

## 年齢差による牛骨格筋の死後変化の比較検討

山本克博\*・鮫島邦彦\*

### A Comparative Study of Age-associated Post-mortem Changes in Bovine Skeletal Muscle

Katsuhiko YAMAMOTO\* and Kunihiko SAMEJIMA\*

(May, 1979)

#### 序 論

動物の種類、年齢あるいは肉の部位等の違いにより肉の硬さに差違の見られることは周知の事実である。肉の硬さの要因は結合組織に由来するもの (background toughness) と筋原線維に由来するもの (myofibrillar toughness) に大別される<sup>5)</sup>。結合組織は主にコラーゲンから成るが、子牛の筋肉組織中の結合組織量は成牛のそれと比べて多いにもかかわらず肉は柔らかいということから、硬さの原因はコラーゲン量の多少ではなく、年齢にともなうコラーゲン分子の化学的性質の変化に由来するものと考えられている<sup>10)</sup>。さらに最近、筋肉の構造タンパク質としてコネクチンの存在が明らかにされた<sup>11)</sup>。典型的な弾性タンパク質としての性質にもかかわらず、死後の筋肉内でプロテアーゼ分解を受けやすいこのタンパク質の肉の硬さへの寄与も今後考慮されなければならない実験事実が示されている<sup>1),3)</sup>。

死後の筋肉は、硬直、解硬という硬さの変化を示し、このような硬さの変化の大部分は筋原線維構成タンパク質の変化に由来するものであるが、動物の年齢差による筋原線維構成タンパク質の性質の差異についての報告例は殆んど無い。このようなことから本実験は年齢の異なる二種類の牛骨格筋における死後の筋原線維性タンパク質の性質の変化を比較検討することを目的として行なわれた。

#### 実験材料および方法

##### 実験材料

牛 (Aberdeen Angus 種) を屠殺後、直ちに剥皮、内臓除去を行ない、第9~13胸椎間

\* 酪農学科、肉製品製造学研究室

Laboratory of Meat Research, Department of Dairy Science, The College of Dairying, Ebetsu, Hokkaido, Japan.

の胸最長筋 (*M. longissimus thoracis*) および半膜様筋 (*M. semimembranosus*) を切り取り、ポリエチレン袋に入れ水中に保存した。供試牛の年齢は2歳および9歳で、片枝肉重量は各々121 kg, 170 kgであった。

#### 肉の硬さの測定

肉塊を内部温度 80°C となるまで湯煮し、水道水にて冷却した後、直径 1.27 cm の円筒状に筋肉を筋線維に平行となるようにくり抜き、Warner-Blatzler 型 shear tester により shear force を測定して肉の硬さとした。

#### 保水力の測定

筋肉組織に付着する脂肪や膜等をできるだけ除去して肉を挽き、肉重量の 2.5% の食塩を加えて十分に混和し、池田らの方法<sup>8)</sup>により保水力を測定した。

#### 筋原線維の調製

筋原線維は常法<sup>19)</sup>により調製した。

#### ミオシン A の抽出性

筋原線維 suspension (タンパク質量 30 mg) を遠心分離し、沈澱部に 10 ml の Straub 液 (0.3 M KCl, 0.09 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.06 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 6.5) を加えて 4°C で 15 分間抽出した後遠心分離した。上清部に 13 倍量の冷水を加えてイオン強度を下げ、遠心分離によりミオシン A を沈澱させた。沈澱部を 0.5 M KCl に溶解させた後、ビウレット法によりタンパク質濃度を測定した。

#### 筋原線維性 ATP アーゼ活性の測定

筋原線維を 0.1 M NaCl, 20 mM イミダゾール, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM CaCl<sub>2</sub> あるいは 0.1 mM EGTA, 1 mM ATP, タンパク質濃度は Ca<sup>2+</sup> 存在下の場合は 1.0 mg/ml, EGTA 存在下の場合は 2.0 mg/ml とし、25°C で所定の時間保持した後等量の 10% TCA を加えることによって反応を停止させ、遊離した無機リン酸を Fiske-Subbarow の方法<sup>3)</sup>で測定して ATP アーゼ活性値を求めた。

#### SDS (sodium dodecylsulfate) ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS PAGE)

筋原線維性タンパク質の SDS PAGE は Weber と Osborn の方法<sup>16)</sup>に従って行なった。なお、アクリルアミド濃度 7.5% のゲルを用いた。

