

凍結貯蔵中における家兎骨格筋原線維の変化

鮫島邦彦・田原繁美・山本克博

(肉製品製造学研究室)

Changes Occurring in Rabbit Myofibrils during Frozen Storage

Kunihiko SAMEJIMA, Shigemi TAHARA
and Katsuhiro YAMAMOTO

(May 1980)

緒 論

各種動物の肉を食肉として利用する際に最近の流通機構の複雑さや、生産地と消費地の遠隔化というような理由によって、衛生的にもまた肉の品質を良好に保つという目的のために、動物を屠殺した後に比較的長期間氷結点以下の温度で枝肉あるいは精肉を保存するようになってきた。動物が屠殺されると血液循環をはじめとするいろいろな生体循環系が停止し、引き続いて体温低下や筋肉内解糖作用の開始が速やかに起こり、いわゆる筋肉の硬直、解硬、熟成というような死後変化現象が観察されるようになる。一般にこのような死後変化現象は低温条件下ではその速度を著しく遅くする事が出来ると考えられている。

肉を氷結点以下に保ってこれ等の変化を実際に観察してみると保存期間が長くなるにつれて、筋肉構造タンパク質の崩壊^{(11),(17),(18)}や筋原線維の小片化⁽¹⁸⁾やpHの変化⁽¹⁶⁾が起きている事が報告されている。しかしこれ等の変化は凍結中に起きるのか、凍結後の解凍と言う作業によって引き起こされるものかまだよくわかっていない。したがって筋肉の貯蔵中における変化を凍結条件下で詳細に検討する必要がある。

この実験は家兎の骨格筋を屠殺後直ちに -20°C で凍結し保存したものと、 4°C で7日間熟成した後に -20°C で180日間凍結保存し、解凍後筋原線維を調製しATPase活性、加熱ゲル強度、電気泳動法等により凍結による影響を検討しようと試みたものである。

実 験 方 法

試料の調製

家兎骨格筋(胸最長筋)を屠殺後直ちにポリエチレン袋に入れて -20°C で凍結させたものと、肉が細菌の影響を受けないように 1 mM NaN_3 を塗付して同様に乾燥しないようにポリエチレン袋に包み 4°C で7日間保持した後に -20°C で凍結したものを用意し、それぞれからPerry and Corsi⁹⁾の方法に準じて前報¹⁸⁾の通りに筋原線維を調製した。

ATPase 活性の測定

筋原線維のATPase活性は以前に報告した¹¹⁾方法を用い、それぞれ以下に示す条件下で測定した。

EDTA-ATPase 活性: タンパク濃度 0.5 mg/ml , 10 mM EDTA , 0.5 M KCl , $20\text{ mM Tris-Maleate (pH 7.0)}$ 。

Mg-ATPase 活性: タンパク濃度 0.5 mg/ml , 1 mM MgCl_2 , 0.05 M KCl , $20\text{ mM Tris-Maleate (pH 7.0)}$ 。

Mg-EGTA-ATPase 活性: 0.5 mg/ml , 1 mM MgCl_2 , 1 mM EGTA , 0.05 M KCl , $20\text{ mM Tris-Maleate (pH 7.0)}$ 。

Ca-ATPase 活性: タンパク濃度 0.5 mg/ml , 1 mM CaCl_2 , 0.05 M KCl , $20\text{ mM Tris-Maleate (pH 7.0)}$ 。

遊離リン酸の定量はFiske-Subbarow⁵⁾の方法で測定した。

加熱ゲル強度の測定

筋原線維の最終タンパク濃度 10 mg/ml になるように 0.6 M KCl で約1時間溶解し, $0.02\text{ M phosphate (pH 6.0)}$ になるように調整し, 65°C 20分間加熱し出来るゲル強度を帯型粘度計²⁰⁾で測定した。

SDS (Sodium dodecyl sulfate) ポリアクリルアミドゲル電気泳動

SDSポリアクリルアミド電気泳動法は基本的にWeber-Osborneの方法¹⁵⁾に従って行った。

結 果

Fig. 1は屠殺後直ちに -20°C で凍結した家兎骨格筋を同温度で7, 30, 90, 180日間、それぞれ保存した後、筋原線維を調製してそれらのMg-, Ca-, EDTA-, Mg EGTA-ATPase活性測定の結果を示している。いずれのATPase活性も凍結保存7日目で最大の活性を示し、その後保存日数が長くなるにつれて値は次第に減少した。

