

魚類の肉質変化に関する生化学的研究 — I *

漁獲直後の myosin 区と解糖関与物質の変化について

齊 藤 要 ・ 日 高 富 男

Studies on the Biochemical Change in the Fish Muscle-I

On the Changes in Amount of Myosin Fraction and Glycolytic Products of Muscle in Newly Caught Fish

Kaname SAITŌ and Tomio HIDAKA

緒 言

漁獲後に起る魚類の肉質変化は大別して体内の酵素系が関与する自己消化の現象と、更に微生物の作用による変敗の現象とに分けて考えられる。変敗現象は微生物と魚肉並に外因因子の錯綜する高次現象であつて比較的多くの学者により研究されている。自己消化の現象は生活現象と直結するものであるが、その限界は極めて微妙であり、死直後に起る死後硬直の現象も広義の自己消化であると著者等は考える。

最近筋肉収縮の支配的物質として注目されている ATP が死後硬直の完了時迄は筋肉内に存在している事より、ATP を生活エネルギー源とする見地からみれば、死後硬直以後が筋肉の生化学的意味での死であるとも考えられる。従つて肉質変化を究明する意味での解糖現象は磷酸関与物質の消長を中心として追究すべきであつて、既に山田氏^{1) 2) 3)}等はこの見地より魚類の即殺と疲労死別、或は魚種、漁法による肉質変化の相違を見ている。最近天野氏等⁴⁾は魚種、漁法更に致死条件を明確にした試料について、glycogen と 2, 3 の解糖生産物の変化を明らかにし、又藤巻氏等⁵⁾は解糖に関与する酸可溶磷酸化合物の変化と死後硬直との関係に就いて観察している。

ところで解糖作用に関与する磷酸化合物の中で特に重要な役割を果している ATP は ATPase の触媒作用に依り ADP と磷酸とに分解される。この ATPase の本態について ENGELHALDT⁶⁾ は myosin と同一物質であるとする結果を総説しており、之に対し筋肉の ATPase が myosin に吸着されているとの説もあるが、何れにせよ両者は密接不離の関係にあると考えられている。著者等は魚の生活時から自己消化の過程を含めた期間に於ける肉質変化の要因とその抑制手段を研究するに当り、先づ筋肉の主要成分である myosin がそれ自身重要な酵素作用を有する事に関心をもち、myosin を中心とした一連の酵素系の特異性、或はその消長と鮮度との関係について研究を進めている。此処にその予備実験として行つた魚類の捕殺手段による解糖関与物質の消長並びに myosin 量との関係に就いて観察し若干の知見を得たので報告する。

実 験 方 法

I. 実験材料及び試料調製法

実験材料：実験に使用した魚は淡水魚のコイ, *Cyprinus carpio*, 海水魚ではムロアジ

* 1954年10月, 第8回日本生化学会九州地方部会にて発表

Decapterus muroadsi, ゴマサバ *Scomber tapeincephalus* で海水魚は本学練習船上で釣獲したものを使用した。試料魚の平均体長はコイ 23cm. ムロアジ, ゴマサバ共に 15cm であった。

試料調製：コイ肉を例として説明すれば次の如くである。コイ10尾を大容器に生かして静かに冷蔵庫に運び、之を5尾宛二群に分ち、一群は水中より取上げ直ちに庖刀で断頭直殺し他の一群は常温の床上で暴れるに任せて放置し苦悶死せしめた。其後は -3°C の冷蔵庫室内にて各群から夫々4尾をとり、内臓除去、三枚卸、剥皮した肉を細切して試料肉とし、 18°C に各所定時間放置し、夫々その実験目的に応じて処理を施し分析に供した。各群残りの1尾は内臓除去の状態にて魚体状況の観察に供した。

尚海水魚については直殺、苦悶死の外に電戟死を追加した。即ち径45cm, 水深15cm, 海水温度 24.5°C のタンク中に釣獲した試料魚を入れ、直ちに電極距離 45cm にて出力 420V, 0.5A の電流を72秒間通電し死に至らしめ、コイ同様処理して試料肉とした。