### 結果および考察

死後の筋肉における pH 変化を Table I に示したが、年齢や筋肉の部位による差は殆んど見られなかった。最終 pH は 5.5 前後で、PSE や DFD 等の異常肉で見られるような pH 値の異常はなく、供試した筋肉はいずれも正常なものと考えられた。

**Table I** Post-mortem changes in pH of bovine muscle

	Post-mortem Time (days)						
	0	1	3	5	7	9	14
a	6.4	5.4	5.7	5.7	5.8	5.8	5.9
b	—	5.4	5.5	5.6	5.5	5.6	5.6
c	6.3	5.6	5.6	5.5	5.7	5.7	5.7
d	—	5.7	5.6	5.5	5.7	5.8	6.0

a; 2 year old bovine 1. thoracis, b; 2 year semimembranosus, c; 9 year 1. thoracis, d; 9 year semimembranosus.

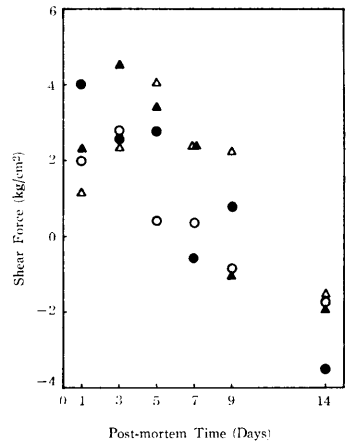
**Table II** Post-mortem changes in shear force\* of bovine muscle

	Post-mortem Time (days)						
	0	1	3	5	7	9	14
a	4.31 ± 0.73	6.27 ± 0.57	6.85 ± 0.91	4.57 ± 0.46	4.00 ± 0.57	3.77 ± 0.33	2.64 ± 0.22
b	7.58 ± 0.84	11.71 ± 1.07	10.19 ± 1.06	10.26 ± 1.42	6.88 ± 1.20	8.14 ± 0.66	4.42 ± 0.28
c	5.72 ± 0.72	7.05 ± 1.29	8.00 ± 1.04	9.54 ± 1.19	7.97 ± 0.72	7.83 ± 0.48	6.04 ± 0.30
d	9.28 ± 1.17	11.83 ± 0.96	13.66 ± 0.73	12.54 ± 1.08	11.42 ± 1.45	8.39 ± 1.12	6.80 ± 0.83

\* shear force: kg/cm<sup>2</sup>

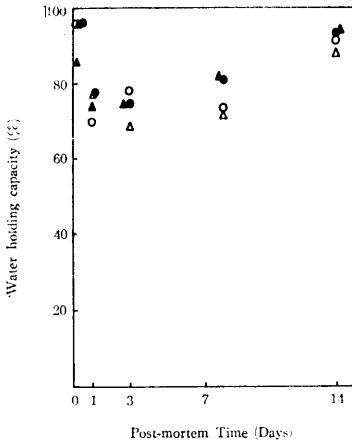
a, b, c and d are the same as those in Table I, respectively.

Table II に筋肉の硬さの変化を示したが、いずれの筋肉も死後いったん硬さを増し(死後硬直)、その後再び柔らかさを取り戻した(解硬)。筋肉の部位や年齢の違いに着目すると、胸最長筋は半膜様筋よりも柔らかく、また若齢牛の筋肉の方が老齢牛のそれよりも柔らかかった。筋肉の硬さには myofibrillar toughness と background toughness の二つの関与がある<sup>5)</sup>が、死直後の筋肉ですで見られる硬さの違いは大部分が background toughness に由来するものと考えられる。そこで Table II における shear force の変化を次のように表現して Fig. 1 に示した。 $(St - S_0) = \Delta S$ 、 $St$ : 死後  $t$  時間後の shear force、 $S_0$ :  $t=0$  の shear force、 $\Delta S$ : ある筋種についての経時的な shear force 変化量。この図から分かるように、background toughness を差し引いた shear force の死後変化は、若干の変動はあるが、筋肉の部位や年齢による硬さの差異はそれ程大きくなく、死後 3 日目

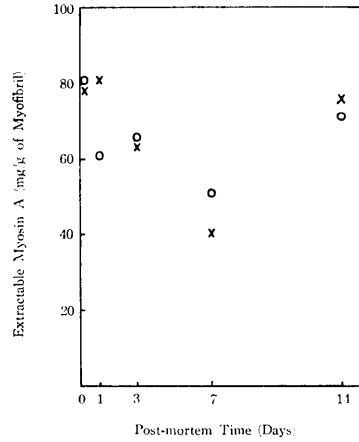


**Fig. 1.** Post-mortem changes in muscle toughness.

○; longissimus thoracis  
 △; semimembranosus  
 open symbols; 2 year old,  
 closed symbol; 9 year old.



