冷凍すり身中のタンパク質の分散状態に及ぼす 重合リン酸塩の影響

佐藤 繁雄, 中川 則和, 照井正三郎, 土屋 隆英

(1990年2月23日受付)

Effects of Polyphosphates on Dispersion State of Protein in Alaska Pollack Frozen Surimi

Shigeo Sato,*¹ Norikazu Nakagawa,*¹ Shozaburo Terui,*¹
and Takahide Tsuchiya**

For clarifying what dispersion state the proteins assume in Alaska pollack frozen surimis, effects of polyphosphates and of pH, ionic strength and Mg^{2+} on dispersion state of proteins were examined by phase contrast microscopy and electron microscopy. Frozen surimi and carp myofibril were homogenized with various dispersion media, and the dispersion states of proteins in the resultant homogenates were compared with respect to the effects of the medium composition. The pH of the dispersion media was found to affect the dispersion state of proteins, while ionic strength of polyphosphates did not affect the dispersion significantly. The ionic strength of polyphosphates, low or high, was not found to increase the effect of polyphosphates to cause dissociation of actin and myosin, resulting in occurrence of myosin-poor actomyosin filaments and myosin free F-actin filaments. Based on the facts obtained, it was estimated that actin and myosin in the frozen surimi exist in the state of myofibrillar structure.

先に著者らは,¹⁾ 冷凍すり身中のタンパク質の分散状態を調べるため、冷凍すり身にその溶媒に相当する分散媒(スクロース 4.7%, ソルビトール 4.7%, 重合リン酸塩(ピロリン酸ナトリウム: トリポリリン酸ナトリウム=1:1) 0.3%を含む)を加えてホモジナイズしたところ、ホモジネート中の筋タンパク質は、アクトミオシンフィラメントの状態になると報告した。しかし、冷凍すり身中のタンパク質は筋原線維の状態を保たれていることも併せて報告した。¹⁾ そしてこれらの結果から、ホモジネート中に観察されたアクトミオシンフィラメントは、分散媒中の重合リン酸塩によって筋原線維が変化したものと推定した。

重合リン酸塩は ATP と同様に、高イオン強度下 ($I=0.6$) で、アクトミオシンをアクチンとミオシンに解離すると言われるが、²⁻⁷⁾ 冷凍すり身中に重合リン酸塩が含まれているにもかかわらず、そのホモジネート中にアクトミオシンフィラメントが観察された。この事実は、冷凍すり身に含まれる重合リン酸塩が ATP と異なった働きをしていることを示唆するにも思われる。

そこで、本研究はタンパク質の分散状態に対する重合リン酸塩の影響を調べることににより、冷凍すり身中でタンパク質がどのような状態で存在しているのかを明らかにすることを目的とした。

実験方法

筋原線維の調製 コイ活魚を断首・即殺し、直ちに背筋から Fig. 1 に示す方法に従って筋原線維を調製した。

光学顕微鏡試料作製法 筋原線維懸濁液 2 ml に、Table 1 に示した種々の分散媒 8 ml を加え、ガラスホモジナイザーで泡だたないように注意深くホモジナイズし、位相差顕微鏡(オリンパス社製 BH-2 型)で観察した (Fig. 2)。

電子顕微鏡試料作製法 光学顕微鏡試料 1 ml にさらに同種の分散媒 9 ml を加えて混合した後、50% 飽和酢酸ウランでネガティブ染色し、日立 HS-9 型電子顕微鏡で観察した (Fig. 3)。冷凍すり身のホモジネートを試料とした場合は、前報の方法¹⁾に従って行った。

電子顕微鏡で観察する試料の場合、このようにさらに

*¹ 株式会社紀文 (KIBUN, Co. Ltd., Ginza, Chuo, Tokyo 104, Japan).

*² 上智大学理工学部 (Department of Chemistry, Sophia University, Kioicho, Chiyoda, Tokyo 102, Japan).

Fig. 1. Preparation of carp myofibril.

希釈した理由はタンパク質濃度が高いと良好な像が観察できなくなるからである。

結果および考察

著者らは先に,¹⁾ 冷凍すり身中のタンパク質の分散状態を調べ、以下のことを見いだした。

1) 冷凍すり身の切片には筋原線維構造が観察された。

2) 冷凍すり身と同じ組成のスクロース、ソルビトール、重合リン酸塩から成る分散媒を加え、冷凍すり身をホモジナイズすると、アクチンとミオシンのそれぞれから成る筋原線維構造が消失し、アクトミオシンフィラメントが形成されていた (Fig. 4A)。

この他、前報¹⁾では触れなかったが

Fig. 2. Sample preparation for light microscopy.

