度とした。

非タンパク態 N の定量 上記遠心上澄 40 ml に 40% 三塩化醋酸 10 ml を加えて除タンパクした濾液の N 量をキエルダール法で定量して非タンパク態 N とした。

ゲル法 KCl-borate buffer (M/20 K_2BO_3 + 60 mM KCl + M/10 HCl, μ 0.185, pH 7.0) で膨潤させた Sephadex G 200 (Pharmacia 社) を支持体として、内径 1.4 cm, 長さ 90 cm のカラムに 1.4×86~88 cm のゲルベッドをつくり、試料タンパク液 6.0 ml を添加、上記 buffer を溶媒として 10°C の恒温室内で下降法で溶離させた。溶離液 4 ml づつを分取し、タンパク濃度をマイクロビュレット法 (310 m μ)^① で

Fig. 2. Elution patterns of extracts made at low ionic strengths from chub mackerel muscle on Sephadex G 200.

— optical density at 310 mμ by micro-biuret method⁶⁾.

--- optical density at 280 mμ.

Samples: μ 0 (A) and 0.1 extracts (B) obtained on the same conditions as shown in Fig. 1, as well as μ 0.1 extract (C) from the residue of extracted muscle homogenate at μ 0. Amount applied: 6.0 ml.

Gel: Sephadex G 200, 1.4×86 cm.

Eluent: KCl-borate buffer (M/20 K_2BO_3 + 60 mM KCl + M/10 HCl, μ 0.185, pH 7.0).

Recovery: A 89%, B 86%, and C 93%.

メのような白身魚まで、ボラ、エソ、サワラ等を含めて、概して赤身魚種と白身魚種の中間的な種類が示すパターンと見られる。

凹型 (白身型): μ 0~0.1 での溶出量の変動が極めて小さく、 μ 0 から 0.05 にかけて溶出量はむしろ僅かに低下する (全タンパク量の 0~4%) タイプである。この特徴を示した魚種はスケトウダラ、アンコウ、イトヨリ、アマダイの 5 種で、いずれも血合肉が少なく、肉色の白い典型的な白身の魚であつた。

このようにタンパク溶出パターンと肉色の間に一定の関係が見られたということは大変興味深い結果であるが、これは魚の生態的特徴、特に運動性と Sp タンパクの組成の間の密接な関係を示しているものと思われる。今、その溶出曲線の特徴を数量化するための目安として、 μ 0 と μ 0.05 でそれぞれ抽出されたタンパク量の差を全タンパク量の % で示してみると、Table 1 のようになる。マイワシの 23.8% を筆頭に、し

定量し、また blue dextran 2000 の溶離位置により void volume を決定し、 K_{av} (分配係数) を求めた。

筋原繊維の調製 背側筋の挽肉に 8 倍量の 0.12 M NaCl を加え、三菱 JM 1000 型ミキサー (目盛 2 で 3 分間) で筋原繊維 (以下 Mf と略記) レベルまで磨碎し、0.1 N NaOH で pH 6.8 に調節してから 1300 G で 10 分間遠心分離した。沈殿した残渣を集めて 8 倍量の 0.1 M NaCl 中に懸濁、攪拌、洗浄してからサラシ・ネットを通して筋基質 (Stroma) を除去した後、再び遠心分離 (1300 G, 10 分間) して得られた沈殿を供試 Mf とした。

結果と考察

タンパク抽出曲線 供試 18 魚種の μ 0~0.3 におけるタンパク抽出曲線を Fig. 1 に示す。 μ 0.1~0.3 の曲線形状は全魚種ほとんど同じであるが、 μ 0~0.1 の間、特に μ 0~0.05 における形状は魚種によつてそれぞれ異つている。そこで、その特徴を捉えてこれらの溶出パターンを分類したところ、次の 3 型に大別することができた。

凸型 (赤身型): μ 0 → 0.05 で急激に溶出量が增加する (全タンパクの 10% 以上) タイプで、マイワシ、マサバ、ウルメイワシ、シイラ、サバフグ、マルアジがこれに属する。サバフグ以外はいずれも血合肉に富み、普通筋も肉色の濃いいわゆる回遊性の赤身の魚であるところから、赤身型のパターンと考えられる。

僅かに凸型 (中間型): μ 0 → 0.05 で溶出量は増加するが、凸型ほど著しくない (全タンパクの 0~10%) タイプであつて、 μ 0.05 付近で抽出曲線が屈折するものが多かつた。マアジのように赤身の魚に近いものからムシガレイやガンゾウビラ

