



Title	食肉の熟成に伴う筋原繊維Z線の脆弱化機構に関する研究
Author(s)	島田, 謙一郎
Citation	北海道大学. 博士(農学) 甲第4173号
Issue Date	1997-03-25
DOI	10.11501/3122331
Doc URL	<a href="http://hdl.handle.net/2115/51428">http://hdl.handle.net/2115/51428</a>
Type	theses (doctoral)
File Information	000000307522.pdf



[Instructions for use](#)

食肉の熟成に伴う筋原線維Z線の  
脆弱化機構に関する研究

畜産学専攻 博士後期課程

島田謙一郎

①

目次

食肉の熟成に伴う筋原線維Z線の  
脆弱化機構に関する研究

北海道大学大学院農学研究科

畜産学専攻 博士後期課程

島田 謙一郎

## 目次

第 1 章	緒論	1
第 2 章	実験材料および実験方法	5
第 1 節	実験材料	5
第 2 節	実験方法	5
第 1 項	食肉の熟成	5
第 2 項	グリセリン処理筋線維束の調製	5
第 3 項	筋原線維の調製	5
第 4 項	筋原線維のTriton X-100処理	7
第 5 項	筋小胞体の調製	8
第 6 項	I-Z-I brushの調製	8
第 7 項	脂質の抽出	9
第 8 項	凍結切片の調製	10
第 9 項	光学顕微鏡による観察	10
第10項	電気泳動用試料の調製	10
第11項	SDS-ポリアクリルアミドゲルの調製法	11
第12項	電気泳動法	12
第13項	染色および脱色方法	12
第14項	デンストメトリーによる $\alpha$ -アクチニンの定量	12
第15項	イムノブロット法	12
第16項	薄層クロマトグラフィーによる脂質の同定	13
第17項	薄層自動検出装置 (TLC-FID法) による脂質 の同定	14

第18項	HPLCによる分析試料の調製法	15
第19項	HPLCによる各リン脂質成分の同定	16
第20項	筋原線維のCa処理	16
第21項	Z線の脆弱化の程度の測定	17
第22項	脂質の定量	17
第23項	脂質のCa結合能の検出	18
第24項	タンパク質濃度の測定	19
<b>第3章</b>	<b>実験結果</b>	<b>20</b>
第1節	食肉の熟成に伴うZ線の構造変化	20
第2節	Z線の構成成分	20
第1項	骨格構造を構成する成分	20
第2項	無定形物質を構成する成分	28
第3節	Z線を構成する脂質成分に及ぼすCa <sup>2+</sup> の影響	37
第1項	Z線の脂質成分の熟成に伴う変化	37
第2項	筋原線維のCa処理によるリン脂質の遊離と Z線の脆弱化	41
第3項	Z線構成脂質成分のCa結合性	56
<b>第4章</b>	<b>考察</b>	<b>67</b>
<b>第5章</b>	<b>要約</b>	<b>82</b>
	<b>謝辞</b>	<b>84</b>
	<b>引用文献</b>	<b>85</b>

## 第1章 緒論

我々が利用している食肉は、家畜や家禽の骨格筋であり、魚肉とは区別されている。また、心臓、肝臓および消化管などの内臓類は畜産副生物と呼ばれる。食肉の品質は、家畜および家禽の品種、年齢、性別、飼養条件、および熟成の良否などによって大きく左右される。食肉の品質を決定する五大要素は、軟らかさ、味、香り、多汁性および色調であるが、これらの要因の中で、消費者によって最も重視されるのが軟らかさである。家畜や家禽の骨格筋を食肉として利用する場合、屠畜後、骨格筋は非生理的条件におかれることになり、骨格筋の主成分である筋線維内で起こる様々の生化学的変化を経ることによって、食肉の物理化学的性質は生筋のそれとは大きく異なったものになる。すなわち、熟成することによって食肉は軟らかくなるとともに、風味の改善などの附加価値を獲得する。従って、良好な軟らかさの食肉を得るには、屠畜した後に一定の熟成期間が必要である。熟成期間は家畜の種によって異なり、5℃で熟成した場合、牛肉では10日以上、豚肉では5～7日間、鶏肉では半日～1日である<sup>1)</sup>。

食肉の一般的化学組成は、水分60～70%、タンパク質18～22%、脂質10～20%、その他（炭水化物、ビタミン、ミネラルなど）約2%であり、食肉の軟らかさに関係するのは専らタンパク質である。食肉中に存在するタンパク質は、その存在様式によって1) 解糖系の酵素群や色素タンパク質ミオグロビンなど筋漿（サイトゾル）に溶存するもの、2) ミトコンドリアや筋小胞体などの細胞内小器官を構築しているもの、3) 筋原線維を構成するミオシン・アクチンなど、および4) 筋肉内結

合組織を構成するコラーゲンなどの細胞外マトリックス成分に大別することができる。全タンパク質量に対してそれぞれが占めるおおよその割合は、筋漿のタンパク質30%、細胞内小器官のタンパク質5%、筋原線維のタンパク質60%、筋肉内結合組織のタンパク質5%である<sup>2)</sup>。これらのタンパク質の中で食肉の物性に直接影響を及ぼすのは、物理的衝撃に対して比較的堅固な高次構造を組んで存在する筋原線維と筋肉内結合組織であり、両者の状態によって食肉の軟らかさが規定される<sup>3)</sup>。換言すれば、食肉の硬さは筋原線維の構造および筋肉内結合組織の構造の機械的強度に依存している。

従って、熟成に伴う食肉の軟化は、筋原線維構造と筋肉内結合組織の脆弱化によってもたらされる。筋肉内結合組織は食肉の熟成中に変化しないと考えられてきた。しかし、最近のNishimuraら<sup>4-6)</sup>およびLiuら<sup>7-9)</sup>の構造変化に着目した研究成果によると、熟成に伴う結合組織の変化は、コラーゲン細線維自体が変化するのではなく、コラーゲン細線維同士を架橋しているプロテオグリカンの変化によって、細線維間の接着が脆弱になり、その結果筋肉内結合組織の脆弱化が熟成後期に起こることが明らかにされている。

一方、食肉の熟成に伴う筋原線維の脆弱化に関連する4種類の現象が明らかにされている。すなわち、1) 筋原線維のZ線の構造が脆弱になり物理的な力(ホモジナイズ)に対する抵抗性を失い、容易に切断されて筋原線維が小片となる<sup>10-12)</sup>。2) アクチン・ミオシン間に形成された硬直結合が脆弱になり、死後硬直時に短縮したサルコメア長が復元する<sup>10,13-17)</sup>。3) 筋原線維内に存在する細胞骨格タンパク質であるコネクチンのフィラメント<sup>18,19)</sup>やネブリンのフィラメント<sup>20,21)</sup>が断片

化する<sup>22-24)</sup>。4) 細胞骨格タンパク質であるデスミンが形成される中間径フィラメントが脆弱になることである<sup>25-27)</sup>。デスミンはLazarideとHubbardが発見した分子量5万のタンパク質で、中間径フィラメントを形成しZ線の周囲を取り巻き、隣合う筋原線維同士を連結すると共に細胞膜に結合し、筋線維における筋原線維の位置を固定している<sup>28)</sup>。

これらの筋原線維構造の脆弱化の要因として、骨格筋線維内に存在するカテプシン類やカルパインなどのプロテアーゼの関与が考えられたが、1) 食肉の熟成は通常3~5℃の低温で行われる、および2) 熟成に伴い乳酸の蓄積によりpHが5.5付近まで低下するという事実は、熟成中の食肉における諸条件はプロテアーゼの活性が発現する条件とは大きく異なっていることを示している<sup>30)</sup>。また、牛肉を5℃で無菌的に貯蔵してもプロテアーゼにより加水分解されてペプチドやアミノ酸は、食肉中の全タンパク質量の僅か2.3%に過ぎないというDaveyとGilbertの報告がある<sup>31)</sup>。この実験事実と食肉の熟成条件から考えると、プロテアーゼの作用によって筋原線維構造の脆弱化を説明することはできない。従って、熟成中に起こるプロテアーゼによるタンパク質の加水分解は食肉の軟化に関係するのではなく、生成されるペプチドやアミノ酸が呈味成分として働き、食肉の風味の改善に寄与していると考えるのが妥当であろう。

それでは、筋原線維の脆弱化は一体どのようにして惹起されるのであろうか？ 当畜産食品開発学講座では、熟成に伴う食肉の軟化機構をタンパク質の分子レベルで追究する過程で、前記の全ての筋原線維構造の脆弱化が0.1 mM $\text{Ca}^{2+}$ により最大に誘起されることを明らかにし、

数多くの実験事実に基づいてTakahashi<sup>30,32)</sup>は"食肉の軟化に関するカルシウム説"を提唱している。

食肉の熟成に伴う筋原線維Z線の脆弱化も、0.1 mM  $\text{Ca}^{2+}$ によって最大に誘起されるが<sup>33,34)</sup>、Z線の微細構造とその構成成分、およびZ線の脆弱化に対する $\text{Ca}^{2+}$ の作用機作の詳細については未だ明らかにされていない。また、安と高橋<sup>35)</sup>は鶏肉、豚肉、および牛肉の熟成中にZ線を構成するリン脂質の約30%が遊離することを報告している。そこで、本研究においては、熟成に伴うZ線の脆弱化機構を明らかにすることを目的として、Z線の構造および構成成分の同定、食肉の熟成に伴うそれらの変化、さらにZ線の脆弱化に対する $\text{Ca}^{2+}$ の作用機序について追究した。

