イワシ肉氷蔵中の筋原繊維タンパク質の ATPase 活性およびその他の性状変化

関 伸夫・大金由夫・渡辺孝博

(1980 年 1 月 7 日受理)

Changes in ATPase Activities and Other Properties of Sardine Myofibrillar Proteins during Ice-storage

Nobuo SEKI^{*1}, Yoshio OOGANE^{*1}, and Takahiro WATANABE^{*1}

The process of deterioration of the ordinary muscle of sardine, *Sardinops melanosticta*, during ice-storage was studied by the measurements of myofibrillar ATPase activities, subunit composition, and other properties.

Myofibrillar EDTA^{*2}-ATPase activity lost about 70% after 1 day-storage in ice. Ca²⁺- and Mg²⁺-ATPase activities decreased to 50%–40% of their initial levels after 6 day-storage, while Mg²⁺-ATPase activity in the presence of EGTA increased and then decreased. A similar change in ATPase activities was observed when the isolated myofibrils were stored in a solution at pH 6.0, whereas little change occurred in the ATPase activities at pH 7.0.

Subunit composition of the myofibrillar proteins with exception of myosin showed little change during ice-storage, while some degradation of myosin heavy chain due to proteolysis was observed.

A specific sarcoplasmic protein was insolubilized readily within the 1 day-storage of muscle.

白身魚に比較してイワシなどの赤身魚では、漁獲後の肉質の劣化が速やかにおこることが知られている。その主因は死後の筋肉 pH の急激な低下によつて、筋肉タンパク質が変性するためであると考えられている¹⁻⁴⁾。

しかし赤身魚の肉質劣化過程における生化学的、物理化学的变化については、まだ具体的に充分な理解が得られていないように思われる。そこで本研究では、イワシ肉氷蔵中におこる筋肉タンパク質の性状変化を、筋原繊維タンパク質の ATPase 活性や物理化学的性状変化から調べた。得られた結果を死後硬直とそれに続いておこる肉の軟化過程との関連において検討した。また白身魚のコイとの比較をおこなつて、イワシ肉の特徴を明らかにしようとした。

実験方法

函館近海の定置網で漁獲した中羽のマイワシ *Sardinops melanosticta* を頭をたたいて殺し、氷蔵して研究室に持帰つた。水揚げから筋原繊維の調製までに要した時間は 2~4 時間であつた。これは本文中の氷蔵 0 日の試料である。比較のためにマサバ *Scomber japonicus* とコイ *Cyprinus carpio* を用いた。いずれも即殺魚で

普通肉を試料とした。

イワシ肉の氷蔵は次のようにおこなつた。イワシ普通肉を 5~7 mm 角に切り、20 g ずつに分けてポリエチレン製の袋に入れ、氷水中で貯蔵した。

筋原繊維の調製は前報⁵⁾のコイと同様の方法によつた。すなわち、肉 20 g に 100 ml の 0.1 M KCl-20 mM Tris-maleate 緩衝液 (pH 7.0) を加えて攪拌した後、3,000 rpm で 5 分間遠心分離し、上清を捨てた。この洗浄操作を 3 回繰返した。洗浄肉に 100 ml の 0.1 M KCl-20 mM Tris-maleate 緩衝液 (pH 7.0) を加え、ブレンダー (日本精機 (株) 製、約 10,000 rpm) で 30 秒間のホモジナイズを 4 回おこなつた。一層のガーゼで濾過し、濾液にその 1/20 量の 20% Triton X-100 を加えた。10 分間放置後、600×g、15 分間遠心分離して沈殿を得た。これに 100 ml の前述の緩衝液を加え、攪拌したのち 600×g、15 分間遠心分離した。この操作を 3 回繰返し、筋原繊維を得た。

ミオシン B は前報⁶⁾と同様に、筋原繊維から 0.6 M KCl-30 mM Tris-maleate 緩衝液 (pH 7.0) で抽出した。これを 20,000×g、20 分間遠心分離し、上清をミオシン B とした。沈殿はテフロン製の Potter 型ホ

^{*1} 北海道大学水産学部 (Faculty of Fisheries, Hokkaido University, Hakodate 041).

