数種の魚類の筋原繊維 Ca-ATPase の安定性に 及ぼす pH と温度の影響

橋本昭彦・新井健一

(1978 年 6 月 19 日受理)

The Effects of pH and Temperature on the Stability of Myofibrillar Ca-ATPase from Some Fish Species

Akihiko HASHIMOTO* and Ken-ichi ARAI*

The effects of pH and temperature on the stability of myofibrils from some fish species have been studied in terms of the first order rate constant (K_D) for inactivation of Ca-ATPase.

The myofibrils were incubated at various pH values while maintaining the temperature constant, though the temperature applied for incubation was different for each fish species.

1. Myofibrillar Ca-ATPase was found to be more resistant to thermal inactivation in the neutral range of pH 7.0-8.5.

2. The inactivation rates of myofibrillar Ca-ATPases at acidic pH below 6.9 and at alkaline pH above 8.6 were faster than that observed at neutral pH, 2-7 times faster depending upon pH values.

The rate constants (K_D) were plotted semilogarithmically against the reciprocal of absolute temperature for incubation.

3. Linear ARRHENIUS plots in the temperature range of 20-35°C were identifiable for sardine myofibrils at pH 5.8 and atka-mackerel myofibrils at 7.6.

4. The rate of inactivation of the Ca-ATPase of sardine myofibrils at pH 5.8 and 5°C was found to be comparable with that of Ca-ATPase at 7.6 and 26°C.

The significance of these results is discussed in relation to the rapid deterioration of sardine muscle during storage under various environmental conditions.

魚類筋原繊維の安定性は、その種類によつて異なり、また生息環境温度と強く相関していることは、すでに報告されている¹⁻³⁾。これらの結果は、精製した筋原繊維について得たものであるから^{4,5)}、おそらく、その魚類筋原繊維にとつて本質的な固有の性質であるように思われる。しかし、水揚げ後の魚肉は、極めて異なる環境条件(たとえば、温度、pH、共存物質など)におかれるため、これらの要因によつてその固有の安定性が複雑な影響を受けることが予想される⁶⁾。特に、近年、その高度利用が企てられている沿岸性の多獲魚であるサバ、イワシなどの赤身魚については、その肉質は死後急速に変質することが知られており、この原因として、死後における筋肉内 pH の急速な低下があげられている⁷⁾。しかし、異なる条件下におかれた魚類筋原繊維の安定性に関して、基礎的な実験は充分行なわれていない現状である。そこで、著者らは、まず、各種魚類の筋原繊維タンパク質の安定

性に対する環境温度と pH との影響について研究を行なつた。また、白身魚と赤身魚の筋原繊維の変性を比べることにより赤身肉の特性を明らかにすることも目的の一つとした。

実験方法

筋原繊維懸濁液の調製および pH の調節 すでに加藤らの報じた方法²⁾に従つて、新鮮な魚肉から筋原繊維を調製した。初めに緩衝液を含まない 0.16 M KCl 溶液に懸濁した後、次に緩衝液 (Tris-maleate pH 5.8~7.6 または Glycine-NaOH pH 8.0~9.8) を終濃度が 70 mM となるように加え懸濁液の pH を正確に調節した。なお、pH が温度により変化する緩衝液については、pH メーターで正確に pH を再測定し次の加熱変性に供した。

筋原繊維の調製に供した魚種は次に示すが、いずれも新鮮な背肉を使用した。

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

マイワシ *Sardine* (*Sardinops melanosticta*)
 サバ *Chub mackerel* (*Scomber japonicus*)
 サンマ *Mackerel pike* (*Cololabis saira*)
 イカナゴ *Sand lance* (*Ammodytes personatus*)
 コイ *Carp* (*Cyprinus carpio*)
 メガネカスベ *Ray* (*Raja pulchra*)
 ホッケ *Atka-mackerel* (*Pleurogrammus azonus*)

