

魚類の肉質変化に関する生化学的研究-II.

各種動物筋肉の Myosin 系蛋白質とその ATPase 作用について

斎藤 要・日高 富男

Studies on the Biochemical Change in the Fish Muscle-II.

On the ATPase Activity and Amount of Myosin
Fractions Isolated from Several Animals

Kaname SAITŌ and Tomio HIDAHA

緒 言

一般に動物の種類により筋肉構成蛋白質の組成並びにその理化学的性質が異なる事は知られているが、最近筋肉の主要成分である actomyosin を構成する二種類の蛋白質中、myosin は種に特有のものであり、actin は器官に特有のものであると報告されている¹⁾。従つて筋肉 myosin 系蛋白質は系統的に異なる哺乳動物と魚類間は無論、魚類相互間にも種属的な相違のある事が一応考えられる。更に又この myosin 系蛋白質は筋肉の主要成分をなしている事より、動物の種類による筋肉の感能的相違或はその理化学的性質の特性には筋肉中の該蛋白質の諸性質が支配的一要素をなしている事も予測されるのである。

斯様な見解に基づき著者等は獣肉と魚肉との相違並に魚肉の加工処理の過程における変質及び変敗現象等を、主として myosin 系蛋白質の質並びに量的な変化と関連づけて一連の研究を進めているが、本報では家兎、ニワトリ及び数種の魚類を材料として、所定の条件下における筋肉 myosin 系蛋白質の抽出量と ATPase としての活性度及びその安定性を、試料の系統的或は種属的な位置と関係づけて比較検討した結果若干の知見を得たので報告する。

実 験 の 部

1. 実験材料 魚類では淡水魚のコイ *Cyprinus carpio* 及び海産魚のマサバ *Scomber japonicus*、ゴマサバ *Scomber tapeinocephalus*、マアジ *Trachurus japonicus*、チダイ *Evynnis japonica*、キス *Sillago sihama*、ツノザメ *Squalus mitsukurii* 等を使用し、又対照として陸上動物の家兎、ニワトリをも実験に供した。供試動物はすべて実験直前に断頭死又は頸動脈切断による放血死せしめて、魚肉では血合肉を除いた精肉を、家兎では背肉、ニワトリは股肉を切出し冷所で肉挽機にかけて myosin 区の抽出に供した。

2. myosin A, B 及び純 myosin 区の調整法 myosin A 及び B 区は前報¹⁰⁾の如く BAILEY 法²⁾に準じて、短時間抽出物を myosin A 区、長時間抽出物を myosin B 区として各々抽出精製した。純 myosin 区は SZENT-GYÖRGYI 法³⁾に従い 0.3 M KCl 溶液による短時間抽出区分に ATP を過不足なく添加し actomyosin を超沈澱せしめて除き myosin だけを精製単離した。

3. ATP の調製法 頸動脈を切つて放血死に至らしめた犬の筋肉を手早く切出し、冷所にて筋基質及び脂肪等を除き精肉のみを肉挽機にかけ、この挽肉を 3~5 倍量の冷アセトンで固定し、更に温アルコール処理を施して脱水風乾して乾燥筋末とする。この筋末を水にて数回抽

出しその液を合して酢酸添加処理によりグリコーゲン、不純蛋白質等を除去し、この清澄液に酢酸第二水銀を加え ATP の水銀塩を沈澱してとり、それを H₂S を通じて分解、ATP を遊離して以下全く KERR法⁹⁾に従い ATP を Ba 塩として精製し結晶標品とした。ATPase の基質には Na₂SO₄ 処理により ATP-Na 塩として用いた。

4. ATPase 活性度測定法とその表示法 LOMMAN¹²⁾等は筋肉の 0.9% KCl 抽出物をそのまま ATPase 酵素液として使用しているが、之等の中には当然 ATPase と共に他の磷酸関与の酵素系(例えば ADPase)も混在する事が考えられる。従つて斯様な粗酵素液より真の ATPase 活性を求める事には不都合が感じられるので、著者等は前述の精製 myosin 区を酵素として BAILEY²⁾が家兎 myosin 区について行つた方法に準じて力価を測定した。(コイ筋肉 myosin 区の ATPase としての酵素学的諸性質については 第 III 報¹¹⁾参照)。その活性度は次式により 37°C で 5 分間反応させた時に myosin 区蛋白質 1 mg により遊離する P の 1 時間当りの γ 数を仮想ガスの μ l 数で示す Q_p なる単位で表わした*。