II. myosin A, myosin B区の抽出方法

筋肉 myosin の分離精製法に就いては獣肉を対象として多数研究されている。近年 SZENT-GYÖRGYI⁷⁾等は従来 myosin と呼ばれていたものが, actin なる蛋白質と純 myosin とが結合した actomyosin である事を示しているが両者の関係については現在も尚種々議論されている。元来哺乳動物と魚類とでは筋肉の蛋白組成は異り, HAMOIR⁸⁾は魚肉の myosin と称せられる蛋白質は哺乳動物の actomyosin に類似したものであると述べているが未だ確定の段階には至っていない様である。

然して筋肉中の myosin 定量法としては従来熱凝固或は塩類による分別沈澱法等種々あるが、著者等は抽出 myosin の ATPase 活性保持の見地より予備実験の結果その収量は低下するが次記の BAILEY 氏法⁹⁾により抽出精製を行つた。即ち試料肉を更に孔径 3mm の目板を附したミンチで2回挽肉し、予冷した 0.5M 塩化加里液 (0.5 MKCl-0.03N NaHCO₃, pH 8.5) 10倍量を加え冷所で充分振盪しつゝ10~20分間、24時間抽出する。この抽出時間10~20分間の方を一応 myosin A区、24時間の方を myosin B区⁶⁾とした。抽出終了後は各々冷所で 3500 r.p.m, 20分間遠沈し、その上層液に 20 倍容の氷冷水を添加して一昼夜冷所放置によつて myosin A, B 区を析出せしめ、上記塩化加里液に溶解すれば乳白色の液を得る、之等は夫々 100 cc 恒量としてその蛋白態窒素を測定して myosin 量とした。この量は前述の如く myosin の絶対量でなく、相対的な見掛上の値を表わすものである。尚、獣肉を試料とした実験では myosin A区は所謂純ミオジンを主成分とし myosin B区は actomyosin を主成分とすると発表されている。

III. 分析方法

1. 酸可溶性磷酸区分の抽出とその分割定量法：ATP 初め酸可溶性磷酸区分の定量法としてはイオン交換樹脂による分割定量法等もあるが、著者等は LEPAGE 氏法¹⁰⁾に準じて分割定量した。即ち試料 10g に冷 10% トリクロール酢酸 93cc を加え冷所でホモゲナイズして抽出を行い、30分間放置後濾過、抽出液を得る。このトリクロール酢酸抽出液について直ちに酸可溶性全磷、無機磷、phosphagen を定量する。また抽出液のバリウム沈澱部の $\Delta 7\text{P}$ と ribose を定量して之から ATP, ADP を算出した。尚操作中必要に応じては冷蔵庫内で処理を行つた。

2. glycogen : 試料に30%苛性加里溶液を加えて加熱溶解, アルコールにて沈澱し常法により定量, 算出した。

3. ammonia : トリクロール酢酸抽出液について NESSLER法¹¹⁾ に準じて比色定量した。

4. 乳酸 : トリクロール酢酸抽出液について Hydroquinone法¹²⁾ にて比色定量した。

実験結果及び考察

I. 死後経過時間によるサバ肉 myosin A, B 区の変化

直殺サバ肉を 25°C に放置し各時間毎に BAILEY 氏法に依り myosin A, B 区を抽出して窒素量を定量した結果は Fig. 1 に示す如くである。サバ肉の鮮度低下に伴う myosin 量の変化は, A, B 両区共に死後時間経過に従ってその量を減少する傾向にある事は明らかであり死後 8 時間後, 即ち死後硬直が完了する時期に於て特異的な一時増加現象が見られたが, 10 時間後再び減少して 25 時間後位には myosin A, B 両区分共に消失した。

