南極産オキアミの肝すい臓たんぱく質分解酵素による アクトミオシンの消化性

大 泉 徹・白 木 永 子・矢 部 和 夫・新 井 健 一

(1982 年 5 月 29 日受理)

Digestibility of Actomyosin of Antarctic Krill *Euphausia superba* by its Digestive Protease

Tooru OOIZUMI,*¹ Eiko USUKI*², Kazuo YABE*², and Ken-ichi ARAI*¹

A change in the muscular protein of Antarctic krill with its digestive protease of hepato-pancreas has been studied by measuring the viscosity of actomyosin. Taking account of the instability of actomyosin, the decrease in viscosity was assayed in the presence and absence of sorbitol. The decrease in viscosity was thus found to proceed in two distinct stages: a fast first-order decrease in an early stage, followed by a relatively slow first-order decrease. The first-order rate constant (K') at the early stage was then used as a measure of digestibility of actomyosin.

In the presence of 1.5 M sorbitol, actomyosin was digested with various concentrations of crude protease and at various temperatures. It was thus found that actomyosin of krill was several times more rapidly digestible than that of carp was. When the digestion was performed in the presence of various concentrations of sorbitol (0-2.5 M), the rate constant (K') was found to decrease with increasing molarity of sorbitol. From the linear relation between $\log K'$ and sorbitol (M), the K' value for actomyosin of krill without sorbitol was theoretically obtained.

SDS-gel electrophoretic patterns of these digests showed that myosin heavy chain of krill was rapidly decomposed by its digestive protease, but this decomposition was effectively prevented by sorbitol.

南極産オキアミの筋肉には、ウサギ¹⁾や魚類²⁾の筋肉のそれらと同じ生化学的特性を示すアクトミオシンが含まれていることが、最近確かめられた。³⁾ またその研究において、オキアミ筋肉のアクトミオシンそのものが従来までに類例を見ないほど不安定であり、その上、損傷を受けた消化管（肝すい臓や胃など）から筋肉中に浸透してくるたんぱく質分解酵素（プロテアーゼと呼ぶ）によってアクトミオシンが消化分解をうける可能性が強いことから、⁴⁾ 特別な処理法によらない限り、オキアミ筋肉から変性させることなくアクトミオシンを調製することはきわめて困難であることが明らかにされた。^{5,6)} 一方では、オキアミの消化性プロテアーゼについても研究が行われており、その諸性質がかなり知られるようになった。⁶⁻⁹⁾ さらに、オキアミのプロテアーゼによって引き起こされる筋肉の自己消化についても研究がすすめられているが、^{9,10)} オキアミの筋肉たんぱく質を基質としてその消化性を定量的に検討した研究は全く行われてい

ない。そこで本研究では、主として食品学的な必要性から、オキアミ筋肉たんぱく質の特徴を明らかにするため、アクトミオシンを基質としてオキアミの消化性プロテアーゼによる消化速度を求め、魚類アクトミオシンの場合と比較検討することを目的とした。

実 験 方 法

アクトミオシンの調製法 オキアミ *Euphausia superba* 筋肉のアクトミオシンは、西田らがすでに報じた方法⁹⁾ に準じてグリセリン浸漬した筋肉（漁獲直後のオキアミ筋肉を 50% グリセリンに浸漬し、 -20°C で保存したもの）から調製し、1.5 M ソルビトールを含む 0.5 M KCl, 20 mm Tris-maleate (pH 7.5) 溶液として実験に供した。

コイ *Cyprinus carpio* 筋肉のアクトミオシンは新鮮な背筋から高土の用いた方法¹¹⁾ で調製し 0.5 M KCl, 20 mm Tris-maleate (pH 7.5) 溶液として使用したが、比

*¹ 北海道大学水産学部生物化学教室 (Laboratory of Biochemistry, Faculty of Fisheries, Hokkaido University, Hakodate 041, Japan).

*² 北海道教育大学釧路分校化学教室 (Chemical Laboratory, Kushiro College, Hokkaido University of Education, Kushiro 085, Japan).

