コイミオシン B の -8°C 凍結貯蔵および -8°C 過冷却貯蔵中の変性

小国盛稔, 猪上徳雄, 大井嘉代子, 信濃晴雄

(1986 年 8 月 15 日受理)

Denaturation of Carp Myosin B during Frozen and Supercooled Storage at -8°C

Moritoshi Oguni,*¹ Norio Inoue,*² Kayoko Ohi,*² and Haruo Shinano*²

In order to study the participation of concentrated salt solution in denaturation of myosin B during frozen storage, carp myosin B in KCl solution was stored for 17 days in frozen and supercooled state at -8°C and the extent of denaturation was compared. The comparison was also made with that of myosin B stored at 0°C and frozen-stored at -20°C . The extent of denaturation was followed up by changes in solubility, Ca-ATPase activity, reduced viscosity and streaming birefringence of the solution, and form of myosin B filaments. The apparent rate constant for inactivation of Ca-ATPase (k_D , day^{-1}) of myosin B in 0°C storage was 0.018 and those in -8°C -supercooled- and -20°C -frozen-storage were equally 0.074. In contrast to the above values, the k_D in -8°C -frozen-storage was 0.691 at a very early stage (0-2 days) and 0.028 for the period of the subsequent 15 days. The reduced viscosity of the myosin B solution decreased rapidly within a day when stored in the frozen state at -8°C , but decreased very slowly within the first 3 days when stored in the supercooled state at the same temperature. In the case of the -8°C -frozen-storage, the streaming birefringence was not detected after a day, but in the cases of three other storage conditions it could be observed. The electron microscopic observation showed that the deformation of myosin B filaments was accelerated in the early stage of -8°C -frozen-storage. Their filamentous form changed to granular form and the filamentous form of myosin B disappeared after 2 days. During both -8°C -supercooled-storage and -20°C -frozen-storage, the morphological change of myosin B filaments occurred gradually and the extent of the change was very similar in each case, and the filamentous form of myosin B remained intact even after 17 days. These findings show that the denaturation of myosin B during -8°C -frozen-storage is accelerated to some extent by temperature depression itself and significantly by concentrated unfrozen KCl solution.

魚肉タンパク質の凍結貯蔵中の変性には多くの要因が複雑に作用しあっているため,¹⁾ 抽出したタンパク質によるモデル系での研究が多い。²⁻⁵⁾ ミオシン B を用いた研究では KCl の共晶点 (-11.1°C) 以下の温度で起こっている場合が多く、その理由は -18°C 以下で凍結貯蔵する深温凍結が凍結品の品質保持に重要な意味を持っているためである。近年、パーシャル・フリージングが魚類の鮮度保持に有効であることが明らかになってきた。^{6,7)} 一方、この温度帯は最大氷結晶生成帯⁸⁾ にあり、氷結晶生成による筋肉細胞損傷に起因する魚肉等の品質劣化がおこる可能性も指摘されている。⁹⁾ さらに、塩類の水点降下による塩濃縮⁹⁾ が進行する温度帯でもあるた

め高濃度塩溶液のタンパク質への悪影響¹⁰⁾ も指摘されている。しかし、Ca-ATPase 全活性の失活からみたタンパク質の変性は比較的遅いことも知られている。¹¹⁾ このように、パーシャル・フリージング貯蔵中の品質劣化はタンパク質の変性という面から解明しなければならない問題点があるが、これに関連した研究例は少ない。

著者らは、特に塩濃縮による高濃度塩溶液のタンパク質への影響という視点から研究を続けている。本報告では、KCl-コイミオシン B 溶液を凍結貯蔵したとき、不凍液中に残存する高濃度 KCl 溶液によってミオシン B がどのように変性を受けるかを知るため、KCl 溶液の共晶点よりも高い温度である -8°C で凍結貯蔵および

*¹ 現住所: 藤森工業(株)開発本部技術開発部 (Research and Development Division, Fujimori Kogyo K.K., Nihonbashi, Bakurocho 1-1-2, Chuo, Tokyo 103, Japan).

