水溶性タンパク質画分中のミオシン重鎖分解抑制因子の存在

野村 明, 伊藤慶明, 逢坂良昭
北村有里, 宮崎裕規, 小島 渥

(1997年12月24日受付)

A factor Inhibiting Myosin Heavy Chain Degradation of Washed Meat Paste Around 40°C, in the Sarcoplasmic Protein of Fish Meat

Akira Nomura,^{*1} Yoshiaki Itoh,^{*2} Yoshiaki Osaka,^{*2,*3}
Yuri Kitamura,^{*1} Hiroki Miyazaki,^{*2,*3} and Atushi Obatake^{*2}

The separation of a factor, which inhibits the degradation of myosin heavy chain in washed meat paste around 40°C, from the sarcoplasmic protein of fish meats was examined. The factor was extracted easily with water from meat. After the extract was mixed with DEAE-ion exchange resin, the factor was eluted with 0.1 M NaCl solution. On the other hand, when the extract was fractionated by ammonium sulfate, the factor was contained in a 50-70% saturated fraction. Then ammonium sulfate fractionation, after ion exchange treatment, gave an almost single peak chromatogram in gel filtration. The peak was 80,000-90,000 in molecular weight and showed no transglutaminase activity. Furthermore, this factor was separated from various kinds of fish meats, that is even from fish meat of which *modori* at 40°C is not induced by meat washing, which varies in *modori* behavior.

キーワード: ミオシン重鎖, 戻り, 水晒し, 戻り抑制因子

これまでに著者は、土佐湾で漁獲される19魚種の無晒肉と晒肉の温度-ゲル化曲線を求め、それらの肉の戻りの発現状況から四つの型に大別した。¹⁾ 無晒肉および晒肉共に戻り現象を示さない魚種をI型魚、無晒肉では60°C付近で戻りが認められるが、水晒しによって戻らなくなる魚種をII型魚、無晒肉および晒肉共に50-70°Cで戻りを起こす魚種をIII型魚、IIおよびIII型魚とは異なり、無晒肉では60°C付近で戻りが起こるが、水晒しによって新たに40-50°Cで戻りが発現する魚種をIV型魚とした。また、II-IV型魚で認められた戻り現象はSDS-PAGE像からいずれもミオシン重鎖(HC)の分解を伴っていた。IV型魚のような魚種では、40°C付近で予備加熱することは足の低下をもたらすことを報告した。²⁾ さらに、この戻りはI-IV型魚いずれの水溶性タンパク質画分(Sp-P)の添加によっても抑制されたことから、Sp-P中にはHC分解抑制因子が存在することを推測した。³⁾ そこで本研究では、Sp-P中からこの因子の分離精製を試み、その存在を確認することを目的とした。

実験方法

供試魚 高知市御土^{あま}瀬^せ漁港に水揚げされた戻り発現の異なる4種(I-IV型魚)、¹⁾すなわち、I型魚としてヒメコダイ *Chelidoperca hirundinacea*、II型魚としてワキヤハタ *Malakichthys wakiyae*、III型魚としてヨメゴチ *Calliurichthys japonicus*、IV型魚としてカナド *Lepidotrigla guentheri* およびユメカサゴ *Helicolenus hilgendorfi* を供試した。

イオン強度の異なる溶媒によるSp-Pの抽出・分画 無晒肉の挽肉に対して10倍量の冷蒸留水を加え、泡止めホモジナイザーで15分間攪拌したものを、10,000×gで20分間遠心分離後、綿濾過した上澄液を水抽出画分(E₀)とした。この沈澱に対して5倍量の0.05 M NaCl溶液で抽出して得られた上澄み画分(E_{0.05})、更にこの沈澱から0.1 M NaClで同様に抽出した画分(E_{0.1})を調製した。これらの3画分をそれぞれ透析チューブに充填後、ポリエチレングリコール(#20,000)に埋没して2°Cで脱水乾固した。これを冷蒸留水で溶

^{*1} 高知県工業技術センター (Kochi Prefectural Industrial Technology Center, Nunoshida, Kochi 781-5101, Japan).

