HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	熟成に伴う食肉の軟化機構に関する研究 : アクチン－ミオシン間硬直結合に及ぼすパラトロポミオンの影響
Author(s)	中村, 富美男; 服部, 昭仁
Citation	北海道大学農学部邦文紀要, 16(4), 359-367
Issue Date	1989-09-05
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/12110
Type	bulletin (article)
File Information	16(4)_p359-367.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

北大農邦文紀要 16(4): 359～367, 1989

熟成に伴う食肉の軟化機構に関する研究

アクチン－ミオシン間硬直結合に及ぼすパラトロポミオンの影響

中村富美男・服部昭仁
(北海道大学農学部畜産学科)

(平成元年6月2日受理)

Studies on the Mechanism of Meat Tenderness During Postmortem Ageing

Effect of Paratropomyosin on the Weakening of Rigor Linkage Between Actin and Myosin

Fumio NAKAMURA and Akihito HATTORI
(Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo 060, Japan)

I. 緒　　言

屠殺直後の家畜・家禽の筋肉は弛緩しており，筋原線維内部の細いフィラメントと太いフィラメントは“滑り”[1,2]を起こしておらず，サルコメアの長さは静止長に保たれている。死後硬直の過程で筋原線維が収縮するときには両フィラメントの間で滑りが起こり，両フィラメントの重なり合が大きくなり個々のサルコメアは短くなる。死後硬直が完了した時点では ATP が消失している[3]ので細いフィラメントのアクチンと太いフィラメントのミオシンは短くなったサルコメア内で強く結合して硬直複合体を形成している。ところが，食肉の熟成にともなってサルコメアは当初の長さ(静止長)に復元し，見かけ上，屠殺直後の筋肉の場合と区別できない[4]。食肉の硬さはサルコメアの長さとも関係しており，サルコメアが短く細いフィラメントと太いフィラメントの重なり合が大きい食肉ほど硬い[5]のでサルコメアの長さの復元が熟成に伴う食肉の軟化の要因となっていることは明かである。

食肉の熟成中に起こるサルコメア長の復元は生体時の収縮・弛緩とは異なる機構によって生ずるものであり，アクチンとミオシン間の硬直結合が脆弱になることによるものである。TAKAHASHI らは，アクチン・ミオシン間の硬直結合の強さの指標として筋原線維からの細いフィラメントと太いフィラメントの解離量を測定することにより，硬直結合が食肉の熟成中に脆弱になることを見いだした[6]。すなわち，死後硬直時に筋原線維から解離されるフィラメントの量は筋原線維の全タンパク質量の5%に過ぎないが，熟成後には70%にまで達する。また，新鮮な筋肉から調製した筋原線維を Ca^{2+} で処理すると処理時間の経過と共に，熟成中の食肉と同様に，フィラメントの解離量が増大することを明らかにした。さらに，筋原線維の Ca^{2+} 処理によって筋原線維から遊離される新しいタンパク質がアクチン・ミオシン間の硬直結合を直接的に脆弱化することを示し，このタンパク質をパラトロポミオシンと命名した[7,8]。

本研究では，筋原線維におけるフィラメントの解離性と粗パラトロポミオシンの遊離量との関係，および部分精製したパラトロポミオシンがアクトミオシンにおけるフィラメントの解離性に及ぼす影響を検討することによりアクチン・ミオシン間の硬直結合が Ca^{2+} 処理によって遊離するパラトロポミオシンによって脆弱になることを支持する結果を得たので報告する。

II. 実験材料および方法

1. 筋肉および筋肉モデルの調製

家兎の胸最長筋と大腰筋を供試した。筋線維束は家兎大腰筋から SZENT-GYORGYI の方法[9]によって，筋原線維は家兎胸最長筋から ETLINGER らの方法[10]あるいは PERRY と GREY の方法[11]によって，ミオシン B は，

SZENT-GYORGYI の方法[9]によって調製した。

2. タンパク質の調製

ミオシンは PERRY の方法[12]によって，アクチンは REES と YOUNG[13]および SPUDICH と WATT の方法[14]によって，トロポミオシンは BAILEY の方法[15]の改良法[16]によって，トロポニンは EBASHI らの方法[17]によって，α-アクチニンは MASAKI と TAKAITI の方法[18]によって調製した。

3. 合成アクトミオシンの調製

0.5 M KCl に溶解したミオシン (6 mg/ml) と F-アクチン (2 mg/ml in 0.1 M KCl) を等量づつ攪はんしながら混合し，30分以上氷冷した後に緩衝液を用いて 0.1 M KCl となるように希釈し，合成アクトミオシン懸濁液を作成した。トロポミオシンおよびトロポニンを含む場合にはトロポミオンとトロポニンの複合体を F-アクチンと予め混合し 15 分以上氷冷した後にミオシンと混合した。α-アクチニンはアクチン－ミオシン複合体に 0.3 M KCl 溶液中で加えた。