屠殺後 4°C で7日間保存した後に -20°C で凍結し、同温度で7, 30, 90, 180日間保存し

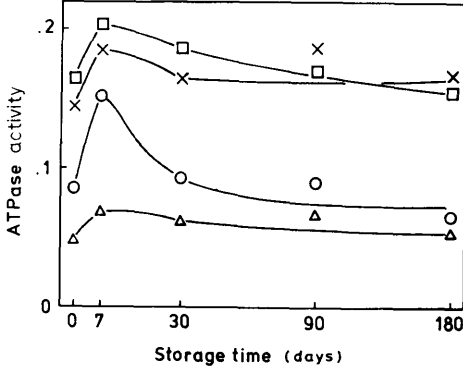


Fig. 1. Changes in ATPase activity of myofibril prepared from rabbit skeletal muscle stored at -20°C .

□: Mg-ATPase. ×: Ca-ATPase.
○: EDTA-ATPase.
△: Mg, EGTA-ATPase.

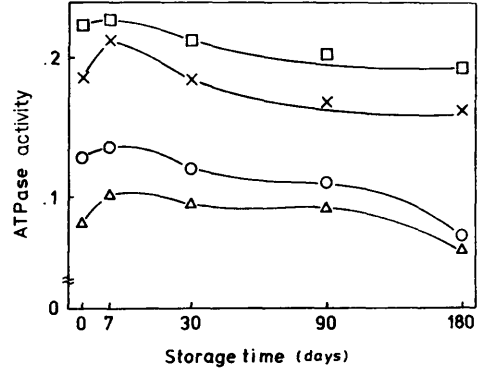


Fig. 2. Changes in ATPase activity of myofibril prepared from rabbit skeletal muscle stored at -20°C after aging for 7 days at 4°C .

Symbols are the same as in Fig. 1.

た後に筋原線維を調製してその ATPase 活性を測定した結果を Fig. 2 に表わしてある。この場合も Fig. 1 の場合の傾向とよく似た結果を示している。すなわち、すでに 4°C で 7 日間熟成されているのにも拘らず、凍結 7 日目に最大の活性を示し、以後徐々に凍結日数の長くなるにつれて活性値の減少傾向が認められた。しかし Fig. 1 の場合程凍結 7 日目の活性値の増大は明瞭ではない。また 4°C 7 日間保存することによっていずれの活性値も多少増大していることが観察された。

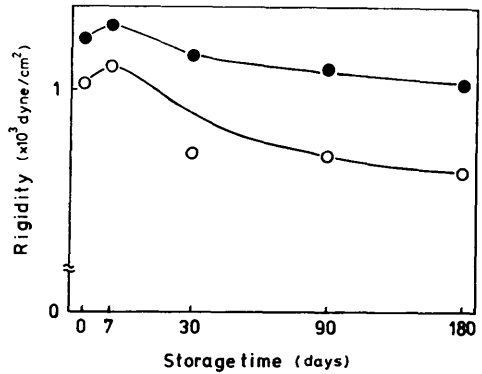


Fig. 3. Changes in rigidity of heat-induced gel of myofibril prepared from rabbit skeletal muscle stored at -20°C .

○: Samples prepared from muscle stored at -20°C .
●: Samples prepared from muscle stored at -20°C after aging for 7 days at 4°C .

Fig. 3 は筋原線維を 0.6 M KCl に溶解した後に加熱し、形成されたゲルのゲル強度を測定した結果である。これを見ると屠殺後直ちに凍結した肉から調製したもので、また、凍結前に 7 日間熟成したもので凍結保存による加熱ゲル強度の変化はよく似ている。またその変化は ATPase 活性の変化 (Fig. 1 と 2) と平行しているように観察された。すなわち、凍結保存 7 日目でゲル強度は最大に達し、その後保存時間が長くなるにつれてその値は減少した。しかし屠殺後直ちに凍結したものと 4°C で 7 日間熟成した後凍結したものとで、加熱ゲル強度の値を比較すると後者

