低イオン強度下におけるコイ筋原繊維たんぱく質の 熱変性に及ぼす重合リン酸塩の影響

八木 浩・阪本正博・若目田 篤・新井健一

(1984年9月14日受理)

Effect of Inorganic Polyphosphate on Thermal Denaturation of Carp Myofibrillar Protein at Low Ionic Strength

Hiroschi YAGI,*¹ Masahiro SAKAMOTO,*² Atsushi WAKAMEDA,*¹
and Ken-ichi ARAI*¹

The increase in pH and ionic strength of carp myofibrils suspension was induced by the addition of inorganic polyphosphates, such as sodium pyrophosphate, sodium tripolyphosphate and SODIUM POLYPHOSPHATE (Food additive). Thus, the effects of increase in pH and ionic strength were separately examined by measuring the change in the first order rate constant (k_D) for thermal inactivation of myofibrillar Ca-ATPase.

To the myofibrils suspension containing various concentrations of inorganic polyphosphate, KCl was added to fix its ionic strength. The k_D values of these myofibrils were found to be minimum at pH 7.0-7.5.

As the myofibrillar protein concentration was increased beyond 20 mg/ml, the pH of myofibrils suspension became neutral with 0.3% inorganic polyphosphate, regardless of whether its original pH was at 5.9 or 6.9.

The sum of ionic strength given by KCl and inorganic polyphosphate was increased from 0.03 to around 0.1, virtually no change was found in the k_D values, but with the increase from 0.1 to over 0.2, a gradual increase in the k_D was observed.

These results revealed that when inorganic polyphosphate was mixed with myofibrils suspension to make its ionic strength fixed at nearly 0.1 and to make its pH neutral, the preventive effect of inorganic polyphosphate against thermal denaturation of myofibrillar protein was maximally exhibited.

肉製品の製造において重合リン酸塩が利用される例としては、ハムやソーセージなどの畜肉製品が著名であり、食品としてかなり古い歴史がある。一方、魚肉に関しては、特にかまぼこなどのねり製品の原料である冷凍すり身の製造に使用されている。そのため、製品に対するこれら重合リン酸塩の効果と作用機構について、いくつかの研究がなされており、以前から、魚肉たんぱく質の変性に対する pH 及びイオン強度の調節作用の効果や、金属イオンのキレート作用の効果などに関して、種々推論されてきた。¹⁻³⁾ しかし、確定的な成果が示されていないのが現状である。

著者らは、その研究の第一歩として、水晒しを行なった後の魚肉に重合リン酸塩を添加する場合を想定して、イオン強度（本文中では I と略す）が 0.1 前後にお

ける筋原繊維（以下 Mf と略す）たんぱく質に対するポリリン酸塩、トリポリリン酸塩及びポリリン酸塩（いずれもナトリウム塩）の添加効果を、混合系の pH 及びイオン強度の変動と Mf たんぱく質の変性速度への影響との関係から詳細に検討した。

実験方法

筋原繊維の調製 コイ carp *Cyprinus carpio* の Mf は、加藤らが用いた方法によって調製した。⁴⁾ すなわち、新鮮な背肉を細切後、0.16 M KCl, 40 mM Tris-maleate (pH 7.0) を用いてホモジナイズし、0.5% Triton X-100 を含む同上 0.16 M KCl 溶液で 2~3 回洗浄を繰り返して、遠心分離によって沈殿させた Mf を、ガラス製ハンドホモジナイザーを用いて 0.16 M KCl, 40 mM Tris-

*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, Japan).

*² 現住所: 北海道立中央水産試験場 (Present address: Hokkaido Central Experimental Station, Yoichi, Hokkaido, Japan).

maleate (pH 7.0) 溶液中に均質に懸濁させた。なお、Mf を 30 mM KCl 溶液に懸濁させるには、上記 Mf 懸濁液 (0.16 M KCl, 40 mM Tris-maleate, pH 7.0) を遠心分離して Mf を集め、30 mM KCl で 2 回洗浄後、同じくハンドホモジナイザーを用いて同上液に懸濁させた。