4. 太いフィラメントおよび細いフィラメントの分離

0.1 M KCl, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM K-phosphate buffer, pH 7.0 の溶液に懸濁した 10 mg/ml の筋原線維に等量の 0.2 M KCl, 10 mM ATP, 2 mM EGTA, 10 mM K-phosphate buffer, pH 7.0 の溶液を加えた。従って，混和液の最終組成は筋原線維 5 mg/ml, 0.15 M KCl, 5 mM $MgCl_2$, 5 mM ATP, 1 mM EGTA, 10 mM K-phosphate buffer, pH 7.0 となり，この組成は Huxley の "relaxing medium"[19]と同一である。この混和液をテフロンホモジナイザーで 1,400 rpm で 100 秒間ホモジナイズした。その後直ちに 3,000 rpm で 10 分間遠心分離し，上澄液のタンパク質濃度を biuret 法[20]で測定した。操作は全て 5°C 以下で行った。

5. 筋原線維の Ca^{2+} 処理

PERRY と GREY の方法[11]によって得られた筋原線維を HATTORI と TAKAHASHI の方法[21]に従って 0.1 M KCl, 0.1 mM $CaCl_2$, 1 mM DTT, 1 mM NaN_3, 10 mM Tris-maleate buffer, pH 7.0 の溶液に 10 mg/ml のタンパク質濃度で浸せきし，5°C でゆっくり攪はんし，一定時間経過後に Virtis ホモジナイザーで 60 秒間 10,000 rpm でホモジナイズ後直ちに 12,000 rpm で 20 分間遠心分離した。上澄液中の遊離タンパク質量を biuret 法で測定し，このタンパク質画分を粗パラトロポミオシンとした。

6. 粗パラトロポミオンの部分精製

筋原線維の Ca^{2+} 処理によって遊離してくる粗パラトロポミオシンからパラトロポミオシンを部分精製した。粗パラトロポミオシンのタンパク質濃度を 1.5-2.0 mg/ml として固形硫安を 40% 飽和となるように溶解し，アンモニア水で pH を 7.0 に調整後 30 分間氷冷した。この溶液を 12,000 rpm で 30 分間遠心分離し上澄液に 80% 飽和となるように固形硫安を溶解し，pH 7.0 に調整後 30 分間氷冷した。12,000 rpm で 30 分間遠心分離して沈澱を回収し，少量の 0.1 M KCl, 10 mM $CaCl_2$, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5 溶液に溶解し，大量の同液に対して約 20 時間透析した。透析により完全に硫安を除いたものを 15,000 rpm で 20 分間遠心分離した上澄液を部分精製パラトロポミオシンとした。

7. Mg^{2+}-ATase 活性の測定

合成アクトミオシン懸濁液の Mg^{2+}-ATPare 活性は ATP の添加により直ちに超沈澱が起こる条件を選んで行った。反応条件は 0.25 mg/ml アクチン，0.75 mg/ml ミオシン，75 mM KCl, 2 mM $MgCl_2$, 1 mM $CaCl_2$, 20 mM imidazol-HCl, pH 7.0, 0.3 mM ATP であった。25°C で攪はんしつつ，一定時間経過後に等量の冷却した 15% TCA を加えて反応を停止させ，遊離した無機リン酸を測定した。無機リン酸の定量は Fiske-Subbarow 法[22]によって行った。

III. 結　　果

1. 筋線維束，ミオシン B および合成アクトミオシンにおけるフィラメントの解離量

筋肉模型である筋線維束をリンゲル液に浸せきし，ATP によって解離するフィラメントの量を調べた結果が Fig. 1 である。Ca^{2+} を含むリンゲル液に浸せきした場合には，時間の経過と共にフィラメントの解離量は増加し，50 時間以降では一定値を示すようになり，このパターンは死後筋肉の場合[6]と同様であった。一方，Ca^{2+} を EDTA で置き換えた場合にはこのような変化はみられず，フィラメントの解離量は変化せず浸せき開始時の値のままで推移した。この結果は，筋原線維を Ca^{2+} 処理した場合[6]とよく一致していた。従って，ATP の添加によって太いフィラメントと細いフィラメントが解離するためには Ca^{2+} の存在が必須であることが明かである。筋原線維構成タンパク質のほとんど全てを含むミオシン B の超沈澱の全過程で ATP 添加によって解離するフィラメント量の変化を調べた。Fig. 2 に示すように Ca^{2+} が存在する場合には超沈澱後の時間経過にともなってフィラメントの解離量が変化する。超沈澱を起こして 1 時間後には，解離するフィラメント量が

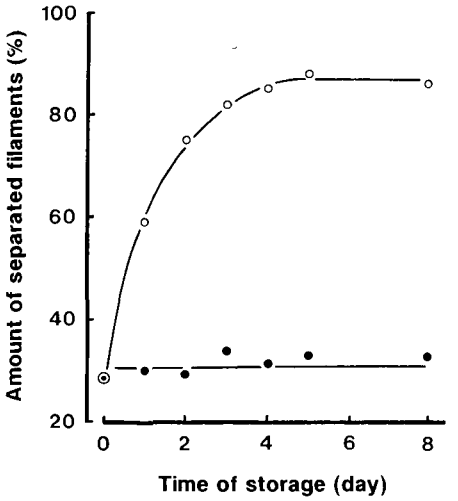

Fig. 1. Effect of Ca^{2+} on the amount of separated filaments in rabbit psoas muscle fiber bundles. Freshly prepared muscle fiber bundles were incubated at 5°C in a Ringer's solution containing 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.2 mM $MgCl_2$, 1.3 mM $CaCl_2$ and 26 mM Na-phosphate buffer, pH 7.4. After incubation with gentle stirring, myofibrils were prepared and the amounts of separated filaments were measured. Solid simbols, 5 mM EDTA instead of $MgCl_2$ and $CaCl_2$.