筋原繊維の安定性の測定 上述の方法で各 pH に調節した魚類筋原繊維懸濁液を 1 ml ずつ分取して、所定の温度に調節した恒温槽中に保持し、一定時間ごとに取り出して 0.5 M Trismaleate, 0.5 ml を加え pH を 7.0 にもどしながら同時に急冷した。続いて、Ca-ATPase 活性を測定した。筋原繊維の Ca-ATPase 活性は、できる限りすみやかに測定を行なつたが、たとえ 24 時間後に測定しても支障はなかつた。すなわち、酸性（またはアルカリ性）において起る速い変性も、これに高濃度の中性緩衝液を加え、同時に氷冷することにより、完全に阻止できるかどうかを検討したところ、不安定な魚種であるホッケの筋原繊維においてさえも、Ca-ATPase 活性の変動は氷蔵 1 日後で 5% 程度にとどまり、求められる変性速度も同じであることを確めた。さらに、加熱が長時間にわたつて行なわれるときは、微生物の繁殖を阻止するため 2 mM デヒドロ酢酸ナトリウム、または 0.1% チモールの添加を試みたが結果に差異を認めなかつた。また、採用した条件で加熱中、筋原繊維懸濁液の凝固、白濁など官能的な変化も起らない。なお、Ca-ATPase 活性測定の実験組成は、100 mM KCl, 5 mM CaCl_2 , 25 mM Tris-maleate pH 7.0, 1 mM ATP とし 25°C で遊離する無機リン酸を測定し比活性を得た。また加熱による筋原繊維 Ca-ATPase 活性の失活は時間の関数において、一次反応式に従い変性速度定数 (K_d) を求め、安定性を比較検討した⁷⁻⁹⁾。

実験結果

一定温度下における筋原繊維の変性に及ぼす pH の影響について 先ず、ホッケ筋原繊維の例を上げると、加熱温度は 30°C をえらんだ。この温度における筋原繊維 Ca-ATPase の失活を pH 5.8, 6.1, 7.6, 8.2 および 9.1 において測定し、加熱時間との関係をえがくと Fig. 1 の結果となる。すなわち、いずれの pH における失活も一次反応式にしたがうので、これより筋原繊維 Ca-ATPase の変性速度定数を求めることができる。このような方法に従つて、次に、サバ (35°C)、サンマ (35°C)、メガネカスベ (35°C)、イワシ (37.5°C)、コイ (40°C) とウサギ (47.5°C) の筋原繊維 Ca-ATPase の変性速度と pH との関係を検討し、結果を Fig. 2(A-C) として示した。これらの結果から明らかなように、魚類筋原繊維は一般

Fig. 1. Logarithmic plots of myofibrillar Ca-ATPase of atka-mackerel as a function of time at different pH values.

The suspensions of myofibrils (1–2 mg/ml) in 0.16 M KCl containing 70 mM buffer of required pH values were pipetted into tubes and incubated at 30°C. At a definite intervals, the tubes were transferred in ice, immediately neutralized by adding excess concentration (166 mM) of Tris buffer of pH 7.0 and used for ATPase assay. ATPase activity was determined from the rate of release of inorganic phosphate in the following mixture at 25°C and at pH 7.0; 100 mM KCl, 5 mM CaCl_2 , 1 mM ATP and 0.1–0.2 mg/ml of myofibrillar proteins.

- (▲) Tris-maleate, pH 5.8
- (■) Tris-maleate, pH 6.1
- (○) Tris-maleate, pH 7.6
- (□) Glycine-NaOH, pH 8.2
- (△) Glycine-NaOH, pH 9.1

に pH 7.0–8.6 において安定であり、pH が 6.9 以下、または、pH 8.6 以上になると著しく不安定となることがわかる。これらの性質は検討した魚類のいずれについても同じであり、赤身魚（イワシ、サバ、サンマ）と白身魚（コイ、カスベ、ホッケ）の筋原繊維間でも差異がなかつた。また、イワシについては、普通筋（白筋）と血合筋（赤筋）の筋原繊維の変性速度を比較したが、その変性速度およびそれに及ぼす pH の影響もほとんど同じであつた。また、ウサギ骨格筋でも同じである。