較のために 1.5 M ソルビトールを含む同溶液をも調製した。

なお、プロテアーゼによる消化性およびソルビトール濃度の影響を検討する実験では、KCl および緩衝液の濃度を一定に保ちながら、高濃度のソルビトール溶液を加えて終濃度を 0.5~2.5 M に調整し以後の測定に供した。

オキアミ肝すい臓から粗プロテアーゼ溶液の調製法
漁獲直後の新鮮なオキアミ、または、冷凍したオキアミ (-20°C, 3 ヶ月~7 ヶ月) から肝すい臓を採取し、4~5 倍容量の 0.16 M KCl, 40 mM Tris-HCl (pH 7.5) 溶液を加えてホモジナイズ (30 秒間) し遠心分離して集めた上清を 0.5 M KCl, 20 mM Tris-maleate (pH 7.5) に対して透析して、粗プロテアーゼ溶液を得た。なお、以上の方法によってほぼ 90% 以上のプロテアーゼ活性が抽出されていることを確かめた。

また、アクトミオシン溶液および粗プロテアーゼ溶液のたんぱく質濃度は牛血清アルブミン画分 V を標準としてビュレット法¹³⁾によって比色定量した。

粗プロテアーゼによるアクトミオシンの消化速度の測定法 オキアミの粗プロテアーゼによるアクトミオシンの消化性は、その粘度の減少速度を測定することによって検討した。^{13,14)} すなわち、粘度計中に入れたアクトミオシン溶液に対して、たんぱく質量として 1/5~1/200 の範囲内で一定の比になるように粗プロテアーゼ溶液を加え、一定温度に保持しながら経時的に粘度の変化を測定した。本実験では、試料溶液 2.5 ml 用のオストワルド型粘度計を使用し、アクトミオシン濃度は約 1.5 mg/ml とし、 $Z\eta = \ln \eta_r / C$ を求めた。続いて $\ln Z\eta$ (相対値) を消化時間に対してプロットし、粘度の減少速度を次式によって求め、消化性を判定する尺度とした。¹⁴⁾

$$K = (\ln Z\eta_0 - \ln Z\eta_t) / t, \quad K' = K / 2.303$$

ここで $Z\eta_0$ と $Z\eta_t$ はそれぞれ消化前と消化 t 秒後における $Z\eta$ (相対値) の対数値である。

粗プロテアーゼのカゼイン水解決活性の測定法 粗プロテアーゼのカゼインを基質とした活性の測定は KUNITZ の方法に準じて行った。すなわち、カゼイン (5 mg/ml) 1.9 ml に等量の 0.1 M Tris-HCl (pH 7.5) を加え、粗プロテアーゼ溶液 0.2 ml を添加して 25°C で 10 分間反応後、2 ml の 15% 過塩素酸を加えて反応を停止させた。活性の単位は、10 分間に 280 nm における吸光値を 1 増加させる場合を 1 単位として表わした。

SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動によるサブユニット組成の検討 WEBER と OSBORN の方法に準じて¹⁸⁾ 10% アクリルアミドゲル-0.1% SDS を用いて 0.2 M Tris-glycine, pH 8.8 溶液中で泳動した後、Co-

Fig. 1. Changes in viscosity of actomyosins from carp and Antarctic krill by digestive protease of Antarctic krill.

(A) Carp actomyosin in 0.5 M KCl, 20 mM Tris-maleate (pH 7.5) was digested at 10°C with crude protease in an amount of 1/35 (w/w) relative to actomyosin. (B) Antarctic krill actomyosin in 0.5 M KCl, 20 mM Tris-maleate (pH 7.5) containing 1.5 M sorbitol was digested at 10°C with crude protease in an amount of 1/15 (w/w) relative to actomyosin.

The viscosity of digests (A and B) was measured at 10°C with an OSTWALD type viscometer having a flow time of 60 s for a 2.5 ml of solution. The relative viscosity data was converted to viscosity number ($Z\eta$). $Z\eta$ is $\ln \eta_r / C$, where η_r and C are the relative viscosity and the protein concentration (mg/ml).