^{*2} 高知大学農学部栽培漁業学科 (Department of Aquaculture Faculty of Agriculture, Kochi 783-0093, Japan).

^{*3} 現所属 錦セントラルフーズ (Central Foods Co. Ltd., Higashi-shinagawa, Shinagawa, Tokyo 140-0002, Japan).

解後、HC 分解の判定に供試した。

DEAE トヨパール 650 によるイオン交換 E_0 のタンパク質含量をビューレット法で定量後、約 3.0 g のタンパク質を含んでいる E_0 1000 ml と 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液-1 mM EDTA で平衡化した DEAE トヨパール 650 (東ソー(株)製) 250 g を混合した。これに 5 mM EDTA を含む 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.8) を 200 ml 加えて、50 分間攪拌放置した。これを東洋濾紙 No. 2 を用いてブフナー漏斗で濾過し、得られた濾液並びに 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液-1 mM EDTA 500 ml で同樹脂を 15 分間攪拌洗浄した濾液を合わせて非吸着画分 (I_0) とした。この樹脂に 0.1

M NaCl を含む同緩衝液、更に 0.5 M NaCl を含む同緩衝液で上記と同様の操作によって得られた濾液をそれぞれ 0.1 M NaCl 溶出画分 ($I_{0.1}$) および 0.5 M NaCl 溶出画分 ($I_{0.5}$) とした。これらの各分画試料も上記と同様の操作を行って濃縮乾固し、HC 分解判定に用いた。

硫安分画⁴⁾ E_0 を分画する場合には、30-90% 飽和となるように 10% 間隔で硫安を順次加え、それぞれの硫安濃度で得られた沈澱を回収した。また、 $I_{0.1}$ の分画では、始めに 50% 飽和の上澄液を得、70% 飽和の沈澱を回収した。

各沈澱画分を HC 分解判定に使用する際には、沈澱を 5-10 ml の冷水で溶解後、一晩水に透析し、硫安を

Fig. 1. Effects of sarcoplasmic proteins (E_0 , $E_{0.05}$, and $E_{0.1}$) fractionated by successive extraction with three kinds of NaCl solutions (0, 0.05, 0.1 M) from meats (Type IV), on the gel forming ability (upper) and myosin heavy chain degradation (lower) of the washed meat paste of fish Type IV at 40°C.

Redbanded searobin *Lepidotrigla guentheri* and hilgendorf saucord *Helicolenus hilgendorfi* were used as fish Type IV.

E_0 : Soluble fraction obtained by centrifuging ($10,000 \times g$, 20 min) the homogenate of the unwashed meat with ten volumes of chilled water. $E_{0.05}$: Soluble fraction extracted from the resulting residue with five volumes of 0.05 M NaCl solution. $E_{0.1}$: Soluble fraction extracted successively from the residue with 0.1 M NaCl solution. Resulting solutions E_0 , $E_{0.05}$, and $E_{0.1}$ were packed in dialytic tubes and concentrated in polyethylene glycol (#20000) powder. The amount of E_0 , $E_{0.05}$, and $E_{0.1}$ corresponding to that in the unwashed meat was added to the washed meat respectively. Gels were prepared by heating at 40°C for two hours with 3% NaCl according to the procedure shown in previous paper.¹⁾ Measurement of gel strength as the product of tensile strength and breaking extension, and SDS-PAGE based on the Laemmli method⁵⁾ were also carried out by the same procedures as shown in the previous paper.¹⁾

① E_0 ; ② $E_{0.05}$; ③ $E_{0.1}$; C, distilled water added; 1, E_0 added; 2, $E_{0.05}$ added; 3, $E_{0.1}$ added; U, unheated; H, heated; HC, myosin heavy chain; A, actin

除去して供試した。

Sephacryl S300 によるゲル濾過 50-70% 飽和硫酸分画後の沈殿を上記と同様に溶解, 透析し, その約 10 ml (タンパク量 3-5 mg/ml) を FPLC (Pharmacia 製 GP-250PLUS) を用い, 0.1 M NaCl-10 mM リン酸緩衝液-1 mM EDTA で平衡化した Sephacryl S300 (ϕ 2.6 cm $\times$ 70 cm カラム) にかけて, 流速 2.5 ml/min でゲル濾過した。溶出液は 3 ml ずつ分画回収した。