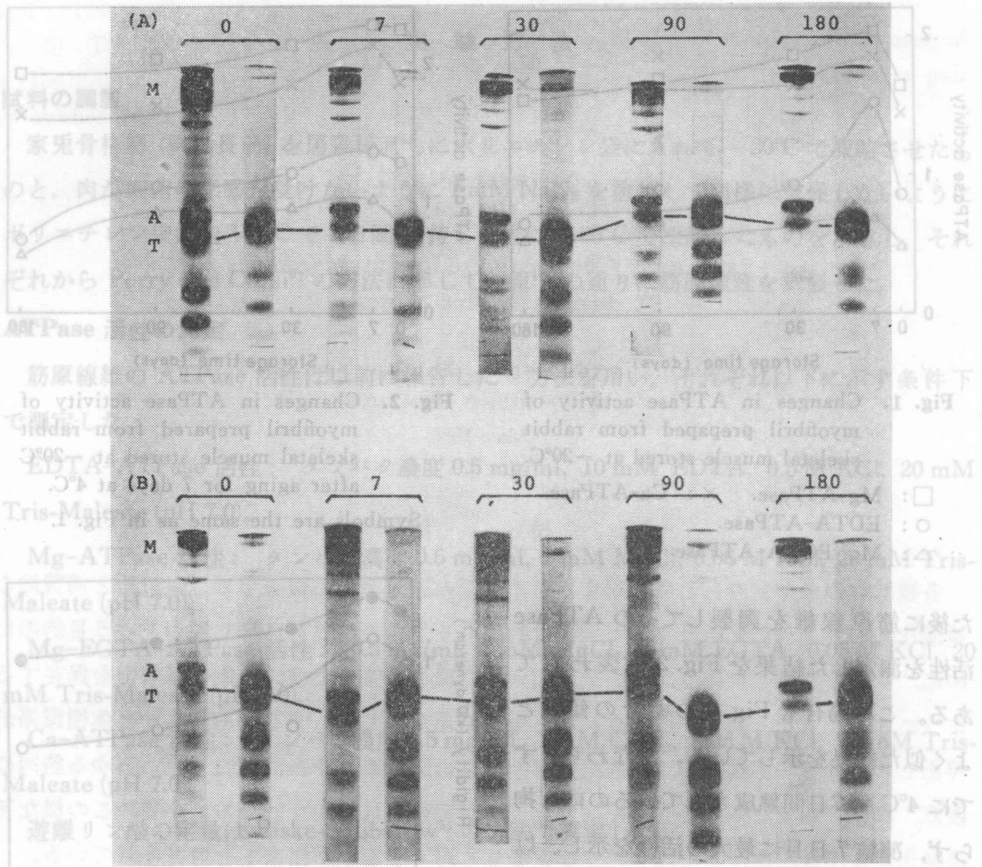


Fig. 4. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis patterns of supernatants (right) and precipitates (left) of myofibrils centrifuged after thermal treatment. (A): -20°C storage, (B): -20°C storage after aging for 7 days at 4°C . M: Myosin, A: Actin, T: Tropomyosin.

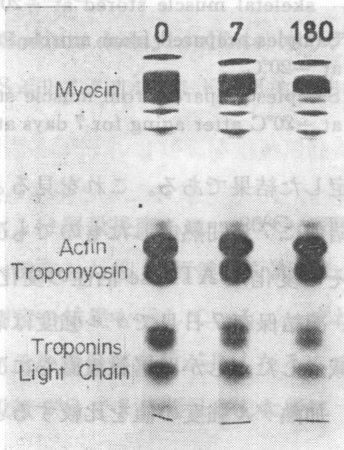


Fig. 5. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis patterns of proteins extracted with Weber-Edsall solution from myofibrils of aged muscle.

の方が高い加熱ゲル強度を示した。

次に塩によって溶解した筋原線維を加熱した時にできる加熱ゲルがどんなタンパク質成分によって形成されるのか調べるために、加熱ゲルを 40,000 rpm (100,000×g), 1 時間遠心し沈澱と上澄にわけ、それぞれ SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけた。その結果を Fig. 4 に示した。Fig. 4 (A) は屠殺後直ちに -20°C で凍結貯蔵した場合の加熱ゲルの沈澱と上澄のタンパク質成分を表わしており、Fig. 4 (B) はあらかじめ 4°C 7 日間熟成した後に凍結保存した場合の沈澱と上澄のタンパク質成分を表わしている。凍結日数が長くなるにつれて myosin の heavy chain の崩壊が認められる。沈澱側には myosin heavy chain, c-protein, α -actinin, actin, tropomyosin とそれ以下の低分子量のタンパク質成分が移行している。しかし上澄側には驚いたことに tropomyosin が主成分として、また tropomyosin より低分子量のいくつかのタンパク質成分 (おそらくは troponin のサブユニットと考えられる) が残っているのが観察された。極くわずかではあるが myosin heavy chain よりも大きな分子量をもったタンパク成分が上澄側に残っていることが観察されこの物質が何であるかという興味を持たれる。