んがりのスケトウダラの -4.1% まで、赤身魚種 (回遊魚) から中間肉色魚種、白身魚種 (底魚) の順に並び、その順序はエキスN量や全タンパク量の順序ともよく対応している。後述のように、この値は全 Sp タンパク ($\mu 0.05$ 抽出タンパク) 量と共に、白身魚と赤身魚を区別するための指標になり得ると考えられる。

抽出タンパクのゲル透過 Fig. 2 は典型的な凸型溶出パターンを示したマサバの $\mu 0$ と 0.1 抽出液、および $\mu 0$ 抽出残渣の $\mu 0.1$ 抽出液のゲル透過パターンを、また Fig. 3 は凹型溶出パターンを示したキイトヨリの $\mu 0$, 0.025 , および 0.1 抽出液のゲル透過パターンを示す。マサバの抽出液は void volume 付近の痕跡的なピークを含めて5つの画分からなっており、またキイトヨリの抽出液でも2番目と3番目のピークがマサバよりやや後にずれるがやはり5つの画分が認められる。しかし、このうち5番目の画分は、溶出位置がゲルの分画下限を遙かに超えており、また紫外部での吸収が極めて強いことから、核酸関連物質を含む非タンパク態の成分と推定した。これを除く a, b, c, d, 並びに I, II, III, IV の各4画分の抽出イオン強度による消長を検討してみると、マサバの $\mu 0$ から 0.1 にかけての著しい溶出タンパク量の増大は主として画分bの溶出によるものであること、また、キイトヨリの場合その凹型溶出パターンに対応して変動するのは画分Iであることが推測できる。

画分bは、その K_{av} 値 ($0.2 \sim 0.3$) から分子量 20 万前後と推定され、グロブリン様の挙動を示すところから、いわゆるグロブリンX類似の区分とも考えられるが、この点については今後検討してみたい。赤身魚の筋肉に多いミオグロビンの K_{av} は 0.8 付近で、d 画分に含まれて溶離することを確認した。したがってb画分にはミオグロビンは含まれないものと思われる。一方、void volume 付近に溶離するイトヨリの画分Iについては、別に Sepharose 2B での溶出位置を確認したところ K_{av} は $0 \sim 0.15$ であったので、梅本・神名の報告⁷⁾に照らして Mf 由来のタンパク、おそらくアクトミオシン (以下 AM) と推定した。低イオン強度抽出液中への AM の溶出については、すでに CONNELL⁸⁾ が新鮮な cod の $\mu > 0.1$ (pH 7.5) 抽出液で認めているが、今回のように水抽出液での著しい溶出例は初めてのようである。この場合マサバの画分も同じように AM と推定できるが、イトヨ

Fig. 3. Elution patterns of extracts made at low ionic strengths from nemipterid muscle on Sephadex G 200.

— optical density at $310\text{ m}\mu$ by micro-biuret method⁹⁾.

--- optical density at $280\text{ m}\mu$.

Samples: $\mu 0$ (A), 0.025 (B) and 0.1 extracts (C) obtained on the same conditions as shown in Fig. 1. Amount applied: 6.0 ml .

Gel: Sephadex G 200, $1.4 \times 88\text{ cm}$.

Eluent: same as in Fig. 2.

Recovery: A 85%, B 88%, C 86%.

Fig. 4. Effect of ionic concentration on the solubilization of myofibrils prepared from chub mackerel and nemipterid. Conditions of extraction were the same as in Fig. 1.

Fig. 5. Relationship between non-protein and protein nitrogen extractable at μ 0.05 in skeletal muscle of teleosts.

1 Sardine, 2 Chub mackerel, 3 Dolphin fish, 4 Round herring, 5 Puffer, 6 Round scad, 7 Grey mullet, 8 Spanish mackerel, 9 Horse mackerel, 10 Round-nose flounder, 11 Left-eyed flounder, 12 Japanese barracuda, 13 Lizard fish, 14 Red branchiostegus fish, 15 Nemipterid, 16 Anglerfish, 17 Crucian carp, 18 Alaska pollack.