HC 分解および戻り抑制効果の判定 各精製段階で得られた画分を E_0 の場合は元の無晒肉中に相当する量を, $I_{0.1}$, 硫酸沈殿および Fig. 4 で示した fraction G の場合は 2 倍に相当する量を N 型魚晒肉に添加して調製した塩ずり身 (水分 87%, NaCl 濃度 3.0%) を, 40°C

で 2 時間加熱し, 得られたゲルの強度およびその SDS-PAGE 像上のミオシン重鎖 (HC) の分解挙動を前報¹⁾と同様の方法で調べ, 抑制効果を判定した。対照は精製画分と同量の水を添加した。

トランスグルタミナーゼ (TGase) 活性の測定 水溶性画分について Ando *et al.*⁶⁾ の方法に従って蛍光法で調べた。活性はタンパク質 1 mg 当たりの蛍光強度で示した。

実験結果および考察

イオン強度の異なる溶媒による Sp-P の抽出・分画 N 型魚のカナドおよびユメカサゴの無晒肉から調製した E_0 , $E_{0.05}$ および $E_{0.1}$ をそれぞれの晒肉に添加して調製

Fig. 2. Effects of sarcoplasmic proteins (I_0 , $I_{0.1}$, and $I_{0.5}$) eluted from the mixture of E_0 and DEAE-ion exchange resin by successive washing with three kinds of NaCl solutions (0, 0.1, 0.5 M), on the gel forming ability (upper) and myosin heavy chain degradation (lower) of the washed meat paste of fish Type IV at 40°C.

Fish used were the same as shown in Fig. 1. E_0 (about 3 g protein/1,000 ml) obtained by the procedure as shown in Fig. 1 was mixed with DEAE-Toyopearl 650 gel (250 g) equilibrated preliminary with 1 mM EDTA-10 mM sodium phosphate buffer (pH 6.8) (buffer A). After stirring for 50 minutes, the mixture was filtrated on a buchner funnel. The resulting residue was suspended in 500 ml of buffer A and filtrated again. These two filtrates were put together as I_0 . Furthermore, $I_{0.1}$ and $I_{0.5}$ were prepared by the successive washing of the residue with 0.1 M NaCl in buffer A, and 0.5 M NaCl in buffer A. Filtrates I_0 , $I_{0.1}$, and $I_{0.5}$ were dialyzed against chilled distilled water overnight and condensed with polyethylene glycol. The other procedures were as described in Fig. 1 except that I_0 , $I_{0.1}$, and $I_{0.5}$ prepared from twice amount of the unwashed meat was added to the washed meat respectively.

① I_0 ; ② $I_{0.1}$; ③ $I_{0.5}$; C, distilled water added; 1, I_0 added; 2, $I_{0.1}$ added; 3, $I_{0.5}$ added; U, unheated; H, heated; HC, myosin heavy chain; A, actin

した塩すり身を40°Cで2時間加熱して得られたゲルの強度並びにそれらのSDS-PAGE像をFig. 1に示した。両魚種とも水を添加した対照ゲルでは泥状となってゲル性はなかったが、 E_0 を添加するとゲル強度が150–300 g/cm²のこんにゃく様のゲルとなり、 $E_{0.05}$ および $E_{0.1}$ では E_0 添加ゲルに比べて非常に弱いゲルしか得られなかった。これらの試料のSDS-PAGE像を比較するとFig. 1下段に示したように、弱いゲルであった $E_{0.05}$

Fig. 3. Effects of sarcoplasmic proteins fractionated from E_0 by ammonium sulfate (30–90% saturation), on the gel forming ability (upper) and myosin heavy chain degradation (lower) of the washed meat paste of fish Type IV at 40°C.