Fig. 3. Sample preparation for electron microscopy.

3) 冷凍すり身に重合リン酸塩のみを加えてホモジナイズするとアクトミオシンフィラメントが観察されたが (Fig. 4B), 重合リン酸塩を含まないスクロース、ソルビトールから成る分散媒を使用した場合、矢尻構造を持つアクトミオシンフィラメントは認められず、アクトミオシンフィラメントより太い紐状の処々に球状の塊が付着した物体が認められた (Fig. 4C)。

これらの結果から、冷凍すり身に重合リン酸塩を含んだ分散媒を加えてホモジナイズしたときに、アクトミオシンフィラメントが観察されたのは、重合リン酸塩を加えたことによって筋原線維構造が崩れ、アクトミオシンが形成されたものと考えられた。

本研究では、冷凍すり身中でタンパク質がどのような状態で存在しているのかをさらに明らかにするためにコイの筋原線維を用い、タンパク質の分散状態に及ぼす重合リン酸塩の影響を調べた。

溶液に重合リン酸塩を加えると、pHが高くなるとともに、僅かながらイオン強度も上昇する。それ故、タンパク質の分散状態に対する重合リン酸塩の影響を調べるには、(1) pH と (2) イオン強度の影響を考慮に入れな

Table 1. Media for dispersing the muscle proteins

Media	Sucrose (%)	Sorbitol (%)	Polyphosphates (%)	Orthophosphates (mM)	KCl (M)	Mg ²⁺ (mM)	pH* ₁	pH* ₂
1	4.7	4.7	0.3	0	0	0	9.45	8.85
2	4.7	4.7	0.3	0	0	0	7.20	7.15
3	0	0	0	20	0	0	9.45	8.05
4	0	0	0	20	0	0	7.20	7.32
5	0	0	0	20	0.1	0	7.20	7.32
6	0	0	0	20	0.6	0	7.20	7.32
7	0	0	0.3	20	0.6	0	7.20	7.35
8	4.7	4.7	0.3	0	0	5	7.20	7.15

*₁ pH of dispersion media.

*₂ pH of homogenates with dispersion medium.

Fig. 4. Electron micrographs of homogenates of grade SA Alaska pollack frozen surimi. A: With dispersion medium 1. Fine actomyosin filaments with arrowhead structures are shown. B: With dispersion medium, polyphosphates. Actomyosin structures similar to those in A are found. C: With dispersion medium composed of sucrose (4.7%) and sorbitol (4.7%). Thread-like filaments with irregularly attached granules are shown, but no arrowheaded filaments. Samples were negatively stained. Bars represent 0.2 μm .

ればならない。また、(3) 重合リン酸塩の作用には Mg^{2+} が関与するという報告⁴⁻⁶⁾もあるので、これらのことも考慮し、3つの要因をそれぞれ検索できるような各種の組成を持つ分散媒を用い、タンパク質の分散状態の比較検討を行った。

すなわち、分散媒 1~4 は pH、分散媒 2 および 5~7 がイオン強度、そして分散媒 2, 8 は Mg^{2+} の影響を調

Fig. 5. Micrographs of carp myofibrils and their homogenates. A: Phase contrast micrograph of intact myofibrils. Striated structures are shown. B: Phase contrast micrograph of homogenate with dispersion medium 1. Indistinctive entangled filaments are found. Bar represents 10 μm . C: Electron micrographs of homogenate with dispersion medium 2. Fine actomyosin filaments with arrowhead structure are shown. Sample is negatively stained. Bars represent 0.5 μm .

べることを目的として選択した (Table 1, Fig. 2, Fig. 3)。なお、ここでも、重合リン酸塩としてピロリン酸ナトリウムとトリポリリン酸ナトリウムとの混合塩 (1:1) を用い、オルトリン酸塩としてはリン酸緩衝液を使用した。

pH の影響

重合リン酸塩を加えた場合 冷凍すり身の溶媒に相当する分散媒 1 をコイの筋原線維に加えてホモジナイズし、光学顕微鏡で観察した。分散媒を加える前に認められた筋肉の横紋構造 (Fig. 5A) はホモジナイズ後消失

Fig. 6. Micrographs of carp myofibril homogenates. **A:** Phase contrast micrograph of homogenate with dispersion medium 2. Striated myofibrils and partially degraded myofibrils are shown. Sample was negatively stained. Bar represents 10 μm . **B and C:** Electron micrographs of homogenate with dispersion medium 2. Actomyosin filaments with arrowhead structure are shown, but accompanied by amorphous aggregates as is the case with dispersion medium 1. Samples were negatively stained. Bars represent 0.5 μm .

