自動酸化によってマイワシ油トリグリセリドから 生成する極性成分の筋原線維に対する作用

川崎 賢一, 大泉 徹, 今野久仁彦, 林 賢治

(1991 年 7 月 20 日受付)

Involvement of the Polar Fraction Produced by Autoxidation of Triglyceride
of Sardine Oil in the ATPase Activity Change and the Cross-linking
of Myosin Heavy Chain of Myofibrils*

Ken-ichi Kawasaki,*² Tooru Oozumi,*² Kunihiro Konno*³, and Kenji Hayashi*³

Effects of the polar fraction contained in the autoxidized triglyceride of sardine oil on the K-ATPase activity and the cross-linking of myosin heavy chain (HC) of myofibrils (Mf) were investigated.

Purified triglyceride was allowed to autoxidize at 37°C, and the triglyceride oxidation products (TGOP) were prepared with different polar fraction contents. Decrease in the K-ATPase activity and the amount of remaining intact myosin HC upon incubation of Mf with TGOP were measured. Both changes correlated with the polar fraction content in the TGOP employed.

The polar fraction and unoxidized triglyceride were both isolated from the TGOP by thin-layer chromatography (TLC), and it was found that K-ATPase inactivation and cross-linking reaction were both brought about by only the polar fraction. Since the TGOP employed in this study contained practically no free fatty acids and aldehydes detectable on TLC, the oxidation of thiol groups of myosin and cross-linking of HC are attributed to the polar fraction in the TGOP.

前報^{1,2)}において著者らは過酸化脂質がコイ筋原線維(以下 Mf と略す)の ATPase 活性とサブユニット組成に及ぼす影響について検討し、過酸化脂質の添加は Mf の Ca²⁺ および K-ATPase 活性を大きく変化させるだけでなく、Mf 中のミオシン重鎖(以下 HC と略す)の多量化反応をも引き起こすことを報告した。ただし、前報までの結果は、マイワシ油のトリグリセリドの酸化物全体(以下 TGOP と略す)を用いて Mf に対する作用を検討したものであり、このような Mf の変化がトリグリセリド(以下 TG と略す)の酸化物中のいかなる成分と関連して起こるのかについては不明である。そこで、本研究では、酸化度合の異なる TGOP を調製し、それらの Mf に対する作用について検討するとともに、酸化によって生成する TGOP 中の極性成分を分離し、その Mf に対する作用をも検討した。

実験方法

Mf は前報^{1,2)}と同様に、コイ *Cyprinus carpio* の背筋から加藤らの方法³⁾に準じて調製し、0.1 M KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) 溶液に懸濁させた。また、酸化度合の異なる TGOP は、前報^{1,2)}と同様に、Folch らの方法⁴⁾で精製したマイワシ油からケイ酸カラムクロマトグラフィー⁵⁾によって分画した TG を、37°C の恒温器(暗所)に 4~8 日間放置して自動酸化させ、調製した。

TG の酸化度合は、過酸化値(以下 POV と略す)、脂質中における極性成分(以下 PL-fr と略す)の占める割合(重量%)および脂肪酸組成の変化から判定した。POV の測定法は AOCS の標準法⁶⁾に準じ、極性成分の量は、薄層クロマトグラフィー-水素炎イオン化検出法⁷⁾(以下 TLC-FID 法と略す)を用いて測定した。また、

*1 本研究は水産庁委託事業「水産物健康性機能有効利用開発」の一環として行われた。また、本研究の概要を平成 3 年度日本水産学会春季大会において発表した。

*2 富山県食品研究所 (Toyama Food Research Institute, Yoshioka, Toyama, Toyama 939, Japan).

*3 北海道大学水産学部 (Faculty of Fisheries, Hokkaido University, Hakodate, Hokkaido 041, Japan).

略語 SDS: sodium dodecyl sulfate.

TBA: 2-thiobarbituric acid

Table 1. Changes in peroxide value, polar fraction content, and highly unsaturated fatty acid content in autoxidized triglyceride

Treatment time* ¹ (h)	POV* ² (meq/kg)	PL-fr* ³ (%)	(C 20:5+C 22:6)/C 16:0* ⁴
0	32	0	1.05 (0.00)
123	174	38	0.60 (0.43)
145	220	53	0.46 (0.56)
152	229	60	0.37 (0.65)
182	290	69	0.30 (0.72)

*¹ Triglyceride from sardine oil was incubated at 37°C in the dark.