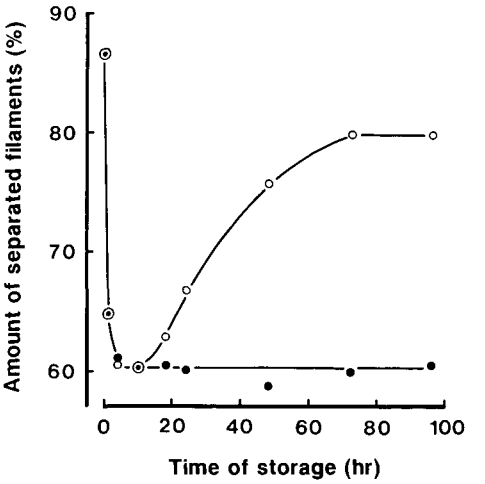

Fig. 2. Effect of Ca^{2+} on the dissociation of thick and thin filaments in superprecipitated myosin B. To 1 mg/ml of myosin B in a solution containing 0.1 M KCl, 5 mM $MgCl_2$ and 20 mM Imidazol-HCl, pH 7.0, 1 mM ATP was added at 25°C. At 10 min after the turbidity of myosin B suspensions were reached to maximum, myosin B suspensions were incubated at 5°C in a solution containing 0.1 mM $CaCl_2$. The myosin B suspensions were homogenized after appropriate incubation, and the amounts of separated filaments were measured. Solid symbols, 5 mM EGTA instead of $CaCl_2$.

0時間の透明化期に比べてすでに20%以上減少しており，4時間目には最低値となり，この値が10時間後まで続いた。ATPによって解離するフィラメント量は18時間目から増加し，72時間目まで増え続けた。EGTAが存在する場合にはフィラメントの解離量は低下したままで，貯蔵時間が経過しても増加することはなかった。フィラメントの解離性に及ぼす既知の筋原線維構成タンパク質の関与を明らかにするためにアクチンとミオシンから再構成した合成アクトミオシンの超沈澱を死後硬直のモデルと考えて次の実験を行った。Fig. 3から明らかなように，アクチンとミオシンだけから成る合成アクトミオシンの場合は超沈澱後の貯蔵時間におけるフィラメントの解離量の増加は Ca^{2+} が存在するにも関わらず認められなかった。アクチンとミオシンの混合比を重量比で1:1から1:5まで変化させたが解離するフィラメントの量に変化はなかった。上記合成アクトミオシンにトロポミオシンおよびトロポニンを加えた場合にはATPによって解離するフィラメント量は全般的に増加するが，超沈澱後の経過時間による変化は認められなかった。なお，加えたトロポミオシンおよびトロポニンの量は合成アクトミオミンに含まれているアクチン量に対して充分量であった。この系に α-アクチニンを加えると合成アクトミオシン懸濁液の超沈澱が起こるまでの時間が短縮し，超沈澱時の濁度が上昇し，全体的にATPの添加によるフィラメントの解離量が低下した。しかし，超沈澱後の経過時間による変化はみられなかった。死後の筋肉においてZ線構成成分である α-アクチニン[18]がアクチンとミオシンの相互作用に影響を及ぼすとすれば硬直後であり，本モデル実験にあっては超沈澱後に相当するものと考えられるので，超沈澱を起こした合成アクトミオンに α-アクチニンを加えてみたがその後の経過時間による変化は認められなかった。さらに，筋原線維の構成タンパク質であるM-タンパク質[23]およびC-タンパク質[24]に付いても同様の実験を行ったがいずれの場合にもミオシンBで見られたようなアクチン－ミオシン相

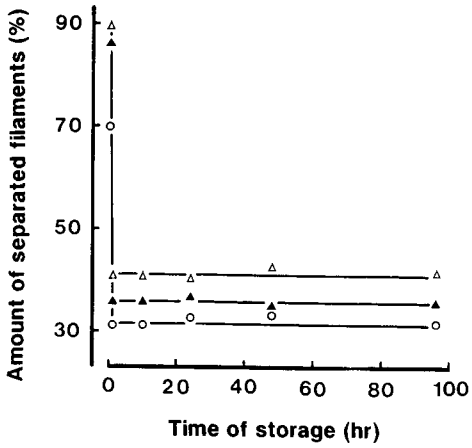

Fig. 3. Effect of several myofibrillar proteins on the dissociation of thick and thin filaments in a reconstituted actomyosin. To 1 mg/ml of reconstituted actomyosin (0.25 mg of actin plus 0.75 mg of myosin) which superprecipitated by addition of 1 mM ATP, 0.07 mg/ml of tropomyosin and 0.08 mg/ml of troponin (△) or 0.07 mg/ml tropomyosin, 0.08 mg/ml troponin and 0.1 mg/ml of α-actinin (▲) were added. After incubation at 5°C, actomyosin suspensions were homogenized, and the amounts of separated filaments were measured. Circle, control.