Fish used was hilgendorf saucord *Helicolenus hilgendorfi*. To 500 ml of E_0 , ammonium sulfate was added to increase the saturation from 30 to 90% at 10% intervals and was stirred for 30 minutes at 0°C. After the precipitate at the each saturation was collected by centrifuging at 10,000 $\times g$ for 60 minutes, it was solubilized with 10 ml of chilled distilled water and dialyzed against distilled water overnight before adding to the washed meat Type IV. The other procedures were as described in Fig. 1 except that precipitates prepared from twice amount of the unwashed meat was added to the washed meat respectively.

Left side of SDS-PAGE patterns is of the fractionated sarcoplasmic protein, and the right side is of the before (U) and after (H) heating of meat pastes mixed with the each fractionated sarcoplasmic protein.

および $E_{0.1}$ 添加試料では対照と同様にHCの分解(SDS-PAGE像上、HCの減少にともなうHCとアクチンとの間の成分の生成、増加)が認められたのに対し、こんにゃく様のゲルとなった E_0 添加試料ではその分解は認められなかった。

これらのことから、HC分解抑制因子は水で溶出されることが分かった。 E_0 のSDS-PAGE像上には多数のタンパク質が認められるので(Fig. 1)、更に精製するために E_0 をバッチ式イオン交換処理した場合(Fig. 2)、あるいは硫安分画を行った場合(Fig. 3)についてその効果を検討した。

バッチ式イオン交換法による精製 カナドおよびユメカサゴの E_0 からバッチ式イオン交換法で分画した I_0 、 $I_{0.1}$ 並びに $I_{0.5}$ のHC分解抑制効果を調べた結果をFig. 2に示した。両魚種とも $I_{0.1}$ を添加した加熱ゲルの強度が最も強く、 $I_{0.5}$ を添加したものではその半分以下であり、 I_0 添加ゲルは対照と同様の弱いゲルであった。それぞれの加熱ゲルのSDS-PAGE像を比較すると、対照

Fig. 4. Separation procedure of a factor inhibiting the degradation of myosin heavy chain in the washed meat from sarcoplasmic protein of fish.

および添加効果のなかった I_0 添加試料では HC の分解が認められたが、ゲルが強くなった $I_{0.1}$ と $I_{0.5}$ を添加した試料ではその分解が抑制され、特にゲル強度が最も強かった $I_{0.1}$ 添加試料では抑制作用が最も強く認められた。このことから E_0 を DEAE トヨパール 650 によるイオン交換にかけると HC 分解抑制因子は 0.1 M NaCl で溶出される画分に含まれることが分かった。

硫安分画 ユメカサゴから調製した E_0 を 30–90% 飽和の硫安で 10% ごとに分画し、それぞれの硫安濃度で得られた沈澱の HC 分解抑制効果を調べ、その結果を Fig. 3 に示した。50, 60 および 70% 飽和の各沈澱を添加した場合はこんにゃく様ゲルになったが、これら以外の画分を添加しても対照と同様に泥状となってゲル化しなかった。また、SDS-PAGE 像からこれら泥状の試料では HC の分解が認められたが、こんにゃく様のゲルが形成された 50, 60 および 70% 飽和の沈澱添加試料では HC の分解は抑制された。なお、これらの画分の SDS-PAGE 像には、まだ多数のタンパク質成分が認められたが、比較的高分子側の成分が飽和度の低い硫安で除去された。

一方、先のバッチ式イオン交換処理では逆に比較的低分子成分が除去されたので、 E_0 をバッチ式イオン交換にかけた後、硫安分画を行い、更にゲル濾過にかけて精製効果を上げることを試みた。その操作方法を Fig. 4

に示した。無晒肉に冷水を加えて E_0 を調製し、それを DEAE トヨパール 650 によるバッチ式イオン交換にかけ、 $I_{0.1}$ を得、これの硫安分画を行い 50% 飽和の沈澱を除去した後、70% 飽和の沈澱を回収した。この沈澱を 0.1 M NaCl, 1 mM EDTA を含む 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.8) で溶解し、更に硫安を除去するために同緩衝液で一晩透析した試料液を、同液で平衡化した Sephacryl S300 でゲル濾過した。I 型魚から IV 型魚いずれの水溶性画分にも HC 分解抑制効果を認めている³⁾ので、これらの水溶性画分をこの方法に従って精製すると、Fig. 5 に示したようにいずれの魚種からほぼ単一のピークのゲル濾過パターンが得られ、その溶出位置も同一であった。