*² 北海道大学水産学部食品製造学講座 (Laboratory of Marine Food Technology, Faculty of Fisheries, Hokkaido University, Hakodate 041, Japan).

過冷却貯蔵による実験をおこなった。その結果を同時におこなった 0°C 貯蔵あるいは -20°C 凍結貯蔵して得られた結果と比較することによって、コイミオシンBの凍結変性におよぼす温度および高濃度 KCl 溶液の影響を検討した。

実験方法

ミオシン B 溶液の調製および凍結処理 養殖コイ *Cyprinus carpio* の背筋から、高士ら¹²⁾の方法に準じてミオシンB溶液を調製した。タンパク質濃度を $5\sim 7\text{ mg/ml}$ (0.6 M KCl 中) とし、 10 ml ずつ試験管に分注した後、凍結貯蔵実験に供した。 -8°C での凍結および過冷却貯蔵には不凍液を循環させた恒温槽を、また、 -20°C の凍結貯蔵には -20°C のフリーザーを使用した。温度モニターは自記温度記録計 (大倉電機製, 15R-F6Ba) でおこなった。試料が -8°C および -20°C になるまでに要する時間は、それぞれ 30 分および 75~80 分であった。凍結貯蔵しようとする試料の場合は、 -8°C では過冷却状態を生じ易く、冷却開始 10 分後 (-8°C , 過冷却状態) にショックを与えて凍結させた。貯蔵実験は 17 日間にわたっておこなった。貯蔵期間中一定期間毎に試験管を取り出し、 20°C の水槽中で解凍し、均質化したものを $20,000\times\text{g}$ で 60 分間冷却遠心分離後、その上澄液を実験に使用した。

Ca-ATPase 活性およびタンパク質濃度の測定 Ca-ATPase 活性は高士ら¹²⁾の方法により測定し、タンパク質濃度はビュレット法¹³⁾で定量した。

溶解度および見かけの変性速度恒数 溶解度は凍結試料では前項の上澄液について、また、非凍結試料では一定期間貯蔵後同様に処理した上澄液について、そのタンパク質量を定量し、それを貯蔵前のタンパク質量に対する百分率で表わした。Ca-ATPase 残存活性は新井ら⁹⁾の方法により求め、見かけの変性速度恒数 (k_D , day^{-1}) は内山の方法¹⁴⁾によって求めた。

粘度測定および流動復屈折の観察 粘度測定はオストワルド型粘度計による Oguni ら¹⁵⁾の方法に準拠し、 2 mg/ml における還元粘度を求めた。流動復屈折¹⁶⁾は簡易型流動復屈折計¹⁷⁾により定性的に判定した。

電子顕微鏡による観察 Oguni ら¹⁵⁾の方法にしたがってネガティブ染色をおこない、日立電子顕微鏡 HU-12 型により、 75 kV で観察した。

結果と考察

各貯蔵温度におけるコイミオシンBの溶解度を Fig. 1 に示した。 0°C および -8°C 過冷却貯蔵では 90% 以上、 -8°C および -20°C 凍結貯蔵では 80~90% の溶解度を示し、貯蔵期間中大きな変化は認められなかつ

Fig. 1. Changes in the solubility of carp myosin B stored at 0°C , -8°C (frozen or supercooled state) and -20°C (frozen state).

○, Storage at 0°C ; ●, Frozen storage at -8°C ; △, Supercooled storage at -8°C ; ×, Frozen storage at -20°C .

Fig. 2. Changes in the remaining Ca-ATPase activity of carp myosin B stored under the four different conditions.

Symbols are the same as in Fig. 1.

The apparent rate constants for inactivation of Ca-ATPase (k_D , day^{-1}) calculated by the method of Uchiyama¹⁴⁾ were summarized in Table 1.