## 第2章 実験材料および実験方法

### 第1節 実験材料

実験材料として、牛、豚、家兎および鶏の骨格筋を用いた。牛（黒毛和種×ホルスタイン種）、豚（ランドレース種）および家兎（日本白色種）の半腱様筋を、鶏（ロードアイランドレッド種）の深胸筋、浅胸筋、縫工筋、半腱様筋および平目筋を供試した。

### 第2節 実験方法

#### 第1項 食肉の熟成

屠鳥直後の鶏のと体より浅胸筋等を、屠畜後24時間後の豚および屠畜後48時間後の牛のと体より半腱様筋を採取し、貯蔵期間中の微生物の繁殖を抑制するため、0.5%アジ化ナトリウム溶液に浸漬したガーゼで骨格筋を包み、ポリエチレンフィルムで包装し、4°Cで熟成した。

#### 第2項 グリセリン処理筋の調製

骨格筋から筋線維方向に平行に太さ1~2 mm、長さ6~7 cmの筋線維束を切り出し、両端を竹ひごに固定した後、50%グリセロール、5 mM EGTAおよび10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) から成る溶液に浸漬し、4°Cで1~2日間静置した。新鮮な同溶液と交換して、-20°Cのフリーザーに30日間以上保存した。

#### 第3項 筋原線維の調製

屠殺直後の家畜および家禽から骨格筋を採取し、可能な限り筋肉内結合組織を除き、細切した後、PerryとGreyの方法<sup>36)</sup>あるいはTatsumiらによるEtlingerらの方法の改良法<sup>37)</sup>により筋原線維を調製

した。SDS-PAGE(SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動)用の筋原線維はPerryとGreyの方法により調製し、それ以外の実験にはTatsumiらによるEtlingerの改良法を用いた。

#### (1) PerryとGreyの方法

骨格筋を挽き肉にして5倍量(重量)の25 mM KCl, 5 mM EDTAおよび39 mM ホウ酸緩衝液(pH 7.1)から成る溶液を加え、Virtis型ホモジナイザー(ヒスコトロン超高速ホモジナイザーNS-60, 日音医理科器機製作所)を用いて、9,000 rpmで60秒間ホモジナイズした後、3,000 rpmで10分間遠心分離した。沈殿に5倍量の0.1 M KCl, 5 mM EDTAおよび39 mM ホウ酸緩衝液(pH 7.1)から成る溶液を加え、9,000 rpmで30秒間ホモジナイズした後、3,000 rpmで10分間遠心分離した。沈殿に対し、この操作をもう一度繰り返し筋原線維標品とした。

#### (2) Tatsumiらの改良法

屠畜直後の家畜の新鮮な骨格筋を採取し、筋肉内結合組織を除き、細切した後に、TatsumiらによるEtlingerらの方法の改良法により筋原線維を調製した。筋原線維の冷却収縮を防止するために、骨格筋重量の7.5倍量の0.1 M KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM NaN<sub>3</sub>, 2 mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>および10 mM トリス-マレイン酸緩衝液(pH 6.8)から成る室温の溶液を加え、Virtis型ホモジナイザー(ヒスコトロン超高速ホモジナイザーNS-60, 日音医理科器機製作所)を用いて、10,000 rpmで60秒間ホモジナイズした後、3,000 rpmで10分間遠心分離した。以上の操作はすべて室温で行った。沈殿に7.5倍量の0.1 M KCl, 5 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM NaN<sub>3</sub>および10 mM

トリス-マレイン酸緩衝液(pH 7.0)から成る冷却した溶液を加え、10,000 rpmで45秒間ホモジナイズした後、3,000 rpmで10分間遠心分離した。沈殿に7.5倍量の同様の組成の溶液を加え、10,000 rpmで30秒間ホモジナイズした後、3,000 rpmで10分間遠心分離した。沈殿に7.5倍量の0.1 M KCl, 5 mM EGTA, 5 unit/ml ペニシリンGカリウム, 1 mM DTT, 1 mM NaN<sub>3</sub>および10 mM トリス-マレイン酸緩衝液(pH 7.0)から成る溶液を加え、8,000 rpmで10秒間ホモジナイズした後、3,000 rpmで10分間遠心分離した。再度、8,000 rpmで10秒間ホモジナイズした後、筋肉内結合組織を除去するために、ガラス棒を立てたビーカーに移して30分程度冷蔵庫内でマグネティックスターラーによりゆっくり攪拌し、ガラス棒に筋肉内結合組織を絡み付かせた後、ガーゼで濾過して4°Cで保存し、1週間以内に使用した。実験に使用する際は、0.1 M KCl, 5 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM NaN<sub>3</sub>および10 mM トリス-マレイン酸緩衝液(pH 7.0)から成る溶液で、2回洗浄したものを筋原線維標品とした。Ca処理する際には、5 mM EDTAを除いた組成の溶液で同様に洗浄したものを筋原線維標品とした。

#### 第4項 筋原線維のTriton X-100処理

屠鳥直後の鶏の深胸筋、縫工筋および平目筋からTatsumiらの改良法<sup>37)</sup>に従い弛緩した筋原線維を調製した。調製した筋原線維を0.1 M KCl, 1% Triton X-100, 5 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM NaN<sub>3</sub>および10 mM トリス-マレイン酸緩衝液(pH 7.0)から成る溶液に懸濁し、4°Cで20分間ゆっくり攪拌しながら処理した。次に、3,000 rpmで10分間遠心分離を行い、得られた沈殿を0.1 M KCl, 5 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM NaN<sub>3</sub>および10 mM トリス-マレイン酸緩衝液(pH

7.0)から成る溶液に懸濁し、再度3,000 rpm で10分間遠心分離した。同様の操作を2回繰り返したものをTriton X-100処理筋原線維とした。

#### 第5項 筋小胞体の調製

屠鳥直後の鶏の浅胸筋からOgawaの方法<sup>38)</sup>によって筋小胞体を調製した。一定量の浅胸筋をハサミで細切し、同量の冷却した0.01 N NaOH溶液を加え、10,000 rpmで20秒間ホモジナイズした。BTB試験紙でpHが6.4~6.8になるように0.01 N NaOH溶液を加えながら、3分ごとに3回ホモジナイズを繰り返した。懸濁液を2,400 gで20分間遠心分離し、その上澄液をさらに8,600 gで20分間遠心分離した後、上澄液は後述する筋小胞体のL-画分の調製に用いた。少量の50 mM KClおよび10 mM MOPSO-KOH(pH 6.8)溶液に懸濁した沈殿を2,400 gで20分間遠心分離した後、上澄液を8,600gで30分間遠心分離し、得られた沈殿を筋小胞体のH-画分とした。筋小胞体のL-画分は、以下の方法によって調製した。第1回目の遠心分離の上澄液を濾紙(東洋濾紙, No. 5A)で濾過し、20,000 gで70分間遠心分離した後、沈殿を少量の50 mM KClおよび10 mM MOPSO-KOH (pH 6.8)から成る緩衝液に懸濁した。懸濁液を5,000 gで10分間遠心分離し、上澄液をさらに54,500 gで30分間遠心分離し、得られた沈殿を筋小胞体のL-画分とし、前述のH-画分と混合して筋小胞体標品とした。

#### 第6項 I-Z-I brushの調製

筋原線維標品の一定量を採取し、Virtis型ホモジナイザー(ヒスコトロン超高速ホモジナイザーNS-60, 日音医理科器機製作所)を用いて、10,000 rpmで60秒間ホモジナイズし、懸濁液を10,000 rpmで10分間遠心分離した。得られた沈殿に0.6 M KCl, 10 mM  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ , 1 mM

MgCl<sub>2</sub> および 0.1 M リン酸カリウム緩衝液, pH 6.4 から成る Hasselbach-Schneider 溶液を加え, テフロンホモジナイザーで均一化した後, 攪拌しながら 4°C で 30 分間, ミオシンを抽出した。10,000 rpm で 10 分間遠心分離し, 得られた沈殿に, 同様の操作をもう一度繰り返した。沈殿に 0.1 M KCl, 5 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM NaN<sub>3</sub> および 10 mM トリス-マレイン酸緩衝液 (pH 7.0) から成る溶液を加え, テフロンホモジナイザーで均一化し, 10,000 rpm, 10 分間遠心分離した。この操作を 2 回繰り返し, 得られた沈殿を同じ組成の溶液に懸濁し, I-Z-I brush 標品とした。

#### 第 7 項 脂質の抽出

調製した I-Z-I brush 標品の懸濁液から 1 ml ずつスクリーキャップ付き試験管に採取し, Bligh と Dyer の方法<sup>39)</sup>に従って, 脂質を抽出した。2.5 ml のメタノールと 1.25 ml のクロロホルムを加え, キャップをしてから 2 分間 Vortex ミキサーで攪拌し, 25°C で約 90 分間静置してから, 1.25 ml のクロロホルムを加えて, 再び 30 秒間攪拌した。更に, 1.25 ml の 0.1 M KCl, 5 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM NaN<sub>3</sub> および 10 mM トリス-マレイン酸緩衝液 (pH 7.0) から成る溶液を加え, 30 秒間攪拌後に, 3,000 rpm で 5 分間遠心分離した。上層のメタノール・水層, 中間のフラッフ層, および下層のクロロホルム層の 3 層のうち下層のクロロホルム層の一定量を試験管に採取し, 吹き付け式試験管濃縮機 (MGS-2100, 東京理化学器械) を用いて窒素ガス気流下で, 濃縮乾固した。脂質組成分析用の試料は, デシケータ内で, 十分に乾燥させて, 重量法により脂質の重量を測定した後に, クロロホルムに溶解させて -30°C で保存した。