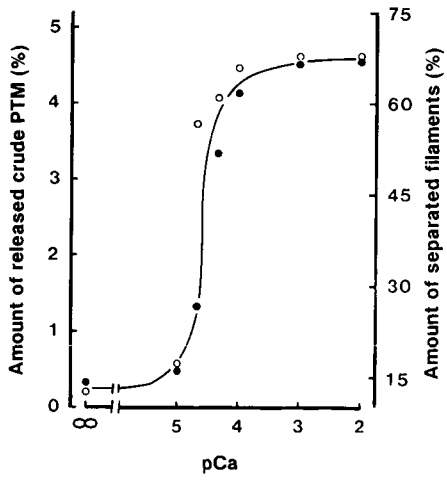

Fig. 4. Dependence of the amounts of separated filaments and the crude paratropomyosin released from myofibrils on Ca^{2+} concentration. Freshly prepared myofibrils (10 mg/ml) were incubated for 1 (○) or 3 (●) days at 5°C in a solution containing 0.1 M KCl, 1 mM DTT, 1 mM NaN_3, 10 mM Tris-maleate buffer, pH7.0 and various concentration of $CaCl_2$. After incubation, the myofibrillar suspensions were homogenized, and the amounts of separated filaments (●) and crude paratropomyosin released (○) were measured.

互作用の変化を示す現象はみられなかった。

2. フィラメントの解離性と粗パラトロポミオシンの遊離量との関係

新鮮な筋原線維を Ca^{2+} で処理するとパラトロポミオシンが遊離してくる。筋原線維からのフィラメントの解離と粗パラトロポミオシンの遊離に及ぼす Ca^{2+} の影響を調べた。フィラメントの解離量と粗パラトロポミオシンの遊離量の Ca^{2+} 濃度依存性を Fig. 4 に示した。フィラメントの解離量と粗パラトロポミオシンの遊離量は共に Ca^{2+} 濃度が 1×10^{-5} M から 1×10^{-4} M にかけて増加し，1×10^{-4} M 以上では一定値となった。Fig. 5 に示すようにフィラメント解離量と粗パラトロポミオシン

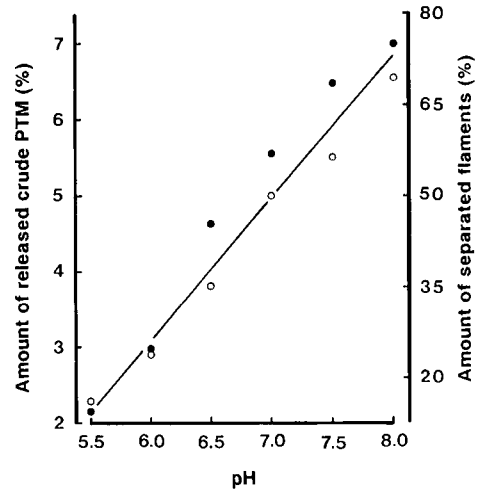

Fig. 5. Dependence of amounts of the separated filaments and the crude paratropomyosin released from myofibrils on the pH during the Ca-treatment. Freshly prepared myofibrils (10 mg/ml) were incubated for 1 (○) or 2 (●) days at 5°C in a solution containing 0.1 M KCl, 10 mM $CaCl_2$, 1 mM DTT, 1 mM NaN_3 and 10 mM Tris-maleate buffer at various pHs. After incubation, the myofibrillar suspensions were homogenized, and the amounts of separated filaments (●) and crude paratropomyosin released (○) were measured.

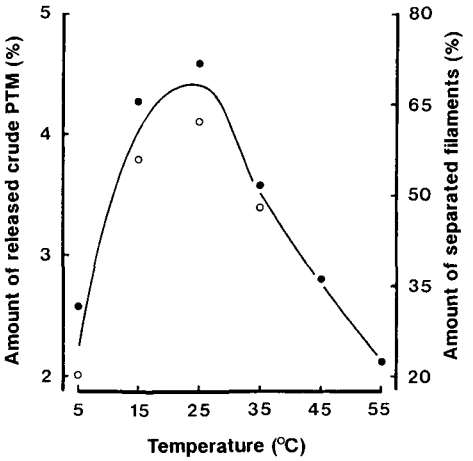

Fig. 6. Dependence of amounts of the separated filaments and the crude paratropomyosin released from myofibrils on the temperature during the Ca^{2+}-treatment. Freshly prepared myofibrils (10 mg/ml) were incubated for 6 (○) or 12 (●) hrs in a solution containing 0.1 M KCl, 10 mM $CaCl_2$, 1 mM DTT, 1 mM NaN_3 and 10 mM Tris-maleate buffer, pH 7.0 at various temperatures. After incubation, the myofibrillar suspensions were homogenized, and the amounts of separated filaments (●) and crude paratropomyosin released (○) were measured.