^{*2} 略語: EDTA, ethylenediamine tetraacetic acid; EGTA, ethyleneglycol-bis (2-aminoethylether)-tetraacetic acid; SDS, sodium dodecylsulfate.

モジナイザーで 0.6 M KCl-30 mm Tris-maleate 緩衝液に懸濁して使用した。これはゲル画分と呼ぶことにする。

筋形質タンパク質は 0.1 M KCl-20 mm Tris-maleate 緩衝液 (pH 7.0) で肉から抽出されるタンパク質とした。

ATPase 活性は前報^{5,6)}と同様に, EDTA, Ca^{2+} , Mg^{2+} の存在下で測定し, EDTA-, Ca^{2+} -, Mg^{2+} (Ca^{2+})-, Mg^{2+} (EGTA)-ATPase 活性として表わした。反応組成は Fig. 1 の説明文中に記した。ATPase 活性は ΔPi $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$ で表示した。 Ca^{2+} 感受性, ATP 感度, 粘性, SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動などの測定法は前報⁶⁾に従った。尿素存在下の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動は先に報告した方法⁷⁾によった。タンパク質量はビウレット法により求めた。

結 果

魚の死後, 筋肉の変化は死後硬直前, 硬直, および硬直後の軟化という3つの過程に分けられる。本実験の場合, 氷蔵0日の試料は水揚げ後, 氷冷下で2-4時間を経過しており, 試料の一部は硬直初期にあつた。また氷蔵1日の試料は, すでに硬直の終了したものであり, これ以後の試料はすべて硬直後の軟化過程にあるものと判定された。

筋原繊維 ATPase 活性の変化 イワシ肉氷蔵中の性状変化を知る一方法として, 筋原繊維 ATPase 活性の変化を調べた。筋原繊維は氷蔵肉から経時的に調製した。Fig. 1 に示すように, 氷蔵0日の ATPase 活性のレベルは EDTA-, Mg^{2+} (Ca^{2+})-, Ca^{2+} -, Mg^{2+} (EGTA)-ATPase の順に高かった。氷蔵1日後には, Mg^{2+} (Ca^{2+})-, Mg (EGTA)-, Ca^{2+} -, EDTA-ATPase 活性の順になった。すなわち, EDTA-ATPase 活性は約70%の著しい低下を示したが, Ca^{2+} -ATPase 活性は約14%, Mg^{2+} (Ca^{2+})-ATPase 活性は約7%の低下であつた。一方, Mg^{2+} (EGTA)-ATPase 活性は約35%の上昇を示した。

氷蔵1日以後は, 肉の軟化過程にあたるがいずれの ATPase 活性も徐々に低下した。この間に Mg^{2+} (Ca^{2+})-ATPase と Mg^{2+} (EGTA)-ATPase 活性はほとんど同じ活性レベルとなつた。したがって Ca^{2+} 感受性は失なわれた。

筋原繊維 ATPase 活性に及ぼす pH の影響 イワシでは死後数時間以内に, 肉の pH が6以下になることが知られている。氷蔵0日の肉においても, 筋原繊維調製時には pH が5.8に低下しているものがあつた。6日間の氷蔵後には pH 6.0を示した。そこで筋原繊維の ATPase 活性に及ぼす pH の影響を知るために, 次の実験をおこなつた。

Fig. 1. ATPase activities of sardine myofibrils prepared from fresh and ice-stored muscles. Sardine muscle was placed in polyethylene bags and stored in ice. Myofibrils were prepared by the method previously described⁶⁾. ATPase activity was measured in the solution containing 0.1 mg/ml of protein, 2 mm ATP, 20 mm Tris-maleate buffer (pH 7.5), and either 10 mm CaCl_2 -60 mm KCl or 5 mm EDTA-1 M KCl for Ca^{2+} - (△), and EDTA-ATPase (□) activity determinations, respectively. Mg^{2+} -ATPase activity was assayed in 2 mm MgCl_2 , 2 mm ATP, 30 mm KCl, 20 mm Tris-maleate buffer (pH 7.5), 5 mm NaN_3 , and 0.1 mg/ml of protein with either 0.1 mm CaCl_2 (○) or 0.5 mm EGTA (●). The ATPase activities were expressed in ΔPi $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$ at 25°C.