**Fig. 2.** Post-mortem changes in water-holding capacity. Symbols are the same as those in Fig. 1.



**Fig. 3.** Myosin A extractability from myofibril (*L. thoracis*). ○; 2year old, ×; 9 year old.

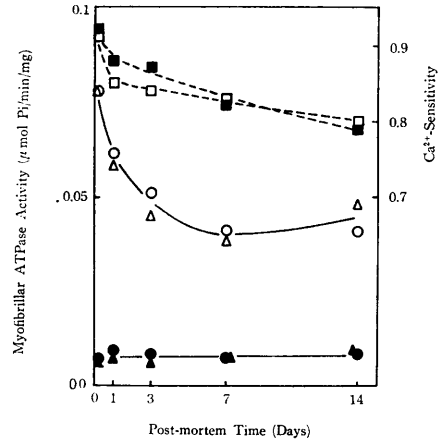
前後で最大となり、7～9日目で生筋とほぼ同じ値となり、以後柔らかくなった。冒頭で述べた弾性タンパク質コネクチンは死後一方向に分解され、肉の硬さにはネガティブに作用すると考えられる<sup>14),15)</sup>ので、Fig. 1の shear force の変化は“background toughness”に付加されて起こる死後硬直と、それに引続いて起こる解硬+コネクチン分解による tenderization の変化量をあらわすものとみなして良いであろう。

筋肉の保水力という性質は肉製品製造において重要な意味をもち、保水力が低い肉からは良い製品を得ることはできない。Fig. 2は保水力の経時変化を示したものであるが、保水力は筋肉の硬さとは逆の関係があった。すなわち、筋肉が硬直期にある場合は保水力が低く、死直後および解硬期には高い値を示したが、筋肉の種類による保水力の差異は小さかった。Fig. 3に筋原線維からのミオシンAの抽出性を示した。ミオシンAの抽出性の経時変化は筋種、年齢とは相関がなく、保水力の経時変化と同様の傾向がみられたが、その極小値は死後7日目に出現した。保水力とはミオシンAあるいはアクチンが加熱凝固する際にそのゲル構造内に水を保持する能力であり、これらのタンパク質の変性の度合が保水力の良否に影響を与える。筋原線維中に存在するミオシンは、筋肉がさらされる温度やpHの条件により変性の度合が異なり、変性したミオシンは抽出性が低下するということが安井らの報告<sup>17)</sup>で明らかにされている。このようなことから本実験での死直後から硬直期にかけての保水力ならびにミオシンAの抽出性の低下はミオシンAの変性の進行ということで解釈ができる。また解硬期における保水力ならびにミオシンAの抽出性の回復は、ミオシン-アクチン間の結合力の弱化<sup>4)</sup>、CAF<sup>2)</sup>やカテプシンなどのプロテア

アーゼの作用あるいは死後の筋肉内におけるCaイオン濃度の上昇による筋原線維構造の変化<sup>7)</sup>というような要因により、アクトミオンタイプタンパク質の抽出量が増加するためと考えられた。

死後の筋肉内での筋原線維性タンパク質の変化を知る方法の一つにATPアーゼの活性測定がある。筋原線維のMg<sup>2+</sup>-ATPアーゼ活性とEGTA-ATPアーゼ活性の測定結果をFig. 4に示した。Mg<sup>2+</sup>-ATPアーゼ活性は死後7日目まで経時的に低下したが、EGTA-ATPアーゼ活性は死後14日目まで殆んど変化は見られず、また両活性とも年齢による差はなかった。二種類の活性値から求めたCa感受性は経時的に低下した。このCa感受性の低下は筋原線維中の調節タンパク質(トロポニン)の変化を示唆するものであり、この点を確認するためSDS PAGEによって筋原線維性タンパク質の泳動パターンの変化を調べた(Fig. 5 a, b)。トロポニンはTN-T, TN-IおよびTN-Cという三つのサブユニットから成り、これらのうちTN-Tが最もプロテアーゼに対する感受性が強く、次いでTN-Iであり、TN-Cはプロテアーゼに対して抵抗性が強い。SDS PAGEの泳動パターンを見ると、経時的に34,000ダルトンのバンドの出現が認められたが、この死後経時的に出現するバンドは若干の分子量の相違はあるにせよ、各種の筋肉で報告されており<sup>8),12),13),18)</sup>、TN-Tの分解産物と考えられている<sup>1)</sup>。Mg<sup>2+</sup>-ATPアーゼ活性やEGTA-ATPアーゼ活性にはトロポニンサブユニット中のTN-Iが関係している<sup>6)</sup>。Ca感受性の変化から、SDS PAGEパターンではTN-Iのバンドに認めうるほどの変化は見られなかったにせよ、TN-Iにも変化が生じているものと思われた。SDS PAGEのパターンでは34,000ダルトンのタンパク質の出現以外には認めうるような変化は見られなかった。