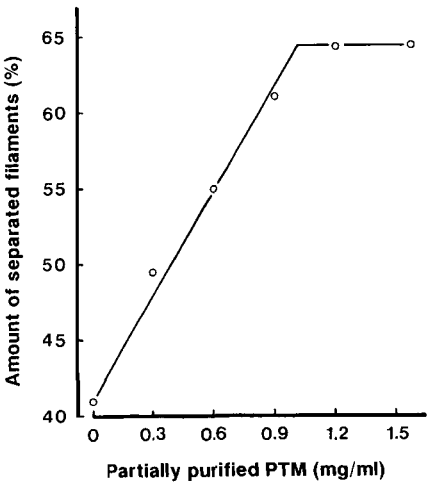

Fig. 7. Effect of the partially purified paratropomyosin on the separation of filaments in reconstituted actomyosin. To 1 mg/ml of reconstituted actomyosin (0.25 mg of actin plus 0.75 mg of myosin) in a solution containing 0.1 M KCl, 5 mM $MgCl_2$, 1 mM $CaCl_2$, 2.5 mM ATP and 20 mM Imidazol-HCl, pH 7.0, various concentration of the partially purified paratropomyosin was added. Reconstituted actomyosin suspensions were centrifuged at 5,000 rpm for 10 min, and the amounts of separated filaments in supernatant were measured.

の遊離量の pH 依存性は共に pH の上昇にとなって増加する pH 依存性を示した。フィラメントの解離量と粗パラトロポミオシンの遊離量に及ぼす温度の影響を Fig. 6 に示した。処理温度が 25°C までは両者ともに温度の上昇にともなって増加するが，それ以上に温度が上昇するとフィラメントの解離量，粗パラトロポミオシンの遊離量ともに減少した。以上の結果はいずれもフィラメントの解離量と粗パラトロポミオシンの遊離量が平行して変化することを示している。

3. 部分精製したパラトロポミオシンが超沈澱を起こしたアクトミオシンに及ぼす影響

合成アクトミオシン懸濁液に ATP を加えると直ちに透明化を起こし，濁度が低下した状態が数分間持続する。

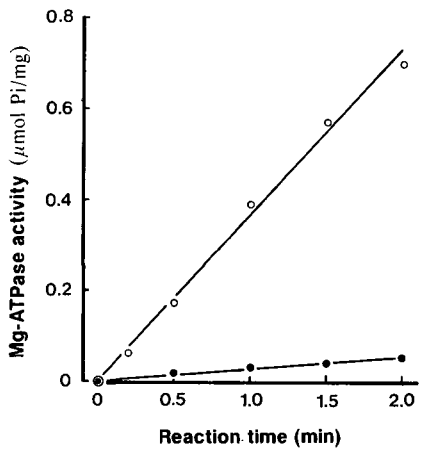

Fig. 8. Effect of the partially purified paratropomyosin on the Mg^{2+}-ATPase activity of reconstituted actomyosin. Mg^{2+}-ATPase activity was measured under the conditions where turbidometric superprecipitation of control actomyosin took place immediately after the addition of ATP; 1 mg/ml of reconstituted actomyosin (0.25 mg of actin plus 0.75 mg of myosin), 75 mM KCl, 2 mM $MgCl_2$, 1 mM $CaCl_2$, 0.3 mM ATP and 25 mM Imidazol-HCl, pH 7.0 at 25°C. (○), control; (●), plus 1 mg of the partially purified paratropomyosin/ml.

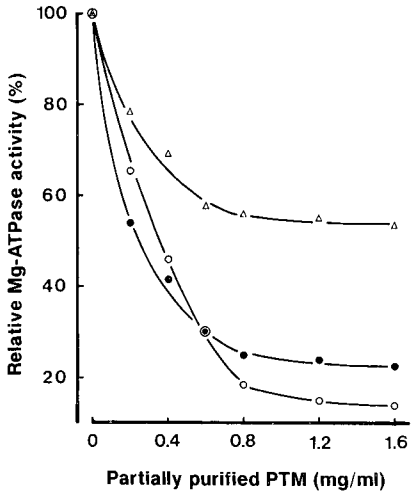

Fig. 9. Effect of the amount of partially purified paratropomyosin on the Mg^{2+}-ATPase activity. To 1 mg/ml of reconstituted actomyosin (○), superprecipitated reconstituted actomyosin (●) or 0.5 mg/ml of myofibrils (△) in a solution containing 75 mM KCl, 2 mM $MgCl_2$, 1 mM $CaCl_2$, and 20 mM Imidazol-HCl, pH 7.0, various concentration of the partially purified paratropomyosin and 0.3 (○), 0.4 (●) or 1.0 (△) mM ATP was added.

