HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	熟成に伴う食肉の軟化機構に関する研究 : 筋原線維 ATPase 活性の変化
Author(s)	服部, 昭仁; 山之上, 稔; 中村, 富美男
Citation	北海道大学農学部邦文紀要, 16(4), 368-374
Issue Date	1989-09-05
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/12111
Type	bulletin (article)
File Information	16(4)_p368-374.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

北大農邦文紀要 16(4): 368～374, 1989

熟成に伴う食肉の軟化機構に関する研究

筋原線維 ATPase 活性の変化

服部昭仁・山之上　稔*・中村富美男
(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

Changes in Myofibrillar ATPase Activities

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

I. 緒　　論

熟成に伴う食肉の軟化の要因の一つである死後硬直時に短縮したサルコメアが静止長へ復元するという現象は1967年に TAKAHASHI らによって発見された[1]が，STROMER らは，電子顕微鏡による観察から，この現象が細いフィラメントと太いフィラメントの滑りによって起こることを明らかにした[2]。ATP の消失した非生理的条件下にある食肉の熟成中に起こるサルコメアの長さの復元という形態的変化は，硬直複合体におけるアクチンとミオシンの硬い結合が脆弱化することを示している。TAKAHASHI らは食肉の熟成中になぜ硬直結合が脆弱になるのか，という問題を追究する過程で，ある種のタンパク質が介在することを見いだし，このタンパク質を筋原線維から単離・精製し，パラトロポミオシンと命名した[3]。パラトロポミオシンは生体の筋原線維においては太いフィラメントの両端部に局在しているが，食肉の熟成中に筋漿 Ca^{2+} 濃度が 10^{-4} M に上昇するとその部分から遊離して細いフィラメントのアクチンと結合するようになり[4]，その結果，死後硬直時に形成されたアクチンとミオシン間の結合を脆弱にする[5]。さらに，このパラトロポミオシンによる硬直結合の脆弱化が食肉の熟成中に起こるサルコメア長の復元を引き起こすことが明らかにされた[6]。

本研究では，食肉の熟成中に起こる筋原線維のサルコメア長の変化という現象をアクチン・ミオシン間の相互作用の変化として捕らえ，筋原線維性 ATPase 活性を指標として熟成中におけるアクチン・ミオシン間の相互作用に対するパラトロポミオンの影響を検討した。

II. 実験材料及び実験方法

(1) 供試動物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。筋線維束は屠殺直後の大腰筋から HATTORI と TAKAHASHI の方法[7]に従って，筋原線維は家兎胸最長筋からは ETLINGER らの方法[8]で，筋線維束からは PERRY と GREY の方法[9]に従って調製した。

(2) タンパク質の調製

ミオシンは PERRY の方法[10]，アクチンは REES と YOUNG の方法[11]および SPUDICH と WATT の方法[12]に従って調製した。合成アクトミオシンは 0.5 M KCl に溶解したミオシンと 0.1 M KCl 中の F-アクチンを 0.3 M KCl として攪はん混合し，30分以上氷冷した後に緩衝液を用いて 0.15 M KCl となるように希釈し，合成アクトミオシン懸濁液を得た。最終的に一定量のミオシン濃度 (0.55 mg/ml) に対して，種々のアクチン濃度 (0-0.6 mg/ml) の合成アクトミオシンを調製した。

(3) 筋原線維のサルコメア長の測定

タンパク質濃度を約 1 mg/ml に調整した筋原線維を位相差顕微鏡（オリンパス光学工業株式会社製 BHSU-

* 現住所；神戸大学農学部

323 型) 下で接眼移動測微計と対物ミクロメーターを用い，100 個以上の筋原線維の長さを測定してサルコメア数で除し，平均値をサルコメア長とした。

(4) K^+-ATPase 活性の測定

ETLINGER らの方法[8] あるいは HATTORI と TAKAHASHI の方法[7] により調製した筋原線維 (2 あるいは 5 mg/ml) あるいは種々のアクチン濃度の合成アクトミオシンを COOKE と FRANKS の測定条件[13] (0.15 M KCl, 4 mM EDTA, 20 mM Tris-maleate buffer pH 7.5 あるいは 7.0) 下で 4 mM となる様に ATP を添加し，25°C で測定した。無機リン酸量は FISKE-SUBBAROW 法[14] で定量した。