そこで、この主ピークを示す画分 (G) を IV 型魚カナドの晒肉に添加して HC 分解抑制効果を調べたところ、いずれの G も、程度の差はあるものの HC の分解を抑制した (Fig. 6)。

また、主ピークの成分は Fig. 7 に示したようにゲル濾過の溶出位置 (K_{av}) から分子量が 80,000–90,000 であると推定した。

トランスグルタミナーゼ活性 上記の分子量はトランスグルタミナーゼ (TGase) のそれと近似していること、および TGase が HC 間に架橋を形成させ、HC の多量化を触媒する酵素^{7–10)}であることから、この画分の

Fig. 5. Gel filtration chromatograms of 50–70% saturation fraction obtained by the procedure shown in Fig. 4 from various *modori* type (Type I–IV) of fish.

Type I, Princes small porgy (himekodai) *Chelidoperca hirundianacea*; Type II, Silverbelly seaperch (wakiyahata) *Malakichthys wakiyae*; Type III, Japanese dragonet (yomegochi) *Calliurichthys japonicus*; Type IV, Redbanded searobin (kanado) *Lepidotrigla guentheri*

Gel filtration conditions were as follows: applied amount, 8 ml (about 3 mg protein/ml); column size, $\phi 2.6 \times 70$ cm; flow rate, 2.5 ml/min; one fraction, 3 ml.

Fig. 6 SDS-PAGE patterns of the effect of G fraction from Type I-IV fish by gel filtration chromatography on the degradation of myosin heavy chain of the washed meat paste (Type IV) before and after heating at 40°C.

Type I-IV used were the same fish as shown in Fig. 5. The other procedures were as described in Fig. 1 except that G fraction in Fig. 5 prepared from twice amount of the unwashed meat was added to the washed meat.

1, 2, distilled water was added in the same amount as G; 3, 4, G was added; 1, 3, unheated meat paste; 2, 4, heated gels at 40°C for two hours

成分は TGase であることも考えられるので、この点について検討した。E₀ およびゲル濾過で得られた画分 (G) について TGase 活性を調べた結果、Table 1 に示したように、E₀ では蛍光強度が増加し、TGase 活性を示したが、G ではほとんど増加せず、TGase 活性は認められなかった。なお、Fig. 1, Fig. 2, Fig. 3 および Fig. 6 の結果をみると HC 分解抑制因子を含む水溶性画分を晒肉に添加しても HC の多量化は認められなかったこと、また TGase は 45°C で加熱すると失活すると

Fig. 7. Relationship between molecular weight of standard proteins and Kav of gel filtration chromatography on Sephacryl S300.

G, major peak of chromatograms in Fig. 5

Table 1. The activity of transglutaminase of E₀ and G prepared from Type IV fish

	Reaction time (min)			
	0	20	40	60
Redbanded searobin (E ₀)	0	0.77	1.0	1.2
Redbanded searobin (G)	0	0.0	0.0	0.0
T Gase (0.156 unit) **	0	40.9	—	78.9

** : From guinea pig liver (SIGMA)

E₀ and G were prepared according to the procedure as shown in Fig. 4

T Gase activity was measured in terms of the incorporation of monodansyl cadaverine into *N*-*N*-dimethylated casein according to method of Ando *et al.*⁶⁾

T Gase activities of E₀ and G were expressed in fluorescence intensity per milligram of protein.

報告されていることから、¹¹⁾ G を 45°C で 1 時間加熱し、遠心分離したその上澄液の HC 分解抑制効果を調べた。その結果 Fig. 8 に示したように、HC 分解の抑制効果は残っていたことから、HC 分解抑制因子は TGase とは異なるものと判定した。また、本因子は 45°C の加熱によって沈殿しない成分であることが示唆された。

以上の結果から、魚肉水溶性タンパク質画分中には晒肉の 40°C 付近での戻りおよび HC の分解を抑制する因子の存在することが明らかになった。この因子は分子量が 80,000-90,000 のタンパク質で、TGase 活性を示さず、また、45°C で 1 時間加熱しても失活しないことから、TGase とは異なるものと判断した。戻りまたはプロテオリシスを抑制するインヒビターに関しては Toyohara *et al.*^{12,13)}、並びに山下^{14,15)} の報告があり、著者らも現在、この因子がミオシン重鎖を分解するプロテアーゼに対するインヒビターと考えて更なる精製と、その

Fig. 8. SDS-PAGE patterns of heated gels mixed with G heated at 45°C for an hour.