The hepatopancreas was collected from fresh or freshly frozen Antarctic krill and homogenized with 4 volumes of 0.16 M KCl, 40 mM Tris-HCl (pH 7.5). The extract was then dialyzed against 0.5 M KCl, 20 mM Tris-maleate (pH 7.5) overnight. Crude protease was obtained in the supernatant by centrifugation.

omassie Brilliant Blue R で染色した。

実験結果

粗プロテアーゼによるアクトミオシンの粘度の経時的減少 コイのアクトミオシン溶液に対して 1/35 量 (重量比) の粗プロテアーゼを加え、10°C において粘度を経時的に測定し、 $Z\eta$ (相対値) の対数値を消化時間に対してプロットすると Fig. 1(A) の結果が得られた。こ

の結果によると、 $Z\eta$ の低下は一次反応式に従って消化の初期に速く後期は遅い二段階の反応になることが示された。Fig. 1(B) にはオキアミのアクトミオシンに対して 1/15 量のプロテアーゼを加え、 10°C で消化した結果を示した。オキアミのアクトミオシンの場合には、その変性を防止するために 1.5M ソルビトールの存在下で消化を行ったが、コイアクトミオシンに対する場合と同様に粘度減少は二段階の反応となることが示されている。この反応様式はウサギおよび魚類のミオシンまたはアクトミオシンをトリプシンによって消化した場合と良く似ており、¹⁴⁾ その場合の初期における速い粘度の減少はミオシン分子の断片化、すなわち、ATPase 活性分子断片 (H-メロミオシンおよび S-1) の生成を反映していると言われている。¹⁵⁾ 実際にこの段階では、両アクトミオシンから水溶性のたんぱく質画分が生成するので、ウサギなどの場合と類似の反応が起っていることを強く支持している。そこで、この初期における粘度の速い減少速度を消化性の尺度として採用することにした。また、コイ以外の魚類または甲殻類の筋肉アクトミオシンについても、 $5\sim 25^{\circ}\text{C}$ の温度における消化性を検討したところ、プロテアーゼによる消化速度には差異が見られるものの、反応様式は常に同じであることを経験した (結果は図示しない)。

アクトミオシンの粘度減少速度と粗プロテアーゼ濃度の関係 コイのアクトミオシン (1.5 mg/ml) 2.4 ml に対して、粗プロテアーゼを最終濃度で 0 から $100\text{ }\mu\text{g/ml}$ になるように加えて 25°C における粘度の減少速度を求め、粗プロテアーゼ濃度に対してプロットした結果を Fig. 2 に示した。この結果によると、酵素濃度が $72\text{ }\mu\text{g/ml}$ 以下の範囲では、粘度の減少速度は酵素濃度に比例することが認められた。なお、この酵素濃度をアクトミオシンに対するプロテアーゼの重量比に換算すると、アクトミオシンに対する粗プロテアーゼの重量が 1/20 以下の範囲では粘度の減少速度は粗プロテアーゼの量に比例することを意味する。一方、カゼイン (2.5 mg/ml) 3.8 ml に対して、粗プロテアーゼを 25, 50 または $100\text{ }\mu\text{g/ml}$ の濃度になるように添加したときも、カゼイン水解活性と酵素濃度は比例することを認めた。そこで、以上の条件下の二つの活性単位を比べると、カゼイン水解活性 0.144 units を示すオキアミの粗プロテアーゼ濃度は、コイのアクトミオシンの粘度では減少速度 $K'=44\times 10^{-5}\text{ s}^{-1}$ を示すので、カゼイン水解活性 1 単位は $K'=306\times 10^{-5}\text{ s}^{-1}$ を示す酵素活性に相当することが知られる。

粗プロテアーゼ活性の個体差と貯蔵性 コイのアクトミオシンに対して 1/17 量の粗プロテアーゼを添加し、 25°C における粘度減少速度 (K') を求めた。このときオ

Fig. 2. Comparison of caseinolytic activity and rate constant for decrease in viscosity of carp actomyosin by digestive protease of Antarctic krill.

The preparation of crude digestive protease from hepatopancreas of Antarctic krill was conducted as described in Fig. 1.

Caseinolytic activity (A) was determined by the method of M. KUNITZ (Ref. 16). A unit of activity was demonstrated as an increase in absorbance of 1 at 280 nm per 10 min at 25°C . The measurement of viscosity (A) was conducted as described in Fig. 1, except that the digestion of carp actomyosin was performed at 25°C with various concentrations of digestive protease. The final concentration of protease in digestion medium was shown in abscissa.