(5) Mg^{2+}-ATPase 活性の測定

筋原線維 (1.0 あるいは 0.5 mg/ml) あるいは合成アクトミオシンの懸濁液 (0.15 M KCl, 4 mM $MgCl_2$, 0.01 mM $CaCl_2$, 20 mM Tris-maleate buffer, pH 7.5) に 4 mM あるいは 0.3 mM の ATP を添加して測定した。

(6) 蛋白質量の測定

蛋白質濃度は folin 法[15] および biuret 法[16] で測定した。

III. 結　　果

10°C に貯蔵した筋肉から一定時間経過後に筋原線維を調製し，K^+-ATPase 活性を測定した。Fig. 1 に示すように，死直後の活性値は 0.025 (μ mol Pi/min/mg) であったが，硬直期の死後 2 日目には，骨格に付けたまま貯蔵した筋肉から調製した筋原線維においては活性値が 0.022 へと，骨格から外して貯蔵した筋肉から調製した筋原線維においては 0.019 とそれぞれ低下した。死後硬直期を過ぎるといずれの場合にも徐々に K+-ATPase 活性が上昇した。熟成の完了した死後 8 日目には，骨格に付けたまま貯蔵した筋肉からの筋原線維においては 0.040 と硬直期の活性値の約 1.8 倍まで増加し，骨格から外して貯蔵した筋肉からの筋原線維においては 0.024 と硬直期の活性値の約 1.2 倍まで増加し，その変化の様相は活

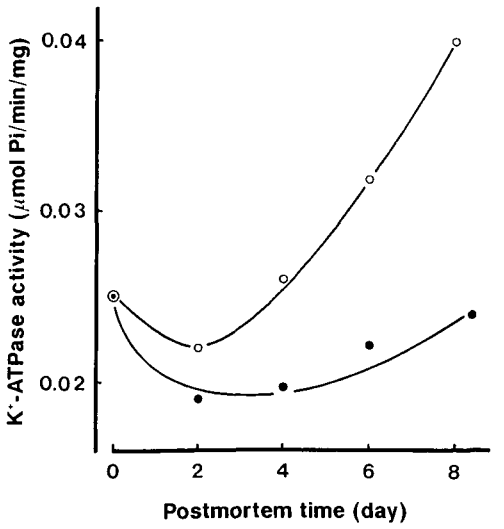

Fig. 1. Postmortem changes in the K^+-ATPase activities of myofibrils. Rabbit skeletal muscles excised immediately at death (●) or attached to skeleton (○) were stored at 10°C. At appropriate time intervals, myofibrils were prepared from stored muscles by method of ETRINGER et al., and K^+-ATPase activities were measured under the following conditions ; 5 mg/ml of myofibrils, 0.15 M KCl, 4 mM EDTA, 4 mM ATP and 20 mM Tris-maleate buffer, pH 7.5, at 25°C.

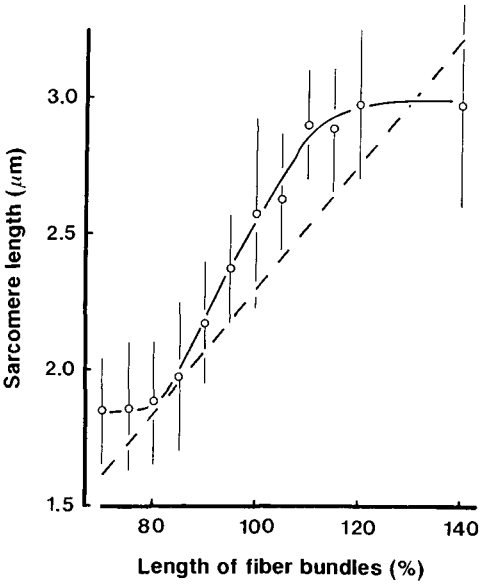

Fig. 2. Relationship between sarcomere length and fixed length of fiber bundles. Fiber bundles were fixed at various lengths and immersed in a Krebs-Ringer's solution (120 mM KCl, 1.2 mM $MgCl_2$, 1.3 mM $CaCl_2$, and 26 mM Na-phosphate buffer, pH 7.4) for 24 h at 5°C. Fiber bundles were homogenized, and sarcomere lengths were measured under a phase contrast microscope. Broken line, calculated values of sarcomere lengths expected from fixed lengths of fiber bundles.