し、粒状の大きな凝集物となった (Fig. 5B)。このホモジネートを同じ分散媒 1 でさらに希釈し、電子顕微鏡で観察したところ、矢尻構造を持つ典型的なアクトミオシンフィラメントが観察されるようになった (Fig. 5C)。

分散媒 1 の pH は 9.45 であり、これをコイの筋原線維に加えたときのタンパク質溶液の pH は 8.85 とかなり高いので (Table 1), pH がタンパク質の分散状態に影

Fig. 7. Micrographs of carp myofibril homogenate. **A:** Phase contrast micrograph of homogenate with dispersion medium 3. Intact myofibrils are less abundant and disintegrated myofibrils are more abundant as compared with the case for dispersion medium 1 and indistinctive structures and particles are found. Bar represents 10 μm . **B and C:** Electron micrographs homogenate with dispersion medium 3. Myosin-poor actomyosin filaments and naked F-actin filaments are shown, beside actomyosin filaments with arrowhead structures. Samples were negatively stained. Bars represent 0.5 μm .

響を及ぼしている可能性がある。なお、この実験で使用した全ての分散媒の pH とホモジナイズ後のタンパク質溶液の pH は Table 1 のようになった。そこで、分散媒 1 と同じ組成で pH を中性付近に調整した分散媒 2 を使用し、筋原線維に及ぼす pH の影響を調べた。

Fig. 8. Micrographs of myofibril homogenates. A: Phase contrast micrograph of homogenate with dispersion medium 4. Some striated myofibrils and many thread-like irregularly shaped objects are shown. Bar represents 10 μm . B, C, D, E: Electron micrographs of homogenate with dispersion medium 4. Partially decomposed remains of myofibrillar structures with M-lines but without Z-bands are shown (B, C). F-actin filaments with little myosin attached are found surrounded by dense amorphous masses (D, E). Samples were negatively stained. Bars represent 0.5 μm .

光学顕微鏡による観察の結果、分散媒1を加えたとき (Fig. 5B) と同様に粒状の凝集塊がみられたが、その他に、筋原線維構造も多数観察された (Fig. 6A)。このタンパク質溶液を希釈し、電子顕微鏡で観察したところ、アクトミオシンフィラメントとともに多数の凝集塊がみられ、分散媒1を使用したときに比べ、タンパク質の分散性が抑えられていた (Figs. 6B, 6C)。この結果から、タンパク質の分散性に対する分散媒1の影響には、高いpH値が関与していることが示唆された。

オルトリン酸塩を加えた場合 分散媒1のpHが高くなったのは、重合リン酸塩を加えた後pHを調整していなかったためであるが、タンパク質の分散性に対する分散媒1の影響は、pHの他に、含まれるリン酸塩の種類による可能性もある。そこで、pHの異なる2種のオルトリン酸塩溶液 (Table 1の分散媒3, 4) を作製し、タンパク質の分散性に対する影響を調べた。pHを分散媒1と同じpH 9.45に調整したオルトリン酸塩溶液 (分散媒

3) でホモジナイズしたものを光学顕微鏡で観察した。重合リン酸塩を使用したときよりも筋原線維が少なくなり、大部分が横紋構造の認められない無定形のフィラメントや粒状物となっていた (Fig. 7A)。次にこれを電子顕微鏡で観察すると、分散媒1を使用したときと異なり、アクトミオシンフィラメントの他に、ミオシンが少なくなり、不鮮明な矢尻構造となったアクトミオシンフィラメントや、ミオシンのはずれた細いアクチンフィラメントが多数認められるようになった (Figs. 7B, 7C)。

一方、中性付近に調整したオルトリン酸塩溶液 (分散媒4) でコイの筋原線維をホモジナイズすると、横紋構造の認められる筋原線維構造を保ったものが光学顕微鏡で観察された (Fig. 8A)。しかし、電子顕微鏡では筋原線維構造は観察されるものの (Figs. 8B, 8C)、これが僅かに崩壊した部分もみられた上、ミオシンがはずれ、裸

Fig. 9. Electron micrograph of homogenate of grade SA Alaska pollack frozen surimi with dispersion medium 4. F-actin filaments with little myosin attached are found with amorphous masses, like Figs. 8D and 8E. Sample was negatively stained. Bar represents 0.5 μm .