重合リン酸塩共存下における筋原繊維たんぱく質の熱変性 Mf 懸濁液に対して、0.1 M ピロリン酸ナトリウム, pH 10.7 (PPi-Na と略す), 0.1 M トリポリリン酸ナトリウム, pH 9.0 (TPi-Na と略す) または、3% ポリリン酸ナトリウム, pH 9.1 (食品添加物; POLYPi-Na と略す) の各溶液を、終濃度が最高 10 mM または 0.3~0.4% になるように添加し、一定の温度 (38°C) 下に保持し、経時的にその一部を取り出し、氷冷して加熱変性を中止し、Mf ATPase 活性の測定に供した。なお、Mf 懸濁液の I は、その pH における重合リン酸塩溶液の解離度⁶⁾ から計算で求めた I と、溶媒の I を加算して算出した。また、Mf 懸濁液の熱変性における I の影響に注目して重合リン酸塩の効果を検討する実験では、この懸濁液にさらに KCl を加えることによって、 I を一定に調節した系を対照として用いた。一方、熱変性における pH の影響に注目して、重合リン酸塩の効果を検討する実験では、一部の Mf 懸濁液の pH をあらかじめ少量の HCl で 5.9 とし、重合リン酸塩溶液を加えた後に懸濁液の pH の変動を測定した。また、添加する前に、重合リン酸塩溶液の pH をあらかじめ HCl で 7.0 に調節しておく、Mf 懸濁液の pH はほとんど変動しないので、これを対照として Mf たんぱく質の熱変性に対する pH の効果を検討した。なお、中和したピロリン酸 Na, トリポリリン酸 Na 及びポリリン酸 Na の溶液は、以下、本文中では PPi, TPi および POLYPi と略して表現する。

Mf Ca-ATPase 活性の測定法 Mf Ca-ATPase 活性 (EC 3.6.1.3) は 0.1 M または、0.5 M KCl, 5 mM CaCl₂, 25 mM Tris-maleate (pH 7.0) 及び 0.1~0.3 mg/ml の Mf たんぱく質及び 1 mM ATP の組成液を 25°C において反応させ、遊離する無機リン酸を FISKE-SUBBAROW の変法⁹⁾ (還元剤として、*p*-methyl-amino-phenol sulfate を使用) を用いて比色定量し、比活性 (μ mol Pi/min·mg of protein) を算出した。なお、反応組成液中の PPi-Na (PPi) および TPi-Na (TPi) は 1 mM, また、POLYPi-Na (POLY Pi) は 0.03% 以下に希釈して、測定に影響しないようにした。しかし、生成した Pi を発色させる条件下では、共存する上記重合リン酸塩の一部に分解が起こり、発色に加わるのを補正する必要がある。そこで、これら重合リン酸塩のそれぞれの標準溶液を用いて、上記と同じ条件において生成する

Pi の発色度を測り、濃度と吸光値との関係直線を作成しておき、これを基にして重合リン酸塩の影響を補正した。補正值は、PPi-Na (PPi) については 1 mM 当り吸光値 (640 nm) として 0.014, TPi-Na (TPi) については 1 mM 当り 0.023, また POLY Pi-Na (POLYPi) については 0.03% 当り 0.021 であった。

Mf Ca-ATPase の変性速度 恒数の算出 一定温度における Ca-ATPase の失活を下記の一次反応式に従って解析し、変性速度恒数 (k_D) を算出した。 $k_D = (\ln C_0 - \ln C_t)/t$, ここで C_0 及び C_t は加熱時間 (t 秒) 前後における活性 (相対値) である。なお、たんぱく質濃度は牛血清アルブミン分画 V を標準とし、ビウレット法によって比色定量した。⁷⁾

実験結果

重合リン酸塩の添加による低イオン強度の Mf 懸濁液の pH の変化 Mf の 30 mM KCl 懸濁液 (11.5 mg/ml) に少量の HCl を加えて pH を 5.9 に調節した後、0.1 M の PPi-Na, TPi-Na または 3% POLYPi-Na を終濃度が 0~10 mM 及び 0~0.3% になるように加えて懸濁液の pH を測定した。添加した重合リン酸塩の濃度 (%、W/V で表わす) と懸濁液の pH との関係を図 1 に示した。これによると、懸濁液の pH は重合リン酸塩の濃度の増加に伴って上昇し、5.9 から 8.4~8.5 に達したが、この変化には重合リン酸塩の種類による差異は認められず、濃度が同じであればほぼ同じ pH になることを示した。なお、30 mM KCl に Mf を懸濁させただけでは懸濁液の pH は 6.9 となり、これに直接重合リン酸塩を加えると、0.2% の添加によって pH は 8.4~8.5 に上昇したが、この場合も塩の種類による効果の差異は見られなかった。