氷蔵0日の肉から調製した筋原繊維を, pH 7.0 および肉の pH に近い pH 6.0 で氷蔵し, ATPase 活性の経時変化を調べた (Fig. 2)。pH 7.0 の場合, 氷蔵10日間に亘り EDTA-, Ca^{2+} -, Mg^{2+} (Ca^{2+})-ATPase 活性は, ほとんど変化がなかつた。 Mg^{2+} (EGTA)-ATPase 活性は氷蔵中に次第に上昇した。これに伴って Ca^{2+} 感受性は低下した。

一方, pH 6.0 の場合, いずれの ATPase 活性も速やかに低下した。この活性低下の傾向は肉で氷蔵した場合 (Fig. 1) と似ていた。しかし肉では Mg^{2+} (EGTA)-ATPase 活性の一時的上昇がみられたが, 筋原繊維では

Fig. 2. Changes in ATPase activities of sardine myofibrils during ice-storage.

The myofibrils (8.8 mg/ml) from fresh muscle were stored in 0.1 M KCl-40 mM Tris-maleate buffer at pH 7.0 and pH 6.0. Symbols and measurements of ATPase activities were the same as in Fig. 1.

一方的に低下した。

筋原繊維氷蔵中のタンパク質濃度は 8.8 mg/ml である。これより低濃度 (2.8 mg/ml) で氷蔵しても、活性変化はほとんど差がなく、タンパク質濃度の影響は少なかった。ただし、pH 7.0 で氷蔵した Mg^{2+} (EGTA)-ATPase の場合は、低濃度のタンパク質量の方が活性の上昇は、やや速くなった。

ミオシン B とゲル画分の性状 ミオシン B の性状変化は、氷蔵中の肉質変化をある程度反映していると考えられる。筋原繊維とミオシン B の性状を相互に比較できるように、ミオシン B を筋原繊維から 0.6 M KCl (pH 7.0) で抽出した。同時に得られた不溶性画分は、0.6 M KCl (pH 7.0) に懸濁し、ゲル画分として使用した。イワシ肉の筋原繊維、ミオシン B、およびゲル画分の性状を Table 1 に示した。

ミオシン B の溶解度 (ここでは筋原繊維からの抽出量で示されている) は氷蔵 0 日で 87.7% であった。3 日後には 21.3% に低下した。残りの部分はゲル画分として回収された。すなわち、氷蔵 3 日後にはゲル画分が約 80% を占めており、ミオシン B の不溶化が進んでいることがわかった。

前報⁹⁾ に示したように、同条件下で貯蔵したコイ肉で

は、氷蔵 15 日後においてもミオシン B の溶解度は 90% 近くの値を示していた。溶解度からみると、イワシ肉の変化はコイに比較して速やかであった。

イワシ氷蔵 0 日のミオシン B は高い EDTA, Ca^{2+} -

Fig. 3. Reduced viscosity of sardine myosin B from fresh and ice-stored muscles by extraction from the myofibrils. Myosin B used was the same preparation as in Table 1. ○, myosin B from fresh muscle; ●, myosin B from 3 day-stored muscle in ice.

Table 1. ATPase activities and other properties of myofibrils, myosin B, and gel fraction. Sardine myofibrils obtained from fresh and 3 day-stored muscles in ice were dissolved with 0.6 M KCl-30 mM Tris-maleate buffer (pH 7.0) for 20 hr at 0°C and then centrifuged at 20,000×g for 20 min. Supernatant (myosin B) and sediment (gel fraction) obtained were used for measurements. Assay conditions for ATPase activity were the same as in Fig. 1 except that Ca^{2+} -ATPase activity* was assayed in 0.5 M KCl.