その後濁度が急速に上昇し，やがて一定値となり超沈澱を起こす。合成アクトミオシンに部分精製したパラトロポミオシンを加えて超沈澱を起こすと無添加の場合に比べて透明化の期間が顕著に延長されることが明らかになっている[7]。合成アクトミオシンの透明化期間に部分精製したパラトロポミオシンを加えてフィラメントの解離量を調べた結果が Fig. 7 である。部分精製したパラトロポミオシンの添加量にともないフィラメントの解離量は増加し，合成アクトミオシン 1 mg に対して約 1 mg の添加量で最大値となり，このときフィラメントの解離量は無添加のものに比べて 22% も増加した。Fig. 8 は，合成アクトミオシンに ATP を添加後直ちに超沈澱が起こる条件下で Mg^{2+}-ATPase 活性を測定した結果である。合成アクトミオシンは高い Mg^{2+}-ATPase 活性 (U=0.35) を示すのに対し，部分精製したパラトロポミオシンを加えて場合には Mg^{2+}-ATPase 活性は低く (U=0.03)，部分精製したパラトロポミオシンが合成アクトミオシンの Mg^{2+}-ATPase 活性を著しく抑制する作用のあることがわかった。部分精製したパラトロポミオシンの添加量と合成アクトミオシンの Mg^{2+}-ATPase 活性の関係を Fig. 9 に示した。合成アクトミオシン，超沈澱した合成アクトミオシン及び新鮮な筋原線維について，無添加の場合の活性を 100% とした相対値で活性を表示してある。合成アクトミオシンおよび超沈澱した合成アクトミオシンの場合には，合成アクトミオシン 1 mg/ml に対して部分精製したパラトロポミオシン 0.8 mg/ml までは添加量に応じて Mg^{2+}-ATPase 活性が抑制され，この量比の時約 80% の活性低下が見られた。一方，筋原線維の場合には，抑制が最大となる部分精製したパラトロポミオシンの添加量は合成アクトミオシンの場合と同じであったが，抑制の程度はかなり低く，約 50% の活性を抑制するにとどまった。

IV. 考　　察

死後硬直時に短縮したサルコメアはその後の時間経過と共に静止長へ復元する[4]が，この時点では筋肉中の ATP は完全に消失している[3]ので，死後筋肉におけるサルコメア長の変化は ATP 存在下で起こる生筋の収縮弛緩とは異なった機構によると考えなければならない。すなわち，硬直後の死後筋肉において太いフィラメントと細いフィラメント間に滑りが起こってサルコメア長が復元するとすれば，その原因は両フィラメント間の結合が弱まることによるか，あるいは両フィラメントを構成するアクチンとミオシンがタンパク質分解酵素の作用によって状態変化を起こすことによるかのいずれかが考えられる。TAKAHASHI 等は，食肉の熟成中におけるフィラメントの解離について調べ，死後筋肉から調製した筋原線維に ATP を添加した場合には死後硬直後の時間経過と共に，フィラメントの解離量が増大することを観察し，両フィラメントを構成するアクチンとミオシン間の結合に ATP が作用し，両者が解離しやすくなることを示すと共に，電子顕微鏡的観察と SDS-PAGE の結果にもとずき，死後筋肉の貯蔵期間中にアクチンとミオシンはタンパク質分解酵素の影響を受けないことを明らかにした[6]。

死後筋肉におけるフィラメント解離性の変化は，全筋及び筋原線維に見られる[6]のと同様のパターンが筋線維束をリンゲル液に貯蔵した場合にも観察され (Fig. 1)，Ca^{2+} によって引き起こされることが確認された。一方，試験管内の筋収縮と見なされているミオシン B の超沈澱を死後硬直のモデルと考え，超沈澱後におけるフィラメントの解離性について調べると，Ca^{2+} 存在下では 10 時間以上貯蔵すると ATP によって解離するフィラメントの量が増加するのに対して，Ca^{2+} 不在下ではこの現象

は観察されない (Fig. 2)。この事実は，ミオシンBの超沈澱の際に形成されたアクチンとミオシンの硬い結合が Ca^{2+} 存在下ではその後の時間経過と共に弱くなることを示している。ミオシンBの超沈澱後におけるフィラメントの解離性は，全筋，筋線維束および筋原線維の場合とよく一致しており，ミオシンBの超沈澱を死後硬直のモデルとすることの妥当性が明らかとなった。一方，Fig. 3 に示したように，アクチンとミオシンだけから成る合成アクトミオシンは，超沈澱後，フィラメントの解離性には変化を生じない。アクチンと共に細いフィラメントを形成しているトロポミオシン[15]およびトロポニン[16]を加えた場合，Z線の構成成分である α-アクチニン[18]を加えた場合，ミオシンフィラメントの格子構造を維持する役割を担っているM線に存在するM-タンパク質[23]を加えた場合，あるいは，ミオシンフィラメント上に存在するC-タンパク質[24]を加えた場合のいずれの場合にも合成アクトミオシンの超沈澱後の時間経過と共にフィラメントの解離量が増加するということはなかった。既知の筋原線維構成タンパク質を加えても，ミオシンBの場合に観察されたようなフィラメントの解離量が増大するという現象が見られないということは，各種のタンパク質を加えた合成アクトミオシンとミオシンBでは構成タンパク質に相違があるためと解される。すなわち，ミオシンBには筋原線維を構成するタンパク質はほとんど全てが含まれていると考えられているので，この中には両フィラメント間の解離に関与する未知のタンパク質が存在し，このタンパク質が Ca^{2+} 存在下でアクチン・ミオシン間の結合を修飾し両者の結合が脆弱になることを示している。このタンパク質は TAKAHASHI 等が発見した筋原線維を Ca^{2+} 処理することによって筋原線維から遊離してくる新しいタンパク質，パラトロポミオシンである[8]。