#### 第8項 凍結切片の調製

Tokuyasuの凍結超薄切片の作成方法<sup>40)</sup>に従い、光学顕微鏡用の切片を作成した。-20°Cで貯蔵しておいたグリセリン処理筋を0.15 M NaCl, 20 mM リン酸緩衝液(pH 7.2)および0.01% NaN<sub>3</sub>から成る溶液(PBS)に浸漬し、4°Cで一晩振とうすることにより、グリセリンを除去した。PBSで2.5%に希釈したグルタルアルデヒド溶液を用いて4°Cで3時間固定した後、PBSで3回洗浄し、氷晶形成防止の為、20% PVP(ポリビニルピロリドン K-15, 分子量1万, キシダ化学), 1.8 M 蔗糖, 83 mM リン酸緩衝液(pH 7.4)および10 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>から成る溶液(PVP・蔗糖液)中で、一晩振とうした。PVP・蔗糖液が十分に浸透した後、OCTコンパウンド(Tissue-Tek, Miles, USA)を用いてクライオミクロトーム用試料台に試料を載せ、試料台ごと液体窒素にすばやく入れて急速凍結を行った。急速凍結した試料は液体窒素中で保存し、ガラスナイフを用いたクライオミクロトーム(Reichert Ultracut-S, Leica)により厚さ2 μmの切片を作成した。切片を回収し、0.1%(w/v)のポリ-L-リジン溶液(Sigma, USA)でコートしたカバーガラスに載せ、PBSで洗浄後、スライドガラス上にマニキュアで封入した。

#### 第9項 光学顕微鏡による観察

凍結切片および調製した筋原線維は、共焦点レーザー顕微鏡(LSM 310, Carl Zeiss)を用いて488 nmのアルゴンイオンレーザーを光源として位相差モードおよび微分干渉モードで観察し、画像は、TIFF形式で統一しMO diskに保存した。

#### 第10項 電気泳動用試料の調製

第3項(1)で調製した筋原線維標品に5 mM EDTAおよびトリス-塩酸緩衝液(pH 8.0)を適当量加えて懸濁させ、6,000 rpmで5分間遠心分離した。さらに、この操作をもう一度繰り返し、得られた沈殿を1% SDS, 1%  $\beta$ -メルカプトエタノール, 5 mM EDTA, 5 mM トリス-塩酸緩衝液(pH 8.0)および10%グリセロールから成る溶液に懸濁し、100°Cで2分間加熱後、電気泳動用試料として-80°Cで凍結保存した。

#### 第11項 SDS-ポリアクリルアミドゲルの調製法

7.5-17% ポリアクリルアミドグラディエントスラブゲルは Laemmliの方法<sup>41)</sup>に従い、0.375 M トリス-塩酸(pH 8.6), 0.1% SDS, 1.75% (w/v) または3.3% (w/v) のグリセロール, 0.75 mg/ml 過硫酸アンモニウムおよび0.57  $\mu$ l/ml TEMED (N,N,N',N'-tetramethyl ethylene diamine)を含む7.5%アクリルアミド溶液(アクリルアミド:ビスアクリルアミド = 37.5:1)と17%アクリルアミド溶液(対ビス比 37.5:1)を等量ずつ、グラディエントミキサーとペリスタリックポンプを使用して間隙 2.0 mm のセル内に注入し、その上部に飽和イソブタノール水溶液を重層した後、1時間以上放置して、アクリルアミドを重合させ、分離ゲルとした。飽和イソブタノール水溶液を除き、脱イオン水で良く洗浄した後、余分な水分を拭き取り、0.125 M トリス-塩酸 (pH 6.8), 0.1% SDS, 0.77 mg/ml 過硫酸アンモニウムおよび2.8  $\mu$ l/ml TEMED (N,N,N',N'-tetramethyl ethylene diamine)を含む4%アクリルアミド溶液(アクリルアミド:ビスアクリルアミド = 37.5:1)を分離ゲルの上部に流し込み、サンプルコームを差し込んで、室温で30分間静置して、アクリルアミドを重合させ、濃縮ゲルとした。

### 第12項 電気泳動法

電気泳動装置は、スラブゲル電気泳動装置 (KS-8000型, マリソル) およびマイクロスラブゲル電気泳動装置 (KS-8010型, マリソル) を用いて, 15 ~ 25  $\mu$ l の試料が濃縮ゲルから分離ゲルに入るまでは 25 mA/plate の電流で, 引き続いて 50 mA/plate の電流で泳動した。電気泳動用緩衝液は, Laemmli の泳動用緩衝液<sup>41)</sup>, すなわち 25 mM トリスアミノメタン, 192 mM グリシンおよび 0.1 % SDS 溶液を用い, 4 °C で泳動した。

### 第13項 染色および脱色方法

泳動後, ゲルを 0.1% Coomassie Brilliant Blue R-250, 50% メタノールおよび 10% 酢酸から成る溶液に入れ, 約 40 °C で 30 分間染色し, 次に 50% メタノールおよび 10% 酢酸から成る脱色液で, ある程度脱色した後に, 5% メタノールおよび 7.5% 酢酸から成る脱色液で十分に脱色した。

### 第14項 デンシトメトリーによる $\alpha$ -アクチニンの定量

$\alpha$ -アクチニン含量は, 完全に脱色したゲルをデンシトメータ (島津二波長フライングスポットスキャナー, CS-9000) にかけて波長 550 nm で得られたデンシトグラムから, 筋原線維の全タンパク質量に対する割合として求めた。

### 第15項 イムノブロット法

電気泳動を行ったスラブゲルからウェスタン・ブロット法<sup>42)</sup>によりタンパク質をニトロセルロース膜 (Bio-Rad 社製, 孔径 0.45  $\mu$ m) に 150 mA で 5 時間, 室温で転写した。転写用緩衝液としては 25 mM トリス, 0.192 M グリシン, 0.1% SDS および 20% エタノールから成る

溶液を用いた。転写終了後、脱イオン水で膜の両面を十分に洗浄し、室温で乾燥させた後、濾紙に挟み使用時まで4°Cで保存した。転写膜の一部を切り出し、0.1% ポンソーSおよび5% 酢酸から成る溶液で染色した後、7% 酢酸で脱色した。ポンソーS未染色の転写膜を用いて10% のスキムミルクおよび0.1%  $\text{NaN}_3$ を含むPBSにより25°Cで1時間以上ブロッキングを行った後、0.05% Tween 20および0.1%  $\text{NaN}_3$ を含むPBSで500倍に希釈した抗 $\alpha$ -アクチニン抗血清と25°Cで1時間反応させた。その後、0.05% のTween-20を含むPBS（以下T-PBSと略記する）で5分間の洗浄を3回繰り返した。次に、0.1% チメロサル（エチル化水銀チオサリチル酸ナトリウム、ナカライテスク社製）を含んだT-PBSで2,000倍に希釈したペルオキシダーゼ標識抗ヤギ抗ウサギIgG(H+L)抗体（Bio-Rad社製）と25°Cで30分間反応させた後、T-PBSで5分間の洗浄を3回繰り返した。次に脱イオン水でよく洗浄した後、50 mM リン酸ナトリウム緩衝液（pH 7.5）、0.3%  $\text{CoCl}_2$ 、0.3%  $(\text{NH}_4)_2\text{Ni}(\text{SO}_4)_2$ 、0.028%  $\text{H}_2\text{O}_2$ およびDAB（3,3-ジアミノベンジン-4 塩酸塩、同仁化学研究所社製）から成るペルオキシダーゼ基質溶液で発色させた。発色後、脱イオン水で数回洗浄した後、室温で乾燥し保管した。なお、抗 $\alpha$ -アクチニン抗血清は鶏浅胸筋からSDS-PAGEにより精製した $\alpha$ -アクチニンを抗原として家兔を免疫し、その抗血清を用いた。

#### 第16項 薄層クロマトグラフィーによる脂質の同定

第7項の方法に従ってI-Z-I brushから抽出された脂質中の成分を薄層クロマトグラフィーを用いて同定した。展開溶媒としてヘキサン：ジエチルエーテル：酢酸=80：30：1を、担体にシリカゲル60を使っ

た濃縮ゾーン付きHPTLCプレート (10 cm×10 cm, Merk社) を用いた。デシケータ内に保存しておいたプレートを100℃で15分間加熱することにより再活性化し、試料を塗布して二槽式展開槽の一方にプレートを入れ、プレートの反対側に展開溶媒を入れ、密閉後30～60分間放置してから展開槽を傾け展開溶媒をプレート側に流し込むことにより展開を開始した。標準物質として、コレステロールエステル、トリアシルグリセロール、遊離脂肪酸、コレステロールおよびホスファチジルコリンから成るTLC Mix40 (Larodan Fine Chemical AB) を用いた。展開後、ドライヤーを用いてプレートを乾燥させた後、モリブデンブルーに5分間、蒸留水に25秒間、さらにエタノールに10分間浸漬した。プレートを取り出してドライヤーの冷風で乾燥させた。約100℃に加温したホットプレートにのせ発色させてから写真撮影し (富士フィルム社製, ミニコピー), 標準物質のRf値より試料中の成分を同定した。硫酸を含んだ溶液で発色させると空気中の水分の吸湿により発色像自体が時間の経過に伴い劣化するため発色と同時に写真撮影した。モリブデンブルーはRyuとMacCossの方法<sup>43)</sup>に従って調製した。すなわち、三酸化モリブデン 8 gを70%硫酸200 ml中で攪拌しながら煮沸して溶解したのちに室温にしたものをA液として、0.4 gの粉末モリブデンをA液100 mlに加え、1時間煮沸した後に室温にしたものをB液とした。A液とB液を等量混合してろ過し、ろ液を2倍容の水で希釈した。この希釈液と酢酸を4:1の割合で混合して3-4日放置してから使用した。このようにして調製したモリブデンブルーは、6ヶ月間は安定であった。