この場合の無機磷の測定は FISKE & SUBBAROW 法⁵⁾により、又 myosin 態窒素の定量には Biuret 法により定量した。

実験結果及び考察

I. 各供試動物筋肉よりの myosin 区抽出量と ATPase 活性

一般に生筋中の所謂 myosin には純 myosin と、これに actin が結合した actomyosin との 2 種があつて、この myosin と actin との結合又は解離に伴う ATP の酵素的分解、合成作用によつて動物は生活エネルギーの一部を保持しているものと考えられている。ところが動物の生活時には之等の反応系は生理的均衡を保っているが、死後には反応が不可逆に進行してその均衡が破れる事は筋肉 ATP の死後変化曲線(前報参照)の様式からも推測されることであり、それに伴い死後の肉質変化とその間における myosin と actomyosin の量並びに質的な変化も当然考えられる。従来筋肉中から自然状態の myosin 区を抽出するには中性塩溶液を用いて溶解分離する種々の方法が試みられているが^{2),3),6),7)}、その定量値は抽出法或は精製程度によつてかなり異なり、その絶対量を求める事は困難である。更に myosin 系蛋白質は極めて不安定で之を筋肉細胞から抽出分離する際も既に或種の変化をうける事が報告⁸⁾されている。従つて筋肉中における両者の量的関係を知る為には尙検討すべき問題が多くある。又 ATPase として作用する myosin に対する actin の影響に関する研究は少く、myosin-ATPase と actomyosin-ATPase の関係は明確でない。斯様な見地より著者等は基礎実験として家兎、マサバ及びコイの筋肉を試料とし myosin と actomyosin を夫々主成分とすると考えられている myosin A 及び B 区並びに ATP 添加処理によつて得られる純 myosin 区の三者を各々抽出精製して、各区の量的関係並びに ATPase 活性度を求めて比較検討した。その結果は Table 1 の如くである。即ち各 myosin 区分の KCl 抽出原液中に含まれる蛋白質量には試料の種類による差は少いが、本実験の結果では家兎肉よりも魚肉の方がやゝ多く、更にコイよりマサバが多い結果となつている。一般に組織が感能的に柔軟であると考えられる動物の筋肉程 KCl 可溶性蛋白質の量が多くなるようで、この傾向は更にワトリ、アジ、チダイ、キス等の間でも認め

$$* Q_p = \frac{\mu\text{g} \cdot P \times 22.4/31}{\text{mg} \cdot N \times 6} \times \frac{60}{5}$$

Table 1. ATPase activity and amount of myosin fractions isolated from several animals

Sample	Fractions	Protein-N mg./100 g.		ATPase activity of puri. fract. (Qp Value)
		KCl extract	Purified fraction	
Rabbit	myosin A	925	453	1250
	myosin B	1400	525	1710
	myosin (pure)	825	113	1540
Carp	myosin A	1025	463	630
	myosin B	1350	475	760
	myosin (pure)	450	—	—
Mackerel	myosin A	1450	750	430
	myosin B	1600	880	575
	myosin (pure)	587	—	—

られた。又各試料とも myosin A 及び B 区の抽出量には大差なく、之に対し純 myosin 区分の原液は家兎では myosin A 及び B 区の約 1/2, コイ, マサバは約 1/3 の抽出量であつた。更にこの抽出原液を再沈澱処理によつて精製した myosin A 及び B 区の収量は夫々の原液の 1/3 ~ 1/2 量であつて、その収量の材料的な相互関係は原液にみられた関係と略々同様であつた。

次に精製純 myosin 区量は家兎においては myosin A 区の約 1/3 量が得られたのに対し、魚肉では各魚種ともに殆んど検出出来なかつた。従つて魚肉の場合には、myosin を主成分とすると云われる myosin A 区も殆んど actomyosin からなるものと推測される。尙この場合魚類の死後既に筋肉中で myosin が actin と結合するものか、或は抽出操作中に変化するものであるかは検討中である。何れにせよ死直後の家兎肉と魚肉との間には純 myosin 含量において特異的な差異が見出された。Rott⁹⁾ はコイ肉中には I-myosin が認められないと報告しているが、この I-myosin と本実験の純 myosin との同定は不明である。