一般に各種の pH および温度下で筋原繊維 Ca-ATPase の失活を追跡するとき、その失活が速い条件、すなわち、高温のとき、または pH が酸性あるいはアルカリ性に傾くときは、その失活の進行が一次反応に良く従うが、失活が極めて遅いときは、従わないような場合も稀に見られる¹⁰⁾。たとえば、初めに小さな速い変性が起り、その後遅い変性が続くような場合、変性の大部分をあらわす後の変性速度を本研究では重視した。魚類筋原繊維は一般に変性が速く、本研究では酸性下の特に速い変性を

Fig. 2. The pH dependence of the apparent rate constants of inactivation of myofibrillar Ca-ATPase activities.

Experimental conditions and method of ATPase assay were the same as in Fig. 1.

- (A) Incubation of myofibrils suspensions were conducted at 30°C for atka-mackerel (○), at 35°C for ray (Δ), chub mackerel (●), and mackerel pike (▲), respectively.
- (B) The rates of inactivation of myofibrillar Ca-ATPases from the dorsal (white) and the dark (red) muscles of sardine at 37.5°C have been compared.
 (—○—) dorsal muscle
 (—●—) dark muscle
- (C) In comparison to the inactivation of carp myofibrils (□) at 40°C, the incubation of rabbit myofibrils (■) performed at 47.5°C.

The first order rate constant (K_D) of inactivation of myofibrillar Ca-ATPase was calculated from the following formula: $K_D = 1/t(\ln C_0 - \ln C_t)$ where C_0 and C_t are the ATPase activities before and after adequate incubation time (t).

討論対象としているので、この場合は影響が少ない。

筋原繊維の変性に及ぼす温度と pH の影響についてすでに述べたように、筋原繊維 Ca-ATPase の失活に対しては、それがおかれた環境の温度と pH が著しく影響することを知った。そこで、次に、イワシおよびホッケの筋原繊維 Ca-ATPase の失活速度を、異なる pH と温度下において測定し、ARRHENIUS 式にならつて作図した。すなわち、縦軸には求めた変性速度恒数の対数値 ($\log K_D$) をとり、横軸には変性温度 (絶対温度) の逆数 ($1/T$) をとつた。先ず、Fig. 3(A) にイワシの筋原繊維の結果を示す。筋原繊維懸濁液の pH を 5.8 (●), 6.1 (Δ) および 7.6 (○) とし、温度領域は 5°C から 40°C における変性を測定しプロットした。この結果によると、両者の関係は ARRHENIUS の式に従い、変性温度がほぼ 20°C を境として勾配の異なる 2 本の直線関係を示すことを認めた。(pH 7.6 の筋原繊維は極めて安定であるので、20°C 以下における変性速度は測定できなかった)。20°C 前後を境界として直線の勾配が変化する理由については明らかではないが、20°C 以下においてこの直線の勾配が緩いと言うことは、イワシ筋原繊維 Ca-ATPase の失活がその環境温度が低下してもあまり減速しないということを意味している。この傾向は pH が 7.6 のときは活性が安定化するため、顕著に認めること

ができない。次に、ホッケの筋原繊維について同じく行なつた実験結果を Fig. 3(B) に示す。この場合は、pH 5.8 (●), 6.1 (Δ) および 7.6 (○) の筋原繊維懸濁液について 5°C~35°C の温度領域の変性速度を求めたが、 $\log K_D$ と $1/T$ の関係は 15°C 前後を境に勾配の異なる 2 本の直線となつた。また、イワシの場合と同じ条件下の K_D を比べると、ホッケの筋原繊維は全体に不安定で変性速度が大きい他は、その安定性に及ぼす pH と温度の影響はかなり良く類似している。すなわち、15°C 以上の温度においては、pH 7.6 のホッケの筋原繊維 Ca-ATPase の変性は、pH 5.8 のイワシの筋原繊維の速度とほとんど同じであり、また、pH 5.8 のホッケの筋原繊維の変性は著しく速かつた。一方、15°C 以下の温度における変性は全般に遅くなるが、特に酸性域でのホッケ筋原繊維の変性はイワシの場合に比べやや速いだけで、中性域、高温における両者の場合ほど大きな差異が見られなかつた。