*² Peroxide value (POV) was determined according to the standard method of AOCS (Ref. 6).

*³ The polar fraction (PL-fr) content was measured by the TLC-FID method (Ref. 7).

*⁴ The fatty acid composition of triglyceride oxidation product (TGOP) was analyzed by gas chromatography, and the relative decrease in the sum of C20:5 and C22:6 was also shown in parentheses.

TG および TGOP から 10% 塩酸メタノールによって脂肪酸メチルエステルを調製し,⁸⁾ それらをガスクロマトグラフ (島津製作所製 GC-7AG 型) に供して脂肪酸組成を測定した後, C 16:0 酸に対する C 20:5 酸と C 22:6 酸の和の比率⁹⁾を求め, 酸化度合の指標とした。

PL-fr の分取は薄層クロマトグラフィー (以下 TLC と略す) により行なった。すなわち Merck Kiesel gel 60 (厚さ 0.5 mm) プレートを用い, *n*-ヘキサン: ジエチルエーテル (85:15, v/v) を展開溶媒¹⁰⁾として TGOP を展開した後, PL-fr はクロロホルム: メタノール (1:9, v/v) を用いて抽出した。また, TG はジエチルエーテルで抽出した。

前報^{1,2)}と同様に, ジメチルスルフォオキシドに溶解した TGOP または PL-fr を Mf 懸濁液に添加して, Mf の K-ATPase 活性とサブユニット組成 (特にミオンシン HC) の変化を検討した。

結果および考察

酸化処理による TG の性状の変化 マイワシ油から精製した TG を 37°C (暗所) に放置して自動酸化させた場合の酸化度合の変化を 3 種の方法で測定した。結果を Table 1 に示した。上記の条件下で, POV は約 100 時間の誘導期を経た後, 著しく上昇した。また, Kaitaranta¹¹⁾ および加藤ら⁷⁾は, TLC-FID 法を用いて脂質中の極性成分の生成量を測定し, これが脂質の酸化度合の指標になりうることを提唱している。この方法によると, 本研究の場合も, TG は経時的に減少し, 酸化処理前には見いだせない原点上にとどまる極性の強い成分 (PL-fr) が増加することが確認された。この結果は TLC によっても確かめられた (Fig. 3)。さらに, 魚油中の高度不飽和脂肪酸はきわめて酸化しやすいことがよく知られているが, 本研究の場合も, C 20:5 酸および C 22:6 酸は酸化処理によって著しく減少し, それらの減少度合は PL-fr の生成度合と相関していることが示された (Table 1)。POV は二相性の経時変化を示すことが知られてお

Fig. 1. Effect of the polar fraction content in TGOP on the decay of Mf K-ATPase activity.

Four different TGOPs containing various amounts of polar fraction were prepared in the same manner as shown in Table 1.

(A): Various amounts of these TGOPs with different polar fraction contents dissolved in dimethyl sulfoxide were mixed with 0.5 ml of carp myofibrils (5.5 mg/ml) suspended in 0.1 M KCl and 20 mM Tris-HCl (pH 7.5). The mixture was kept overnight at 0°C and submitted to K-ATPase assay. ATPase was assayed in a medium of 0.5 M KCl, 25 mM Tris-maleate (pH 7.0), 1 mM ATP, and 5 mM EDTA. Polar fraction content in TGOPs used was 38% (○), 53% (△), 60% (□), and 69% (●).

(B): The same data in (A) were replotted as a function of polar fraction content in TGOPs used.

り, その絶対値を酸化度合の指標にすることができない。そこで, 以下本実験では TG の酸化度合の指標として, TLC-FID 法により検出される PL-fr の生成量を用いることにした。

TG の酸化と ATPase 活性の変化の関係 Mf 懸濁液

Fig. 2. Effect of the polar fraction content in TGOP on the cross-linking of HC.