第17項 薄層自動検出装置 (TLC-FID法)<sup>44)</sup>による脂質の同定

薄層クロマトグラフィーにより同定した脂質の確認および脂質の構成比を薄層自動検出装置（イアトロスキャン TH-10, ヤترون, 以下, イアトロスキャンと略記する）によって求めた。脂質の同定には, 薄層クロマトグラフィーに用いたのと同じ標準物質を用いた。イアトロスキャン専用の棒状薄層（クロマロッド-S III, ヤترون）を空焼きして, 表面をクリーニングした後に試料を1~2  $\mu$ l添加し, 薄層クロマトグラフィーの際と同様にヘキサン:ジエチルエーテル:酢酸=80:30:1の展開溶媒によって最初の展開を行い, 80~90°Cで2分間乾燥させ, 溶媒のフロントからRf値0.3に対応する部分まで分析し, その後クロロホルム:メタノール:水=65:25:4から成る展開溶媒で2回目の展開を行った。同様に乾燥し, 溶媒のフロントから原点までのすべてを分析した。なお, スキャンスピードは30 sec/scanで行った。脂質の構成割合は, 個々に分離同定されたピーク面積が全体のピーク面積に対して占める割合で表わした。2回目の展開で分離された各ピーク面積の合計をリン脂質の総量とした。

#### 第18項 HPLCによる分析試料の調製法

Hamiltonらの方法<sup>45)</sup>に準じて, I-Z-I brushから抽出された脂質中の極性脂質成分をSep-Pack シリカカートリッジ（セップパックプラス, Waters)を用いて分離した。すなわち, Sep-Pack シリカカートリッジに試料500  $\mu$ lを供し, 約 25 ml/minの流速のクロロホルム 30 mlで中性脂質を, 次いでメタノール 30 mlで極性脂質を溶出させ, 吹き付け式試験管濃縮機（MGS-2100, 東京理化学器械）を用いて窒素ガス気流下で, 濃縮乾固した。これを500  $\mu$ lのクロロホルムに溶解し, HPLC用試料とした。

#### 第19項 HPLCによる各リン脂質成分の同定

Sasakiの方法<sup>46)</sup>に従い、10  $\mu$ lの試料を Waters  $\mu$ Bondasphere 5  $\mu$  NH<sub>2</sub> 100 Åカラム（直径 3.9 mm×長さ150 mm）に導入し、流速 1.0 ml/mlでアセトニトリル：メタノール：0.2%トリエチルアミン = 64:28:8(V/V)から成る溶液(pH 3.0)によって溶出し、溶出液の205 nmにおける吸光度を測定した。標準リン脂質として、卵黄のホスファチジルコリン、牛脳のスフィンゴミエリン、豚肝臓のホスファチジルエタノールアミン、豚肝臓のリゾホスファチジルコリン、豚肝臓のホスファチジルイノシトールおよび牛脳のスフィンゴセリンから成るリン脂質キット（Serdary Research Laboratories, UK）を用い、溶出時間からリン脂質を同定し、ピーク面積の占める割合から構成割合を求めた。イオンペアー試薬はトリエチルアミン(Pierce, USA)を用い、pHをリン酸で3.0に調整した。

#### 第20項 筋原線維のCa処理

第3項(2)で調製した筋原線維を、0.1 M KCl, 1.1  $\mu$ M カルパスタチン, 1 mM DTT, 1 mM NaN<sub>3</sub>および10 mM トリス-マレイン酸緩衝液(pH 7.0)から成る溶液に懸濁し、13時間ゆっくりと攪拌した後、0.2 M CaCl<sub>2</sub>を添加して溶液の最終組成を7 mg/ml 筋原線維, 0.1 M KCl, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.1  $\mu$ M カルパスタチン, 1 mM DTT, 1 mM NaN<sub>3</sub>, 10 mM トリス-マレイン酸緩衝液(pH 7.0)とし、マグネティックスターラーでゆっくりと攪拌して筋原線維をCa処理した。10分経過後を0時間とし、経時的に採取して実験に供した。対照として、0.1 mM CaCl<sub>2</sub>を5 mM EGTAに置き換えた溶液で同様に処理した。なお、Ca処理はすべて4°Cで行い、カルパスタチンは、遺伝子組み換え技術

により生産された分子量約14,000, 137アミノ酸残基から成るドメイン Iを用いた (Code No. 7316, Takara)。

#### 第21項 Z線の脆弱化の程度の測定

Ca処理した筋原線維の一定量を経時的に採取し, Virtis 型ホモジナイザー (ヒスコトロン超高速ホモジナイザーNS-60, 日音医理科器機製作所) を用いて, 10,000 rpmで60秒間ホモジナイズし, 適当に希釈した後, 位相差顕微鏡 (BH-2型, Olympus) により1,000倍で観察した。Z線の脆弱化の程度は, Takahashiらの方法<sup>10)</sup>に従い, 500個以上の筋原線維を観察して, 5個以上のサルコメアから成る筋原線維と1-4個のサルコメアから成る小片の数 [ F ]を数えて, 1-4個のサルコメアから成る筋原線維の数 [ F ]が全体[ $\Sigma$ ]に占める割合を求め, Z線の脆弱化の程度とした。

#### 第22項 脂質の定量

抽出したリン脂質中の無機リン酸を定量し, その量を25倍することによりリン脂質の重量を求めた。無機リン酸の定量はBartlett法<sup>47)</sup>に従った。すなわち, 抽出した試料の2 mlを濃縮乾固し, 試験管に蒸留水200  $\mu$ lを加え, 10 N 硫酸 0.5 mlを加えてよく攪拌してからビー玉を試験管の上に載せ, ブロックヒーターにより150°Cで3時間以上加熱し湿式灰化を行った。水冷し, 30%過酸化水素 100  $\mu$ lを加え, 再び150°Cで2時間以上加熱し, 試料が完全に透明になったところで加熱を終了した。水冷後, 0.22%モリブデン酸アンモニウムを加え, Vortex ミキサーで攪拌し, 直ちに0.5 mlの Fiske-Subbarow 試薬<sup>48)</sup> (0.125 gの1-アミノ-2-ナフトール-4-スルホン酸, 0.25 gの亜硫酸ナトリウムおよび7.5 gの亜硫酸水素ナトリウムを50 mlの水に溶解し,

スターラーでよく攪拌した後、ろ紙でろ過し暗所に保存したもので、調製後、1週間以内に使用)を加えて攪拌した。キャップを閉めて、沸とう水浴中で7分間加熱し、発色させた。分光光度計(U-3210形 自記分光光度計, 日立製作所)を用いて、830 nmにおける吸光度を測定した。標準物質として、リン酸二水素カリウム溶液(20  $\mu\text{g}$  リン/ml)を0, 0.2, 0.4, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0  $\mu\text{g}$ になるように希釈し、試料と同様に加熱し、検量線を作成し、無機リン酸量を算出した。なお、I-Z-I brushから抽出されたリン脂質の量は無機リン酸含量から求め、それにイアトロスキャンによって得られたリン脂質の割合の逆数を乗じて総脂質量を算出した。筋原線維に占める脂質の割合は、筋原線維のタンパク質100 g当たりの脂質のグラム数で表わした。

### 第23項 脂質のCa結合能の検出

Maruyamaらの方法<sup>49)</sup>およびTakahashiらの方法<sup>19)</sup>に準じて、<sup>45</sup>Caを用いたオートラジオグラフィにより脂質のCa結合能を調べた。即ち、予めメタノールで親水化処理を行ったPVDF膜(Bio-Rad社製, 孔径0.2  $\mu\text{m}$ )を約0.5 cm  $\times$  0.5 cmの正方形に切り、異なる濃度の脂質を含むクロロホルム溶液の一定量に浸漬し、1分後、取り出した膜を乾燥した。その膜を10  $\mu\text{Ci/ml}$  <sup>45</sup>CaCl<sub>2</sub>を含む0.1 M KCl, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 1 mM NaN<sub>3</sub>および10 mM トリス-マレイン酸緩衝液(pH 7.0)から成る溶液に12時間浸漬した。0.1 M KCl, 1 mM DTT, 1 mM NaN<sub>3</sub>および10 mM トリス-マレイン酸緩衝液(pH 7.0)から成る溶液に移し変えて、脂質が吸着していない膜がサーベイメーターで反応しなくなるまで洗浄を行った。十分に乾燥した膜をX線フィルム(富士写真フィルム, AIF NEW RX)に重ね鉛カセットに入れて、

-80℃のフリーザー中で24時間露光させた後、富士メディカルフィルムプロセッサ（FPM100, 富士写真フィルム）で現像した。放射線量を定量するために、試料を吸着させた膜とイメージングプレート（富士写真フィルム）を重ね、IPカセット（富士写真フィルム）に入れて1時間室温で露光させ、富士バイオイメージングアナライザー（BAS 1000, 富士写真フィルム）で検出した。

#### 第24項 タンパク質濃度の測定

タンパク質濃度はビウレット法<sup>50)</sup>および色素結合法<sup>51)</sup>を利用したプロテインアッセイ法（Bio-Rad社, USA）によって測定した。なお、プロテインアッセイ法による測定では牛血清アルブミンを標準物質として用いた。ビウレット法ではタンパク質 1 mg/ml の吸光係数を0.057としてタンパク質濃度を算出した。