筋原線維の Ca^{2+} 処理によって遊離してくるタンパク質すなわち粗パラトロポミオシンの遊離量とフィラメントの解離量との関係を Ca^{2+} 濃度，pH および温度について調べるといずれの場合も同様の変化した (Figs. 4, 5, 6)。これらの事実は，Ca^{2+} 処理によって筋原線維から遊離した粗パラトロポミオシンにフィラメントを解離させる作用のあることを示している。部分精製したパラトロポミオシンを筋原線維に加えるとフィラメントの解離量が増加することはすでに明らかにされている[7]が，超沈澱を起こした合成アクトミオシンに加えた場合にもフィラメントの解離量は顕著に増加した (Fig. 7)。パラトロポミオシンが，アクチン・ミオシン相互作用に影響を及ぼし，その結果，太いフィラメントと細いフィラメントが容易に解離するものと考えられる。このようなパラトロポミオンシの効果は Mg^{2+}-ATPase 活性の結果からも明確である (Fig. 8)。アクチンによって活性化されるミオシンの Mg^{2+}-ATPase 活性はアクチンとミオシンの相互作用の強さを反映しているので，パラトロポミオシンを添加した場合には，合成アクトミオシンの Mg^{2+}-ATPase 活性が対照の約12分の1にも低下することは，パラトロポミオシンがアクチン・ミオシン相互作用を著しく抑制することを示している。フィラメントの解離量及び Mg^{2+}-ATPase 活性に対して最大の効果を現すのに要する部分精製したパラトポミオシンの添加量はいずれの場合も合成アクトミオシン 1 mg/ml に対し 0.8 mg であった。部分精製したパラトロポミオシンの一定量の添加によって，アクチン・ミオシン相互作用が顕著に抑制されることから筋線維束，筋原線維あるいは超沈澱したミオシンBを Ca^{2+} 処理することにより遊離されるパラトロポミオシンが徐々に増加し，このタンパク質がアクチン・ミオシン間の硬直結合を修飾することによりフィラメントの解離量が増大するものと結論される。

V. 要　　約

筋肉模型である筋線維束とミオシンBからのフィラメントの解離量，筋原線維におけるフィラメントの解離量とパラトロポミオシンを含む画分の遊離量との関係，および部分精製したパラトロポミオシンがアクチン・ミオシン相互作用 (Mg^{2+}-ATPase 活性) に及ぼす影響を調べることによって，食肉の熟成中に起こるアクチン—ミオシン間硬直結合の脆弱化の機序を検討した。結果の大要は以下の通りであった。

(1) 筋線維束を Ca^{2+} を含むリンゲル液に浸せきすると，時間の経過と共にフィラメントの解離量は増加するが，Ca^{2+} 不在下では，この変化は観察されなかった。

(2) 同様の現象は，筋原線維構成タンパク質のほとんど全てを含むミオシンBの超沈澱後 (硬直筋モデル) も観察されるが，アクチン，ミオシンおよび既知の筋原線維構成タンパク質から再構成した合成アクトミオシンでは観察されなかった。

(3) 筋原線維からのフィラメントの解離量と，パラトロポミオシンを含む画分の遊離量は，Ca^{2+} 濃度，pH 及び温度を変化させた場合，いずれも同様の変化を示した。

(4) 部分精製したパラトロポミオシンを合成アクトミオシン系に添加すると，フィラメントの解離量はパラトロポミオシンの濃度に依存して増加した。

(5) 逆に,筋原線維,合成アクトミオシンおよび超沈澱を起こした合成アクトミオシンの Mg^{2+}-ATPase 活性は添加するパラトロポミオシンの量に応じて低下した。

(6) 以上の結果から,熟成中の食肉にみられるアクチン・ミオシン間の硬直結合の脆弱化は,死後の筋肉内で増加した Ca^{2+} によって遊離されてくる新しい筋原線維構成タンパク質・パラトロポミオシンによって引き起こされるものと考えられる。