性の増減に程度の差は認められるものの，骨格に付けたまま貯蔵した筋肉，骨格から外して貯蔵した筋肉からの両方の筋原線維間で類似していた。また，この死後筋肉中の筋原線維 K^+-ATPase 活性の増減は，死後筋肉におけるサルコメア長の変化[1] とよく対応していた。筋線維及び筋原線維を形態的に観察し，アクチンフィラメントとミオシンフィラメント間の滑りによって筋肉の収縮と弛緩は起こるという "滑り説"[17,18] と，アクトミオシンの K^+-ATPase 活性はアクチンとミオシン間の結合の程度により阻害されるという事実[13] を考慮すると，死後筋肉におけるサルコメアの長さが短縮してから元の長さに復元するという結果は Fig. 1 に示された死後筋肉における筋原線維 K^+-ATPase 活性の変化とよく対応しており，サルコメア長の短縮およびその復元，すなわちアクチンフィラメントとミオシンフィラメント間の結合の程度が筋原線維 K^+-ATPase 活性の低下およびその後の増大に反映していることが示唆された。このことを確認するために，種々の長さのサルコメア長を有する筋原線維を調製した。HATTORI と TAKAHASHI の方法[7] に従い，長さを変えて作成した筋線維束から調製した筋原線維のサルコメア長の実測値と期待値の関係を Fig. 2 に示した。サルコメアが 2.30 μm の静止長を持つ筋原線維が得られるように固定した筋線維束の長さを 100 として，その長さから筋線維束を 140% まで引っ張り，あるいは 70% までたるませて固定した。それぞれの筋線維束から調製した筋原線維のサルコメア長は，筋線維束を固定時に期待した期待値とは違っており，しかも直線的ではなくS字形の変化を示した。それらの種々の長さの筋原線維を用いて K^+-ATPase 活性を測定した結果を Fig. 3 に示した。静止長である 2.30 μm よりも短いサルコメア長をもつ筋原線維においてはアクチンフィラメントとミオシンフィラメントが完全に重なり会っているが，これらの場合にはサルコメア長が変化しても，その K^+-ATPase 活性値は一定であった。一方，サルコメア長が 2.30 μm 以上の場合にはサルコメア長の増加に比例して筋原線維の K^+-ATPase 活性値も増加し，2.90 μm のサルコメア長をもつ筋原線維の K^+-ATPase 活性は，静止長よりも短いサルコメア長をもつ筋原線維の K^+-ATPase 活性の約 1.5 倍まで活性値が増加した。ミオシンの濃度を 0.55 mg/ml と一定にして，添加するアクチン量を段階的に変えたアクチンとミオシンの量比の異なる合成アクトミオシンの K^+-ATPase 活性の変化を Fig. 4 に示した。アクチンの存在しないミオシンのみの K^+-ATPase 活性が最も高い活性値を示し，アク

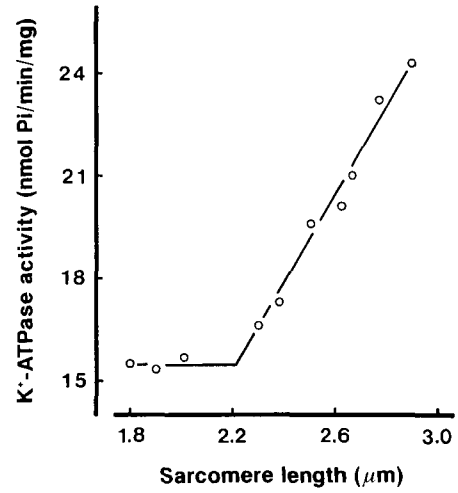

Fig. 3. Relationship between sarcomere length myofibrillar K^+-ATPase activities. Fiber bundles were fixed at various lengths and immersed in a Krebs-Ringer's solution for 24 h at 5°C. Myofibrils were prepared by method of ETLINGER et al. Sarcomere lengths and K^+-ATPase activities were measured under the following conditions; 2 mg/ml of myofibrils, 0.15 M KCl, 4 mM EDTA, 4 mM ATP, and 20 mM Tris-maleate buffer, pH 7.5, at 25°C.