又各 myosin 区 ATPase 作用の Qp 値は myosin B 区が myosin A 区よりもやや大であり、myosin A 区と純 myosin 区とでは類似した活性を示したが、この程度の精製標品では明確な相違は認められなかつた。即ち本実験では myosin の ATPase 作用に関し actin 結合の有無は活性度に対し影響しないと云う説³⁾ を肯定する結果が得られた。

II. 死後経過時間による家兎筋肉 myosin 区抽出量の変化

魚肉の鮮度低下によつて見掛上の myosin A 及び B 区の定量値が変化することは前報¹⁰⁾ で述べたが、筋肉中の myosin と actin との結合割合或は ATP 量の変化によつて筋肉の収縮、弛緩が起ると云う従来の見解より考え、死後の筋肉では ATP の分解に伴い死後硬直が進行し、同時に myosin と actin とが不可逆的に結合して actomyosin になる事も考えられる。前述の如く本実験では家兎肉にのみ純 myosin 区が検出されたのであるが、この純 myosin 区も死後時間の経過に伴い量的に変化する事が予測されるので、次の実験を追試した。即ち放血直殺後の家兎肉を 25°C に放置し所定時間毎に myosin A, B 及び純 myosin 区量を求めた。結果は Fig. 1 の如くである。

この結果によれば家兎肉では myosin A 及び B 区は放置後 8 時間迄は抽出量に殆んど変化はないのに対し、サバ肉について同一条件で行つた実験¹⁰⁾ では放置後 8 時間で myosin A 及び

B 区 の抽出量は共に死直後の約 1/3 量に減少した。

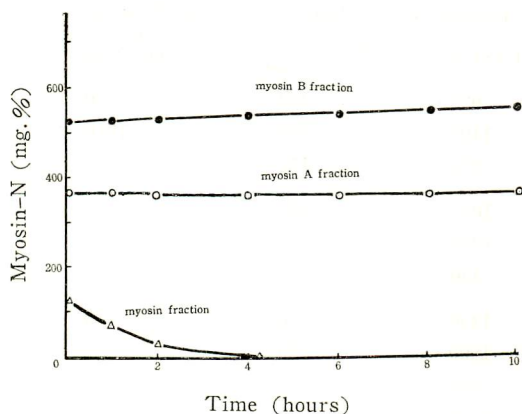


Fig. 1. Changes in amount of myosin fractions of rabbit muscle during storage at 25°C.

筋肉の収縮性蛋白質である myosin 系蛋白質に関しては ENGELHARDT³⁾の myosin-ATPase 作用の発見以来、これが生活エネルギーの支配的一要因をなす事より今日迄幾多の酵素化学的な研究が行われている。しかし一方生体にとって最も本質的で且つ重要な問題である筋肉の運動性とその主成分をなす myosin 系蛋白質の ATPase 作用との相互関係についての研究は少いようである。そこで家兎、ニワトリ及び各種魚類を材料とし動物の系統学上の位置或は種属の相違により myosin 区蛋白質の ATPase 活性度が異なるか否か、又それが材料の運動性と如何なる関係があるかを知るため各種筋肉から myosin A 区を抽出精製してその単位量当りの ATPase 力価を比較した結果は Table 2 の如くである。

即ち本実験結果によれば運動の活潑な洄游魚に対し、低棲魚と淡水魚の方が Qp 値が大なる傾向となつているが、この程度の差が有意のものであるか否かは未だ追試の要がある。更に魚の捕獲時における苦悶状態は同じ漁法であつても運動活潑な洄游魚と不活潑な底棲魚とは異なる事等を考えると魚類の種属間に見られる Qp 値の相違が本質的なものか或は致死前後の諸因子による後発的な差異であるかは明確でなく、本実験では運動性と筋肉 ATPase 作用との関係については一定の見解は得られなかつた。