の状態になった F-アクチンフィラメントも多数認められた (Figs. 8D, 8E)。これは冷凍すり身に分散媒 4 を加えてホモジナイズしたとき観察された結果と一致した (Fig. 9)。

イオン強度の影響 0.3% の重合リン酸塩は溶液中ですべて解離し、イオンになるものと仮定すると、イオン

強度は約 0.1 となる。そこで、重合リン酸塩添加によるイオン強度上昇がタンパク質の分散状態に及ぼす影響について調べた。

まず、重合リン酸塩のかわりに KCl を用い、重合リン酸塩と同じイオン強度にした分散媒 5 をコイの筋原線維に加えてホモジナイズしたものを、光学顕微鏡で観察した。その結果、横紋構造を持つ筋原線維構造が多数認められ、分散媒 5 を加える前の状態 (Fig. 5A) とほとんど変わらなかった (Fig. 10A)。これを希釈して電子顕微鏡で観察すると、筋原線維構造 (Figs. 10B, 10C) の他に、僅かながら筋原線維が崩壊した構造もみられた上、アクチンフィラメントの状態のものも認められた (Fig. 10D)。

このように、KCl を加えてイオン強度を 0.1 にしたときのタンパク質の分散状態は、KCl を加えていない分散媒 4 で観察された像とほとんど同じであることから、重合リン酸塩の持つイオン強度はタンパク質の分散状態に影響を及ぼさないものと考えられた。

タンパク質の性状に及ぼす重合リン酸塩の影響を調べた従来の研究²⁻⁷⁾は、高イオン強度下 ($I=0.6$) のアクトミオシンを試料としたものが主であり、冷凍すり身のような低イオン強度下 ($I=0.1$) での重合リン酸塩とは異なる

Fig. 10. Micrographs of carp myofibril homogenates. A: Phase contrast micrograph of homogenate with dispersion medium 5. Both intact striated myofibrils and degraded fragments are shown. Bar represents 10 μm . B, C, D: Electron micrographs of homogenate with dispersion medium 5. Partially degraded myofibrils similar to Figs. 8B and 8C are shown in greatest area (B, C). F-actin filaments accompanied by amorphous masses are observed in a area like Figs. 8D and 8E (D). Samples were negatively stained. Bars represent 0.5 μm .

Fig. 11. Electron micrograph of homogenate of carp myofibrils with dispersion medium 6. A and B: Actomyosin filaments with arrowhead-poor structure are found. Sample was negatively stained. Bars represent 0.5 μ m.

Fig. 12. Electron micrographs of homogenate of carp myofibrils with dispersion medium 7. A and B: Arrowhead-poor actomyosin filaments similar to Fig. 11 are observed. Samples were negatively stained. Bars represent 0.5 μ m.

った結果を与えるものと考えられる。そこで、高イオン強度下 ($I=0.6$) の重合リン酸塩の影響について調べた。コイの筋原線維に高イオン強度 ($I=0.6$) の分散媒 6 を加えてホモジナイズし、電子顕微鏡で観察したところ、矢尻構造を持つアクトミオシンフィラメントが認められた (Fig. 11)。また、この分散媒に、重合リン酸塩を加え

Fig. 13. Electron micrographs of homogenate of carp myofibrils with dispersion medium 8. Arrowhead-poor actomyosin filaments and naked F-actin filaments with little myosin attached are found accompanied by amorphous masses (A, B). Samples were negatively stained. Bars represent 0.5 μ m.