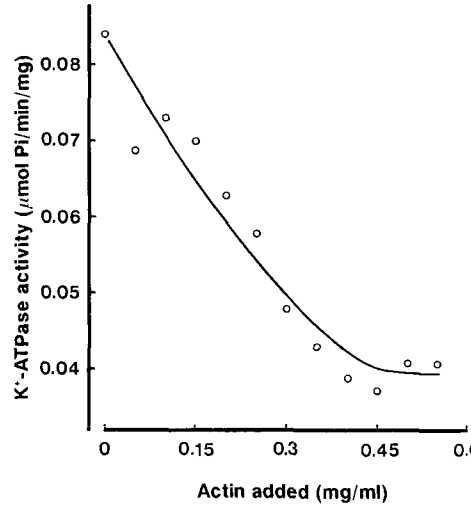

Fig. 4. Effect of actin on the K^+-ATPase activities of myosin. After the addition of various amounts of actin to 0.55 mg/ml of myosin, K^+-ATPase activities were measured under the following conditions; 0.55 mg/ml of myosin, various amounts of actin, 0.15 M KCl, 4 mM EDTA, 4 mM ATP, and 20 mM Tris-maleate buffer, pH 7.5.

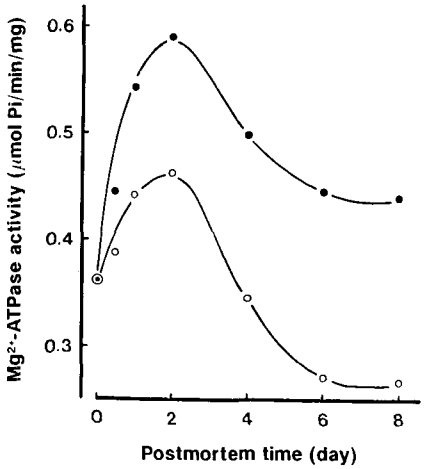

Fig. 5. Postmortem changes in Mg^{2+}-ATPase activities of myofibrils. Rabbit skeletal muscles excised immediately after death (●) or attached to skeleton (○) were stored at 5°C. At appropriate time intervals, myofibrils were prepared from stored muscles, and Mg^{2+}-ATPase activities were measured under the following conditions; 1 mg/ml of myofibrils, 0.15 M KCl, 4 mM $MgCl_2$, 0.01 mM $CaCl_2$, 4 mM ATP, and 20 mM Tris-maleate buffer, pH 7.0, at25°C.

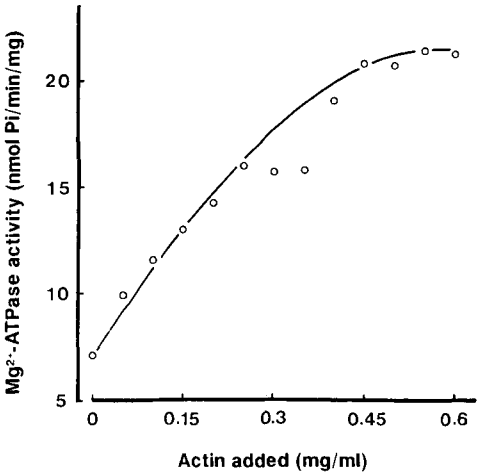

Fig. 6. Effect of actin on the Mg^{2+}-ATPase activities of myosin. After the addition of various amounts of actin to 0.55 mg/ml of myosin, Mg^{2+}-ATPase activities were measured under the following conditions; 0.55 mg/ml of myosin, various amounts of actin, 0.15 M KCl, 4 mM $MgCl_2$, 0.01 mM $CaCl_2$, 0.3 mM ATP, and 20 mM Tris-maleate buffer, pH 7.5, at 25°C.