次に魚肉 myosin A 区 の Qp 値は同一処理によつて得られた家兎及びニワトリのそれに比し低く、特に家兎は魚類の 2 倍の Qp 値を示し、両者間に可成りの差が見られた。SZENT-GYÖRGYI³⁾は動物筋肉中の actin 及び myosin 自体には種類による本質的な差はないが、筋肉中に含有する actin と myosin の量的関係及び両者に対し何等かの調節作用にあづかる第三の物質の相異によつて筋肉の諸性質が異ると述べている。しかし一方 KEZTYÜSI¹⁾等によれば前述の如く種特異性を認めているのである。何れにしても動物の生活時に筋肉 myosin の Qp 値に斯様な系統的な差異があるか否かは断定し難いが、死直後の筋肉では多くの実験例において常にこの程度の差異が認められた。

次に純 myosin 区は死後経過時間に従い漸次減少して 4 時間後頃に消失する結果を得た。即ち死後或時間を経過した場合には家兎肉においても純 myosin 区は検出されないのである。又純 myosin の減少に対し myosin A 及び B 区量には余り変化がなかつた。

以上の結果は魚肉が獣肉に比して死後硬直が早く起り、しかも変質し易い事と何等かの関係が有るとも考えられるが、その詳細については目下検討中である。

III. 各供試動物筋肉から抽出した myosin A 区 の Qp 値

Table 2. Qp value of myosin A fractions isolated from muscle of several animals

Sample		Qp value
Mackerel	<i>Sbomber japonicus</i>	420
Mackerel	<i>Scomber tapeinocephalus</i>	355
Horse-mackerel	<i>Trachurus japonicus</i>	623
Sea-bream	<i>Evynnis japonica</i>	645
Flathead	<i>Platycephalus indicus</i>	400
Sillago	<i>Sillago sihama</i>	470
Shark	<i>Squalus mitsukurii</i>	301
Carp	<i>Cyprinus carpio</i>	612
Hen		717
Rabbit		1120

IV. 魚肉及び家兎肉 myosin A 区 の保存性

死直後の家兎肉と魚肉では前述の如く純 myosin 区の有無, myosin A 区の Qp 値及び死後経過時間による抽出量の諸点に相違が認められる事は両者の myosin 区蛋白質の外圍の諸条件に対する安定度が異なる事に起因する可能性も考えられる. 次にチダイ, マサバ及び家兎の myosin A 区を抽出精製し, pH 7.5 の条件で所定温度に所定時間放置して, その ATPase 力価を測定した結果は Fig. 2, 3 の如くである.

この結果によれば家兎肉 myosin A 区に比し魚肉のそれは本条件下における ATPase 活性の減少が顕著である. この場合 ATPase 活性が native な状態にある myosin 区の本質的な機能であるとすれば, この機能の消失は該蛋白質が変性を起した事を意味し, 魚肉 myosin 区は家兎肉 myosin 区に比し不安定で変性し易い事を示すものと考えられる.

以上述べた結果より魚肉が獣肉に対し変性又は腐敗し易いと云う事はその主成分をなす myosin 区蛋白質の諸性質とも密接な関係のある事が予測されるのであるが, これらについては追つて検討する予定である.

要 約

系統的な位置を異にする陸上動物(家兎, ニワトリ)及び数種の魚類の筋肉を用い所定の条件下で各種 myosin 区蛋白質の抽出量と組成並びに ATPase 活性度(Qp 値)とその安定性を比較検討して次の結果を得た.

1. 家兎, コイ及びサバ等の筋肉からの myosin A 及び B 区の収量は試料による大差は見られなかつたが一般に組織が柔軟であると考えられる材料程抽出量が多くなる傾向が認められた.

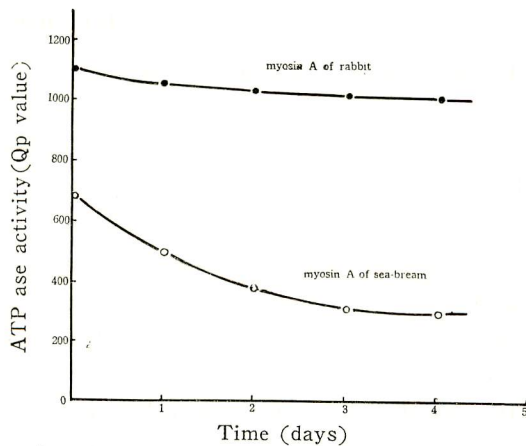


Fig. 2. Changes in Qp value of myosin A fractions during storage at 5°C.