## 第3章 実験結果

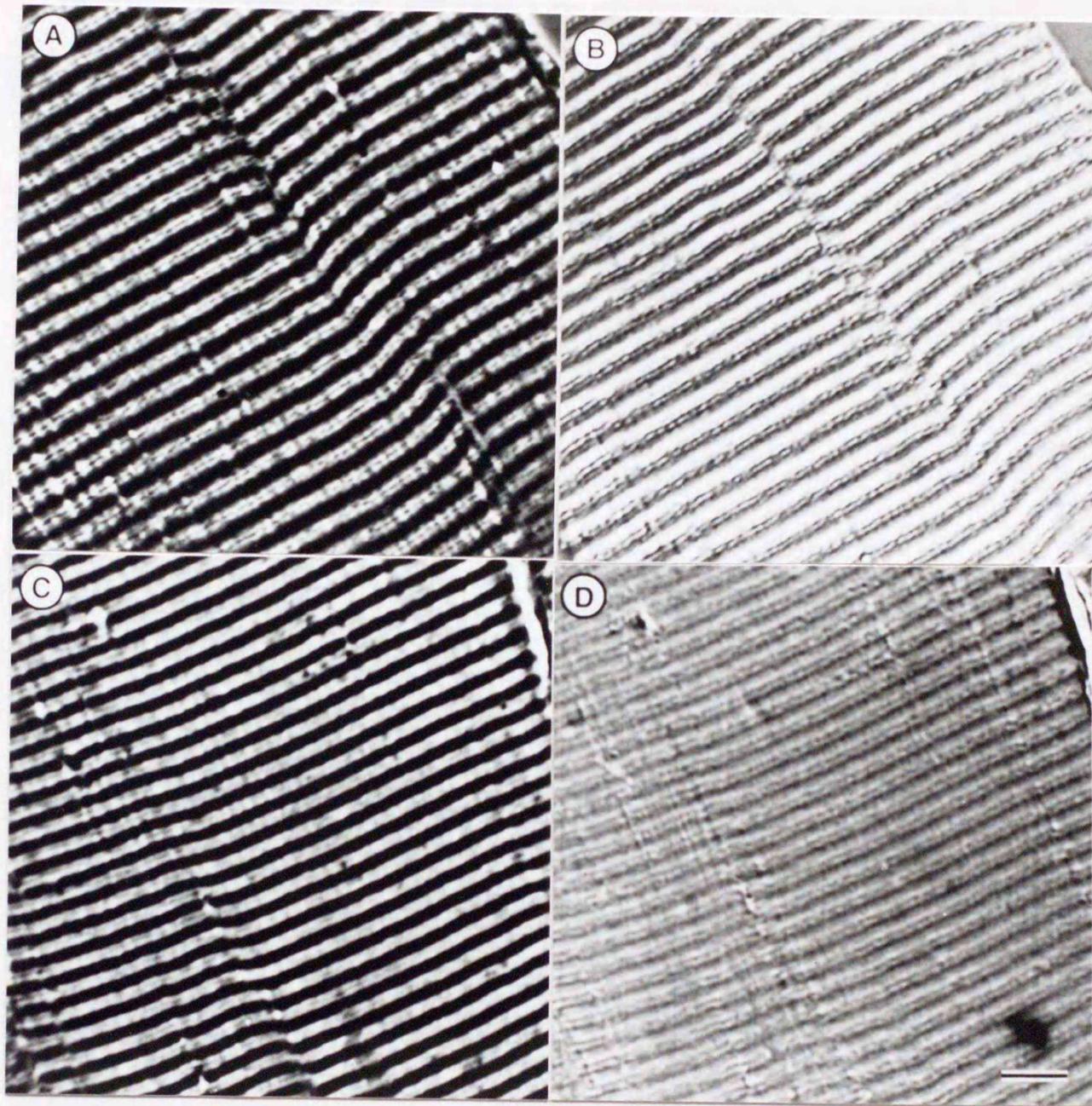
### 第1節 食肉の熟成に伴うZ線の構造変化

食肉の熟成に伴うZ線の構造変化に関するこれまでの研究は、単離した筋原線維の位相差顕微鏡による観察や食肉から作製した超薄切片の電子顕微鏡観察によって行われており、いずれの場合も試料作成の際の人工産物の影響が払拭できなかつた。そこで、熟成中の食肉におけるZ線の構造変化を正確に観察するために、試料を直接凍結して薄切し、そのまま観察するという方法を用いた。屠畜直後および熟成後の牛肉および豚肉から凍結切片を作成し、位相差顕微鏡および微分干渉顕微鏡でZ線の構造を観察した。第1図に屠畜直後および屠畜後21日目の牛肉におけるZ線の構造を示す。位相差顕微鏡像においては屠畜直後の試料では明瞭な、密度の高いZ線が観察されるのに対し、熟成後の牛肉においてはZ線は消失し、殆どその存在が確認できなかつた。微分干渉顕微鏡像においても牛肉の熟成に伴うZ線の構造変化は顕著で、屠畜直後の試料におけるZ線は大きく隆起し、物質が豊富に存在しているのが認められたのに対し、熟成後の牛肉では隆起が小さくなり、Z線を構成する物質の減少が観察された。豚肉においても屠畜直後の試料と7日間熟成した豚肉を用いて熟成に伴う変化を観察すると、牛肉の場合と同様にZ線を構成する物質の減少が明らかに認められた(第2図)。

### 第2節 Z線の構成成分

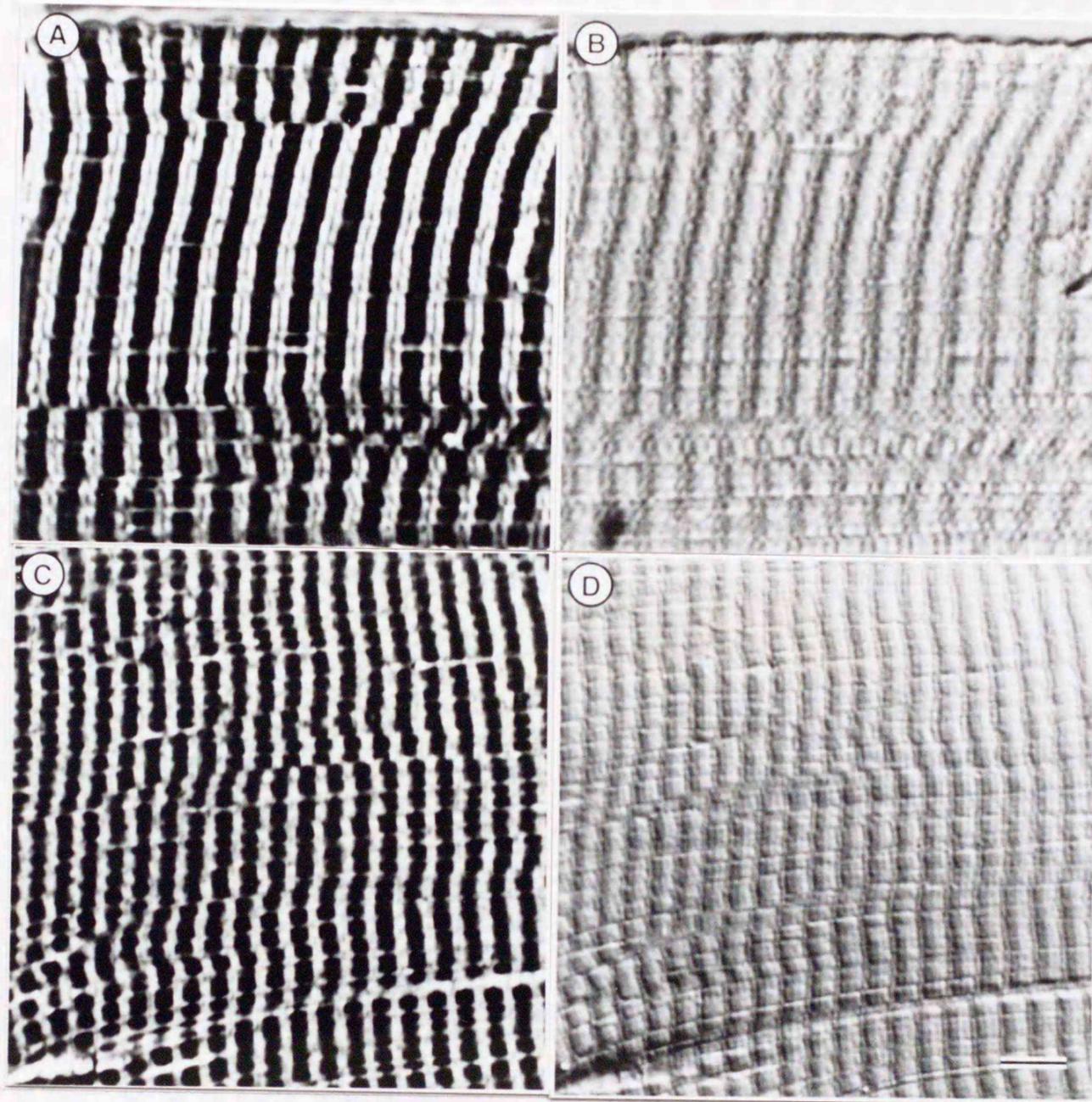
#### 第1項 骨格構造を構成する成分

牛肉および豚肉の熟成に伴うZ線の構造変化は構成成分がZ線から遊



### 第1図 牛半腱様筋の熟成に伴うZ線の構造変化

屠畜直後 (A, B) および4°Cで21日間熟成した (C, D) 牛半腱様筋から厚さ 2  $\mu\text{m}$ の凍結切片を作成し、位相差顕微鏡 (A, C) および微分干渉顕微鏡 (B, D) で観察した。スケールバーは 5  $\mu\text{m}$ を示す。