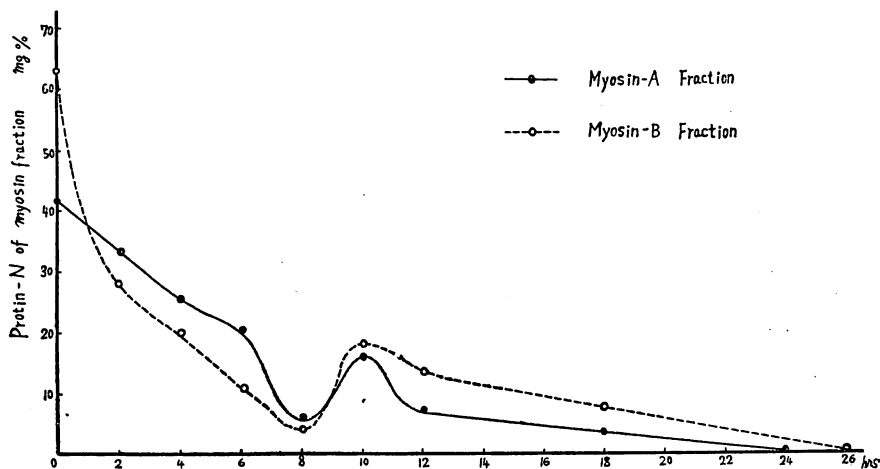


Fig. 1. Changes in amount of myosin A and myosin B fraction in muscle of *Scomber tapeincephalus* which was instant death during storage at 25°C.

尚両区の量的関係は死直後の筋肉ではB区がA区より多いが其後硬直期に至る迄はA区の方がB区より多い傾向が見られた。この一因としては両区の抽出条件の相違, 即ちB区分を 24 時間抽出する中に最初に抽出される myosin の一部が不溶性の myosinfibrin 等に変化する事が考えられ, 事実其の現象を観察している。(詳細は後報する)。硬直完了後は再びB区がA区よりも多く, 遂には鮮度低下に伴いA区が先に消失する結果となつている。即ち両者の死後経過による変化は若干の量的差異をもつだけで殆んど同様の傾向を示す事が知られた。

II. コイ肉解糖関与物質の死後変化

コイ肉を 18°C に放置し, 直殺肉と苦悶死肉とで死後経過時間により解糖関与物質が如何に変わるかを測定した結果を Fig. 2~5 に示す。之等の結果を取纏めれば, (1) 酸可溶性

全磷は致死条件の別なく, 又死後経過によつても顕著な変化は見られなかつた。(2) 真性無機磷は死直後に於て直殺肉より苦悶死肉に多いが死後時間の経過に伴い両肉同様の傾向

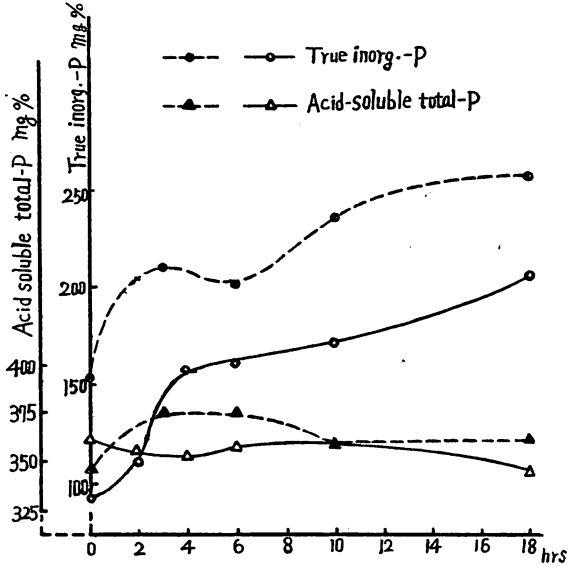


Fig. 2. Changes in amount of acid-soluble total-P and true inorg.-P in the muscle of carp during storage at 18°C.