重合リン酸塩の添加による低イオン強度の Mf 懸濁液の pH と k_D の変化の関係 Mf の 30 mM KCl 懸濁液 (pH 6.9) 及び HCl で pH を 5.9 に調節した同懸濁液に対して、終濃度が 5 mM に至る PPi-Na または TPi-Na を添加し、これらの混合液の pH と 38°C における Mf Ca-ATPase の変性速度恒数 (k_D) を測定した。なお、この場合、重合リン酸塩の添加による I の変動を考慮して、混合液の I が一定値 (ここでは $I=0.08$) になるように計算量の KCl を加えて調節した。測定した 38°C における k_D と pH の関係を図 2 に示した。それによると、重合リン酸塩を添加する前の上記 2 種の Mf 懸濁液の pH は僅かに異なり、添加後もやや異なるが、 k_D は重合リン酸塩の添加量とは係わりなく、pH のみによって定まり、pH 7.2 前後で最小値となり、pH 6.5 以下および 7.8 以上では急増する傾向を示した。また、この傾向は、重合リン酸塩の種類に係わりなく同じ

Fig. 1. Increase in the pH of myofibrils suspension in 30 mM KCl by addition of inorganic polyphosphate.

The pH of carp myofibrils suspension (11.5 mg/ml) in 30 mM KCl was adjusted to set at 5.9 by the addition of a small amount of HCl. To the myofibrils suspension, 0.1 M sodium pyrophosphate (PPI-Na), 0.1 M sodium tripolyphosphate (TPi-Na) or 0.3% SODIUM POLYPHOSPHATE (POLY Pi-Na) was added to make a final concentration of ranging 0 to 0.4% (W/V). The pH value of these mixtures was measured by a glass electrode.

(●) none, (○) PPI-Na, (△) TPi-Na, (□) POLY Pi-Na.

Fig. 2. Increase in the pH of myofibrils suspension in 30 mM KCl induced by addition of inorganic polyphosphate and its effect on thermal inactivation rate of Ca-ATPase.

The pH of myofibrils suspension (11.5 mg/ml) in 30 mM KCl was estimated to be 6.9 (open symbols). A portion of this suspension was adjusted to make its pH to 5.9 (filled symbols) by adding a small amount of HCl. To these myofibrils suspensions, 0.1 M sodium pyrophosphate (circles) or 0.1 M sodium tripolyphosphate (triangles) was added to make a final concentration of ranging from 0 to 5 mM.

Before the measurements of pH value and ATPase activity, the ionic strength of myofibrils suspension was adjusted to fix at 0.08 by the addition of calculated amount of KCl. The Ca-ATPase activity was assayed at 25°C in a reaction medium containing 0.1 M KCl, 5 mM CaCl_2 , 25 mM Tris-maleate (pH 7.0), 1 mM ATP and 0.15–0.25 mg/ml of protein. The first order rate constant (k_D) for inactivation of Ca-ATPase at 38°C was calculated (Ref. 8)

であった。すなわち、この実験は、 I が一定 (0.08) に保持されていれば、Mf たんぱく質の変性は、懸濁液の pH によって著しく大きな影響を受け、ここで用いた重合リン酸塩のイオン種とは係わりなく、中性域で最も安定化されることを示している。

なお、Mf の 0.1 M KCl 懸濁液 (pH 5.9) に対して、

終濃度が 0.5% に至る POLY Pi-Na を添加し、pH と 35°C における k_D との関係とを求めると、上記した他の 2 種の重合リン酸塩の場合と同様に、 k_D は pH 7.2 前後で最小値となり、pH 6.5 以下及び 7.8 以上では急増する傾向を示し、本質的には Fig. 2 と同じ結果であった。(結果は図示しない)。