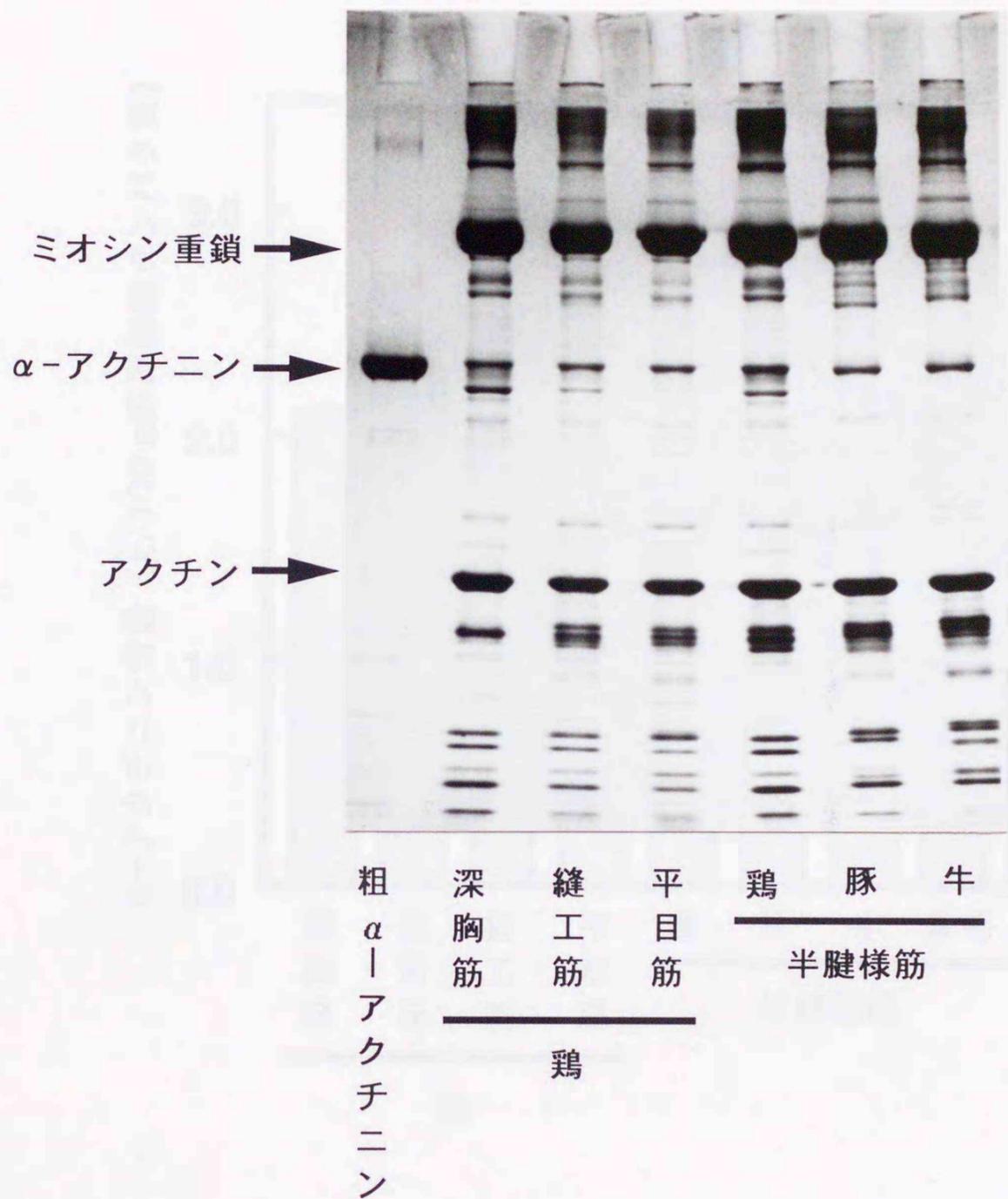


## 第2図 豚半腱様筋の熟成に伴うZ線の構造変化

屠畜直後 (A, B) および4°Cで7日間熟成した (C, D) 豚半腱様筋から厚さ 2  $\mu\text{m}$ の凍結切片を作成し、位相差顕微鏡 (A, C) および微分干渉顕微鏡 (B, D) で観察した。スケールバーは 5  $\mu\text{m}$ を示す。

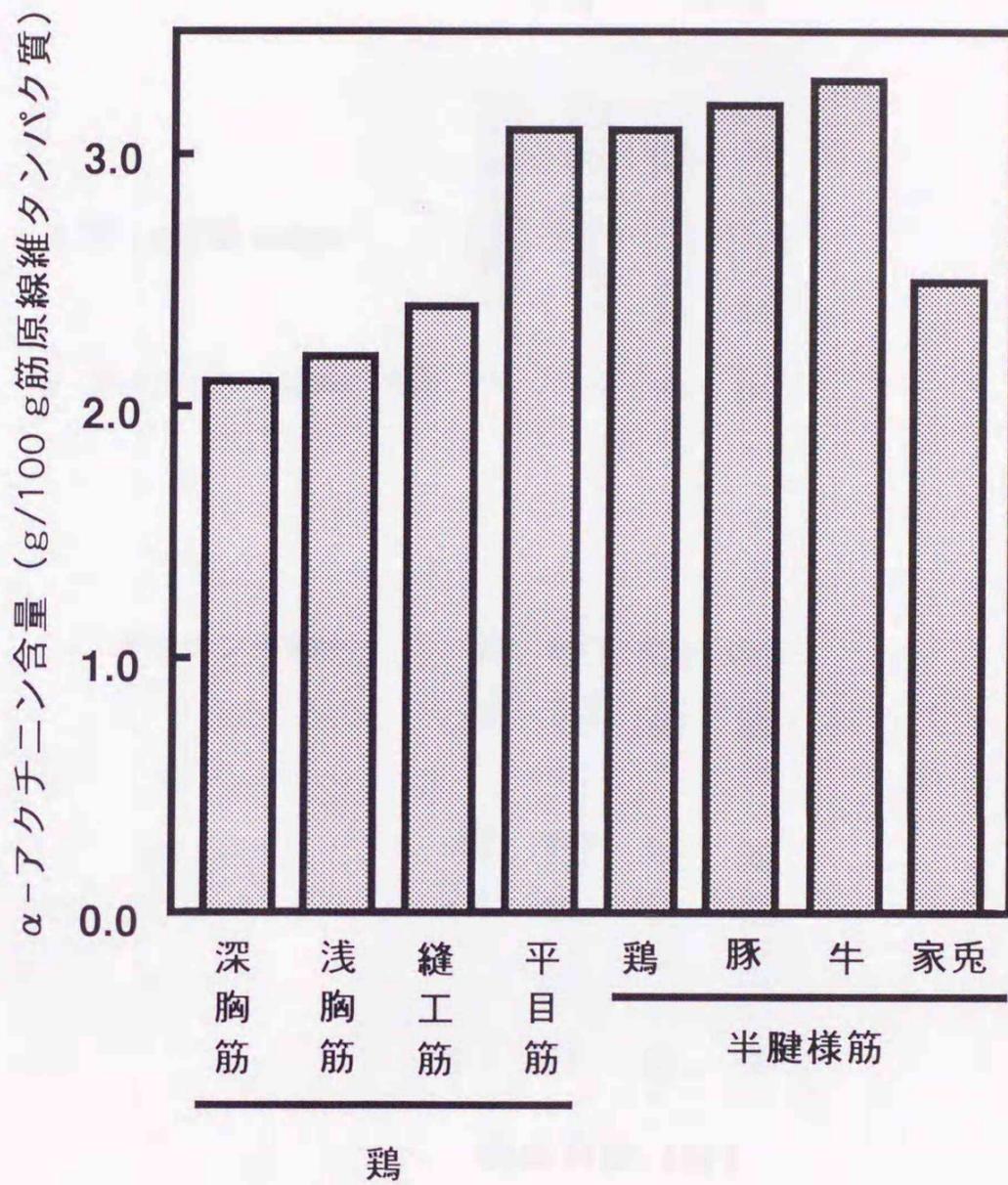
離するために起こる可能性が大きい。熟成に伴うZ線の構造変化と構成成分との関連を明らかにするためには、先ずZ線の構成成分を正確に把握しなければならない。Z線は骨格構造を構成するタンパク質とその間隙を埋める無定形物質から成ることが明らかにされている<sup>52,53)</sup>。そこで、Z線の骨格構造を構成するタンパク質である $\alpha$ -アクチニンの筋原線維に占める割合をSDS-PAGEのデンストグラムから求めた(第3図および第4図)。牛および豚の半腱様筋では $\alpha$ -アクチニンのバンドは単一であったが、鶏の骨格筋の場合にはいずれにおいても $\alpha$ -アクチニンのバンドの直ぐ下に1本バンドが存在しており、このバンドは白色筋である深胸筋で最も多く、次いで中間型である縫工筋、赤色筋である平目筋の順に少なくなった(第3図)。イムノブロット法で確認した結果、このバンドは $\alpha$ -アクチニンに由来するものではなく、86 kDaタンパク質であることが明らかになったので、デンストグラムによる $\alpha$ -アクチニン含量の算出からは除外した。 $\alpha$ -アクチニンの含量は牛、豚の半腱様筋で100 g 筋原線維タンパク質当たり、それぞれ3.3 gおよび3.2 gであった(第4図)。供試した全ての骨格筋において、 $\alpha$ -アクチニンの含量は100 gの筋原線維タンパク質当たり2.2 g~3.3 gの範囲にあり、量的な関係は牛半腱様筋>豚半腱様筋>鶏半腱様筋 $\approx$ 鶏平目筋>兎半腱様筋>鶏縫工筋>鶏浅胸筋>鶏深胸筋であった。