The first order rate constant for the decrease in viscosity at the early stage was calculated using a formula, $K=(\ln Z\eta_0 - \ln Z\eta_t)/t$, where $Z\eta_0$ and $Z\eta_t$ are the viscosity numbers (relative value) before and after digestion time (t second) $K'=K/2.303$. $Z\eta=\ln \eta_t/C$.

キアミを約 200 個体ずつ 3 群に分け肝すい臓を採取し、別々に粗プロテアーゼを調製して活性を比較したところ、 K' の平均値は $72.8\times 10^{-5}\text{ s}^{-1}$ で標準偏差は $1.56\times 10^{-5}\text{ s}^{-1}$ となり、よく近似した値を得た。なお、漁期および漁場の異なる群の個体については比較しなかったが、漁獲された一群のオキアミに関しては個体による活性の差はあまり大きくないと思われる。次に、粗プロテアーゼを氷蔵しておき、一定の酵素濃度によるコイのアクトミオシンの粘度減少速度を経時的に測定したところ、一週間にわたってほとんど変化しないことを認めた。さらに、調製した日の異なる別のコイのアクトミオシン標品 (4 種) に対して同一の粗プロテアーゼを作用させたところ、粘度減少速度の平均値は $70.9\times 10^{-5}\text{ s}^{-1}$

Fig. 3. Enzyme concentration dependency of rate constant for decrease in viscosity of carp actomyosin by digestive protease of Antarctic krill.

The preparation of crude digestive protease from hepatopancreas of Antarctic krill was conducted as described in Fig. 1.

The measurement of viscosity and calculation of rate constant (K') for the decrease in viscosity were conducted as described in Figs. 1 and 2, except that the digestion was performed in the absence (○) and presence (●) of 1.5 M sorbitol at 25°C (A) and at 10°C (B) with a definite concentration of carp actomyosin (1.5 mg/ml) and various concentrations of digestive protease.

で標準偏差は $1.36 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ となり、この場合もほとんど差異がないという結果を示した。

なお、冷凍貯蔵したオキアミ (−20°C, 3 ヶ月〜7 ヶ月) から肝すい臓を採取し同じ方法で粗プロテアーゼを調製して、アクトミオシンの粘度減少速度を測定したところ、速度 (K') は新鮮な場合に比べて、むしろやや高い値を示した。

粗プロテアーゼによるコイアクトミオシンの消化性におよぼすソルビトールの影響 すでに報じたようにオキアミのアクトミオシンはソルビトールを共存させない限り、速やかにその生物学的活性 (たとえば ATPase 活性) を失うため、⁸⁾ その消化性を検討する際にもソルビトール共存下で行う必要性が考えられる。そこでまず初めに、コイのアクトミオシンを対象とし、1.5 M ソルビトール存在下および非存在下で粗プロテアーゼを添加し、粘度の減少速度 (K') を求めて比較した。Fig. 3 には、一定量のアクトミオシン (約 3.6 mg) に対して、粗プロテアーゼを重量比で 1/5 から 1/200 までの間で添加して、25°C (A) または 10°C (B) で粘度の減少速度を測定した結果を示した。この結果によると、粗プロテアーゼ量が少ない場合の方が、また消化温度が低い場合の方が、そして、ソルビトールが共存する場合の方が、明らかにアクトミオシンの粘度減少速度 (K') は小さくなった。1.5 M ソルビトール共存下の速度 (K') はソル

ビトールが存在しないときの速度のほぼ 1/5 程度になることは、消化温度の差異や粗プロテアーゼ量の多少にかかわらず、ほぼ同じであった。

Fig. 4 には、アクトミオシンに対する粗プロテアーゼ量を 1/20 として、1.5 M ソルビトールの存在または非存在下で、5~30°C の間の一定温度における粘度の減少速度を求めた結果を示した。この結果によると、アクトミオシンの粘度の減少速度 (K') はソルビトールの存否にかかわらず 20°C 以上で急激に大きくなり、また、ソルビトール存在下の消化速度は非存在下の速度に比べて、いずれの消化温度でも、1/4 から 1/5 程度であることが示された。