なお、これらの結果から筋原繊維 Ca-ATPase の熱変性における熱力学的な活性化のパラメーターを求めたが、その値についての討論は次報で行なう。

考 察

本研究の結果から、魚類筋原繊維の変性は、その環境

Fig. 3. ARRHENIUS plot of the rate of inactivation of myofibrillar Ca-ATPase activity at different pH values.

The suspensions of myofibrils from sardine (A) and atka-mackerel (B) were incubated at various temperatures and at pH 5.8 (●), 6.1 (△) and 7.6 (○), respectively. T represents absolute temperature.

Experimental conditions and the method of ATPase assay were the same as in Fig. 1. The calculation of K_D were made by the formula shown in the legend of Fig. 2.

温度の影響をうける他に、筋肉細胞内の pH によつても著しい影響をうけることが明らかになった。すなわち、筋原繊維は温度、pH および時間の要因によつて複雑な変性をすると言ふことができる。ただし、筋肉細胞内の pH が酸性側に变化するのは赤身魚肉の一つの特徴であつて、白身魚肉では考慮する必要がない要因であろう。サバおよびイワシ筋肉中の pH は死後 2~5 時間以内に 5.8 に下ること¹¹⁾漁獲後のイカナゴ筋肉中の pH は 6.5 になつてゐること*がすでに知られており、赤身魚肉の pH が急激に下る原因については解糖作用によつてグリコーゲンから乳酸が生成するためであるとされている。また、魚肉の pH が同じでも、その pH における筋原繊維の変性速度は環境温度によつて異なるため、流通の条件がはつきりしない魚肉のタンパク質の変性状態を推定することは極めて困難であるように思われる。ただし、筋原繊維の中性域における変性速度と酸性域（もしくはアルカリ性域）における変性速度を一定温度下で比較すると、その比は魚種によつてあまり差異がないことは明らかになった。つまり、加熱温度がそれぞれの魚種ごとに異なつてゐるが、数種の魚類筋原繊維 Ca-ATPase の異なる pH (5.8, 6.1, 7.6, 9.1) における K_D をここで再度引用すると、結果は Table 1 のようになる。すな

わち、pH 7.6 における K_D を基準にすると、pH 6.1 における筋原繊維は 2~3 倍、pH 5.8 の場合は 4~7 倍

Table 1. The apparent rate constants of inactivation of myofibrillar Ca-ATPase at various pH values

Experimental conditions and method were the same as in Fig. 1. From the curves shown in Fig. 2 and 3, K_D values were quoted in this table.

	K_D ($10^{-5} \cdot \text{sec}^{-1}$)				
	pH				Tem- pera- ture
	5.8	6.1	7.6	9.1	°C
Sardine					
dorsal (white)	152	81	37	99	37.5
dark (red)	233	108	35	69	37.5
Chub mackerel	246	150	53	90	35
Mackerel pike	350	122	51	81	35
Sand lance	246	122	39	—	35
Carp	327	184	69	129	40
Ray	332	157	64	99	35
Atka-mackerel	161	108	48	168	30
Rabbit	152	83	23	37	47.5

* 川島孝省（稚内水産試験場）私信

Table 2. The apparent rate constants of inactivation of sardine myofibrillar Ca-ATPase at various temperatures and at pH 5.8 and 7.6

Experimental conditions and method were the same as in Fig. 3. From the data presented in Fig. 3 (A), K_D values were quoted in this table.

