ミオシンの凍結による疎水性アミノ酸残基の露出

丹羽 栄二, 甲田 真一郎, 加納 哲, 中山 照雄

(1986 年 5 月 22 日受理)

Exposure of Hydrophobic Amino Acid Residues from Myosin on Freezing

Eiji Niwa,* Shin-ichiro Kohda,* Satoshi Kanoh,*
and Teruo Nakayama*

In order to clarify the reason why the white muscle fishes are more easily deteriorated by freezing than the red muscle fishes and the warm blooded animals, the fluorometric intensity of their myosin solutions was measured in the presence of sodium 8-anilino-1-naphthalene sulfonate. The fluorometric intensity was relatively low for the myosin solutions from the red muscle fishes, such as albacore and yellowfin tuna, and the warm blooded animals, such as pork, whale, chicken and beef, and scarcely increased on freezing overnight at -20°C . The intensity was, however, higher for the solutions from the white muscle fishes, such as angler, Alaska pollack, stone flounder, hair tail, butterfish and barracuda, and remarkably increased on freezing. Furthermore, in such the fluorometric behaviors, the pink muscle fishes, such as mullet, saury, Pacific mackerel and Spanish mackerel, showed intermediate between the red muscle fishes and the white muscle fishes. The increment of the fluorometric intensity on freezing was suppressed on the addition of sucrose and Na-glutamate.

These results suggest that in the white muscle fishes, the hydrophobic amino acid residues of myosin molecules are more easily exposed on freezing.

さきに、アクトミオシン (AM) やアクチン (Ac) の塩溶液を 1~2 日間凍結貯蔵すると、1) ラウリル硫酸ナトリウム (SDS)^{1,2)} や 8-アニリノ-1-ナフタレンスルホン酸ナトリウム (ANS)³⁾ に対する吸着能が増加するが、2) その増加はショ糖やグルタミン酸 1 ナトリウムで抑えられること、3) 畜肉よりも魚肉の方が、^{1,3)} そして、4) Ac よりも AM の方が大きく増加することなどについて述べた。これらの結果は、1) AM や Ac など筋原繊維タンパクを凍結貯蔵すると分子内の疎水性アミノ酸残基 (疎水基) が露出すること、2) しかし、ショ糖など凍結変性抑制剤が共存すればその露出が抑えられること、3) 耐凍性の大きい畜肉よりもその小さな魚肉で大きく露出すること、4) さらにその露出は Ac よりもミオシン (M) で激しいことなどを意味すると思われる。そうすれば凍結変性の起こり易さと疎水基の露出し易さが一致するので、凍結変性の結果として起るタンパク不溶化の原因をこうして露出した疎水基相互間の結合形成に求めるのは妥当なように思われる。一方、魚肉の凍結による組織のスポンジ化程度から判断される耐凍性では、白身の魚は赤身の魚に劣ると言われる (魚肉の変色、油焼けを基準とすれば白身魚が逆に優れる)。⁴⁾ し

かし、上に述べた AM からの疎水基の露出程度は畜肉と魚肉の間で明確な差があったものの、赤身魚と白身魚の間にさほどの差は認められなかった。この理由について共存する Ac の影響とも考えられるので、ここでは各種 M 溶液の凍結前後における表面疎水性を ANS 吸着法で比較した。

実験方法

試料 温血動物としてブタ (モモ肉)、クジラ、ニワトリ (ササミ肉)、ウシ (スネ肉)、赤身魚としてビンナガ *Thunnus alalunga*、キワダ *Thunnus albacares*、中間色魚としてボラ *Mugil cephalus*、サンマ *Colorabis saira*、マサバ *Scomber japonicus*、サワラ *Scomberomorus niphonius*、白身魚としてアンコウ *Lophiomus setigerus*、スケトウダラ *Theragra chalcogramma*、インガレイ *Kareius bicoloratus*、タチウオ *Trichiurus lepturus*、マナガツオ *pampus argenteus*、ヤマトカマス *Sphyræna japonica* を選んだ。畜肉、赤身魚、白身魚中のスケトウダラについては切り身を、その他についてはラウンドを津市内小売店で購入し、ラウンドからは背側筋を切り取った。

* 三重大学水産学部 (Faculty of Fisheries, Mie University, Tsu 514, Japan).