粗プロテアーゼによるソルビトール存在下におけるコイおよびオキアミのアクトミオシンの消化性の比較

1.5 M ソルビトールを含むコイとオキアミのアクトミオシンに対して 1/14 から 1/140 量の粗プロテアーゼを加え、10°C における粘度の減少速度 (K') を求めた。その結果を Fig. 5 に示したが、これによると、オキアミのアクトミオシンはコイのアクトミオシンよりも消化をうけやすく、両者の粘度減少速度の差はアクトミオシンに対する粗プロテアーゼ量が多いときにはやや大きく、少ないときは小さくなる傾向を示した。すなわち、粗プロテアーゼ量が 1/14 の場合はオキアミの方がコイの 6.6 倍、1/27 の場合および 1/50 の場合は同じく 3.8 倍

Fig. 4. Temperature dependency of rate constant for decrease in viscosity of carp actomyosin by digestive protease of Antarctic krill.

The preparation of crude digestive protease from hepatopancreas of Antarctic krill was conducted as described in Fig. 1.

The measurement of viscosity and calculation of rate constant (K') for the decrease in viscosity were conducted as described in Figs. 1 and 2, except that the digestion was performed in the absence (○) and presence (●) of 1.5 M sorbitol at various temperatures with digestive protease in an amount of 1/20 (w/w) relative to actomyosin.

および 2.8 倍大きかった。

次に、同じく 1.5 M ソルビトール存在下のコイとオキアミのアクトミオシンに 1/20 重量の粗プロテアーゼを加え、5~25°C の異なる消化温度で粘度の減少速度を測定し結果を Fig. 6 に示した。この結果によると、オキアミのアクトミオシンはコイのアクトミオシンに比べて常に消化を受けやすく、この 5~25°C の範囲ではどの温度においてもほぼ 4 倍ほど速度が大きかった。

粗プロテアーゼによるアクトミオシンの粘度減少速度 (K') とソルビトール濃度の関係 アクトミオシンにソルビトールを共存させると粗プロテアーゼによる粘度の減少速度が小さくなることを知ったので、次に、オキアミのアクトミオシンに対して粗プロテアーゼ量を 1/14 または 1/27 量とし、10°C における粘度の減少速度を 0.5 から 2.5 M に至る異なる濃度のソルビトール存在下で測定した。粘度減少速度 (K') とソルビトール濃度の関係を Fig. 7(A) に示した。また、 K' の対数値とソルビトール濃度の関係を Fig. 7(B) に示した。この結果から、粗プロテアーゼ量と関係なくソルビトール濃度が高いほど粘度の減少速度は小さくなることが示された。その上、 $\log K'$ とソルビトール濃度 (M) の間には直線

Fig. 5. Comparison of enzyme concentration dependency of rate constant for decrease in viscosity of actomyosins from carp and Antarctic krill by digestive protease of Antarctic krill.

The preparation of crude digestive protease from hepatopancreas of Antarctic krill was conducted as described in Fig. 1.

The measurement of viscosity and calculation of rate constant (K') for the decrease in viscosity were conducted as in Fig. 3 (B), except that the digestion was necessarily performed in the presence of 1.5 M sorbitol.

(▲) Krill actomyosin, (○) Carp actomyosin.

関係が成立することが明らかになった。したがって、得られた直線をソルビトール濃度が 0 に相当する点に外挿してこの K' を求めると、それはソルビトールが共存しないオキアミアクトミオシンの粘度減少速度を理論的に示すことになる。実際に Fig. 7 (B) から求めた値は粗プロテアーゼ量が 1/14 のときは $K' = 100 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 、1/27 のときは $44.7 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ となった。なお、コイのアクトミオシンに対してオキアミの粗プロテアーゼを 1/14 量添加し、25°C で 2.5 M に至る各種濃度のソルビトール存在下で粘度減少速度を測定し、Fig. 7 (B) と同じ作図をし、ソルビトール濃度が 0 における理論的な K' を求めると、その値は $79.3 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ となった。コイのアクトミオシンは安定であってソルビトール非存在下における速度は実測可能であるが、その値は $84.0 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ (Fig. 3) となり理論値とよく近似していた。

粗プロテアーゼによるオキアミアクトミオシンの断片化とソルビトールの抑制作用 オキアミのアクトミオシンに 1/14 量の粗プロテアーゼを加え、0.6, 1.5 または 2.5 M のソルビトールの共存下において、10°C で 30 分間にわたって消化するとき起るサブユニット組成の変化を、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法によって

Fig. 6. Comparison of temperature dependency of rate constant for decrease in viscosity of actomyosins from carp and Antarctic krill by digestive protease of Antarctic krill.