た。これは貯蔵が短期間であるためであろう。¹⁸⁾

Ca-ATPase 残存活性の対数値と貯蔵日数の関係 (Fig. 2) から変性速度恒数 (k_D , day^{-1})¹⁴⁾ を求めた結果を Table 1 に示した。 0°C 貯蔵では k_D が 0.018 であり、失活速度は緩やかであった。これに対して -8°C での凍結貯蔵では最初の 2 日間に活性は 75% 低下し、 k_D は 0.691 と大きな値であった。その後 17 日目までの変化は緩やかとなった (k_D は 0.028)。一方、 -8°C 過冷却および -20°C 凍結貯蔵したものでは、両者の

Table 1. The apparent rate constants (k_D) for inactivation of Ca-ATPase and the streaming birefringence of carp myosin B stored under four different storage conditions

Storage condition ($^{\circ}\text{C}$)	k_D^{*1} (day^{-1})	Streaming birefringence *2
0	0.018	+
-8 (supercooled)	0.074	+
-8 (frozen)	0.691 (0-2 days)	-
	0.028 (2-17 days)	n.t.
-20 (frozen)	0.074	+

*1 The apparent rate constants were calculated by the method of Uchiyama.¹⁴⁾

*2 The streaming birefringence was examined qualitatively after one day storage. +: A distinct cross of isocline was observed. -: No cross was observed. n.t.: Not tested.

k_D が 0.074 と同じ値であり、同程度の速さで変性が進行した。このように -8°C 凍結貯蔵において急激に変性が進んだ理由としては、氷結によって KCl 溶液が濃縮され、未凍結状態の高濃度 KCl 溶液 (KCl-水系の -8°C では、KCl 濃度は 2.3 M まで濃縮される¹⁹⁾) として存在し、これによりタンパク変性が引き起こされるため²⁰⁾と考えられた。 -8°C 過冷却状態での k_D は 0°C 貯蔵でのその 4 倍大きい値であり、このことはミオシン B が 0°C 以下の低温に置かれただけでも変性することを示すものであろう。このようなことから、 -8°C 過冷却貯蔵では低温そのものによる影響だけであるが、 -8°C 凍結貯蔵の条件では、さらに凍結に伴う高濃度 KCl 溶液の影響が加わることがわかる。

Fig. 2 に示したように、 -8°C 凍結貯蔵では 2 日間の間に急激な変化が観察されたことから、さらに短時間における変化の状態を知るために冷却開始から 15 時間の間で、 -8°C 過冷却貯蔵と比較して詳しく調べた。この間、 -8°C 過冷却貯蔵では Ca-ATPase 活性の低下は認められなかったが、凍結貯蔵の場合には急速な低下が認められ、このとき最初の 5 時間の k_D は 3.32 であった (Fig. 3)。このように -8°C 凍結貯蔵では貯蔵初期から変性が始まり塩濃度の影響が大きいことが明らかである。

次に高濃度塩溶液中では分子全体の構造に変化のおこることが知られているので、²¹⁾ ここでも分子に構造的変化がおきているかどうかを還元粘度によって調べた。その結果、 -8°C 凍結貯蔵では貯蔵 1 日目で急激な粘度の低下がみられた。一方、 -8°C 過冷却貯蔵では 3 日目まで徐々に低下し、 -20°C 凍結貯蔵では貯蔵 5 日後から低下が確認できた (Fig. 4)。

Fig. 3. Changes in the remaining Ca-ATPase activity of carp myosin B in the very early stage of frozen and supercooled storage at -8°C .

Symbols are the same as in Fig. 1.

The figure indicates the apparent rate constant (k_D , day^{-1}) for inactivation of Ca-ATPase during frozen storage at -8°C for 5 h.

Fig. 4. Changes in the reduced viscosity of carp myosin B during frozen storage at -8 and -20°C , and supercooled storage at -8°C .

Symbols are the same as in Fig. 1.