(A): 0.5 ml of myofibrils suspension (5.5 mg/ml) was incubated with four different TGOPs containing 38% (○), 53% (△), 60% (□), and 69% (●) of polar fraction under the same conditions as shown in Fig. 1 and cross-linking reaction was analyzed by SDS-electrophoresis using 5% polyacrylamide gel. Relative staining intensity of the remaining HC in treated Mf was measured at 640 nm and expressed as a ratio to that of control Mf.

(B): The same data in (A) were replotted as a function of polar fraction content in TGOPs used.

0.5 ml (5.6 mg/ml) に対して Table 1 に示した酸化度合の異なる TGOP を 0~2.5 mg の範囲で添加し、0°C で一晚反応させた後、K-ATPase 活性の変化を検討した。その結果を Fig. 1 (A) に示した。Fig. 1 (A) にみられるように、同じ量の TGOP を添加しても、その酸化度合によって K-ATPase 活性の低下の程度は異なり、PL-fr を多く含む TGOP を添加した場合ほど K-ATPase 活性の低下が著しかった。次に、Table 1 の結果から添加した TGOP に含まれる PL-fr の絶対量を算出し、それに対して K-ATPase 活性をプロットして、Fig. 1 (B) とした。この結果から、TGOP による K-ATPase 活性の変化は、TGOP 中の PL-fr の生成量に本質的に依存することが示された。また、Fig. 1 と同条件で Ca-ATPase 活性を測定した結果、Ca-ATPase 活性も TGOP 中の PL-fr の生成量に依存して変化することが確かめられた (結果は図示していない)。

TG の酸化と HC の多量化反応の関係 前述の条件 (Fig. 1) と同条件で TGOP を作用させた Mf のサブユニット組成の変化を、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (以下 SDS-PAGE と略す) によって解析した。そのうち HC の相対染色強度の変化のみを Fig. 2 (A) に示

Fig. 3. Changes in thin-layer chromatograms of triglyceride by its autoxidation.

Triglyceride from sardine oil was incubated at the same conditions as shown in Table 1, applied to the thin-layer chromatography using Merck Kiesel gel 60 plates and developed in the solvent consisting of *n*-hexane:diethyl ether:acetic acid (85:15:1, v/v). Three % copper acetate-8% phosphate was used for color development.

した。Fig. 2 (A) に示したように、同じ量の TGOP を添加しても、PL-fr を多く含む TGOP を添加した場合ほど HC の減少が著しかった。そこで、次に Fig. 1 の場合と同様に TGOP 中の PL-fr の絶対量を求め、HC の相対染色強度との関係を Fig. 2 (B) に示した。これにみられるように、HC の減少度合も同一の曲線上にプロットされ、TGOP 中の PL-fr の量に依存して、HC の多量化反応が進行することが明らかに示された。ただし、Fig. 1 (B) と Fig. 2 (B) の結果を比較すると、K-ATPase 活性の変化は HC の多量化よりも少量の PL-fr の添加で起こることが認められる。このことから、ミオシン頭部のチオール基への PL-fr の作用は、HC の多量化よりも先行して起こるように考えられるが、この結果は両反応の反応速度の関係^{1,2)}ともよく一致している。

PL-fr の Mf に対する作用 TGOP によって起こる Mf の ATPase 活性の変化および HC の多量化反応は、いずれも TGOP 中の PL-fr の生成量に強く依存していることが明らかとなった。次に TGOP から PL-fr を TLC

Fig. 4. Thin-layer chromatograms of polar and triglyceride fraction separated from TGOP.

TGOP was chromatographed in the same manner as in Fig. 3, except that acetic acid was excluded from the developing solvent. The band corresponding to polar or triglyceride fraction was pooled without color development and extracted with chloroform:methanol (1:9, v/v) for polar fraction or with diethyl ether for triglyceride fraction. These fractions separated were reapplied to thin-layer chromatography by the same method as shown in Fig. 3.