チンの添加量増加に反比例して活性値は減少した。アクチンとミオシンの量比が1:1である合成アクトミオシンの K^+-ATPase 活性の値は，ミオシンのみの K^+-ATPase 活性の値の約2分の1であった。Fig. 5に，10°C で貯蔵した筋肉から一定時間経過後に調製した筋原線維の Mg^{2+}-ATPase 活性の変化を示した。骨格に付けたまま貯蔵した筋肉から調製した筋原線維においては，その活性値の死後時間による変化は死直後の 0.365 (μ mol Pi/min/mg) から，硬直期には 0.470 に増加し，その後死後時間の経過，すなわち熟成の進行とともに徐々に減少して，熟成の完了期には 0.265 まで減少した。この値は硬直期の活性値の約 60% であった。一方，骨格から外して貯蔵した筋肉から調製した筋原線維においては，硬直期に活性値が 0.595 まで急激に増加した。骨格に付けたまま貯蔵した筋肉から調製した筋原線維の場合と同様に，熟成期間に活性の減少が起き，熟成の完了期の活性値は 0.440 と硬直期の約 70% の値であった。Fig. 6 にミオシンの濃度を 0.55 mg/ml と一定にし，アクチンの添加量を変えてアクチンとミオシンの量比の異なる合成アクトミオシンの Mg^{2+}-ATPase 活性の変化を示した。合成アクトミオシン中のアクチンの含量が増加するにつれて Mg^{2+}-ATPase 活性も増加した。アクチンとミオシンを等量混合した合成アクトミオシンの Mg^{2+}-ATPase 活性値は，ミオシンだけの場合の約3倍であった。

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に復元する[1,6]が，この時点では筋肉中の ATP は完全に消失している[19]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。貯蔵した筋肉から調製した筋原線維におけるサルコメアは，死後の筋細胞内の ATP の消失，pH の低下，Ca^{2+} 濃度の上昇とともに短縮する[19]が，この短縮の程度は筋肉を骨格に付けたまま貯蔵した場合と，骨格から外して貯蔵した場合では明かな違いがみられる。その理由は骨格に筋肉の両端が密着していると，筋原線維の自由な収縮が妨げられ張力を発生するので，筋節の短縮が一定の長さで止まるが，骨格による拘束がない場合には筋原線維は自由な収縮を起こすためと考えられる。

食肉の熟成中に起こるサルコメア長の復元は，筋原線維からのフィラメントの解離量の増大と平行して起こることが明らかにされており[6]，このことは，サルコメア

長の復元がアクチンとミオシン間の結合が弱まったことによるものであることを示している。食肉の熟成中のアクチンとミオシン間の結合の強さの変化を筋原線維のATPase 活性の変化を測定することにより検討してみると，死後硬直時までは筋原線維の K^+-ATPase 活性は死直後の値より低下し，筋原線維の Mg^{2+}-ATPase 活性は死直後の値よりも増加した。しかも骨格から外して貯蔵した場合の方が，骨格に付けて貯蔵した場合よりもその変化の程度は大きかった。これらの結果はいずれも死後硬直時にアクチンとミオシン間の結合が強くなったことを表わしており，死後硬直時にはサルコメア長が短縮する[1]というこれまでの結果ともよく一致している。アクチンとミオシンの結合量が多くなれば，K^+-ATPase の活性値は減少するが，一方，Mg^{2+}-ATPase の活性値は増大するという合成アクトミオシンATPase の活性の測定結果も，死後硬直時における筋原線維のATPase 活性の変化をよく説明している。