—— instant death }
 death in agony }
 (to apply from Fig. 2 to Fig. 5)

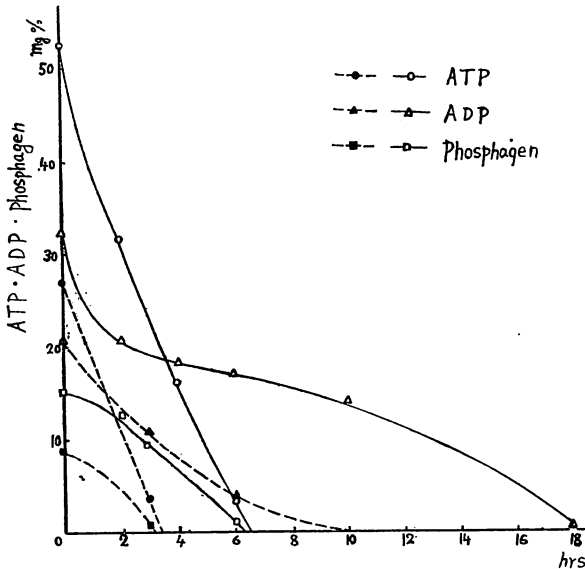


Fig. 3. Changes in amount of ATP, ADP and phosphagen in muscle of carp during storage at 18°C.

で増加する。(3) phosphagen は死直後直殺肉では 15.1 mg%, 苦悶死肉では 9.0 mg% であり, 経過時間と共に漸減して苦悶死肉では 3 時間, 直殺肉では 6 時間後には殆んど消失する。(4) ATP, ADP は大体同様の傾向を示し, ATP は死直後に於て苦悶死肉では直殺肉の約半量で, それも 3 時間後には殆んど消失するが, 直殺肉では 6~7 時間後まで存在している。ADP の減少は ATP に比して緩慢である。(5) glycogen, 乳酸, ammonia も死直後から既に苦悶死肉の方が変化が著しく, 死後経過による変化は従来報告されている結果と同様の傾向であつた。

以上の結果の相互関係をみれば (1) phosphagen, ATP, ADP の消失時期は先づ phosphagen が 3~6 時間後, それに次いで ATP が約 6 時間後, ADP は 17~18 時間後である。(2) phosphagen, ATP 等の分解に伴い無機磷は増加し而もその傾向は phosphagen, ATP が顕著に減少する死後 4 時間位の範囲に於て最も著しい。(3) 死後経過と共に glycogen は減少し乳酸は増加するが, 乳酸も苦悶死肉に於て 7 時間後位から減少の傾向がある。(4) 直殺肉, 苦悶死肉共に ATP が消失する頃にその魚肉の死後硬直の完了が観察された。(5) ammonia の生成は緩慢で時に消長もあるが, phosphagen, ATP が消失する頃一時増加の傾向も見られた。

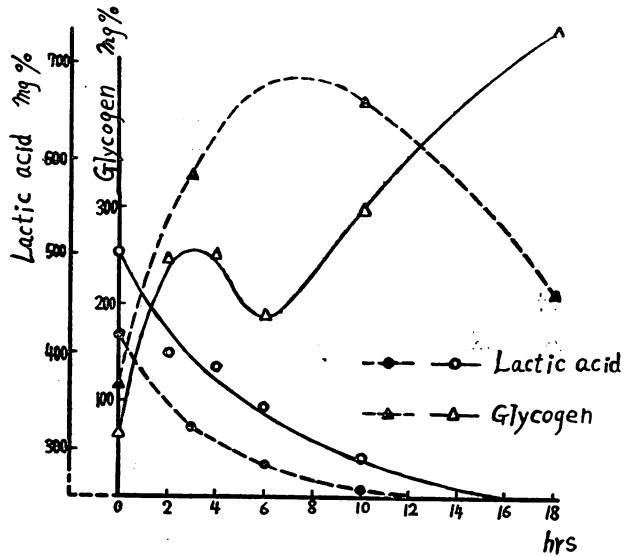


Fig. 4. Changes in amount of lactic acid and glycogen in muscle of carp during storage at 18°C.

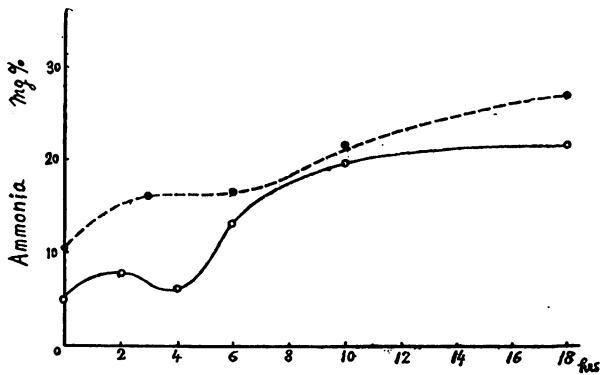


Fig. 5. Changes in amount of ammonia in muscle of carp during storage at 18°C.