The heat-induced gels were prepared according to the procedure as shown Fig. 1 except that G fraction in Fig. 5, prepared from the twice amount of unwashed meat, was added to the washed meat.

1, 2, Distilled water was added (Control); 3, 4, G heated at 45°C for an hour was added

1, 3, unheated meat paste; 2, 4, heated gels at 40°C for two hours

性質を検討中である。

文 献

- 野村 明, 伊藤慶明, 宗園貴仁, 小島 渥: 土佐湾産魚種の戻り発現に及ぼす水晒しの影響. 日本誌, 59, 857-864 (1993).
- 野村 明, 伊藤慶明, 西川 智, 小島 渥: 戻り発現が異なる魚種に対する二段加熱効果の差異. 日本誌, 60, 667-673 (1994).
- 野村 明, 伊藤慶明, 豊田寛国, 小島 渥: 水晒しによって誘発される 40°C 付近の戻りに対する水溶性タンパク質画分の抑制効果. 日本誌, 61, 744-749 (1995).
- 西 望: タンパク質 I (日本生化学会編), 東京化学同人, 東京, 1990, pp. 121-125.
- U. K. Laemmli: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685 (1970).
- Y. Ando, S. Imamura, Y. Yamagata, T. Kikuchi, T. Murachi, and R. Kannagi: High-performance liquid chromatographic assay of transglutaminase and its application to the purification of human erythrocyte transglutaminase and platelet factor XIII. *J. Biochem.* 101, 1331-1337 (1987).
- 関 伸夫, 宇野秀樹, 李 南赫, 木村郁夫, 豊田恭平, 藤田孝夫, 新井健一: スケトウダラ筋肉およびすり身中のトランスグルタミナーゼ活性とミオシン B との反応. 日本誌, 56, 125-132 (1990).
- 塚正泰之, 志水 寛: マイワシ肉とサバ肉の坐り特性. 日本誌, 56, 1105-1112 (1990).
- H. Kishi, H. Nozawa, and N. Seki: Reactivity of muscle transglutaminase on carp myofibrils and myosin B. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 57, 1203-1210 (1991).
- I. Kimura, M. Sugimoto, K. Toyoda, N. Seki, K. Arai, and T. Fujita: A study on the cross-linking reaction of myosin in kamaboko "suwari" gels. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 57, 1389-1396 (1991).
- H. Takeda and N. Seki: Enzyme-catalyzed cross-linking and degradation of myosin heavy chain in walleye pollack surimi paste during setting. *Fisheries Science*, 62, 462-467 (1996).
- H. Toyohara, K. Sasaki, M. Kinoshita, and Y. Shimizu: Effect of bleeding on the *modori-phenomenon* and possible existence of some *modori-inhibitor(s)* in serum. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 56, 1245-1249 (1990).
- H. Toyohara, K. Sasaki, M. Kinoshita, Y. Shimizu, and M. Sakaguchi: Detection of inhibitors for *modori*-inducing proteinase in fish and calf serums. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 57, 521-525 (1991).
- M. Yamashita and S. Konagaya: A comparison of cystatin activity in the various tissues of chum salmon between feeding and spawning migration. *Comp. Biochem. Physiol.*, 100A, 749-751 (1991).
- 山下倫明, 逸見 光, 上田智広, 小原 貢, 田老孝則, 西岡不二男, 小長谷史郎: 産卵期サケ落とし身の加熱ゲル化過程で起る著しいプロテオリシスとプロテアーゼインヒビター添加による魚肉ゲルの劣化抑制効果. 日本誌, 62, 934-938 (1996).