ミオシン (M) 溶液の調製 試料肉を3ミリ目のプレートを通して落し身とし, その80gに4倍の氷水を加えてよく振りまぜ, 遠心分離し (8000 rpm, 10 分間, 以下同条件), 上澄を捨てた。沈殿に水の代りに同量の0.05 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.4) を加え, 上と同じ操作を2回くり返して洗滌した。遠心分離で得た沈殿に5 mm ATP-1 mm $MgCl_2$ を含む0.45 M KCl-17.6 mm Na_2HPO_4 -49 mm KH_2PO_4 溶液 (pH 6.4)²⁾ の4倍量を加え, ゆるやかにかきまぜた後, 遠心分離した。その上澄を10倍容に希釈し, 生じた沈殿を遠心分離で集め, 120 ml の0.45 M KCl-3.38 mm KH_2PO_4 -15.5 mm Na_2HPO_4 溶液 (pH 7.5) に溶解した。この溶液に飽和硫酸アンモニウムを40% 飽和になるように加え, 生じた沈殿を遠心分離で除き, 上澄に50% 飽和になるように飽和硫酸アンモニウムをさらに追加し, 再び生ずる沈殿を遠心分離で集めた。この沈殿を20 ml 上記0.45 M KCl-リン酸緩衝液 (pH 7.5) に溶解した後, 同緩衝液に対して1夜透析して硫酸アンモニウムを除

Fig. 1. Emission intensity of myosin from warm blooded animals and red muscle fishes at 470 nm excited at 365 nm under the presence of sodium 8-anilino-1-naphthalene sulfonate.

● before freezing, --- after freezing overnight at $-20^{\circ}C$.

Albacore: Binnaga *Thunnus alalunga*

Yellowfin tuna: Kiwada *Thunnus albacares*

Fig. 2. Emission intensity of myosin from pink muscle fishes at 470 nm excited at 365 nm under the presence of sodium 8-anilino-1-naphthalene sulfonate.

Glu, Suc: Na-glutamate (0.2%) and sucrose (10%) were added respectively.

Mullet: Bora *Mugil cephalus*

Saury: Sanma *Cololabis saira*

Pacific mackerel: Masaba *Scomber japonicus*

Spanish mackerel: Sawara *Scomberomorus niphonius*

き, さらに遠心分離した上澄を M 溶液とした。

M 溶液の凍結貯蔵と表面疎水性測定 さきに報告した AM 溶液³⁾と同じように, M 溶液を上記緩衝液で数段階に希釈後, その10 ml をポリエチレン製試験管に加え, パラフィルムで口をふさいで $-20^{\circ}C$ のフリーザで凍結した。変性抑制剤を添加するときには, 結晶を M 溶液に溶解後凍結した。1 夜後, 氷水に浸して解凍し, これに 0.04% ANS 1 ml を加えた。10 分後, 励起光を 365 nm としたときの 470 nm における蛍光強度を測定したこのとき蛍光光度計の感度は 0.0025% ウラニルの 510 nm における蛍光強度が 200 を示すように調節した。

タンパクの定量 簡易ビウレット法⁴⁾によった。

結 果

Fig. 1 に畜肉と赤身魚, Fig. 2 に中間色魚, Fig. 3 に白身魚のそれぞれ M について濃度と単位濃度 (mg/ml) あたりの蛍光強度を片対数グラフで比較した。いず

Fig. 3. Emission intensity of myosin from white muscle fishes at 470 nm excited at 365 nm under the presence of sodium 8-anilino-1-naphthalene sulfonate.

Angler: *Ankoh Lophiomus setigerus*

Alaska pollack: *Suketodara Theragra chalcogramma*

Stone flounder: *Ishigarei Kareius bicoloratus*

Hair tail: *Tachiuo Trichiurus lepturus*

Butterfish: *Managatsuo Pampus argenteus*

れについても濃度と単位濃度あたりの蛍光強度は右下りの直線関係となるのは AM や Ac のときと同じである。凍結前、後の M の蛍光強度は種によって異なるが、凍結によって蛍光強度が増加するのはすべての種で一致する。種別に比較すれば、1) Fig. 1 における畜肉と赤身魚では凍結前から蛍光強度は低く、凍結による増加はさほどではない。2) これに対して Fig. 3 の白身魚では最初から高く、凍結によってさらに高くなる。この凍結による増加はとくにスケトウダラ、ヤマトカマスにおいて著しい。3) 一方、サワラ、ボラなど中間色魚における蛍光強度の挙動は種によって大きく異なるものの赤身魚と白身魚のほぼ中間にある。4) さらに、Fig. 2 のマサバに見られるようにシロ糖 (10%) およびグルタ

ミン酸 1 ナトリウム (0.2%) の添加によって蛍光強度の増加は抑えられ、なかでも前者の効果は顕著であった。

考 察

スポンジ化を尺度とした場合、白身魚の耐凍性が赤身魚のそれに劣る理由⁴⁾は、前者が後者に比べて 1) 高水分量である。2) 低タンパク量である。3) 体液中に多量のガスを溶存する。4) 凍結による体積膨張率が大い。5) 筋肉組織が粗雑で小孔が多数あるというように、その筋肉の成分あるいは組織に特徴があるだけではなく、6) 塩溶性タンパクの溶解度が凍結によって低下し易いというように筋肉を構成するタンパク自体も相違があるように思われる。そして、このタンパクの大部分を占めるのが AM であり、さらにその主成分は近時各種筋肉が示す種特異性を担うと考えられるようになりつつある M である。これらのことと溶解度変化で観測される M の凍結変性速度が Ac のそれより大きいこと*などを考え合わせると、疎水基の露出に対する赤身魚と白身魚の微妙な差を把握するにはモデルとして AM よりも M を使った方が妥当であろう。