引用文献

1. HUXLEY, A. F. and NIEDERGERKE, R.: Structural changes in muscle during contraction. Nature, **173**: 971-973. 1954
2. HUXLEY, H. E. and HANSON, J.: Changes in the cross-striations of muscle during contraction and strech and their structural interpretation. Nature, **173**: 973-976. 1954
3. BENDALL, J. R.: Structure and Function of Muscle, Vol. III in Bourne, G. H. eds. 227-272, Academic Press, New York, 1960
4. TAKAHASHI, K., FUKAZAWA, T. and YASUI, T.: Formation of myofibrillar fragments and reversible contraction of sarcomere in chicken pectoral muscle. J. Food Sci., **32**: 409-413. 1967
5. HERRING, H. K., CASSENS, R. G. and BRISKEY, E. J.: Sarcomere length of free and restrained bovine muscel at low temperature as related to tenderness. J. Sci. Food Agric., **16**: 379-384. 1965
6. TAKAHASHI, K., NAKAMURA, F. and INOUE, A.: Postmortem changes in the actin-myosin interaction of rabbit skeletal muscle. J. Biochem., **89**: 321-324. 1981
7. TAKAHASHI, K., NAKAMURA, F. and OKAMOTO, M.: A myofibrillar component that modifies the actin-myosin interaction in postrigor skeletal musle. J. Biochem., **92**: 809-815. 1982
8. TAKAHASHI, K., NAKAMURA, F., HATTORI, A. and YAMANOUE, M.: Paratropomyosin: A new myofibrillar protein that modifies the actin-myosin interaction in postrigor skeletal muscle. I. Preparation and characterization. J.Biochem., **97**: 1043-1051. 1985
9. SZENT-GYORGYI, A.: Chemistry of Muscular Contraction, 2nd ed., pp. 144. Academic Press, New York, 1951
10. ETLIGER, J. D., ZAK, R. and FISHMAN, D. A.: Compositional studies of myofibrils from rabbit straited muscle. J. Cell Biol., **68**: 123-141. 1976
11. PERRY, S. V. and GREY, T. C.: A study of the effects of substrate concentration and certain relaxing factor on the Mg-activated myofibrillar ATPase. Biochem. J., **64**: 184-192. 1956
12. PERRY, S. V.: Myosin ATPase: Methods in Enzymology, Vol. II in COLOWICK, S. P. and KAPLAN, N. O., eds. 582-588, Academic Press, New York. 1955
13. REES, M. K. and YOUNG, M.: Studies on the isolation and molecular properties of homogeneous globular actin. J. Biol. Chem., **242**: 4449-4458. 1967
14. SPUDICH, J. A. and WATT, S.: The regulation of rabbit skeletal muscle contraction. J. Biol. Chem., **246**: 4866-4871. 1971
15. BAILY, K.: Tropomyosin: a new asymmetric protein component of the muscle fibril. Biochem. J., **43**: 271-279. 1948
16. EBASHI, S., KODAMA, A. and EBASHI, F.: Troponin. J. Biochem., **64**: 465-477. 1968
17. EBASHI, S., WAKABAYASHI, T. and EBASHI, F.: Troponin and its components. J. Biochem., **69**: 441-445. 1971
18. MASAKI, T. and TAKAITI, O.: Some properties of chicken a-actinin. J. Biochem., **66**: 637-643. 1969
19. HUXLEY, H. E.: Electron microscope studies on the structure of natural and synthetic protein filaments from striated muscle. J. Mol. Biol., **7**: 281-301. 1963
20. GONALL, A. G., BARDWILL, C. S. and DAVID, M. M.: Determination of serum proteins by means of biuret reaction. J. Biol. Chem., **177**: 751-766. 1949
21. HATTORI, A. and TAKAHASHI, K.: Studies on the post-mortem fragmentation of myofibriles. J. Biochem., **85**: 47-56. 1979
22. FISKE, C. H. and SUBBAROW, Y.: The colorimetric determination of phosphorus. J. Biol. Chem., **66**: 375-400. 1925
23. KUNDRAT, E. and PEPE, F. A.: The M band. J. Cell Biol., **48**: 340-347. 1971
24. OFFER, G., MOOS, C. and STARR, R.: A new protein of the thick filaments of vertebrate skeletal myofibriles. J. Mol. Biol., **74**: 653-676.

1973

Summary

An important aspect of the tenderization of meat during postmortem ageing concerns the intrinsic property of a myofibrillar protein, paratropomyosin. In this study, the effect of paratropomyosin on the actin-myosin interaction was investigated and weakening mechanism of rigor linkages formed between actin and myosin was discussed.

Although the amount of separated thick- and thin-fiaments of superprecipitated myosin B which contains almost all myofibrillar proteins increased with increasing time of storage in the precence of Ca^{2+}, the amount of separated filaments was unchanged in the absence of Ca^{2+}. These phenomena showed good agreement with the observations of myofibrils and fiber bundles. But in actomyosin reconstituted from actin and myosin, the amount of separated filaments was unchanged during storage even in the precence of Ca^{2+}. When the partially purified paratropomyosin was added to the reconstituted actomyosin, the amount of separated filaments increased and depended on the amount of the partially purified paratropomyosin added.

The changes of the amount of separated filaments released from myofibrils in various conditions such as Ca^{2+} concetration, temperature or pH were agreeded with those of crude paratropomyosin released from myofibrils.

These results indicate that during postmortem ageing of meat, paratropomyosin released from myofibrils with an increase of sarcoplasmic Ca^{2+} concentration weakens the rigor linkages formed between actin and myosin.