The preparation of crude digestive protease from hepatopancreas of Antarctic krill was conducted as described in Fig. 1.

The measurement of viscosity and calculation of rate constant (K') for the decrease in viscosity were conducted as in Fig. 4, except that the digestion was necessarily performed in the presence of 1.5 M sorbitol.

(▲) Krill actomyosin, (○) Carp actomyosin.

分析した結果を Fig. 8 に示した。この結果によると、消化前のオキアミアクトミオシンはミオシン重鎖 (HC) とアクチン (A) が主成分で、さらに、HC の下にパラミオシン (PM), A の下にトロポミオシン (TM) およびミオシン軽鎖 (LC) と思われる成分が認められ、従来報告されているアクトミオシンのサブユニット組成とよく似ていた。⁸⁾ 一方、粗プロテアーゼによって消化すると、0.6 M ソルビトール存在下では 10 分後にはミオシン HC に当たる成分が減少して低分子量の分子断片の増加が見られ、30 分後には HC がほぼ消失した。またソルビトールを 1.5 M に増加するとミオシン HC の減少と分子断片の生成は遅くなり、さらに、2.5 M まで増加するとそれらがほとんど起らなくなることが示された。この結果は、オキアミのアクトミオシンの粘度が粗プロテアーゼによって減少する現象は、主にミオシンの断片化に起因しており、ソルビトールの添加はそれらを効果的に抑制することを明らかに示した。

考 察

オキアミの肝すい臓に含まれるたんぱく質分解酵素は、少なくとも 2 種以上から成っているがその精製および同定はまだ終っていない。⁵⁻⁹⁾ そこで、本実験では全ての種類を含んでいる粗酵素液を用いてアクトミオシンに対する作用を検討することにした。したがって、アクトミオシンに起こる変化も複雑であり、二種以上の反応が重なって起こっている可能性が考えられる。しか

Fig. 7. Relation between rate constant for decrease in viscosity and sorbitol concentration.

The preparation of crude digestive protease from hepatopancreas of Antarctic krill was conducted as described in Fig. 1.

The measurement of viscosity and calculation of rate constant (K') for the decrease in viscosity were conducted as in Fig. 5, except that the digestion was performed at 10°C in the presence of various concentrations of sorbitol with crude digestive protease in an amount of 1/14 (▼) and 1/27 (○) relative to actomyosin by weight.

Fig. 8. Changes in SDS-gel electrophoretic patterns of Antarctic krill actomyosin in the presence of sorbitol by its digestive protease.

The preparation of crude digestive protease from hepatopancreas of Antarctic krill was conducted as described in Fig. 1.

The digestion of actomyosin was performed at 10°C for 30 min in the presence of 0.6, 1.5 and 2.5 M sorbitol with crude digestive protease in an amount of 1/14 (w/w) relative to actomyosin. During the digestion, a portion of digest was taken out at 10 min intervals and submitted to electrophoresis by the method of WEBER and OSBORN (Ref. 18) using 10% acrylamide gel, 0.2 M Tris-glycine buffer (pH 8.8) and 0.1% SDS.

し、それにもかかわらず、粘度の減少は常に初期に速く、後期に遅い二段階の反応となり、ミオシンやアクトミオシンから H-メロミオシンを生成する反応と類似していた。また、SDS ゲル電気泳動図型を見ると、消化によって生成する分子断片の分子量は HMM や S-1 に相当するような大きさであった。^{13,10)} したがって、粘度減少速度をアクトミオシンの消化性の指標とすると、それはミオシン分子に起こる大まかな断片化の速度を主に反映しているように推定される。なおホッカイベビおよびケガニの肝臓から調製した粗プロテアーゼを使用し、魚類および同上甲殻類のアクトミオシンに対する作用を検討した場合もほとんど同じ結果を示した。*

コイのアクトミオシンについて、プロテアーゼ活性の単位を粘度減少速度を指標として表わした場合と、カゼイン水解活性を指標とした場合とで比較検討した。一方、オキアミのアクトミオシンの粘度減少を指標とする場合は、測定条件が 10°C で 1.5 M ソルビトール存在下