て pH を中性付近に調整した分散媒 7 を使用したところ、重合リン酸塩を含んでいない分散媒 6 のときと同じく、矢尻構造を持つアクトミオシンフィラメントが多数観察された (Figs. 12A, 12B)。

Mg²⁺ の影響 重合リン酸塩は、ATP と同様、アクトミオシンをアクチンとミオシンに解離させる作用があると言われる。²⁻⁷⁾ しかし、冷凍すり身やコイの筋原線維を重合リン酸塩でホモジナイズしても、アクトミオシンの解離は観察されなかった。一方、岡田⁸⁾や山本⁹⁾は、重合リン酸塩によるアクトミオシンの解離作用に、Mg²⁺ が必要であると報告している。そこで、重合リン酸塩と Mg²⁺ を含み、pH を中性付近に調整した分散媒 8 を使用し、重合リン酸塩と Mg²⁺ の共存効果について検討した。

タンパク質溶液を電子顕微鏡で観察したところ、ミオシンの疎なアクトミオシンフィラメントが多数認められた (Figs. 13A, 13B)。この結果は、Mg²⁺ を含んでいない重合リン酸塩のみの分散媒 2 を使用したとき、矢尻構造を持つアクトミオシンフィラメントが認められた (Figs. 6B, 6C) ことと明らかに異なっていた。[†]このこと

より, 重合リン酸塩によるアクトミオシンの解離には Mg^{2+} が必要であることが電子顕微鏡観察でも明らかとなった。

以上, タンパク質の分散状態に対して重合リン酸塩が影響を及ぼす要因として, (1) pH と (2) イオン強度の上昇, (3) Mg^{2+} との共存効果について調べた結果次のことがわかった。

1. 重合リン酸塩 (ピロリン酸ナトリウム: トリポリリン酸ナトリウム=1:1 の混合塩) の存在により, pH およびイオン強度は上昇する。pH はタンパク質の分散性を高めるが, イオン強度はタンパク質の分散性に関係しない。

2. 重合リン酸塩と同じく pH 9.45 に調整したオルトリン酸塩 (phosphate buffer) でコイの筋原線維をホモジナイズしても, タンパク質の分散性が悪く, アクトミオシンフィラメントの他に, ミオシンが疎なアクトミオシンフィラメントや裸のアクチンフィラメントが観察された。

3. 重合リン酸塩によるアクトミオシンの解離には, Mg^{2+} を必要とする。

これらの結果より, 前報¹⁾で冷凍すり身を分散媒1でホモジナイズしたとき, アクトミオシンフィラメントが観察されたのは, 分散媒中に重合リン酸塩が含まれていたこと, さらにガラスホモジナイザーの物理的な影響¹⁰⁾であることがわかった。重合リン酸塩の存在による溶液の pH の上昇とホモジナイズによって筋原線維構造が崩れ, 遊離したアクチンとミオシンが結合してアクトミオシンが形成されたものと考えられる。このとき, 重合リン酸塩によってアクトミオシンがアクチンとミオシンに

解離されなかったのは, 分散媒1を加えたときのホモジネット中に, アクチンとミオシンが解離するのに必要なだけの Mg^{2+} が存在していなかったためと推定される。

市販の冷凍すり身の pH は 7.2 前後である。本研究の結果から, 重合リン酸塩がタンパク質の分散状態に影響を及ぼすのは pH がかなり高いときであり, 冷凍すり身の pH から考えて, 冷凍すり身中ではタンパク質の分散状態に対して重合リン酸塩は大きな影響を及ぼさないものとする。したがって, 著者が先に,¹⁾ 冷凍すり身の超薄切片で観察したように, 冷凍すり身は筋原線維構造を持っていることが明らかになった。

文 献

- 1) 佐藤繁雄, 土屋隆英, 松本重一郎: 日水誌, **50**, 2117-2126 (1984).
- 2) W. Hasselbach and G. Schneider: *Biochem. Z.*, **321**, 462-475 (1951).
- 3) E. T. Friess and M. F. Morales: *Arch. Biochem. & Biophys.*, **56**, 326-333 (1955).
- 4) C. E. Swift and R. Ellis: *Food Technol.*, **10**, 546-552 (1956).
- 5) J. R. Bendall: *J. Sci. Food. Agr.*, **5**, 460-475 (1954).
- 6) R. Hamm: *Fleischwirtschaft*, **7**, 196-203 (1955).
- 7) 岡村一弘, 松田敏生, 横山理雄: 日水誌, **24**, 545-550 (1958).
- 8) 岡田 稔, 山崎惇子: 東海区水研報, **21**, 49-59 (1958).
- 9) 山本常治, 野口栄三郎: 日水研年報, **6**, 235-242 (1960).
- 10) K. Samejima: *J. Food. Sci.*, **50**, 1540-1544 (1985).