重合リン酸塩による Mf 懸濁液の pH の変化とその条件下の k_D とに及ぼすたんぱく質濃度の影響 たんぱく質濃度を 1~11 mg/ml の間で変えた Mf 懸濁液 (30 mM KCl, pH 5.9) に対して、終濃度が 1 mM の PPi-Na を添加し、pH と 38°C における k_D を測定し、両値の関係を検討した。その結果を Fig. 3 (A と B) に示した。(A) には、pH を 5.9 に調節した Mf 懸濁液に PPi-Na を加えた場合を示すが、たんぱく質濃度の高低は懸濁液の pH の変動の大きさに対して影響を及ぼし、その濃度が低い時は PPi-Na による pH の上昇度が大きく、一方、高い場合は上昇度が小さくなる傾向を示した。すなわち、この結果は、Mf たんぱく質自体が保持している荷電が懸濁液の pH に影響していることを示唆している。次に、この条件下の Mf 懸濁液の pH と k_D の関係を (B) に示したが、その関係は Fig. 2 の結果とほぼ一致し、 k_D は pH 7.2 近くで最小となり、その両側の pH では増加する傾向を示している。しかし、ここにおいても k_D は pH によって決まり、Mf たんぱく質の濃度の高低の差異は、全く影響していないことが示されている。なお、この実験における Mf 懸濁液の I は約 0.030~0.036 の範囲で変化しているが、後述するように、この

相違は k_D にはほとんど影響を与えないので、ここではあえて I の補正を行なわなかった。

Mf 懸濁液中のたんぱく質濃度と重合リン酸塩の濃度が pH の変化に及ぼす影響 たんぱく質濃度を 1~11 mg/ml の間で変えた Mf 懸濁液 (30 mM KCl, pH 5.9) に対して、PPi-Na、または、POLYPi-Na を 0~10 mM、または 0~0.3% 添加し、混合液の pH を測定した。そして、Mf たんぱく質濃度 (mg/ml) の逆数値に対して pH をプロットし、結果を Fig. 4 (A と B) に示した。(A) によると、Mf たんぱく質濃度が低い (2~3 mg/ml) ときは、PPi-Na の添加によって懸濁液の pH は大きく上昇し、3 mM 以上で pH は 8.4~9.0 になったが、一方、Mf たんぱく質濃度が高く、5 mg/ml 以上になると、pH の上昇は見かけ上小さくなり、1~3 mM の PPi-Na の添加では pH はあまり上昇しなくなった。5 mM 以上の PPi-Na では pH の上昇度がやや大きくなるが、一方、たんぱく質濃度がさらに大きくなって 20 mg/ml 以上に及ぶと、pH の上昇は小さくなり、10 mM の PPi-Na の添加によって Mf 懸濁液の pH はちょうど中性域に調節されることを示唆する結果を示した。また、結果は図示しないが、Mf 懸濁液の pH を 7.0 に調

Fig. 3. The pH increase in myofibrils suspension with varied concentrations of myofibrillar protein induced by addition of sodium pyrophosphate and its effect on thermal inactivation rate of Ca-ATPase.

The protein concentration of the myofibrils suspension (30 mM KCl, pH 5.9) was varied as 1.0 (○, ●), 2.5 (△, ▲), 5.0 (□, ■) and 11.0 (▽, ▼) mg/ml, respectively. A portion of these suspension (open symbols) was subjected to measure the pH values and thermal inactivation rate (k_D) of Ca-ATPase. Another portion of the suspensions (closed symbols) was mixed with 1 mM sodium pyrophosphate (final concentration), before the measurements of the pH and k_D values. The methods for measurement of pH, for ATPase assay, and for the calculation of k_D were the same as in Fig. 2.

(A) pH vs. myofibrillar protein concentration

(B) k_D vs. pH

The same symbols were used in Figs. (A) and (B).

Fig. 4. Relation between the pH increase in myofibrils suspension (30 mM KCl) induced by sodium pyrophosphate and the concentration of myofibrillar protein.

The protein concentration of the myofibrils suspension (in 30 mM KCl, pH 5.9) was varied from 1.0 to 20.0 mg/ml. To these myofibrils suspensions, sodium pyrophosphate (PPI-Na) or SODIUM POLYPHOSPHATE (POLYPi-Na) was added and subjected to the measurement of pH. The final concentration of sodium pyrophosphate was 0 (●), 1.0 (○), 3.0 (△), 5.0 (□) and 10.0 (▽) mM, and those of SODIUM POLYPHOSPHATE was 0 (●), 0.03 (○), 0.09 (△), 0.15 (□), and 0.30 (▽) % (W/V), respectively.