Ⅲ. 電戦死魚肉について
 海水魚ムロアジ、ゴマサバの各致死条件による死直後の解糖関与物質量は Table 1 に示す如くである。
 船上での実験でその操作に不備を認め、又電戦条件も再検討を要する事ではあるが、Table 1 の結果では致死条件に依つてゴマサバの直殺肉が他区分の肉に比し phosphagen, ATP, ADP の消費が少々少い丈で、其他の電戦死肉、苦悶死肉では殆んど差異が認められない。
 只電戦死肉は死直後から ammonia 量が多い傾向が認められた。尚電戦の際には水中で可成り激しく苦悶し、ムロアジは約 10 秒間の通電で死ぬもゴマサバは 70 秒間の通電を要した、結局其間の苦悶状態は免れず、今回の電戦死は苦悶死の状態を含むことを附記する。

Table 1 Changes in amount of glycolytic products by death conditions and kinds of fish(mg%)

Sample	Mackerel <i>Scomber tapeincephalus</i>			Horse-mackerel <i>Decapterus muroadsi</i>	
	Killed instantly by decapitation	Died by electric shocks *	Died by after struggling	Died by electric shocks *	Died after struggling
Total-P	334	356	356	322	360
True-inorg. -P	191	207	162	168	211
Phosphagen	3.7	1.6	1.6	1.6	1.4
ATP	38.5	3.2	3.2	—	58
ADP	9.0	3.8	3.8	—	34
Glycogen	65.5	48.6	72.0	66.6	27.3
Lactic acid	350	312	388	462	293
Ammonia	14	26	14.5	27	16

* Condition of electric shock
 electric current : direct current
 electric force : 420V., 0.5 A.
 distance of pole : 45 cm.
 electrified time : 72 sec.

IV. myosin 区と解糖関与物質との関係

酵素と基質の関係にある myosin 区と ATP との量的変化をみれば, 死直後より ATP が減少するに従い myosin 区も減少し, 一般に硬直完了と共に ATP は消失するが myosin 区は尚残存して変敗と共に消失する傾向が見られた。前述の如くこの myosin 区窒素量は特定条件下における見掛上の比較値で絶対量を示すものでない。従つてこの結果より直ちに myosin 区の定量的な変化を考察するには尚検討すべき問題もあるが, ATP の分解と共に筋肉の硬直が進行することより考えて, 筋肉の硬直, 弛緩に伴う状態変化により抽出量が増減する可能性も考えられる。又著者等は *in vitro* の実験において酵素基質間の均衡が破綻する事により myosin 区が不安定化する現象並に myosin 区は本質的に他の筋肉構成蛋白質よりも変性及び変敗し易い事もしばしば経験している。尚死直後において phosphagen の急激な減少が認められる事は, myosin による ATP の分解産物である ADP を phosphagen が磷酸化して ATP とする反応が考えられ, その実験例も一, 二あつたが多くの実験結果では死直後より 2 時間の間隔では ATP 再合成の傾向は確認出来なかつた。之等の点に就いては後報する。何れにせよ硬直完了時に見られる見掛上の myosin 量の変化は ATP 或は phosphagen 量の消失と何等かの関係があるものと思われる。又 myosin が ATPase 作用の外に AMP の desaminase 作用^{6) 13)}を有する事より, 死後の筋肉中では酵素反応の不可逆性が強化され, それが ammonia の一生成因子となり得る可能性も充分考えられる。myosin の有する斯様な両酵素活性が肉質変化の経過中に如何なる機構で使途され, 又それが如何なる影響を有するかに就ては尚検討する予定である。