死後硬直の解除が始まる死後3日目から熟成期にかけて，筋原線維の K^+-ATPase 活性が徐々に増加し，一方筋原線維の Mg^{2+}-ATPase 活性が徐々に低下することは，アクチンとミオシン間の結合が熟成期に脆弱化することを示すものであり，サルコメア長の復元及びフィラメントの解離量の増加のいずれの変化[6]ともよく一致する。アクチンとミオシン間の結合の脆弱化によって起こるサルコメア長の復元，すなわち細いフィラメントと太いフィラメントの重なり合いの減少により，ミオシンに結合するアクチンの量の減少が熟成期の筋原線維のATPase の活性変化に影響を与えていると考えられるので，長さの異なるサルコメアから構成される筋原線維の K^+-ATPase 活性を測定したところ，全てのミオシンがアクチンと結合していると考えられる 2.20 μm 以下のサルコメアから構成される筋原線維の K^+-ATPase 活性は一定であった (Fig. 3)。アクチンと結合していないミオシンが存在する 2.30 μm 以上のサルコメア長を有するサルコメアから構成される筋原線維の K^+-ATPase 活性は，サルコメア長が長くなるにともない直線的に増加した。一方，サルコメア長の変化は，骨格に付けて貯蔵した場合と骨格から外して貯蔵した場合のいずれにおいても，サルコメア長が 2.30 μm 以内の範囲で変化することが明らかにされている[6]。このことは，死後硬直時に短縮したサルコメア長が復元することそれ自体は，熟成中の食肉における筋原線維の ATPase 活性には関与しておらず，アクチンとミオシン間の結合の脆弱化が直接的にサルコメア長の復元と筋原線維の ATPase 活性の変化に反映しているということを示している。食肉の熟成中に起こるアクチンとミオシン間の結合の脆弱化は，パラトロポミオシンがアクチンに結合することによって引き起こされることが明らかにされており[5]，骨格に付けたまま貯蔵した筋肉と骨格から外して貯蔵した筋肉のいずれにおいても，パラトロポミオシンは同じようにアクチンに結合することによってアクチンとミオシン間の結合を弱め，サルコメア長の復元程度の違いは骨格による拘束の有無によるものであると考えられる。従って，食肉の熟成中に起こる筋原線維の K^+-ATPase 活性および Mg^{2+}-ATPase 活性の変化は，サルコメア長の復元[6]と同様に，10^{-4} M に上昇した筋漿 Ca^{2+} の作用によって筋原線維の A 帯両端部から遊離したパラトロポミオシンのアクチンへの結合[4]がミオシンのアクチンへの結合を不安定化し，アクチン・ミオシン間硬直結合が脆弱になることによってひき起こされると結論される。

V. 要　　約

死後筋肉における筋原線維のサルコメア長の変化をアクチン・ミオシン間相互作用の変化として捕らえ，筋原線維性 ATPase 活性を指標として，食肉の熟成中におけるアクチン・ミオシン間相互作用に対する筋原線維の新しいタンパク質・パラトロポミオシンの影響を検討した。結果の概要は以下の通りである。

(1) 屠殺後 10°C に貯蔵した筋肉から調製した筋原線維の K^+-ATPase 活性は硬直時に一旦減少するが，その後の熟成期間中に回復した。

(2) 一方，Mg^{2+}-ATPase 活性は K^+-ATPase 活性と正反対の変化を示した。

(3) 単離精製したミオシンに添加するアクチン量を変化させた場合，K^+-ATPase 活性はアクチンの濃度に依存して低下し，逆に Mg^{2+}-ATPase 活性は増加した。

(4) (1) および (2) の変化は (3) の結果から，熟成中の食肉における筋原線維のサルコメア長の変化が，ミオシンとアクチンの結合量に変化をもたらした事に起因すると考えられるので，種々のサルコメア長を持つ筋原線維を調製した。

(5) 2.4 μm 以上のサルコメア長を持つ筋原線維の K^+-ATPase 活性はサルコメアが長くなる程高い活性を示したが，サルコメアの長さが 2.3 μm 以下では変化がなかった。

(6) 死後筋肉におけるサルコメア長は，2.3 μm 以内で変化するという事実と，以上の結果から，硬直解除期に

おける筋原線維の K^+-ATPase 活性の増加と Mg^{2+}-ATPase 活性の減少は，食肉の熟成中に筋原線維のA帯両端から遊離したパラトロポミオシンのアクチンへの結合によりアクチン・ミオシン間硬直結合が脆弱化することによるものと結論された。