凍結保存日数が 0 日から 7 日目にかけて筋原線維を 0.6 M KCl で溶解し加熱するとその加熱ゲル強度が増大し、保存日数が長くなるにつれてゲル強度が減少するという実験結果 (Fig. 3) を理解するために、凍結保存日数 0, 7, 180 日の肉から筋原線維を調製しそれらを Weber-Edsall 溶液で処理しタンパク質を抽出し、そのタンパク質成分を SDS-ポリアクリルアミド電気泳動で検討した結果が Fig. 5 である。

この結果は保存日数が長くなるにつれて myosin 量が少なくなっていることを示している。また 0 時間のものでも actin と tropomyosin バンドの中間に troponin-T 成分に相当するバンドが見られるにも拘らず、7 日、180 日凍結のものでは見られなくなっている。これ等のゲルをデンストメーターで観察して各タンパク質成分を重量で求め、割合を計算すると Table 1 のようになった。

抽出される成分の内 myosin 量は 0 日で全体量の 28.0%, 7 日凍結保存で 28.7%, 180 日で 27.2%

Table 1. Weight ratios of myofibrillar protein extracted with Weber-Edsall solution

	Control (%)	7 days (%)	180 days (%)
Myosin heavy chain	28.0	28.7	27.2
C-protein	4.5	4.7	6.6
α -actinin	4.9	6.3	7.0
Actin	19.3	20.3	21.3
Tropomyosin	20.3	18.5	19.0
Troponin-T	1.6	0.4	0.8
Troponin-I	6.3	5.4	6.2
Troponin-C	7.7	7.9	6.3
Myosin light chain	7.5	8.1	5.6
Myosin/Actin	1.45	1.41	1.27

で actin はそれぞれ 19.3, 20.3, 21.3%, tropomyosin 量は 20.3, 18.5, 19.0% となった。すなわち myosin 量は 7 日間凍結で最も多く、actin 量は 180 日保存のもので最大になり tropomyosin 量は 7 日間保存のものが最小となっている。

考 察

凍結条件下で保存した肉から調製した筋原線維の ATPase 活性変化 (Fig. 1 と 2) は山本らが以前に報告した結果¹⁸⁾と一致していた。Mg-, Ca-, EDTA-, Mg EGTA-ATPase 活性変化の結果から屠殺後直ちに凍結しても、あるいは、4°C で 7 日間熟成した後に凍結しても本質的には myosin-actin interaction^{6,7)} や myosin 頭部の SH 基の変化^{14,19)} および調節タンパク質の変化は同じであるといえるであろう。しかし 4°C で 7 日間熟成することによって凍結 0 日における ATPase 活性の絶対値が屠殺後直ちに凍結したものに比べて、いく分高い値を示していることから myosin-actin の interaction が強固になっているといえる。これは屠殺後に直ちに凍結したものでは ATP が残っているのに氷結点以上で死後時間がたつと ATP が速やかに消費されることから²⁾も容易に理解出来る。貯蔵時間が長くなるにつれて ATPase 活性が減少傾向を示すことに関して完全な解答を与えることが今のところ出来ないけれども SDS-ポリアクリルアミド電気泳動の結果 (Fig. 4) にあるように myosin の崩壊や myosin が低温により変性し、溶解性の減少 (Fig. 5 と Table 1) が起こることによって説明出来るかもしれない。この結論は myosin 溶液をいろいろな温度条件下で実験し、氷結点以下の温度で myosin が日数がたつにつれて不溶化し、SH 基が減少し変性が促進されることを明らかにした Buttke³⁾の結果によっても支持される。しかし凍結一週間後にいずれの ATPase 活性も最大に達するという事に明解な説明をつけることは出来ない。

調製した筋原線維を塩で溶かし加熱ゲル強度を測定すると凍結保存日数につれてみかけ上 ATPase 活性変化と同じ様な結果を示している (Fig. 1, 2 と 3)。myosin のゲル形成能と ATPase 活性とは直接的には関係がない¹²⁾ことが知られているので、加熱ゲル強度への影響は myosin の貯蔵中の崩壊 (Fig. 4) や myosin の変性による溶解性の低下によるものと考えるのが適切であろう。