	Properties	Sardine Ice-storage time		Carp ⁵⁾
		0 day	3 days	0 day
Myofibrils	Mg ²⁺ (Ca ²⁺)-ATPase activity	0.577	0.375	0.718
	Mg ²⁺ (EGTA)-ATPase activity	0.338	0.330	0.195
	Ca ²⁺ -ATPase activity	0.366	0.226	0.645
	Ca ²⁺ -ATPase activity*	0.105	0.050	
	EDTA-ATPase activity	0.666	0.138	1.030
	Ca ²⁺ -sensitivity* ¹	41	12	73
Myosin B	Mg ²⁺ (Ca ²⁺)-ATPase activity	0.376	0.029	0.375
	Mg ²⁺ (EGTA)-ATPase activity	0.013	0.012	0.006
	Ca ²⁺ -ATPase activity	0.312	0.021	0.556
	Ca ²⁺ -ATPase activity*	0.087	0.009	
	EDTA-ATPase activity	0.801	0.162	1.125
	Solubility (%)	87.7	21.3	94.9
	Ca ²⁺ -sensitivity	96	59	98
	ATP-sensitivity* ²	68	8	94
Gel fraction	Mg ²⁺ (Ca ²⁺)-ATPase activity		0.307	
	Mg ²⁺ (EGTA)-ATPase activity		0.233	
	Ca ²⁺ -ATPase activity		0.132	
	Ca ²⁺ -ATPase activity*		0.034	
	EDTA-ATPase activity		0.190	
	Ca ²⁺ -sensitivity		24	

*1 Ca^{2+} -sensitivity = $[1 - (\text{Mg}^{2+}(\text{EGTA})\text{-ATPase activity} / \text{Mg}^{2+}(\text{Ca}^{2+})\text{-ATPase activity})] \times 100$.

*2 ATP-sensitivity = $(\log \eta_r - \log \eta_{r\text{-ATP}}) / \log \eta_{r\text{-ATP}} \times 100$.

ATPase 活性を示し、 Ca^{2+} 感受性は 96 と高かった。筋原繊維とミオシン B の ATPase 活性を比較すると、ミオシン B の方が Mg^{2+} -ATPase 活性が低く、EDTA-ATPase 活性が高かった。これは筋原繊維を 0.6 M KCl で可溶化したためにおこつた変化である。コイでも筋原繊維とミオシン B の間に同様の関係がみられている⁹⁾。

氷蔵 3 日後には、ミオシン B の ATPase 活性は、 Mg^{2+} (EGTA)-ATPase 活性を除いて、0 日のレベルの 20% 以下に低下した。さらにミオシン B の ATP 感度は 0 日の 68 から 3 日の 8 へ低下した。固有粘度 (Fig. 3) は 3.0 から 1.0 へ低下し、ミオシン B 分子の非対称性が失われていることが示唆された。ミオシン B の沈降分析 (Fig. 4) の結果からも、0 日と 3 日のものでは非常に性質が異なることがわかつた。0 日のミオシン B

は主ピークが 20.5 S であり、アクトミオシンのピークが顕著にみられた。また少量の沈降の遅いピークがみられた。一方、3 日のミオシン B は沈降の遅いピークが主であり、アクトミオシンのピークは検出されなかつた⁹⁾。

3 日のミオシン B は筋原繊維タンパク質の 21.3% を占めているにすぎない。主成分は約 80% を占めるゲル画分である。3 日のゲル画分の ATPase 活性を Table 1 に示した。ゲル画分の ATPase 活性はミオシン B より高いことがわかつた。その活性レベルはミオシン B より、筋原繊維に近いことが明らかとなつた。

筋原繊維タンパク質のサブユニット組成の変化 イワシ肉氷蔵中の筋原繊維タンパク質のサブユニット組成の変化を 10% (Fig. 5, B) と 5% (Fig. 5, C) のアクリルアミドゲルを用いた SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によつて分析した。なお Fig. 5, A は筋原繊維

Fig. 4. Sedimentation patterns of sardine myosin B from fresh (A) and 3 day-stored (B) muscles by extraction from the myofibrils. Sedimentation analysis was carried out under the following condition: 3.0 mg/ml myosin B, 0.6 M KCl, 30 mM Tris-maleate buffer (pH 7.0), 40,000 rpm, 10°C, and phase plate angle of 60°. Time after reaching the top speed is shown below each photograph.