によって分取し, その Mf に対する作用をあらためて検討した。まず, TGOP を TLC 分析した結果を Fig. 3 に示したが, 本研究で用いた自動酸化の条件では, TG より上部に移動する成分は検出されず, また, 遊離脂肪酸も認められなかった。検出された成分は, TG 成分(以下 TG-fr と略す)と原点にとどまる極性成分および原点よりも少し上部に検出される極性成分の三成分だけであった。このように PL-fr は少なくとも二つの成分の混合

物であることが示されたので, 原点にとどまる成分を PL-fr (1), その上部の成分を PL-fr (2) として区別することにした。そこで, PL-fr を 48% 含む TGOP から TLC によってこれら 3 成分を分離し, それらを再び TLC 分析に供した結果を Fig. 4 に示した。これにみられるように, TG-fr と PL-fr (1) は本実験の条件では単一スポットとして検出されたが, PL-fr (2) は PL-fr (1) を多量に含有していた。PL-fr (2) 中に PL-fr (1) が多量に含まれる理由については現在検討中であるが, 分離操作中に PL-fr (2) が PL-fr (1) に変化した可能性も考えられる。これらの画分の回収率は TG-fr が 38.1%, PL-fr (2) が 6.0%, PL-fr (1) が 38.9% であり, これらの合計は TGOP の 83.0% であった。なお, 得られた PL-fr (1) も極性の強い溶剤 (*n*-ヘキサン:ジエチルエーテル:酢酸=80:70:0.5, v/v) を展開溶媒として TLC を行なうと, 多種の成分が検出され, 複雑な成分組成から成ることが示された。

次に, Mf 懸濁液 0.5 ml (5.0 mg/ml) に対して, 得られた PL-fr (1) を 0~4 mg の範囲で添加し, 0°C で一晚反応させた後, Mf の K-ATPase 活性の低下と HC 量の減少 (HC の多量化とみなす) を検討した。結果を Fig. 5 (A) と (B) に示した。同図にみられるように, PL-fr (1) の添加量の増加にともない, K-ATPase 活性は低下し, HC 量は減少した。これに対して, 分離した TG-fr は ATPase 活性に全く影響を及ぼさず, HC の多量化も引き起こさなかった。また, PL-fr (2) も K-ATPase 活性を低下させ, HC の多量化も引き起こしたが, 供試した PL-fr (2) 中に PL-fr (1) が 75% 混在したので, PL-fr (2) そのものが Mf の変化を引き起こしたかどうかは明らかではない。なお, Fig. 5 (A) および (B) 中には, PL-fr (1) を分取する前の TGOP を Mf に添加したときの K-ATPase 活性変化および HC の減少を, 加えた TGOP 中の PL-fr 含量 (PL-fr (1) と PL-fr (2) の含量の和) に対してプロットした結果もあわせて示した (図中 Δ) が, これらの変化は分離した PL-fr (1) (図中 $\circ$) が引き起こす変化と見かけ上よく一致している。これはおそらく TGOP 中の PL-fr (2) の含量がごく少量 (数%) であるためで, TGOP によって起こる Mf の ATPase 活性の変化と HC の多量化は, 主に PL-fr (1) の作用に起因すると推定される。なお, Fig. 5 (A) と (B) に示した結果は TGOP, およびそれから PL-fr (1) を分離した後, 速やかに Mf に添加して, それらの Mf に対する作用を比較したものである。一方, 著者らは酸化度合の異なる TGOP と PL-fr (1), およびそれらを -40°C で長期間保存したものでは, それらの作用が必ずしも一致しないことにしばしば経験している。このことは, TLC 上で原点に残る PL-fr (1) の組成が一定

Fig. 5. Effect of polar fraction separated from TGOP on the decrease of K-ATPase activity (A) and the cross-linking of HC in myofibrils (B).

0.5 ml of myofibril suspension (5.9 mg/ml) was incubated with various amounts of polar fraction (PL-fr (1)) prepared as shown in Fig. 4 (○) or with various amounts of parent TGOP (Δ) under the same conditions as in Fig. 1. K-ATPase activity (A) and remaining HC content (B) were plotted as a function of the actual amount of polar fraction in the incubation mixture.