りの画分 I に較べて抽出されにくい点が注目される。

μ 0~0.3 における筋原繊維の溶解性 Fig. 4

は、マサバとイトヨリの背側筋から調製した粗製の Mf をホモジネートの場合と同様 30 倍量の抽出液で抽出して得た溶解度曲線である。供試 Mf のタンパク態並びに非タンパク態 N 含量は、マサバの場合 1400 mg/100 g と 2.9 mg/100 g, イトヨリの場合 1254 mg/100 g と 3.3 mg/100 g であった。両者とも μ 0.025~0.05 ではほとんど溶けないで、 μ 0.025 $\rightarrow$ 0 で溶出量が急増、 μ 0.1 $\rightarrow$ 0.3 では漸増するという、ホモジネートの場合の凹型と同じパターンを呈している。さらに G200 によるゲル濾過画分 I および a を AM と推定したが、それを裏づける結果と解される。白身魚種に見られた凹型溶出パターンにおける μ 0.05 $\rightarrow$ 0 での顕著な溶出量の増加と、全魚種に共通して見られた μ 0.1 $\rightarrow$ 0.3 での漸増は、どちらも Mf タンパクの溶出に原因していると考えてよさそうである。

Sp タンパク抽出溶媒のイオン強度 魚の筋肉から Sp タンパクを取り出すには、低イオン強度

度溶媒で直接抽出する場合と、高イオン強度溶媒で一旦 Mf タンパクと共に抽出してから希釈沈殿によつて両者を分ける場合があるが、抽出時あるいは希釈時のイオン強度は $\mu \leq 0.15$ の範囲内で割合任意にきめられている嫌いがある。しかし、今回の結果によると、溶媒のイオン濃度が溶出するタンパクの量と組成に及ぼす影響は極めて重要である。凹型パターンを示す白身魚種の場合は μ 0~0.1 の範囲内であれば影響は比較的小さいが、それでも $\mu < 0.02$ では AM の汚染を受ける可能性が高くなる。また、赤身型あるいは中間型の魚種では Mf タンパクが溶出する懸念は少ないが、 $\mu < 0.05$ で抽出あるいは希釈する時は画分 b を残渣あるいは沈殿の中に残す恐れが強くなる。

結局、すべてのタイプの魚を通して同じ溶媒をということであれば、 μ 0.05 付近の溶媒が最も適当ということになる。この μ 0.05 は、かつて CONNELL⁹⁾ が電気泳動のために Sp タンパクを抽出する際に選んだイオン強度でもある。なお、イオン強度をいう場合、今回は筋肉/溶媒比が 1/30 で筋肉自身のイオン濃度は無視したが、抽出比が小さいときはこれを無視できないことは当然である。

赤身の魚と白身の魚の筋形質タンパク含量 筋肉中の Sp タンパク質の量が赤身魚種に多く白身魚種に少ないことは既に知られているが、^{9,10)} 今回供試の 18 魚種の μ 0.05 抽出タンパク量を較べてみても (Table 1), そのことは明らかなようにみえる。赤身の魚と白身の魚の区別は元来慣習的なもので、明確な定義はないようであるが、筋肉のミオグロビン含量¹¹⁾あるいはエキス N 含量¹²⁾が一応の目安になるとされているので、その μ 0.05 抽出タンパク N をエキス N に対してプロットしてみた。結果は Fig. 5 に示した通りで、この種の対比としてはかなり高い相関関係が認められる。この場合、Table 1 に示されているように、 μ 0 抽出タンパク量は白身魚種と赤身魚種との間で有意な差がないから、結局両グループを分けているのは μ 0 で不溶、 μ 0.05 で可溶の区分、つまり G200 ゲル濾過による b 画分ということになるのであろう。

文 献

- 1) 橋本周久：魚類種族の生化学的判別（日本水産学会編），恒星社厚生閣，東京，1975，pp. 32-48.
- 2) 志水 寛： *New Food Industry*, 12(12), 4-8 (1970).
- 3) W. J. DYER, H. V. FRENCH, and J. M. SNOW: *J. Fish. Res. Bd. Canada*, 7, 585-593 (1950).
- 4) J. J. MATSUMOTO, W. J. DYER, J. R. DINGLE, and D. G. ELLIS: *ibid.*, 24, 873-882 (1967).
- 5) J. J. CONNELL: *Biochem. J.*, 54, 119-126 (1953).
- 6) 梅本 滋・神名孝一：東海水研報，No. 56, 109-116 (1968).
- 7) 梅本 滋・神名孝一：本誌，35, 555-558 (1969).
- 8) J. J. CONNELL: *Biochem. J.*, 69, 5-12 (1958).
- 9) 高橋豊雄： *New Food Industry*, 2(9), 38-48 (1960).
- 10) 志水 寛・西岡不二男：本誌，40, 267-270 (1974).
- 11) 野中順三丸・橋本芳郎・高橋豊雄・須山三千三：水産食品学，恒星社厚生閣，東京，1965，p. 45.
- 12) 清水 亘：本誌，15, 35-40 (1949).