Fig. 5. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of sarcoplasmic proteins (A) and myofibrils (B and C) from fresh and ice-stored sardine muscles.

Sarcoplasmic proteins were extracted with 0.1 M KCl-20 mM Tris-maleate buffer (pH 7.0). The electrophoresis was carried out on 10% acrylamide-0.1% SDS gels (A and B) and 5% acrylamide-0.1% SDS gels (C). Protein concentration loaded on the gel: A, 30 μ g/gel; B and C, 60 μ g/gel. The arrow indicates a 34,000-daltons component of sarcoplasmic proteins. HC, myosin heavy chain; Ac, actin; TM, tropomyosin; TN-T, troponin-T; TN-I, troponin-I; LC, myosin light chains.

ンパク質の分析結果を示したものであるから、これについては後述する。6 日間の氷蔵中に、筋原繊維タンパク質のサブユニット組成はミオシン heavy chain とトロポミオシンを除いて、ほとんど変化が見られなかった。

すなわち、Fig. 5, B に示すように、アクチン、トロポニン T と I および 3 本のミオシン light chain は、ほとんど変化がなかった。しかしトロポミオシンは氷蔵中に増加していくように見えた。トロポニン C につい

Fig. 6. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the myofibrils, myosin B, and gel fraction obtained from 3 day-stored sardine muscle in ice.

Myofibrils (A, a), myosin B (B, b), and gel fraction (C, c) used were the same preparations as in Table 1. The myosin B was dialyzed against 0.1 M KCl-20 mM Tris-maleate buffer (pH 7.0) and then centrifuged at $20,000 \times g$ for 20 min. The obtained supernatant (D, d) and sediment (E, e) were also electrophoresed. A-E, 10% acrylamide-0.1% SDS gel; a-e, 5% acrylamide-0.1% SDS gel.

ては検討できなかった。5%アクリルアミドゲル (Fig. 5, C) によると、氷蔵1日以後の泳動図には、新しいバンドが見出された。このうちミオシン heavy chain よりやや分子量が小さいものは、ミオシン heavy chain の分解物と思われる。

次に3日のミオシン B (Table 1) は、アクトミオシン

の特徴を欠いていたので、そのサブユニット組成を調べてみた (Fig. 6)。このミオシン B はトロポニンとトロポミオシン量が多く、ミオシン heavy chain の量が少ないことが見出された。逆に、ゲル画分 (Fig 6, C と c) は調節タンパク質量が少なく、ミオシン heavy chain 量が多いことがみとめられた。

さてミオシン B は、筋原繊維を 0.6 M KCl で抽出し、遠心分離して得られた上清である。3日のミオシン B を終濃度 0.1 M KCl になるよう透析により希釈後、 $20,000 \times g$, 20 分間遠心分離すると、タンパク質量の約 60% が上清に回収された。ここで得た上清と沈殿を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に付したところ、上清 (Fig. 6, D および d) には多量の調節タンパク質とアクチンの一部、および未同定の成分が検出された。沈殿 (Fig. 6, E および e) はアクチンとミオシンが主成分であつたが、ミオシン heavy chain の分解物と推測される成分も検出された。

筋形質タンパク質の変化 赤身魚の特徴の一つに、筋形質タンパク質量が白身魚より多いことがあげられている⁸⁾。事実 Fig. 7 に示したように、イワシ肉 100 g 当たり約 7.3 g の筋形質タンパク質が得られたが、コイからは約 5 g であつた。またイワシ肉の筋形質タンパク質量は、氷蔵1日で約 14%、6日で26%が不溶化した。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によると (Fig. 5, A), 筋形質タンパク質の中で 34,000 ダルトンを示す成分 (図中、矢印で示した) が特異的に不溶化

Fig. 7. Amount of sarcoplasmic protein extracted from fresh and ice-stored muscles with 0.1 M KCl-20 mM Tris-maleate buffer (pH 7.0). ●, sardine; ○, carp.