以上のような実験結果から、年齢の異なる二種類の筋原線維の生化学的性質には大きな差がなく、年齢による筋肉の硬さの違いには結合組織の影響が大きいものと考えられた。



**Fig. 4.** Post-mortem changes in myofibrillar ATPase activity (*L. thoracis*)  
 ○; 2 year old, △; 9 year old  
 open symbols; Mg<sup>2+</sup>-activated ATPase activity  
 closed symbols; EGTA-activated ATPase activity  
 □; Ca<sup>2+</sup> sensitivity calculated from ATPase activity  
 Ca<sup>2+</sup> sensitivity = 
$$\left(1 - \frac{\text{EGTA-ATPase}}{\text{Mg-ATPase}}\right)$$

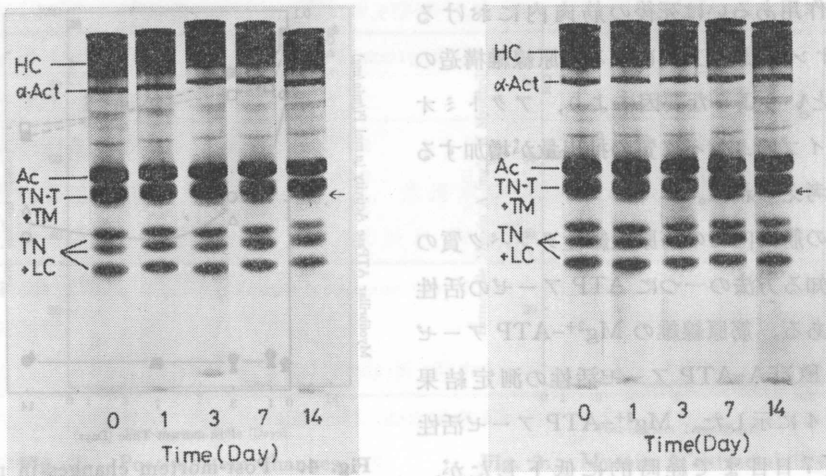


Fig. 5. SDS PAGE electrophoretogram of myofibrillar proteins (*I. thoracis*)

a; 2 year old, b; 9 year old

Fifty  $\mu$ g of protein was applied on each gel.

HC; myosin heavy chain,  $\alpha$ -Act;  $\alpha$ -actinin, Act; actin, TN; troponin, TM; tropomyosin, LC; myosin light chain, arrow; 34,000 dalton protein

### 要 約

年齢の異なる二種類の牛骨格筋の死後変化を比較検討した。死後1~5日目にかけて死後硬直が起こり、その後筋肉は徐々に柔かくなったが、硬さの絶対値は老齢牛の方が若齢牛よりも明らかに大きかった。保水力とミオシンAの抽出性の経時変化は筋肉の硬さとは逆の関係を示したが、これらの性質には年齢には差異は見られなかった。筋原線維のATPアーゼ活性の測定から、Ca感受性の低下が認められ、またSDS PAGEパターンからも調節タンパク質の分解が示唆された。これらの性質にも年齢差は認められなかった。このようなことから、年齢の相違による筋肉の硬さの違いは、筋原線維そのものの性質よりはむしろ結合組織の影響が大きいと思われた。

### 謝 辞

本研究を行なうにあたり、試料を提供して下さいました農林水産省北海道農業試験場草地第一研究室の皆様方ならびに原稿の御校閲を賜った北海道大学農学部安井勉教授に謝意を表します。

### 文 献

- 1) Dabrowska, R., B. Barylko, E. Nowak and W. Drabikowski, 1973. The origin of 30,000 dalton protein in troponin preparation. FEBS Letters 29: 239-242.