引用文献

1. 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
2. STROMER, M. H., GOLL, D. E. and ROTH, L. E.: Morphology of rigor-shortened bovine muscle and the effect of trypsin on pre- and postrigor myofibrils. J. Cell Biol., **34**: 431-445. 1967
3. 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
4. HATTORI, A. and TAKAHASHI, K.: Localization of paratropomyosin in skeletal muscle myofibrils and its translocation during postmortem storage of muscle. J. Biochem., **103**: 809-814. 1988
5. TAKAHASHI, K., YAMANOUE, M., MURAKAMI, T., NISHIMURA T. and YOSHIKAWA, R.: Paratropomyosin, a new myofibrillar protein, weakens rigor linkages formed between actin and myosin. J. Biochem., **102**: 1187-1192. 1987
6. YAMANOUE, M. and TAKAHASHI, K.: Effect of paratropomyosin on the increase in sarcomere length of rigor-shortened skeletal muscles. J. Biochem., **103**: 843-847. 1988
7. HATTORI, A. and TAKAHASHI, K.: Studies on the post-mortem fragmentation of myofibrils. J. Biochem., **85**: 47-56. 1979
8. ETLINGER, J. D., ZAX, R. and FISHMAN, D. A.: Compositional studies of myofibrils from rabbit striated muscle. J. Cell Biol., **68**: 123-141. 1976
9. PERRY, S. V. andGREY, 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
10. PERRY, S. V.: Myosin ATPase. p. 582-588. In: Methods in Enzymology, Vol. 2 (COLOWICK, S. P. and KAPLAN, N. O., eds) Academic Press, New York, 1955
11. REES, M. K. and YOUNG, M.: Studies on the isolation and molecular properties of homogenous globular actin. J. Biol. Chem., **242**: 4449-4458. 1967
12. SPUDICH, J. A. and WATT, S.: The regulation of rabbit skeletal muscle contraction. J. Biol. Chem., **246**: 4866-4871. 1971
13. COOKE, R. and FRANK, K.: All myosin heads from bonds with actin in rigor rabbit skeletal muscle. Biochemistry, **19**: 2265-2269. 1980
14. FISKE, C. H. and SUBBAROW, Y.: The colorimetric determination of phosphorus. J. Biol. Chem., **66**: 375-400. 1925
15. LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. and RANDALL, R. J.: Protein measurment with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem., **193**: 265-275. 1951
16. 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
17. HUXLEY, A. F. and NIEDERGERKE, R.: Structural changes in muscle during contraction. Nature, **173**: 971-973. 1954
18. HUXLEY, H. E. and HANSON, J.: Changes in the cross-striations of muscle during contraction and stretch and their structural interpretation. Nature, **173**: 973-976. 1954
19. BENDALL, J. R.: p. 227-274 In: Structure and Function of Muscle, Vol 3 (BOURNE, G. H ed.) Academic Press, New York, 1960

Summary

An important aspect of the meat tenderness during postmortem ageing concerns the intrinsic property of a myofibrillar protein, paratropomyosin. By measuring the ATPase activities of myofibrils, the effect of paratropomyosin on the actin-myosin interaction during the ageing of meat was examined in this study.

The K^+-ATPase activity of myofibrils from stored muscles decreased at the time of rigor mortis and was recovered during postrigor ageing. In cotrast, the Mg^{2+}-ATPase activity of myofibrils increased at the time of rigor mortis, and then decreased during postrigor ageing. Addition of the actin to the purified myosin inhibited the K^+-

ATPase activity of myosin, concurently, Mg^{2+}-ATPase activity of myosin increased. The change of the sarcomere length during ageing of meat looked like to change the degree of the binding between actin and myosin in myofibrils. The myofibrils having different sarcomere lengths were prepared. Although the K^{+}-ATPase activity of myofibrils, whose sarcomere lengths were more than 2.4 μm, increased according to lengthening of sarcomere length, the K^{+}-ATPase activity of myofibrils, whose sarcomere lengths were less than 2.3 μm, remained unchanged.

These results indicate that paratropomyosin which is translocated from its original position onto actin filaments during ageing of meat weakens the rigor linkages formed between actin and myosin.