凍結変性による粘度低下は分子形態の部分的変化によっておこること²²⁾が知られているが、コイミオシン B の -5°C 凍結貯蔵実験ではミオシン B の繊維状の形態 (本報告ではフィラメント構造と呼ぶ) が粒状に変わることを (断片化) によって粘度低下することをすでに報告した。²³⁾ このようなことから、 -8°C 凍結貯蔵の試料では短期間に分子全体の構造に変化が生じたことが推察できる。しかし、 -8°C 過冷却貯蔵では還元粘度が徐々に低下したことから、構造変化の進行は -8°C 凍結貯蔵の場合よりも遅いことがわかる。

流動復屈折の定性的観察結果からも、上記のことが裏付けられた。すなわち 4 つの実験条件で 1 日間貯蔵したところ、 -8°C 凍結貯蔵したものだけが流動復屈折を示さず、他の条件ではいずれも流動復屈折が確認できた。

Figs. 5-12. Electron micrographs of myosin B filaments stored under the four different conditions.

Figs. 5 and 6: Immediately after preparation and after being stored at 0°C for 17 days, respectively.

Figs. 7 and 8: Frozen-stored at -8°C for 5 h and 2 days, respectively.

Figs. 9 and 10: Supercooled-stored at -8°C for 9 and 17 days, respectively.

Figs. 11 and 12: Frozen-stored at -20°C for 9 and 17 days, respectively.

In all electron micrographs, the bars represent 500 nm.

(Table 1)。このように -8°C 過冷却貯蔵では -8°C 凍結貯蔵に比較して、見かけの変性速度恒数が小さく、構造変化も小さいが、その理由は過冷却状態では凍結時におこるような塩濃縮を伴わないことにあると考えられる。

次に、電子顕微鏡観察によって、上記のようなタンパク質分子全体の構造変化の確認を試みた。それらの結果を Figs. 5-12 に示した。ミオシン B 溶液の 0°C 貯蔵では 17 日後においてもミオシン B のフィラメント構造が認められ、貯蔵前 (Fig. 5) とほとんど同じであった (Fig. 6)。 -8°C で凍結貯蔵したものでは、5 時間経過後から粒状に変化したタンパク質分子²³⁾が目立ちはじめ (Fig. 7)、24 時間後にはほとんどが粒状となり、2 日後ではミオシン B のフィラメント構造を認めることはできなかった (Fig. 8)。この状態は 17 日後まで同様であった。 -8°C 過冷却貯蔵では 2 日目まで形態的にはほとんど変化は認められなかったが、その後粒状に変化したタンパク質分子が多くなった。しかし、9~17 日後にもなおフィラメント構造のミオシン B が認められた (Fig. 9 および 10)。 -20°C 凍結貯蔵における観察結果は、 -8°C 過冷却貯蔵の場合とほとんど同様であった (Fig. 11 および 12)。

ミオシン B 溶液を -8°C で凍結貯蔵すると 1 日後にはミオシン B のフィラメント構造に変化がおこっていることが、還元粘度の低下および流動復屈折の消失から推定され、さらに電子顕微鏡観察によって、これが裏付けられた。そして、コイミオシン B の高塩濃度下での構造変化²¹⁾や、 -5°C における凍結変性についての研究^{23,24)}から推定すると、F-アクチンが断片化して小さいサイズになっている可能性が高いと考えられる。一方、 -8°C 過冷却貯蔵における k_D は同温度に凍結貯蔵 2 日間の k_D (Table 1) の約 $1/9$ と小さく、還元粘度の低下も緩慢で、さらに 17 日間の貯蔵期間を通じてミオシン B のフィラメント構造を確認できたことなどから、凍結状態の貯蔵に比較して変性の進行は遅いことがわかった。このように、同じ温度においても、凍結状態と非凍結状態での変性速度に著しい違いがみられたのは、前記したように -8°C では、KCl の共晶点以上の温度にあるので、凍結した場合には KCl が濃厚溶液となって、未凍結状態で存在 (KCl-水系で計算すると、最初の液量の 26% が未凍結状態) したことに起因すると考えられる。

KCl-ミオシン B 系のタンパク質変性を氷結点と KCl の共晶点の間の温度域で考えると低温そのものによる温度と塩濃度との両者によって影響されるので、この温度域では温度の低いほど変性が促進されることになる。さらに、凍結貯蔵温度が低いと高濃度塩溶液の液量が少な