(A) pH (with PPI-Na) vs. (Protein concentration)⁻¹

(B) pH (with POLYPi-Na) vs. (Protein concentration)⁻¹

節した後に PPI-Na を添加した場合も、Mf 懸濁液の pH は、(A) の実験の場合よりもやや低濃度の PPI-Na によって pH が上昇する傾向を示す以外は、Mf 懸濁液のたんばく質濃度と重合リン酸塩の濃度の相互の関係によって定まり、(A) の結果と同じであった。なお、Fig. 4(A) の実験にならって、Mf を 30 mM KCl に懸濁して pH を 5.9 に調節した後、たんばく質濃度を 2~20 mg/ml の間で変えて、0~0.3% に至る POLYPi-Na を加えて混合液の pH を測定し、結果を (B) に示した。この結果は pH の上昇度がやや小さいことを除けば、やはり (A) の場合と同じとなり、たんばく質濃度が低いときは、0.3% に及ぶ POLYPi-Na によって pH は 8~9 に上昇するが、たんばく質濃度が高くなると 0.3% の POLYPi-Na の添加によって Mf 懸濁液の pH が中性域に調節されることを示唆する点で、全く同じであった。

Mf Ca-ATPase の変性速度に及ぼすイオン強度 (KCl 濃度) の影響 次に、重合リン酸塩による I の増加効果を検討する基礎実験として、種々の濃度のトリス緩衝液及び KCl 溶液に懸濁させた Mf の k_D を比較した。すなわち、10~40 mM の間の種々の濃度の緩衝液に懸濁させた Mf、または 40 mM Tris 緩衝液の他に 0~0.2 M に至る濃度の KCl を含む溶液に懸濁させた Mf について、それぞれ 38°C における k_D を測定し、その結果を

Fig. 5 に示した。これによると、Tris 緩衝液の濃度は k_D に影響を及ぼし、10 mM~40 mM まで濃度が上昇すると k_D は 1/2 になった。なお、緩衝液の濃度変化による pH の変動は認められなかった。次に、40 mM Tris-maleate (pH 7.0) 存在下で KCl 濃度を上昇させてゆくと、 k_D は 0.1 M 前後まではほとんど変化しないが、0.1 M 以上 0.2 M に至る間では徐々に増加する結果を示し、 I が 0.1 以上では k_D が増加することを示唆した。

重合リン酸塩の添加により低イオン強度下の Mf 懸濁液に起こるイオン強度の増加と k_D の関係 Mf の 30 mM KCl 懸濁液に対して、中和したピロリン酸 Na (PPi)、またはトリポリリン酸 Na (TPi) を 0~10 mM の間の種々の濃度になるように添加して、一部はその条件下で 38°C の k_D を求めた。他の一部には KCl を加えて懸濁液の I が全て同じ (すなわち、PPi のときは $I=0.10$ 、TPi のときは $I=0.14$) になるように調節し、同じく 38°C の k_D を求めた。そして、 k_D と PPi 及び TPi 濃度との関係をそれぞれ Fig. 6 (A と B) に示した。この実験では中和した重合リン酸塩を添加しているので、懸濁液の pH は一定値のままで、 I の増加のみが起きている。従って、重合リン酸塩によって起こる I の増加のみが k_D に対して影響を及ぼすと考えられる。その結果によると、Mf の 30 mM KCl 懸濁液に PPi (A)、また

Fig. 5. Effect of the ionic strength increase of myofibrils suspension induced by addition of KCl on thermal inactivation rate of Ca-ATPase.

Carp myofibril was suspended in a medium containing various concentrations of Tris-maleate (pH 7.0) ranging from 10 to 40 mM, at a protein concentration of 1.5–2.5 mg/ml. To the myofibrils suspension in 40 mM Tris-maleate (pH 7.0), KCl was further added to make a final concentration of ranging from 0 to 0.2 M. The ionic strength of these suspensions was then calculated. The thermal inactivation rate constant (k_D) was obtained as described in Fig. 2.

(Δ), k_D (with Tris buffer) ($\circ$), k_D (with KCl-Tris buffer)

Fig. 6. Increase in the ionic strength of myofibrils suspension (in 30 mM KCl) induced by addition of inorganic polyphosphate and its effect on thermal inactivation rate of Ca-ATPase.