- 2) Dayton, W. R., W. J. Reville, D. E. Goll and H. Stromer, 1976. A  $\text{Ca}^{++}$ -activated protease possibly involved in myofibrillar protein turnover. *Biochemistry* **15**: 2159-2167.
- 3) Fiske, C. H. and Y. Sabbarow, 1925. The colometric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.* **66**: 375-400.
- 4) Fujimaki, M. N. Arakawa, A. Okitani and O. Takagi, 1965. The changes of "myosin B" (actomyosin) during storage of rabbit muscle. *J. Food Sci.* **30**: 937-943.
- 5) Goll, D. E., M. H. Stromer, D. G. Olson, W. R. Dayton, A. Suzuki and R. M. Robson, 1974. The role of myofibrillar proteins in meat tenderness. *Meat Industry Research Conference Chicago* 57-97.
- 6) Greaser, M. L. and J. Gergely, 1971. Reconstitution of troponin activity from three protein components. *J. Biol. Chem.* **246**: 4226-4233.
- 7) Hattori, A. and K. Takahashi, 1979. Studies on the post-mortem fragmentation of myofibrils. *J. Biochem.* **85**: 47-56.
- 8) Hay, J. D., R. W. Currie and F. H. Wolfe, 1973. Polyacrylamide disc gel electrophoresis of fresh and aged chicken muscle proteins in sodium dodecylsulfate. *J. Food Sci.* **38**: 987-990.
- 9) 池田敏雄・斎藤不二男・安藤四郎 1968. 畜肉の保水力に関する研究. 畜産試験場研究報告, 第18号: 15-19.
- 10) Marsh, B. B., 1975. Tenderness, in "Meat" (D. J. A. Cole and K. A. Lawrie, ed) 339-375, Avi Publishing.
- 11) Maruyama, K., S. Matsubara, R. Natori, Y. Nonomura, S. Kimura, K. Ohashi, F. Murakami, S. Handa and G. Eguchi, 1977. Connectin, an elastic protein of muscle. *J. Biochem.*, **82**: 317-337.
- 12) Olson, D. G., F. C. Parrish Jr., W. R. Dayton and D. E. Goll, 1977. Effect of postmortem change and calcium activated factor on the myofibrillar proteins of bovine skeletal muscle. *J. Food Sci.*, **42**: 117-124.
- 13) Penny, I. F., 1976. The effect of conditioning on the myofibrillar proteins of pork muscle. *J. Sci. Fd. Agr.*, **27**: 1147-1155.
- 14) Takahashi, K. and H. Saito, 1979. Post-mortem changes in skeletal muscle connectin. *J. Biochem.*, **85**: 1539-1542.
- 15) Takahashi, K. 投稿中.
- 16) Weber, K. and M. Osborn, 1969. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.*, **244**: 4406-4412.
- 17) Yasui, T., T. Gotoh and J. Morita, 1973. Influence of pH and temperature on properties of myosin A in glycerol treated fiber bundles. *Agr. Food Chem.*, **21**: 241-245.
- 18) Yamamoto, K., K. Samejima and T. Yasui, 1977. A comparative study of the changes in hen pectoral muscle during storage at 4°C and -20°C. *J. Food Sci.*, **42**: 1642-1645.
- 19) Yamamoto, K., K. Samejima and T. Yasui, 1979. Changes produced in muscle proteins during incubation of muscle homogenates. *J. Food Sci.*, **44**: 51-55.

### Summary

Age-associated post-mortem changes in functional as well as biochemical properties of bovine skeletal muscles were studied. Two and 9 year old bovine muscle (*l. thoracis* and *semimembranosus*) were used as materials. All muscles stiffened

from 1 to 5th day post-mortem, and then they became more tender. Absolute toughness of old bovine muscle was obviously higher than that of young one.

The tendency of the post-mortem changes in water-holding capacity and extractability of myosin A from myofibrils were in contrast to those of toughness. Ca-sensitivity of myofibrils, calculated from myofibrillar ATPase activity, decreased with the increase in post-mortem time. 34,000 dalton protein, which is possibly a degradation product of regulatory protein, appeared on SDS PAGE electrophoretograms. However, these biochemical properties of all of muscles were not very different. From these results, it is suggested that the difference in age-associated muscle toughness originates from the properties of connective tissue rather than those of myofibrillar components.