くなる²⁰⁾ので、液量も考慮する必要があると考えられる。

-20°C 凍結貯蔵の k_D は -8°C 過冷却貯蔵の場合と同じ値であり、電子顕微鏡観察結果からも変化の程度は類似していることが示されたが、還元粘度の低下においては違いも認められ、変性の内容まで同一と考えることはできない。しかも、 -20°C 凍結貯蔵は KCl の共晶点以下の温度であり、KCl は高濃度未凍結溶液として存在することはない。このように -20°C 凍結貯蔵と -8°C 過冷却貯蔵とは系の状態に大きな違いがあることから変性内容の異なることが想定され、今後さらに研究する必要がある。

本研究を進めるにあたり、終始ご指導を賜った故秋場 稔博士に感謝の意を表する。

文 献

- 1) 野口 敏: 魚肉タンパク質-水産学シリーズ No. 20 (日本水産学会編), 恒星社厚生閣, 東京, 1977, pp. 91-108.
- 2) S. Noguchi and J. J. Matsumoto: *Nippon Suisan Gakkaishi*, **36**, 1078-1087 (1970).
- 3) 新井健一, 高橋英明, 斎藤恒行: 日水誌, **36**, 232-236 (1970).
- 4) 高間浩蔵: 日水誌, **40**, 585-588 (1974).
- 5) M. Ohnishi, T. Tsuchiya, and J. J. Matsumoto: *Nippon Suisan Gakkaishi*, **44**, 755-762 (1978).
- 6) H. Uchiyama and N. Kato: *Nippon Suisan Gakkaishi*, **40**, 1145-1154 (1974).
- 7) 趙 永済, 信濃晴雄, 秋場 稔: 北大水産学部研究報, **35**, 271-285 (1984).
- 8) 加藤舜郎: 食品冷凍の理論と応用, 第 5 版, 光琳書院, 東京, 1974, pp. 321-332.
- 9) H. Buttkus: *J. Food Sci.*, **35**, 558-562 (1980).
- 10) S. Y. K. Shenouda: *Adv. Food Res.*, **26**, 275-311 (1980).
- 11) 内山 均: 水産加工技術-新水産学全集 25 (太田冬雄編), 恒星社厚生閣, 東京, 1980, pp. 15-21.
- 12) 高士令二, 新井健一, 斎藤恒行: 日水誌, **36**, 169-172 (1970).
- 13) A. G. Gornall, C. J. Bardawill, and M. M. David: *J. Biol. Chem.*, **177**, 751-766 (1949).
- 14) 内山 均: 白身の魚と赤身の魚 (肉の特性)-水産学シリーズ No. 13 (日本水産学会編), 恒星社厚生閣, 東京, 1976, pp. 78-92.
- 15) M. Oguni, T. Kubo, and J. J. Matsumoto: *Nippon Suisan Gakkaishi*, **41**, 1113-1123 (1975).
- 16) J. T. Edsall: in "The Proteins" (ed. by H. Neurath and K. Bailey), Vol. I, Part B, Academic Press, New York, 1953, pp. 677-686.
- 17) 梅本 滋: 水産生物化学・食品学実験書 (斎藤恒行, 内山 均, 梅本 滋, 河端俊治編), 恒星社厚生閣, 東京, 1974, pp. 223-226.
- 18) 鈴木たね子: 日水誌, **30**, 792-800 (1964).

- 19) A. V. Wolf, M. G. Brown, and P. G. Prentiss: CRC Handbook of Chemistry and Physics (ed. by R. C. Weast), 64th ed., CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, 1983, pp. D223-D247.
- 20) 岡田 猛, 太田冬雄, 猪上徳雄, 秋場 稔: 日水誌, **51**, 1887-1892 (1985).
- 21) 若目田 篤, 新井健一: 日水誌, **50**, 635-643 (1984).
- 22) 花房尚史: 低温科学 (生物編), **20**, 81-94 (1962).
- 23) T. Okada, N. Inoue, and M. Akiba: *Nippon Suisan Gakkaishi*, **52**, 345-353 (1986).
- 24) 岡田 猛, 猪上徳雄, 信濃晴雄: 日水誌, **52**, 1765-1770 (1986).