Before addition to the myofibrils suspension, sodium pyrophosphate and sodium triphosphate were neutralized with HCl to maintain the pH of mixtures to 7.0. Thus, abbreviations were used as PPi for the former and TPi for the latter, respectively. To the myofibrils suspension (in 30 mM KCl, 11.0 mg/ml), 0.1 M PPi (pH 7.0) or 0.1 M TPi (pH 7.0) was added to make a final concentration of ranging from 0 to 10 mM. A portion of these suspensions was subjected to measure the k_D values ($\circ$). Another portion of the suspensions was mixed with KCl to make a final ionic strength of 0.10 for (A) or 0.14 for (B), before the measurement of k_D values (Δ).

(A) k_D (with PPi)

($\circ$) $I=0.03-0.10$, (Δ) $I=0.10$.

(B) k_D (with TPi)

($\circ$) $I=0.03-0.14$, (Δ) $I=0.14$.

は TPi (B) を加えると、 I は前者では 0.03 から 0.11 まで、後者では 0.03 から 0.14 まで増加するが、一方、この間 k_D はほぼ一定でほとんど変わらなかった。また、 KCl を加えて I を PPi 添加の場合は 0.10 に、TPi 添加の場合は 0.14 に調節したときも、 k_D は I を一定に調節する前の値とほとんど変わらなかった。また、重合リン酸塩の種類を変えても、以上の結果は同じになった。なお、この結果は Fig. 5 に示した結果とよく類似しており、 I が 0.1 をあまり越えない範囲では、その変動は k_D に対して大きな影響を与えない事実が示されている。

重合リン酸塩の添加により生理的イオン強度下の Mf 懸濁液に起こるイオン強度の増加と k_D の関係 次に、Mf の 0.16 M KCl, 40 mM Tris-maleate (pH 7.0) 懸濁液に対して、0~10 mM の PPi, または TPi を添加し、一部はその条件で、また、他の一部には KCl を加えて I がすべて一定 (PPi 添加の場合は 0.22 に、TPi 添加の場合は 0.27) になるように調節して、38°C の k_D を測定した。 k_D と PPi 及び TPi 濃度との関係をそれぞれ Fig. 7 (A) 及び (B) に示した。すなわち、この実験は Mf 懸濁液の pH は生理的な値 (7.0) を保ったままで、 I がほぼ生理的な値から、さらに重合リン酸塩の添加によって増加するときに、 k_D がうける影響を知ることが目的である。Fig. 7 の結果によると、0.16 M KCl の

Mf 懸濁液に PPi (A), または TPi (B) を加えると、 I は前者では 0.16 から 0.22 まで、後者では 0.16 から 0.27 まで上昇するが、それに伴って k_D も徐々に増加する傾向を示した。しかし、上記の混合液の I を KCl を加えて一定になるように調節すると、 k_D は重合リン酸塩の濃度には係わりなくほぼ一定値を示すようになった。また、この k_D は重合リン酸塩の種類 (PPi 及び TPi) によってほとんど変わらない値であった。なお、以上に述べた Fig. 6 と 7 の実験では、 I の調節を KCl の代わりに NaCl を用いて行なっても同じ結果になったが、これらは Fig. 5 の結果とよく一致しており、Mf の k_D は、生理的 I (0.10~0.15) 以上に増加するとそれに伴って増加する傾向を示している。なお、TPi の場合に比べて、PPi を加えた Mf 懸濁液の示す k_D は、KCl を添加して I が一定になるように調節した後も PPi の低濃度側で低く、高濃度側でわずかに高い値を示した。この原因はまだ不明であるが、ピロリン酸イオンによる何らかの特別な効果が作用していることも考えられる。

次に、Mf の 0.16 M KCl, 40 mM Tris-maleate (pH 7.0) 懸濁液に対して、POLYPi を終濃度が 0~0.3% の範囲になるように加え、Mf の 38°C における k_D を測定し、 k_D と POLYPi の濃度 (%) との関係を Fig. 8 に示した。なお、対照のために、Fig. 7 に示した PPi を添加し

Fig. 7. Increase in the ionic strength of myofibrils suspension (in 0.16 M KCl) induced by addition of inorganic polyphosphate and its effect on thermal inactivation rate of Ca-ATPase.