食肉の熟成に伴う $\alpha$ -アクチニンの量的な変化を調べるために、牛および豚の半腱様筋から調製した筋原線維をSDS-PAGEに供試した(第5図)。SDS-PAGE像から $\alpha$ -アクチニンのバンドの密度はほとんど変化しなかった。屠畜直後の試料から調製した筋原線維における $\alpha$ -アクチニンのバンドのミオシン重鎖のバンドに対する割合を1.0とすると、21



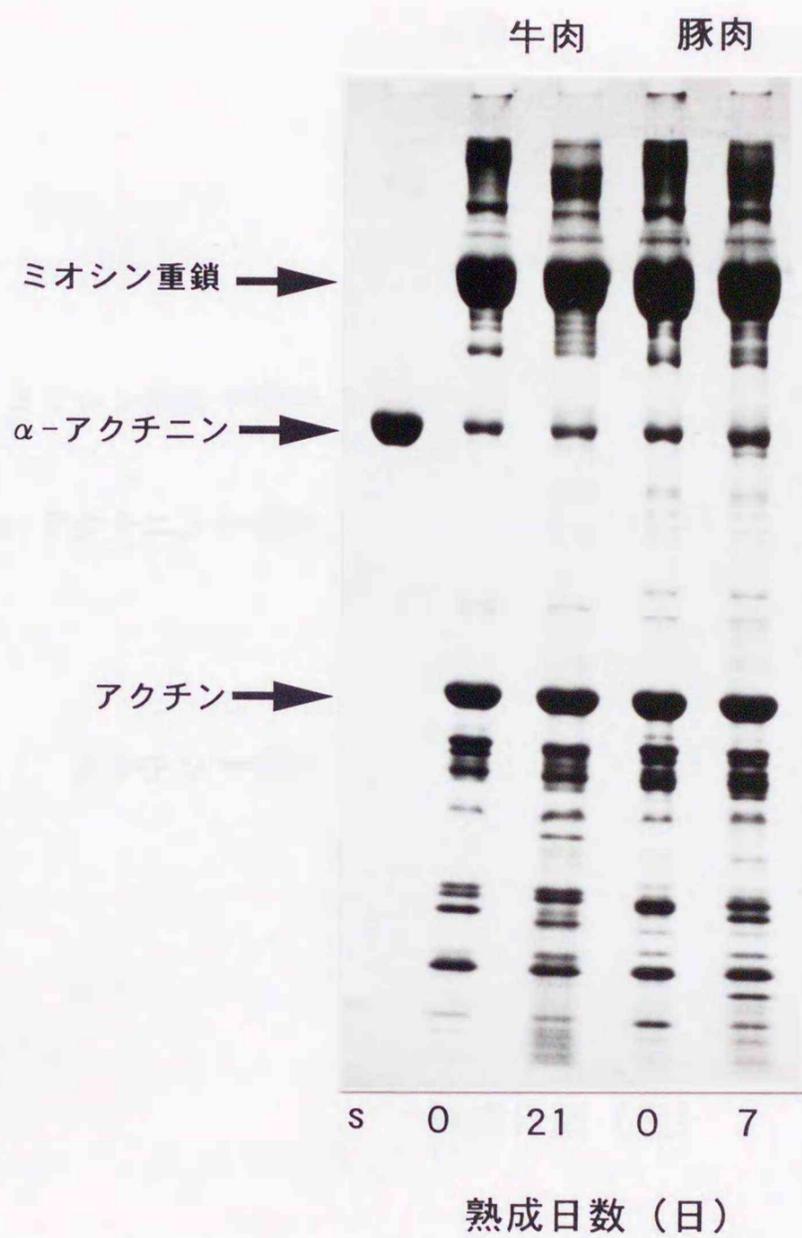
第3図 各種骨格筋の筋原線維の電気泳動像

屠畜直後の鶏，豚および牛の半腱様筋，および鶏の各種骨格筋より調製した筋原線維を電気泳動に供試した。粗α-アクチニンは，鶏浅胸筋よりPinterらの方法<sup>54)</sup>に従い，調製した。



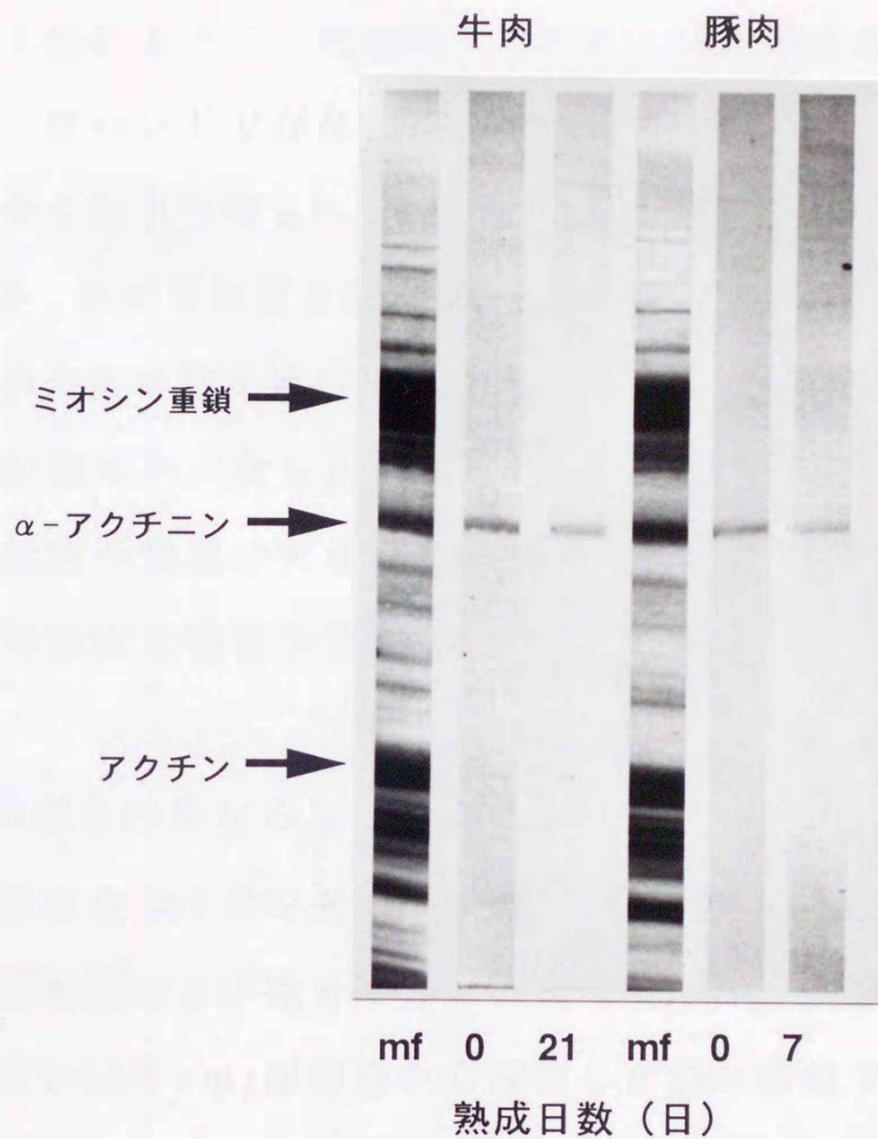
第4図 各種骨格筋の $\alpha$ -アクチニン含量

第3図に示したSDS-PAGE像のデンストグラムから筋原線維のタンパク質100g当たりの $\alpha$ -アクチニン含量を算出した。



### 第5図 熟成に伴う筋原線維構成タンパク質の変化

屠畜直後および 4℃で21日間熟成した牛半腱様筋と屠畜直後および 4℃で7日間熟成した豚半腱様筋から筋原線維を調製し、電気泳動に供試した。sは粗α-アクチニン標品を示す。



第6図 食肉の熟成に伴う $\alpha$ -アクチニンの変化

第5図と同様に試料を調製し、電気泳動後にニトロセルロース膜に転写し、抗 $\alpha$ -アクチニン抗血清によりイムノブロットを行った。mfは屠畜直後の牛および豚の半腱様筋から調製した筋原線維をポンソーSで染色した。