Fig. 8. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of insolubilized sarcoplasmic proteins during ice-storage. Sarcoplasmic proteins were stored for 24 hr in ice at pH 6.0 or pH 7.0, and then centrifuged at $20,000 \times g$ for 20 min. A, E, sarcoplasmic proteins; B, F, sediment obtained from the stored sarcoplasmic proteins at pH 6.0; C, G, sediment obtained from the stored sarcoplasmic proteins at pH 7.0; D, H, myofibrils from fresh muscle; I, myofibrils from 1 day-stored muscle in ice. A-D, 10% acrylamide-0.1% SDS gel; E-I, 10% acrylamide-0.1% SDS gel containing 8M urea. The arrow indicates a 34,000-daltons component of sarcoplasmic proteins.

していくことが示唆された。氷蔵0日の肉から抽出した筋形質タンパク質を pH 6.0 または pH 7.0 で、 0°C 、24 時間放置した場合も、pH 6.0 で 17%、pH 7.0 で 15% が不溶化することがわかった。この量は、肉を1日氷蔵したときに不溶化する筋形質タンパク質量とほぼ見合っており、主として 34,000 ダルトンの成分から成ることが示された (Fig. 8)。

34,000 ダルトンの成分は SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で、トロポミオシンと同一の移動度を示したが (Fig. 8, A-D)、尿素存在下の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動では、この両者を分離することができた (Fig. 8, E-I)。

以上の結果から、Fig. 5 に示したトロポミオシンの増大が、実は筋形質タンパク質の混入によるためであることがわかった。

次に氷蔵0日と1日の肉から調製した筋原繊維を尿素存在下のポリアクリルアミドゲル電気泳動に付して、34,000 成分の混入について調べてみた (Fig. 8, H および I)。図に示すように、34,000 ダルトンの成分は氷蔵1日の筋原繊維からは検出されたが、0日のものからは検出されなかつた。この成分は不溶化すると高イオン強度 (0.6M KCl) の溶液にも溶けなくなるので、ミオシン B には含まれていない。

考 察

筋原繊維 ATPase 活性の変化 イワシ肉 (氷蔵0日) から調製した筋原繊維の ATPase 活性は、コイ⁹⁾ やテトラピア* のそれとは多少異なっている。すなわち、イワシでは Mg^{2+} (EGTA)-ATPase 活性が高く、 Ca^{2+} 感受性が低いのである (Fig. 1, Table 1)。

この性質はイワシ以外の赤身魚でも見られるであろうか。そこで即殺サバ肉で Fig. 2 と同様の実験をおこなって Fig. 9 に示した。図のように氷蔵0日のサバでは Mg^{2+} (EGTA)-ATPase 活性はイワシの 1/2 程度であり、 Ca^{2+} 感受性は 73 と高かつたが、 Ca^{2+} 、EDTA、 Mg^{2+} (Ca^{2+})-ATPase 活性のレベルはイワシと同程度であつた。この結果から、赤身魚の特徴とはいえないようである。

Ca^{2+} 感受性の低下からは、調節タンパク質 (トロポニンとトロポミオシンの複合体) の失活が予想される^{9,10)}。しかし、ミオシン B では高い Ca^{2+} 感受性を示している (Table 1) ので、この可能性は少ないであろう。また氷蔵肉中の調節タンパク質は SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動図 (Fig. 5, B) から、ほとんど変化がないようにみえるので、分解の可能性は少ないと思

* 即殺テトラピアの筋原繊維の ATPase 活性は Mg^{2+} (Ca^{2+}) - , Mg^{2+} (EGTA) - , Ca^{2+} - , EDTA-ATPase の順に、0.435, 0.055, 0.345, 0.636 $\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mg}$ である。 Ca^{2+} 感受性は 87 である。

Fig. 9. Changes in ATPase activities of mackerel myofibrils during ice-storage. The myofibrils (8.0 mg/ml) from fresh muscle were stored in 0.1 M KCl-40 mM Tris-maleate buffer at pH 7.0 and pH 6.0. Symbols and measurements of ATPase activities were the same as in Fig. 1.