つぎに屠殺後熟成してから貯蔵したものが屠殺後直ちに凍結貯蔵したものよりも強いゲル強度を示し (Fig. 3)、この現象をどのように理解すればよいかという問題が残される。myosin の加熱ゲルに関する実験報告で actin が存在すると myosin の加熱ゲル強度が著しく増大されることが解っている^{10,21)}そして最大のゲル強度を発揮するには myosin と actin が結合しているばかりではなく両者の適当な比率が必要であることが結論され

た²¹⁾。動物の屠殺後の処理方法 (例えば温度の違いとか、熟成時間などの差) によって筋肉中の ATP 含量に差が生じる²⁾ ことなどから凍結前の処理方法によって myosin-actin 間の interaction に変化があると考えることができる。この考えは Mg-ATPase 活性の凍結前の処理方法による差 (Fig. 1 と 2) が認められることから理解出来るであろう。

SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動によるゲル形成に関与するタンパク質成分の検索は (Fig. 4) 上澄側に Tropomyosin や Troponin 成分が多量に見られることによって、これ等の調節系タンパク質が加熱ゲル形成に関与している可能性がほとんどないと考えられる。最近鮫島ら¹³⁾ は Natural actomyosin (NAM) と tropomyosin を除いた Desensitized actomyosin (DAM) の加熱ゲル強度の実験をして、それ等の間にほとんど差のないことを報告した。したがって Nakayam and Sato⁸⁾ と Cheng ら⁴⁾ のゲル形成能に tropomyosin が大きな影響をもっているとした結論は否定される。また電気泳動的に myosin よりもいくらか大きな分子量をもったバンドが上澄側に表われているがこの実験からこのタンパク成分が何であるか指摘することはできない。しかし最近骨格筋から発見されて筋原線維の Z 帯に局在している 24 万¹⁾ の分子量をもったタンパク質である可能性が考えられる、この点については今後の研究が必要である。

凍結保存した肉から調製した筋原線維から塩溶性タンパクを抽出し、その抽出成分を電気泳動シデンシトメーターから計算した各タンパク成分の全体に対する重量%は各タンパク成分のコマシーブリリアントブルーによる染色が同一であるかどうかの確認をしていないので絶対的な数値ではないことを指摘しておく。したがって全体量に対して報告されている量に比べて myosin 量の少いこととそれに反して tropomyosin や troponin 成分が実際より多く検出されている可能性が考えられる。しかしながら相対的には充分比較出来る傾向が得られていると考える。したがって塩溶性タンパク質の保存期間による myosin/actin 値を求めると 0 日、7 日保存に比べて 180 日のものが幾分低い値を示しており Yasui ら²¹⁾ の結果からも 180 日保存のものでゲル強度が低下する (Fig. 1) ということが理解出来る。

要 約

家兎骨格筋を屠殺後直ちに -20°C 貯蔵およびあらかじめ 4°C 7 日間熟成してから -20°C で貯蔵し 0~180 日保存し、それ等から筋原線維を調製して、その ATPase 活性の変化、ゲル強度の測定、SDS-電気泳動法によって、凍結による影響を検討した。

ATPase 活性およびゲル強度は、凍結 7 日目で最大に達し、以後保存日数が長くなるにつれて次第に減少した。保存日数が長くなると myosin の heavy chain と Weber-Edsall

溶液によって抽出されるタンパク成分の myosin/actin 値が減少することが解った。また比較的高いイオン強度条件下 (0.6) で加熱ゲルを遠心して上澄と沈澱にわけると上澄側に myosin より大きな分子量のものが極くわずかであるが見られ、tropomyosin と troponin 成分の可なり多くの部分もまた上澄側に移行していることがわかった。