To the myofibrils suspension (in 0.16 M KCl-40 mM Tris-maleate, pH 7.0), 0.1 M PPi or 0.1 M TPi was added as the same manner as described in Fig. 6. A portion of these suspensions was subjected to measure the k_D values (○). Another portion of the suspensions was mixed with KCl to fix a final ionic strength of 0.22 for (A) or of 0.27 for (B), before the measurement of k_D values (△).

(A) k_D (with PPi)

(○) $I=0.16-0.22$, (△) $I=0.22$.

(B) k_D (with TPi)

(○) $I=0.16-0.27$, (△) $I=0.27$.

Fig. 8. Effect of addition of inorganic polyphosphate to myofibrils suspension (0.16 M KCl) on thermal inactivation rate of Ca-ATPase.

The procedures for mixing SODIUM POLY-PHOSPHATE or sodium pyrophosphate with myofibrils suspension (0.16 M KCl) and the method for measurement of k_D values were the same as described in Fig. 7. SODIUM POLY-PHOSPHATE and sodium pyrophosphate were previously neutralized with HCl to pH 7.0 and conveniently expressed as POLYPi and PPI, respectively. The concentration of inorganic polyphosphate was demonstrated as the percent (W/V) on the basis of the suspension.

(□) none, (○) POLYPi, and (Δ) PPI.

た実験結果も併せて示した。これによると、 k_D に対する POLYPi の効果と PPI の効果は良く似ており、その濃度が増加すると、 k_D もわずかに増加する傾向を示している。なお、POLYPi は分子量と解離度が不明のため、 I の補正 (再調節) によってもたらされる k_D の影響は、検討できなかった。そこで、KCl 添加によってもたらされる k_D の増加値を読みとり、この値を参考にして、0.3% の POLYPi の添加によって起こる k_D の増加値から、仮に、比例によって相当する I を求めると、その値は約 0.1 になった。この値は 10 mm の TPI の I に近似している。

考 察

著者らは、従来から Mf たんぱく質の変性に及ぼす各種要因の影響を、Mf Ca-ATPase の変性速度を指標として研究してきた。そして、変性速度に対しては、温度、⁹⁾ pH、⁹⁾ およびイオン強度 (塩濃度)¹⁰⁾ が強い影響を及ぼすことを明らかにした。

一方、重合リン酸塩と Mf たんぱく質の変性との係わりあいについてもいくつかの研究が行われてきた。¹¹⁻¹³⁾ 本研究では、分子量と解離定数が明らかにされているという理由から、ピロリン酸とトリポリリン酸を主用し、 k_D に及ぼす影響を解析し、ポリリン酸 (食添) の場合と比べた。すなわち、これら 3 種の重合リン酸塩の水溶液は、いずれも強いアルカリ性を呈し、また、多価イオンとしてイオン強度を高める効果を有している。そこで、Mf たんぱく質の熱変性に及ぼす効果を解析するには、重合リン酸塩による pH とイオン強度 (I) への効果を別々に評価する必要があると考えた。そこで、 I の効果を知るためには、pH を一定に保つように中和した重合リン酸塩溶液を添加し、一方、pH の効果を知るためには、 I を一定に保持するように計算量の KCl を添加して調節した。その実験の結果、PPI-Na, TPI-Na, POLYPi-Na が低いイオン強度下の Mf 懸濁液の pH を上昇させる度合は、同じ濃度 (%) で比べるとほぼ同じ程度であり、 k_D に及ぼす影響もほぼ同じであることが示された。なお、pH を上昇させる効果は、Mf たんぱく質の濃度により著しい影響を受け、0.3% 程度の重合リン酸塩の添加は、Mf たんぱく質濃度が高いときは、ほぼ中性を維持するように作用することが、強く示唆された。これは、おそらく、Mf たんぱく質それ自身の緩衝能が、大きく作用するようになるためであると考えられる。実際に、スケトウダラの水晒し後の脱水肉の pH は 6.7~6.8 であるが、0.3% の重合リン酸塩を添加すると、pH はわずかに上がり、7.1~7.2 に調整されるといわれる。¹²⁾ 一方、Mf たんぱく質の変性速度 (k_D) はどんな魚種でも中性域 (pH 7.0~7.5) において最も遅く非常に安定化される事実⁹⁾ を考えると、冷凍すり身における重合リン酸塩の役割の 1 つは、明らかにこの点にあるように推定される。なお、Mf たんぱく質の変性速度が中性域で最も小さいという事実は、熱変性ばかりでなく冷凍変性の場合でも同じであり、¹³⁾ さらに、変性に対するソルビトールの保護効果が中性域において最も強く発揮される事実⁸⁾ も、すり身の pH を中性に保つことの重要性をさらに高めている。