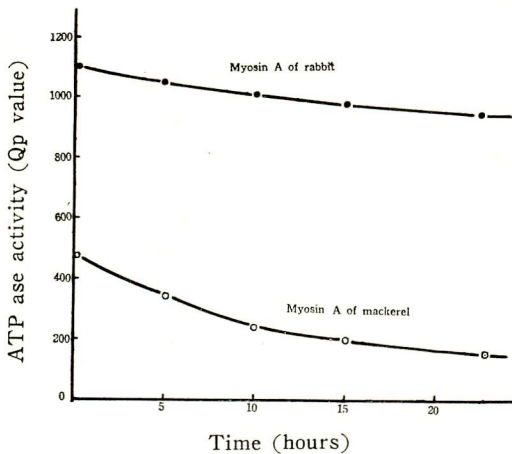


Fig. 3. Changes in Qp value of myosin A fractions during storage at 25°C.

ものでも抽出は出来なかつたが、家兎肉では 25°C の放置条件で死後 4 時間後迄は検出された。即ち獣肉の myosin A 区は純 myosin を主成分とすると云われるが、魚肉の myosin A 区は myosin B 区と同様に actomyosin が主成分であると考えられる。更にこの現象は死後魚肉では家兎肉に比し actin と myosin との結合が早く起る事を意味するのではないかと推論した。

終りに臨み本研究を行うに当り御指導を賜つた本学高田幸二教授に深甚の謝意を表する。

Résumé

In this paper, the authors; using the various myosin fractions isolated from the skeletal muscles of terrestrial animals (rabbit; hen) and several species of fish; made some studies on the changes in the amount of myosin-N, its composition, ATPase activity (Qp value) and stability.

1) Difference in the kind of samples gives no large effects upon the yield of myosin A and B fractions extracted from the muscles.

2) In cases of fish muscles cut immediately after its death the myosin fraction was hardly perceptible, but in the rabbit muscle left under the temperature of 25°C, it was possible to detect it within the lapse of 4 hours.

In case of fish meat, myosin A fraction contains as much amount of actomyosin as myosin B fraction.

3) The ATPase activity (Qp value) of myosin A fraction isolated from muscles varies in accordance with the zoological status the animals; and it increases successi-

2. 家兎、ニワトリ及び数種の魚類筋肉の myosin A 区-ATPase 活性度 (Qp 値) は、動物の系統的な位置によつてかなりの差がみられ、魚類、ニワトリ、家兎の順に Qp 値は大きく、又供試魚類中では洄游魚より底棲魚と淡水魚の方が Qp 値は高い傾向がみられた。

3. 家兎、タイ及びマサバの筋肉 myosin A 区の保存性を ATPase 活性の消長より比較した処、魚類の myosin A 区は家兎のそれに比し不安定で容易に活性を消失する結果を得た。

4. 純 myosin 区は魚肉では死直後

vely in fishes, hens and rabbit, respectively.

4) The myosin A fraction of rabbit muscles is observed to be more stabilized that of fish muscle.

文 献

- 1) L. KEZTYÜS, S. NIKODEMUSZ, T. SZILÁRD: *Nature*, **163**, 136 (1945).
- 2) K. BAILEY: *Biochem. J.*, **36**, 121 (1942).
- 3) A. SZENT-FYÖRGYI: "Chemistry of Muscular Contraction", Acad. Press, New York, (1951) pp. 146.
- 4) S. E. KERR: *J. Biol. Chem.*, **139**, 121 (1941).
- 5) C. W. FISKE, Y. SUBBAROW: *J. Biol. Chem.*, **66**, 375 (1925).
- 6) W. T. DYER etc.: *J. Fish. Res. Boa. Cana.*, **7**, 587 (1954).
- 7) W. F. H. M. MOMMAERTS: *J. Biol. Chem.*, **188**, 559 (1951).
- 8) F. HAUROWITZ: "Chemistry and Biology of Proteins" Acad. Press, New York (1950), pp. 154.
- 9) E. ROTH: *Bioch. Z.*, **318**, 74 (1947).
- 10) 齊藤 要, 日高富男: 本誌, **4**, 90 (1955).
- 11) 齊藤 要, 日高富男: 日水誌, **21**, 925 (1955).
- 12) K. LOHMANN: *Biochem. Z.*, **282**, 109 (1935).