ではない可能性があること、さらに、それらは不安定で保存中に容易に変化する可能性もあることを示唆するものである。TGOP 中には TLC で検出できるほどの高級アルデヒドや遊離脂肪酸などの混在が全く認められないことを先に述べたが、Mf に作用する極性の強い成分は TBA 反応陰性であり、マロンアルデヒドを含まないことも定性的に確認した。従って、Mf の ATPase 活性の変化や HC の多量化を引き起こす成分はマロンアルデヒドや炭素鎖の切断で生ずるモノアルデヒドではなく、グリセリド構造を保持した酸化生成物であると考えられる。言い換えると本研究の結果は、アクトミオシンの不溶化を引き起こすといわれているマロンアルデヒド^{12,18)}や、HC の多量化を引き起こすことが知られているグルタルアルデヒド¹⁴⁾などのアルデヒド類の生成を伴うほど酸化が進行していない過酸化脂質の中にも、Mf の性状に影響を及ぼすならぬ成分が存在することを示すものである。この極性の強い成分は、ヨウ化カリウム-デンプン法¹⁵⁾によって認知されるヒドロペルオキシドが主成分であることを定性的に確認したが、重合物を主体とした二次生成物も含まれる可能性¹⁶⁾があり、その成分の構造と Mf との反応機構に関しては現在検討中である。

本研究を実施する機会を与えていただいた富山県食品

研究所堀井正治所長に感謝する。また、本研究の遂行にあたり有益なご助言をいただいた北海道大学水産学部新井健一教授に謝意を表する。

文 献

- 1) 川崎賢一, 大泉 徹, 今野久仁彦: コイ筋原線維の ATPase 活性に及ぼす過酸化脂質の影響. 日水誌, 57, 1185-1191 (1991).
- 2) 川崎賢一, 大泉 徹, 今野久仁彦: マイワシ油由来の過酸化脂質によって引き起こされるミオシン重鎖の多量化反応. 日水誌, 58, 127-133 (1992).
- 3) 加藤 登, 内山 均, 塚本志朗, 新井健一: 魚類筋原線維 ATPase の生化学的性質. 日水誌, 43, 857-867 (1977).
- 4) J. Folch, M. Lees, and G. A. Sloane Stanley: A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 226, 497-509 (1957).
- 5) 藤野安彦: 生物化学実験法 9, 脂質分析法入門, 学会出版センター, 東京, 1978, pp. 69-71.
- 6) E. Bilinski, R. E. E. Jones, and Y. C. Lau: Chill stowage and development of rancidity in frozen Pacific herring, *Clupea herengus pallasi*. *J. Fish Res. Board Canada*, 35, 473-477 (1978).
- 7) 加藤 治, 田中正康, 石井重吉, 伊東俊洋, 金子 弘: TLC-FID 法によるリノール酸メチル及び油脂酸化生成物の定量. 油化学, 36, 183-187 (1987).
- 8) 山川民夫: 5-3 脂肪酸. 生化学実験講座 3 脂質の化学, (日本生化学会編), 東京化学同人, 東京, 1974, pp. 197-209.
- 9) 庄野寿彦, 豊水正道: 魚内の低温貯蔵 (5°C) 中における脂質構成脂肪酸の変化. 日水誌, 37, 912-918 (1971).
- 10) 藤野安彦: 生物化学実験法 9, 脂質分析法入門, 学会出版センター, 東京, 1978, pp. 101-104.
- 11) J. K. Kaitaranta: TLC-FID assessment of lipid oxidation

- as applied to fish lipids rich in triglycerides. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **58**, 710-713 (1981).
- 12) H. Buttke: The reaction of myosin with malonaldehyde. *J. Food Sci.*, **32**, 432-434 (1967).
- 13) 高間浩蔵, 座間宏一, 五十嵐久尚: 魚類筋肉脂質の冷凍貯蔵中の変化 III 脂質酸化生成物の蛋白質に及ぼす影響. *日本誌*, **38**, 607-867 (1972).
- 14) D. H. Hu, S. Kimura, and K. Maruyama: Cross-linking of native myosin forms, oligomers of myosin heavy chain dimers. *J. Biochem.*, **104**, 509-511 (1988).
- 15) K. Oette: Identification of some lipid peroxides by thin-layer chromatography. *J. Lipid Res.*, **6**, 449-454 (1965).
- 16) S. Y. Cho, K. Miyashita, T. Miyazawa, K. Fujimoto, and T. Kaneda: Autoxidation of ethyl eicosapentaenoate and docosahexaenoate. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **64**, 876-879 (1987).