ところで、ここで使った M はその調製法から考えて純粋ではなく、不純物として Ac が混入しており、その混入度も種によって様々なように思われる。しかし、Figs. 1~3 の結果から判断される M の疎水基の挙動は魚肉の耐凍性に関する種特異性に対してさきに述べた AM 以上によく対応する。すなわち、上述の M の表面疎水性測定の結果は、1) 耐凍性の大きな畜肉や赤身魚では凍結前の M 分子の表面に露出する疎水基の量は比較的少なく、この量は凍結してもさほど増えない。逆に、2) 耐凍性の小さな白身魚の M 表面には凍結前から多量の疎水基が露出しているだけでなく、凍結によってさらに増加する。3) 赤身魚と白身魚の間に位置する中間色魚の疎水基の挙動については種によって異なるが、ほぼ赤身魚と白身魚の中間となる（これら中間色魚は赤身の魚として分類されることもある）。さらに、4) マサバに見られるようにシロ糖やグルタミン酸 1 ナトリウムの共存下では疎水基の露出が抑えられることを意味するからである。AM をモデルとしたときには魚肉と畜肉の相違しか判らなかったのに対し、ここではさらに進んで赤身魚と白身魚の相違が明確になった。Ac が除かれたために M の種特異性がより鮮明になった結果と察せられる。

しかし、上のように露出した疎水基は溶媒としての水に個々に接触しているのではなく、それらは互いに集

* 入佐 豊, 大西守, 松本重一郎: 昭和 53 年度日本水産学会春季大会講演要旨集, pp. 160.

て存在する (ANS は M 分子表面の疎水基が集っている個所に吸着され蛍光強度を増加させる)。その方が水の clathrate (包接化合物) 形成に基づくエントロピー低下が少なく済むからである。このとき疎水基の集合が分子間にわたって起れば M 分子は重合し、これが不溶化につながる。白身魚の塩溶性タンパクの方が赤身魚のそれに比べて凍結による不溶化が著しいというのも、白身魚タンパクの方が多量の疎水基を露出させるという事実を考えれば当然であり、この関係は耐凍性の大きな畜肉に対するその小さな魚肉と同じとなる。さらに、これらのことはショ糖やグルタミン酸 1 ナトリウムなど変性抑制剤共存下で蛍光強度増加が抑えられるという事実から裏付けられる。ショ糖のようなポリオール、グルタミン酸 1 ナトリウムのようなアミノ酸類の共存中では疎水基の露出が抑えられることが判ってきたからである (これらの共存下で疎水基が露出するにはあまりにも大きな自由エネルギー増加を伴うことに起因する。これらの分子と疎水基間の相互作用は熱力学的に不利なためにタンパクの化学ポテンシャルが増加するからである)^{7,8)}

以上のことから畜肉、赤身魚に対する白身魚の耐凍性の差が最終的に M 分子の疎水基の露出し易さに起因す

ることが判ったが、一方では M を構成するアミノ酸の組成は種によってさほど変わらないと言われる。そうすれば、耐凍性の大きな畜肉や赤身魚の M では、その分子内部に強固な疎水結合を作り得るように疎水性アミノ酸が配列しているという推定もできる。

本研究は昭和 60 年度文部省科学研究費助成による“魚肉タンパクの不安定性に対する 2 次構造論的研究”の一環として行なわれた。

文 献

- 1) 丹羽栄二, 甲田真一郎, 中山照雄: 日水誌, **52**, 859-862 (1986).
- 2) 丹羽栄二, 甲田真一郎, 加納 哲, 中山照雄: 日水誌, **52**, 1697 (1986).
- 3) 丹羽栄二, 甲田真一郎, 加納 哲, 中山照雄: 日水誌, **52**, 1039-1042 (1986).
- 4) 田中和夫: 白身の魚と赤身の魚 (日本水産学会編), 恒星社厚生閣, 東京, 1976, pp. 93-105.
- 5) 高士令二, 新井健一, 斎藤恒行: 日水誌, **36**, 165-168 (1970).
- 6) 梅本 滋: 日水誌, **2**, 427-435 (1966).
- 7) 日向邦彦: 農化, **57**, 1247-1254 (1983).
- 8) 荒川 力: 生化学, **54**, 1255-1259 (1982).