われる。しかし、ミオシン heavy chain の分解の可能性が示唆されているところから (Fig. 5, C), プロテアーゼ活性の存在は否定できないので、定量的には調節タンパク質の減少が起つているかもしれない。したがって、氷蔵期間の長い筋原繊維については、調節タンパク質の分解によって、 Ca^{2+} 感受性が低下することも考えられる。

氷蔵初期のイワシ筋原繊維の Mg^{2+} (EGTA)-ATPase 活性が高く、 Ca^{2+} 感受性が低い理由は次のように考えられる。氷蔵 0 日の試料には死後硬直初期のものが含まれていること、および氷蔵 1 日後にはこの性質が強まっていることから、死後硬直との関連が示唆される。すなわちミオシンとアクチンの結合が強まって、調節タンパク質が作用できない状態に変化しているものと推測される。つまりこの性質はイワシ筋原繊維に本質的なものではなく、死後変化によるものと思われる。しかし、コイ肉氷蔵中に Ca^{2+} 感受性は低下するが、コイの硬直期においては、このような顕著な Mg^{2+} (EGTA)-ATPase 活性の上昇と Ca^{2+} 感受性の低下はみられない⁹⁾。このコイとの相違は、死後のアクチンとミオシン結合の不可逆性の問題であるかもしれないが、今後検討する必要があるように考えられる。

イワシ肉氷蔵中の第 2 の特徴は EDTA-ATPase 活性の低下が著しいことである。この活性は氷蔵 1 日で約 70% の低下を示した (Fig. 1)。肉の pH 低下によるミオシンの変性を示すものと思われるが、 Ca^{2+} -ATPase 活性は約 14% の低下にすぎない。ミオシンの EDTA-ATPase 活性は、アクチンとの結合によって低下する¹⁰⁾ので、アクトミオシンの形成もこの活性低下に多少関与しているかもしれない。

EDTA-ATPase 活性はミオシンの易反応性 SH 基 (SH_1) が修飾されると失活するが、同時に高イオン強度下で測定した Ca^{2+} -ATPase 活性が上昇することが知られている¹¹⁾。しかし氷蔵中には、この様な Ca^{2+} -ATPase 活性の変化はみられない (Table 1) ので、 SH_1 の修飾の可能性は少ないと思われる。

ATPase 活性の変化からみると、pH 6.0 におけるイワシ筋原繊維は (Fig. 2)、同様の貯蔵条件下のコイ⁹⁾やサバ (Fig. 9) に比較してより不安定であるといえる。pH 7.0 にすると、ATPase 活性の変化がほとんど抑制されることは、イワシ肉の利用、加工において、pH 調整によって肉の安定化をはかっている事実¹²⁾と一致する結果であつた。

ミオシン B の性状 イワシのミオシン B については渡部ら¹³⁾が Ca^{2+} 、 Mg^{2+} -ATPase 活性を測定しているが、本報の 0 日のミオシン B の活性より低い値である。これはミオシン B を凍結肉から調製したためと思われる。

氷蔵 0 日の肉から得たミオシン B は、ATPase 活性、沈降分析、粘性などの性状から判断すると、アクトミオシンの特徴を有していると思われる。しかし、氷蔵 3 日のミオシン B はこのような特徴をほとんど失なっていた。氷蔵 3 日では 21.3% がミオシン B として回収されるにすぎない。しかもミオシン B の約 60% は調節タンパク質で占められていた。すなわち、アクトミオシンに比較して、調節タンパク質ははるかに不溶化し難いことを示している。

氷蔵 16 日のコイひき肉から得たミオシン B の性状は⁹⁾、イワシの氷蔵 3 日のものと良く似ていた。いずれも肉中のアクトミオシンの不溶化が著しく、肉の変性が進んでいることを示唆しているものと考えられる。