に限定されるために、両活性の正確な比較は困難である。しかし、すでにアクトミオシンに対する粗プロテアーゼの重量比が 1/20 の条件では、コイのアクトミオシンに比べオキアミのアクトミオシンが 4 倍程度消化を受けやすいという結果を得ているので、カゼイン水解活性 1 単位はオキアミのアクトミオシンの粘度減少速度 $K' = 1200 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ に相当すると概算される。

オキアミのプロテアーゼによる ATPase 活性中心部位の消化性に関する研究をすることも必要であるが、オキアミの粗プロテアーゼ活性を一時的に阻止する方法が見い出されていないので、消化による ATPase 活性の経時変化を検討することは現時点では不可能である。ただし、対照のためにトリプシンによってアクトミオシンの粘性¹⁴⁾と ATPase 活性²⁰⁾の経時変化を比較検討した結果によると、粘度の減少は Ca-ATPase 活性の変化よりもはるかに起こりやすかったが、ATPase 活性の変化様式は単純ではなく反応速度論的な解析が困難であっ

* 白木永子・矢部和夫，未発表。

た。

本実験で用いたオキアミはほぼ同じ時期に漁獲された一群の中から得たものである。したがって、オキアミの体長も似ており、肝すい臓から抽出したプロテアーゼ活性においても個体差がほとんど見出されなかった。しかし、小長谷によると、漁期および漁場などの異なるオキアミの粗プロテアーゼのカゼイン分解活性は約3倍にわたって変動している。⁹⁾したがって、本方法によって表わしたアクトミオシンに対するオキアミのプロテアーゼ活性が魚群によってどの位変動するかを今後検討する必要があると思われる。しかし、同種のオキアミの肝すい臓に含まれる消化性プロテアーゼの種類および組成は個体によってあまり大きな相違がないように推定すると、本実験で明らかにしたオキアミ肝すい臓プロテアーゼによってオキアミのアクトミオシンがコイのそれに比べてほぼ数倍消化されやすいという結果は、おそらく魚群や個体によって変わらないように予想される。また、上の結果はアクトミオシンのトリプシンによる消化性が魚種によって異なり、寒帯産の種類のものほど消化されやすいという従来の知見²⁰⁾と良く一致するものである。

アクトミオシンの粗プロテアーゼによる消化がソルビトールが共存することによって抑制される原因については、未だ明らかではない。しかし、この抑制はソルビトールだけが示す性質ではなくラクチトールやグリセロールによっても認められ、抑制の強さはラクチトール>ソルビトール>グリセロールの順であった。一方、これらの糖アルコールは、上記の反応系中の基質であるアクトミオシンのCa-ATPase活性部位の変性に対して、上と同じ強さの順で保護作用を発揮することがすでに知られている。²¹⁾したがって、ソルビトールの抑制効果はアクトミオシンに対して作用した結果として表われるのか、プロテアーゼに対して作用した結果として認められるものであるかという疑問が生ずるのであるが、著者らが別に行った実験によると、ソルビトールによる消化反応の抑制はオキアミの粗プロテアーゼの代わりにトリプシンを使用した場合も、また、アクトミオシンを基質とする代わりにカゼインを使用した場合にも明らかに認められるので、酵素と基質の両方に関与する様な機構によって発揮されたものであることを強く示唆している。

本実験で研究の対象としたアクトミオシンは高塩濃度溶液であるから、低塩濃度下にある肉質よりも不安定であることは当然である。しかし、低塩濃度下のオキアミの筋原繊維はアクトミオシンに比べて2~3倍安定(Ca-ATPaseの変性速度)であるだけで、⁸⁾他に類を見ない程不安定である事実に変りがなかった。また、オキアミの肝すい臓プロテアーゼ活性は他の甲殻類のそれらとは