ピロリン酸 Na 及びトリポリリン酸 Na の添加が I を増加させる度合は、すべて計算によって求めたが、⁹⁾ その添加量は、冷凍すり身に使用されている重合リン酸塩の量を基準として考え、モル濃度に換算して 10 mm までする範囲で、Mf たんぱく質の k_D に及ぼす効果を検討した。その結果、重合リン酸塩がもたらす I の増加効果は、0.03 から 0.10 前後までする増加の場合は k_D に対してほとんど影響しないが、0.10 から 0.20 に

* 松本行司・大泉 徹・新井健一：日本水産学会，59 年度春季大会講演要旨集，p. 248.

上に及ぶ増加の場合は明らかに k_D を増加させ、Mf たんばく質を不安定化する事実を示した。また、この影響は、 I が同じであれば PPI, TPI 及び POLYPI についてはほとんど同程度であった。実際には、スケトウダラのおとしみを、水晒し後に脱水すると、この脱水肉中の I は生理的 I より低くなるのは当然であり、この状態において 0.3% の重合リン酸塩を添加すると、生すり身（凍結する前のすりみ）のイオン強度は最高でも 0.15 を越えることはないと推定できる。それ故、この条件下の Mf たんばく質は、重合リン酸塩を添加する前に比べて極めて安定化されることは、先に述べたとおり確実と考えられる。一方、このような低いイオン強度下では、Mf たんばく質の冷凍変性は、高いイオン強度における場合よりも、かなり小さかった。^{12,13)} 従って、冷凍すりみに添加される重合リン酸塩のもう一つの役割は、 I を 0.10 前後に調節し、Mf たんばく質の安定化（冷凍変性速度の減少）を計るという点にあると推定される。

本研究の結果を総括すると、Mf たんばく質に対する重合リン酸塩の効果は、その混合系の pH を中性に調節するように、また、同時に I は 0.1 を大きく超えないように加えられたときに最高に発揮され、Mf たんばく質の変性速度を最小にするように作用することが明らかである。

なお、本研究は、 I が 0.2 以下に保持された Mf 懸濁液の熱変性に関して検討することを目的としたが、冷凍すり身に添加される重合リン酸塩は、ねり製品を製造するときの塩ざりと加熱過程においても当然なんらかの影響をもたらすと考えられるため、現在、その問題につい

て検討している。

本研究は文部省科学研究費補助金によって行なわれたので、ここに記して感謝致します。

文 献

- 1) 清水 亘：水産ねり製品，光琳書院，東京，1967，pp. 183-184.
- 2) 志水 寛：魚肉ねり製品（岡田 稔・衣巻豊輔・横関源延編），恒星社厚生閣，東京，1981，pp. 190-201.
- 3) 野口 敏： *New Food Industry*, **13**, 56-60 (1971).
- 4) 加藤 登・内山 均・塚本志朗・新井健一：日水誌，**36**, 169-172 (1970).
- 5) L. G. SILLÉN: *Stability Constants of Metal Ion Complexes*, Special Publication No. 17. London, 1964, pp. 190-198.
- 6) C. H. FISKE and Y. SUBBAROW: *J. Biol. Chem.*, **66**, 375-400 (1925).
- 7) A. G. GORNALL, C. J. BARDWILL, and M. M. DAVID: *J. Biol. Chem.*, **177**, 751-766 (1946).
- 8) 橋本昭彦・小林章良・新井健一：日水誌，**48**, 671-684 (1982).
- 9) 橋本昭彦・新井健一：日水誌，**44**, 1389-1393 (1978).
- 10) 若目田 篤・野澤誠子・新井健一：日水誌，**39**, 237-243 (1983).
- 11) 松田由美子：日水誌，**45**, 573-579 (1979).
- 12) 川島孝省・大場明子・新井健一：日水誌，**39**, 1201-1209 (1973).
- 13) 新井健一・高士令二：日水誌，**39**, 533-541 (1973).