文 献

- 1) Bechtel, P. J. 1979. Identification of a high molecular weight actin-binding protein in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* **254**: 1755-1758.
- 2) Bendall, J. R. 1974. in "The structure and function of muscle" (ed. by G. H. Bourne Vol. 4 pp. 243-309. Academic Press, New York.
- 3) Buttkus, H. 1970. Accelerated denaturation of myosin in frozen solution. *J. Food Sci.* **35**: 558-562.
- 4) Cheng, C. S., P. D. Hamann, N. B. Webb and V. Sidwell 1979. Effects of species and storage time on minced fish gel texture. *J. Food Sci.* **44**: 1087-1092.
- 5) Fiske, C. H. and Y. Subbarow 1925. The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.* **66**: 375-400.
- 6) Goll, D. E., M. H. Storer, 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 75-97, Chicago.
- 7) Jones, J. M. 1972. Studies on chicken actomyosin. 1. Effect of storage on muscle enzymic and physico-chemical properties. *J. Sci. Fd. Agr.* **23**: 1009-1019.
- 8) Nakayama, T. and Y. Sato, 1971. Relationship between binding quality of meat and myofibrillar proteins. IV. Contribution of native tropomyosin and actin in myosin to rheological properties of heat set minced-meat gel. *J. Texture Studies.* **2**: 475-488.
- 9) Perry, S. V. and A. Corsi, 1958. Extraction of proteins other than myosin from isolated rabbit myofibril. *Biochem. J.* **68**: 5-12.
- 10) Samejima, K., Y. Hashimoto, T. Yasui and T. Fukazawa, 1969. Heat gelling properties of myosin, actin, actomyosin and myosin-subunits in a saline model system. *J. Food Sci.* **34**: 242-245.
- 11) 鯨島邦彦・木坂 徹・山本克博, 1977. 豚骨格筋原線維の低温貯蔵中の変化. 酪農大紀要, **7**: 25-37.
- 12) Samejima, K. 1978. The studies on the denaturation and the heat gelling properties of myosin and its helical subfragments. *J. College of Dairying* **7**: 143-250.
- 13) 鯨島邦彦・石下 真・安井 勉, 1980. ミオシンの加熱ゲル形成能. IV. トロポミオシンの効果, 日本農芸化学会, 昭和 55 年度大会, 講演要旨 p. 369.
- 14) Seidel, J. C. 1969. Similar effects on enzymic activity due to chemical modification of either of two sulfhydryl groups of myosin. *Biochem. Biophys. Acta* **80**: 216-218.
- 15) Weber, K. and M. Osborn, 1969. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacryl amide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* **244**: 4406-4412.
- 16) Winger, R. J., O. Fennema and B. B. Marsh, 1979. Rate of pH decline in beef muscle stored at above and below freezing temperatures. *J. Food Sci.* **44**: 1681-1685.
- 17) 山本克博・細川敏治・鯨島邦彦, 1974. 凍結貯蔵が鶏脳筋原線維に及ぼす影響. 酪農大紀要, **5**: 119-126.

- 18) Yamamoto, K., K. Samejima and T. Yasui, 1977. A comparative study of the change in hen pectoral muscle during storage at 4°C and -20°C. *J. Food Sci.* **42**: 1642-1645.
- 19) Yasui, T., T. Sumita and S. Tsunogae, 1975. Stability of myofibrillar EDTA-ATPase in rabbit psoas fiber bundles. *J. Agric. Food Chem.* **23**: 1163-1168.
- 20) Yasui, T., M. Ishioroshi, M. Nakano and K. Samejima, 1979. Changes in shear modulus, ultrastructure and spin-spin relaxation times of water associated with heat-induced gelation of myosin. *J. Food Sci.* **44**: 1201-1211.
- 21) Yasui, T., M. Ishioroshi and K. Samejima, 1980. Heat-induced gelation of myosin in the presence of F-actin. *J. Food Biochem.* (in press).

Summary

Myofibrils were prepared from rabbit skeletal muscle stored for 180 days at -20°C or at -20°C after aging at 4°C for 7 days. Their properties were compared by means of ATPase activity, SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and measurement of heat-induced gel strength.

The changes in ATPase activity and gel strength indicated maximum value at 7 day-storage, but the extents decreased gradually with the time of storage under freezing. Degradation of myosin heavy chain and diminution of the rate of myosin to actin in the protein fraction extracted from myofibrils with Weber-Edsall solution were observed by the results of SDS-polyacrylamide gel electrophoresis with time of storage at -20°C.

It was also found that the major band represented tropomyosin, the minor bands showed troponin components and a faint band of unknown protein of the upper part of myosin band in the SDS-polyacrylamide gel electrophoresis patterns appeared in the supernatant fraction after ultra centrifugation of heat-induced gel.