ほとんど同じであることも確かめられたが、⁹⁾筋肉たんぱく質が消化性プロテアーゼの作用をうけやすいことは甲殻類に共通して起こる現象である。実際に新鮮なオキアミを漁獲後ただちに洗浄しつつ脱殻したオキアミの筋肉は、プロテアーゼの混在がほとんど認められず、*このような筋肉たんぱく質の組成と性状を検討すると、塩溶性たんぱく質が多く水溶性たんぱく質が少ないなど、魚類の筋肉たんぱく質のそれらとあまり違いが認められない。²²⁾一方、上のような洗浄処理を施さず殻付きのまままで貯蔵したオキアミには明らかにプロテアーゼ活性が残存し、かつ、塩溶性たんぱく質が減少して水溶性たんぱく質が多量に含まれることが、事実として明らかにされている。²³⁾したがって、オキアミの筋肉たんぱく質がその加工適性を失ないやすい理由の一つは、その筋肉たんぱく質が消化性プロテアーゼの影響を受けることに起因することは確かであり、それを避けるためにはプロテアーゼ活性を強く抑制するような条件下で肉質を処理することが有効であることが示唆される。

本研究を遂行するにあたり南氷洋上において新鮮なオキアミを試料とするために、乗船の便宜をとりはからっていただきました大洋漁業株式会社研究部の尾崎弘忠氏に深謝いたします。また、試料の採取に御協力いただいた喜山丸乗組員の皆様に深く感謝いたします。

さらに、本研究に用いたソルビトールは東和化成工業株式会社より御分与いただいたので併記して謝意を表します。

なお、本研究の一部は文部省科学研究費補助金によって記して謝意を表します。

文 献

- 1) Y. TONOMURA: Muscle Proteins, Muscle Contraction and Cation Transport, University of Tokyo Press, Tokyo, 1972, pp. 20-22.
- 2) 新井健一: 水産生物化学・食品学実験書(斉藤恒行・内山 均・梅本 滋・河端俊治編), 恒星社厚生閣, 東京, 1974, pp. 179-188.
- 3) 西田清義・武田恭治・新井健一: 日水誌, 47, 1237-1244 (1981).
- 4) 関 伸夫・小沢 竜太郎・新井 健一: 日水誌, 41, 1287-1292 (1975).
- 5) 橋本昭彦・新井健一: 日水誌, 45, 1453-1460 (1979).
- 6) 関 伸夫・酒谷 博史・小野沢 鉄彦: 日水誌, 43, 955-962 (1977).
- 7) 木村 進: 化学と生物, 13, 432-441 (1975).
- 8) 野口明徳・柳本 正勝・梅田 圭司・木村 進: 農化誌, 53, 415-421 (1976).
- 9) 小長谷史郎: 日水誌, 46, 175-183 (1983).
- 10) Y. KAWAMURA, K. NISHIMURA, S. IGARASHI, E. DOI, and D. YONEZAWA: Agric. Biol. Chem.,

* 水産庁研究部研究課, オキアミ食用化技術開発研究成果の概容(昭和56年3月)。

- 45, 93-100 (1981).
- 11) 高士令二・新井 健一・斉藤 恒行: 日水誌, **36**, 169-172 (1970).
- 12) A. G. GORNALL, C. S. BARDAWILL, and M. M. DAVID: *J. Biol. Chem.*, **177**, 751-765 (1949).
- 13) E. MIHALYI: *J. Biol. Chem.*, **201**, 197-209 (1955).
- 14) A. HASNAIN, H. TAMURA, and K. ARAI: *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **42** 783-791 (1976).
- 15) H. H. WEBER and H. PORTZEHL: in "Adv. Protein. Chem." (ed. by M. L. ANSON, K. BAILEY, and T. T. EDSALL), Vol. 7, Academic Press, New York, 1952, p. 207.
- 16) M. KUNITZ: *J. Gen. Physiol.*, **30**, 291-310 (1947).
- 17) M. LASKOWSKI: in "Methods in Enzymology" (ed. by S. P. COLOWICK and N. O. KAPLAN), II, Academic Press, New York, 1955, pp. 32-36.
- 18) K. WEBER and M. OSBORN: *J. Biol. Chem.*, **224** 4406-4412 (1969).
- 19) 木村郁夫・高城茂展・高橋康弘・新井健一: 日水誌, **46**, 571-581 (1980).
- 20) A. HASNAIN, I. KIMURA, K. ARAI, and T. YASUI: *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **44** 143-148 (1978).
- 21) 大泉 徹・橋本浩二・小倉潤子・新井健一: 日水誌, **47**, 901-908 (1981).
- 22) 柴田宣和: 東海区水研報, **100**, 17-33 (1979).