要 約

コイ, ムロアジ, ゴマサバを試料とし, 直殺, 苦悶死, 電戦死せしめた筋肉について myosin 区及び解糖関与物質の定量を行い, 致死条件又は死後経過時間等による該物質の量的変化を観察し, myosin 区と解糖関与物質の相互関係を検討した。その結果は Fig. 1—5, Tabel 1 に示す。要約すれば次の如くである。

1) BAILEY 氏法によつて分離した myosin A, B 両区の鮮度低下による量的変化は何れも死後時間経過と共に減少し, 死後硬直完了の死後 8 時間後頃に特異的な一時的増加の傾向があるが 10 時間後再び減少して 20~25 時間後遂に消失する。その変化は両区共に殆んど同様の傾向を示し, 又死後筋肉に於て myosin 区が他の筋肉構成蛋白質より速かに変性し, 肉質変化には myosin の変性及び変敗が重要な関係を有するものと推察した。

2) 筋肉 ATP の消失時期と死後硬直完了時が略々一致し, 更に myosin の一時的増加の時期と ammonia 増加期とが一致しており, この点は死後の肉質変化の重要段階と考えられる。

3) 苦悶死は直殺肉に比し解糖作用が著しく, 死直後に於て Phosphagen, ATP, ADP, glycogen が少く, 無機磷, 乳酸が多い。今回の電戦死魚肉の解糖現象は苦悶死と同程度であつた。

終りに臨み本実験に関し終始御指導賜つた本学高田教授並に文献の御便宜を賜つた兵庫農大吉村貞彦教授更らに試料に就き御援助賜つた黒木助教授及び本学練習船かごしま丸の各位に併せて深甚の謝意を表する。

Summary

In this paper we dealt with the post mortem changes in the apparent amount of myosin fraction and some glycolytic products in fish muscles by death conditions and following times its death.

The sample, carp (*Cyprinus carpio*), horse-mackerel (*Decapters muroadsi*) and mackerel (*Scomber tapeincephalus*) were divided into three different killing groups, the one was instant death which was killed cutting head off immediately after the catch. The second group of fish was death in agony which was death after struggling for several minutes on floor board, and the last group was died by electric shocks.

The results were summarized in Fig. 1~5 and Table 1, the phenomena were observed as follows.

- 1) The longer becomes the lapse of time after its death the less becomes the amount of myosin-fraction, and after being kept for 20~25 hours at 25°C its trace fades away entirely.
- 2) Temporal increasing of myosin fraction, disappearing of ATP, and death rigor-finish take place almost simultaneously; in case of the fish meat kept at 25°C occurring about 8 hours after its death.
- 3) The changing mode of the amount of glycolytic products in muscle, except that of glycogen, keeps nearly same state throughout the above mentioned dying conditions, but the breakdown-rate of ATP and Phosphagen is more early at the muscle of the instant death-fish than at that of the gradual death-fish, while no difference in the changing tendency is observed between instant death-fish and electric shock one.

文 献

- (1) 山田, 新聞: 日水誌, 14, 23-26, (1948)
- (2) 山田, 新聞, 鈴木: 日水誌, 14, 41-43 (1948)
- (3) 山田: 日水誌, 14, 44-47 (1948)
- (4) 天野, 尾藤, 河端: 日水誌, 19, 487-498 (1953)
- (5) 藤巻, 古城: 日水誌, 19, 499-504 (1953)
- (6) V. A. ENGELHARDT: Advances in Enzymol., 6, 147-192 (1947)
- (7) A. SZENT-GYÖRGYI: "Chemical physiology of Contraction in Body and Heart Muscle", Acad. Press New York, (1951)
- (8) G. HAMOIR: Biochem. J., 48, 146 (1951)
- (9) K. BAILEY: Biochem. J., 36, 121-139 (1942)
- (10) W. W. UMBREIT, R. H. BURRIS and J. F. S $\frac{T}{S.C.}$ AUFFER: "Manometric Techniques and Tissue Metabolism", Buygess Publishing co., Minn., 185 (1951)
- (11) 齊藤: 光電比色計による臨床化学的検査, 3版, 南山堂, 94-95 (1952)
- (12) 全上 全上 164-166
- (13) 坂口, 朝井: 酵素, 2版, 朝倉, 101 (1952)