筋形質タンパク質の変化 イワシ肉氷蔵中に、その筋形質タンパク質の一部は不溶化する。最初に不溶化するの、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で 34,000 ダルトンを示す成分である。SCOPES¹⁴⁾によると、哺乳動物肉ではクレアチンキナーゼが最も不安定であると報告されているが、この酵素のサブユニットは 41,000 ダルトンであり¹⁵⁾、イワシの 34,000 ダルトンの成分とは異なっている。イワシのこのタンパク質の正体は不明で

ある。

氷蔵1日の筋原繊維には 34,000 ダルトンの成分が 5~6% 混入しているが、筋原繊維 ATPase 活性の低下に、特に著しい影響を与えているようにはみえない。Fig. 2 で用いた筋原繊維は、この成分を含んでいないにもかかわらず、急激な ATPase 活性の低下を示すからである。

なお、新鮮魚肉から低イオン強度の溶液でアクトミオシンが溶出されるという報告¹⁰⁾があるが、本実験では、イワシ筋形質タンパク質の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動図からはミオシン heavy chain に相当するバンドは検出されなかつた。

ミオシン heavy chain の分解の可能性 Fig. 5, C の結果は、氷蔵中にミオシン heavy chain が分解する可能性を示している。イワシ肉を pH 5~6, 25°C でインキュベートすると、一層明瞭にミオシン heavy chain の分解が検出されるので*、イワシ肉では pH 低下に伴って、プロテアーゼが活性化されることが推測される。SUZUKI ら¹⁷⁾はウサギのミオシン B をカテプシン D で処理すると、Ca²⁺-ATPase 活性には影響がないが、Mg²⁺-ATPase 活性の低下がおこることをみている。しかしイワシではプロテアーゼの筋原繊維タンパク質に及ぼす影響、ならびに肉質の軟化との関連などについて、まだ検討がされておらず今後の問題である。

試料の入手にあたり、御援助をいただいた北海道大学水産学部羽田野六男助教授に深謝します。また本実験にあたり同学部学生成田憲弘氏の協力を得たことを感謝します。

文 献

- 1) 藤井 豊: *New Food Industry*, **20**, 8-13(1978).
- 2) 福田 裕・掛端甲一・新井健一: 日水誌, **43**, 717-725(1977).
- 3) 小長谷史郎・小長谷庸夫: 東海水研報, No. 96, 67-74(1978).
- 4) 橋本昭彦・新井健一: 日水誌, **44**, 1389-1393(1978).
- 5) 関 伸夫・成田憲弘: 日水誌, **46**, 207-213(1980).
- 6) 関 伸夫・池田 優・成田憲弘: 日水誌, **45**, 791-799(1979).
- 7) 関 伸夫・岩淵三郎: 日水誌, **44**, 1333-1340(1978).
- 8) 志水 寛・柄多 哲・西岡不二男: 日水誌, **42**, 1025-1031(1976).
- 9) S. EBASHI, A. KODAMA, and F. EBASHI: *J. Biochem.*, **64**, 465-477(1968).
- 10) W. J. BOWEN and T. D. KERWIN: *J. Biol. Chem.*, **211**, 237-247(1954).
- 11) T. SEKINE and W. W. KIELLY: *Biochim. Biophys. Acta*, **81**, 336-345(1964).
- 12) 石川宣次・中村邦典・藤井 豊: 東海水研報, No. 90, 59-66(1977).
- 13) S. WATABE, K. KANNA, and T. SUZUKI: *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **43**, 1353(1977).
- 14) R. K. SCOPES: *Biochem. J.*, **91**, 201-207(1964).
- 15) K. WEBER and M. OSBORN: *J. Biol. Chem.*, **244**, 4406-4412(1969).
- 16) J. J. CONNELL: *Biochem. J.*, **69**, 5-12(1958).
- 17) A. SUZUKI, A. OKITANI, and M. FUJIMAKI: *Agr. Biol. Chem.*, **33**, 1723-1729(1969).

* 下村昌夫・成田憲弘・関 伸夫: 昭和 54 年度 日本水産学会春季大会講演要旨集, p 204.