Temperature (°C)	K_D ($10^{-6} \cdot \text{sec}^{-1}$)							
	5	10	15	20	25	30	35	40
pH 5.8	0.42	0.74	1.27	2.01	8.51	34.4	133.0	—
pH 7.6	*	*	*	0.03	0.27	2.29	18.0	132.5

* Values was not calculated because the inactivation rates of myofibrillar Ca-ATPases under these conditions were extremely slow.

不安定であるということになる。また、pH 9.1 の場合はやはり 2~3 倍不安定である。これらの傾向は、魚種によつて、さらに筋肉の種類（普通肉と血合肉）によつてあまり差異がなかったが、一方、環境温度が低くなると別の傾向を示すことがすでに Fig. 3 に示されている。イワシの筋原繊維の場合を例として、 K_D 値を Table 2 に整理してみると、温度が 25~35°C の領域では、pH 7.6 の場合に比べて pH 5.8 の筋原繊維は約 10 倍近い不安定度を示している。また、温度が 20°C 以下になると、pH 7.6 の筋原繊維は極めて安定化し変性速度は非常に小さくなるが、一方、pH 5.8 の変性はあまり減速しない。すなわち、pH 5.8 のイワシ筋原繊維の 5°C における変性は、pH 7.6 の場合の 26°C 前後の変性速度に匹敵している。したがって、他の要因が入りこまなにかぎり、pH が 5.8 前後まで低下したイワシの筋原繊維の変性を阻止するための有効な条件は、氷冷 (5°C 前後) するよりむしろ pH を中性域まで上げることにあるということになる。

以上述べたような魚類筋原繊維の変性に及ぼす温度と pH の影響に関する知見は、あくまでも精製した筋原繊維について得たものであつて、魚類の生筋中に在りその変性に影響を及ぼす可能性が考えられる他の要因については、まだ充分な検討を加えていない。たとえば、筋肉色素、脂質、その酸化物、水溶性タンパク質（解糖系酵素などを含む）などがその要因である。しかし、一般的にいえば、筋原繊維について観察された成果は、おそらく生筋についてもあてはまるように推定されうるので、本研究によつて得られた結果を、特に赤身魚肉の早い品質低下と関連づけて考察すると、これら魚肉の取扱い、

処理法について極めて示唆することが多いように思われる。

本研究の一部は文部省科学研究補助金によつて行なわれた。ここに記して謝意を表する。なお、本実験に使用したイカナゴは道立稚内水産試験場から御分与を受けたものである。併記して感謝致します。

文 献

- 1) 内山 均・加藤 登・工藤雄司・新井健一：日水誌，44, 491~498 (1978).
- 2) I. A. JOHNSTON, N. J. WALESBY, W. DAVIDSON, and G. GOLDSPIK: *Nature*, 254, 74-75 (1975).
- 3) I. A. JOHNSTON and G. GOLDSPIK: *Nature*, 257, 620-622 (1975).
- 4) R. J. SORALA, O. C. RANG, and F. N. BRIGGS: *Biochim. Biophys. Acta*, 245, 259-262 (1972).
- 5) 加藤 登・内山 均・塚本志朗・新井健一：日水誌，43, 857~867 (1977).
- 6) 福田 裕・掛端甲一・新井健一：日水誌，43, 717-725 (1977).
- 7) T. YASUI, H. KAWAKAMI and F. MORITA: *Agr. Biol. Chem.*, 32, 225-233 (1968).
- 8) 新井健一・川村久美子・林 千恵子：日水誌，39, 1077~1085 (1973).
- 9) 室塚剛志・高士令二・新井健一：日水誌，42, 57~63 (1976).
- 10) T. YASUI, T. SUMITA, and S. TSUNOGAE: *Agric. Food Chem.*, 23, 1163-1168 (1975).
- 11) 福田 裕・山内寿一・長谷川幸雄・掛端甲一：青森県水産物加工研究所昭和 47・48 年度試験研究報告，14~22 (1974).