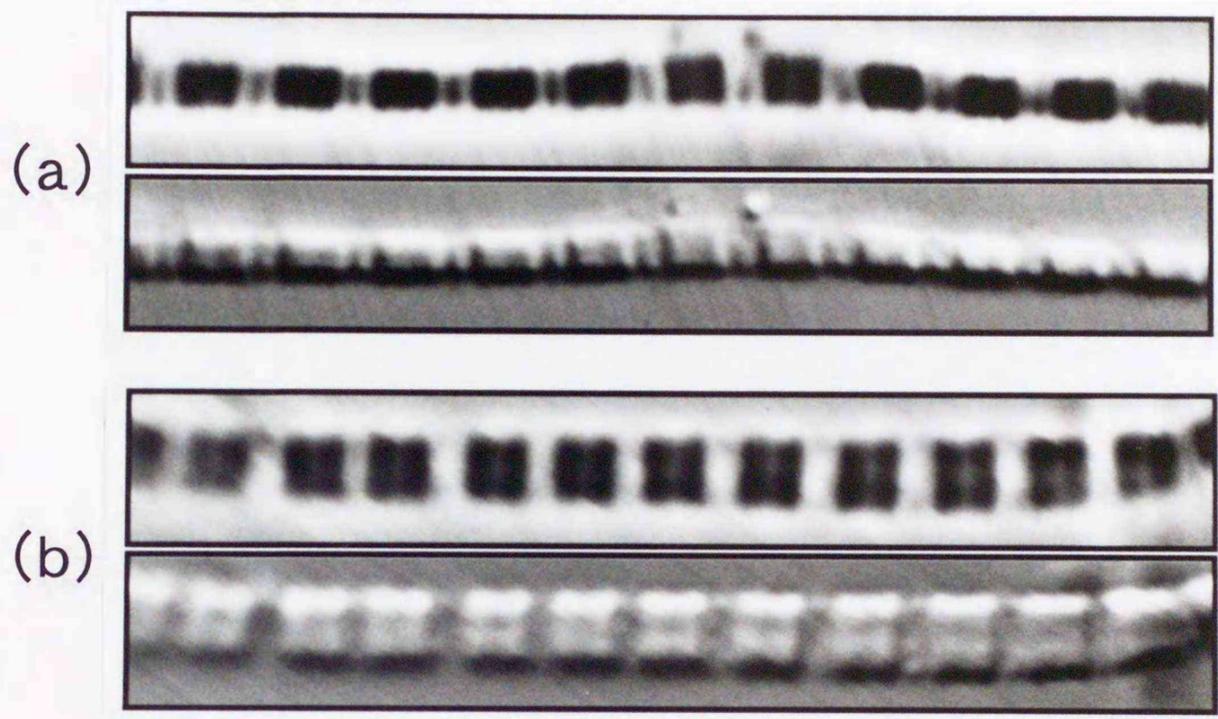
日間熟成した牛肉では0.91であり、7日間熟成した豚肉では0.95であった。また、第6図に示すように抗 $\alpha$ -アクチニン抗血清を用いたイムノブロット法によって、熟成後の牛肉および豚肉においても $\alpha$ -アクチニンは単一なバンドで存在し、熟成中に $\alpha$ -アクチニンはプロテアーゼによって全く加水分解されないことが明らかになった。

## 第2項 無定形物質を構成する成分

Z線の骨格構造を形成する $\alpha$ -アクチニンは食肉の熟成中に変化しないことが明らかになったが、このことは、熟成に伴うZ線の脆弱化がZ線の無定形物質の変化に関係することを強く示唆しているので、次にZ線の無定形物質を構成する成分の同定を目的として以下の実験を行った。

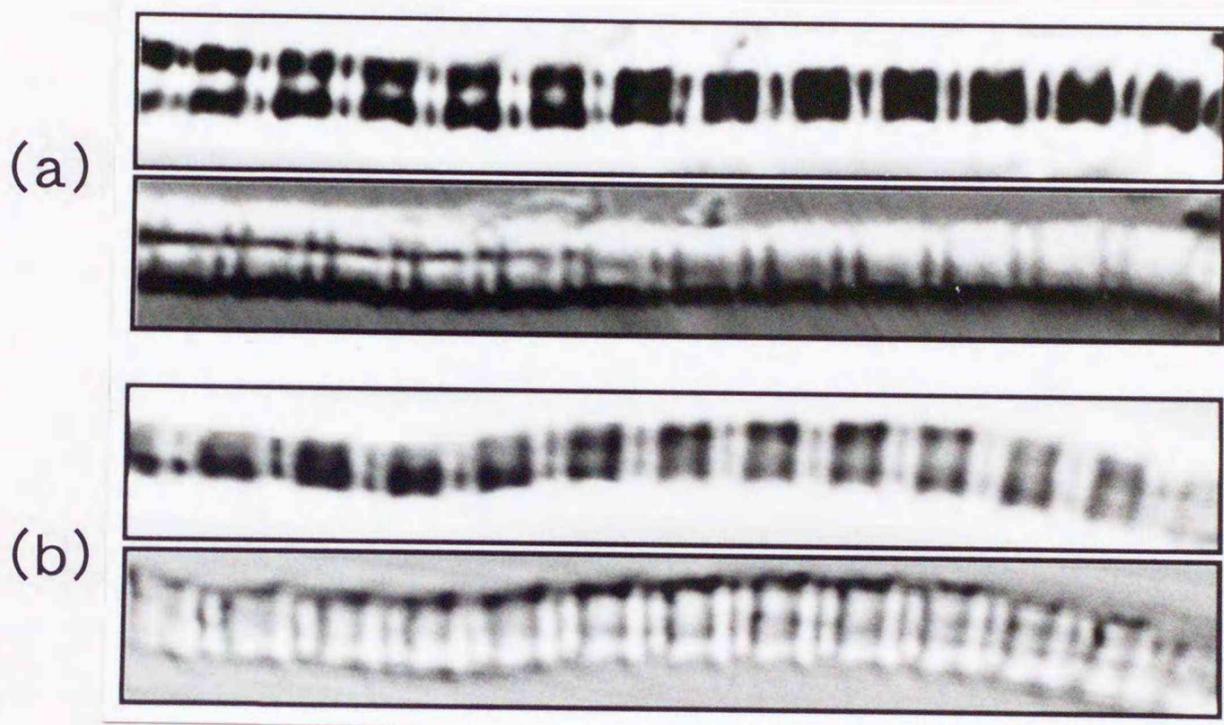
Z線の厚さが異なることが知られている3種類の鶏骨格筋から調製した筋原線維を非イオン系の界面活性剤であるTriton X-100で処理し、位相差顕微鏡および微分干渉顕微鏡によりZ線を観察した。Z線の厚さが最も薄い(33 nm)深胸筋から調製した筋原線維では、Triton X-100による処理で、位相差顕微鏡像ではZ線がほとんど消失していたが、微分干渉顕微鏡像ではZ線の部分に僅かに構造物が残っていた(第7図)。縫工筋(第8図)および平目筋(第9図)の場合も深胸筋の場合と同様な傾向が認められ、筋原線維をTriton X-100で処理することによりZ線から遊離する物質の存在が確認された。

Z線から遊離する物質を同定するため、屠畜直後の牛の半腱様筋から調製したI-Z-I brushのクロロホルム・メタノール系列の有機溶媒抽出物を薄層クロマトグラフィーに供試した。その結果を第10図に示す。牛半腱様筋のI-Z-I brushからの抽出物には、トリアシルグリセロー



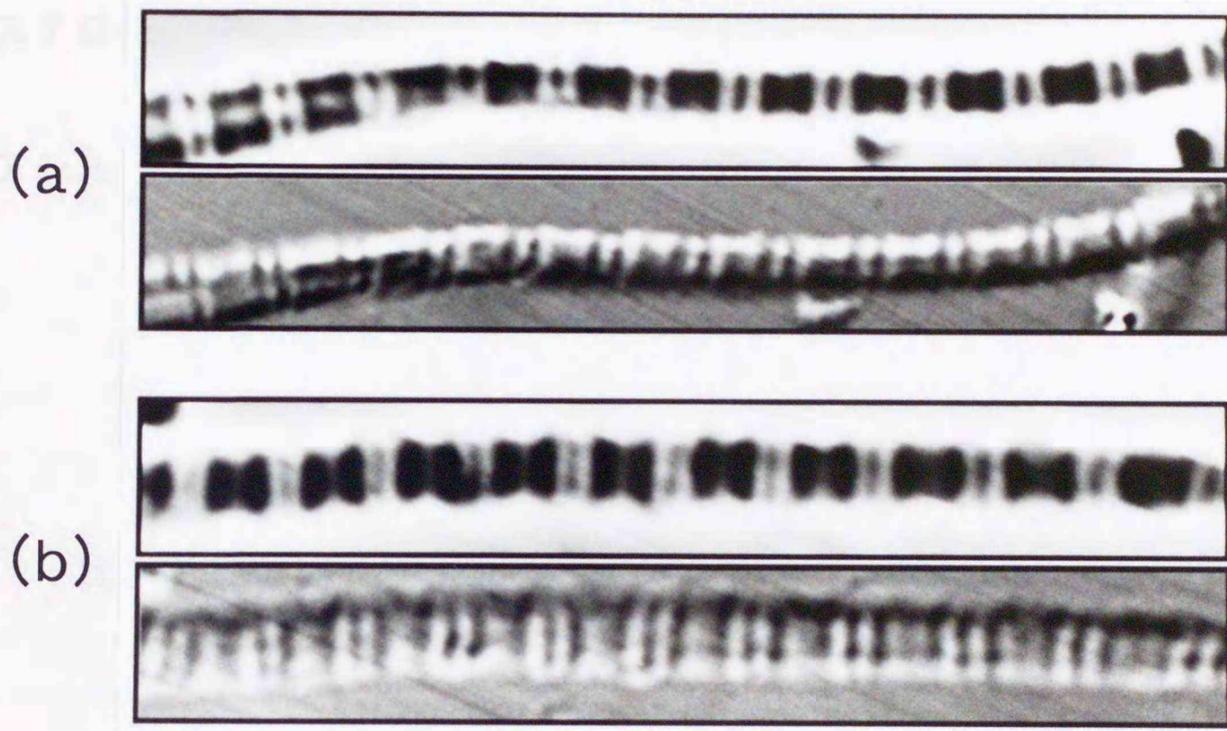
第7図 Triton X-100処理による鶏深胸筋筋原線維の構造変化

屠鳥直後の鶏の深胸筋から調製した筋原線維をTriton X-100で処理した際の位相差顕微鏡像および微分干渉像を示す。(a)は無処理の筋原線維を、(b)はTriton X-100で処理をした筋原線維を示す。上段は位相差顕微鏡像で、下段は微分干渉顕微鏡像である。



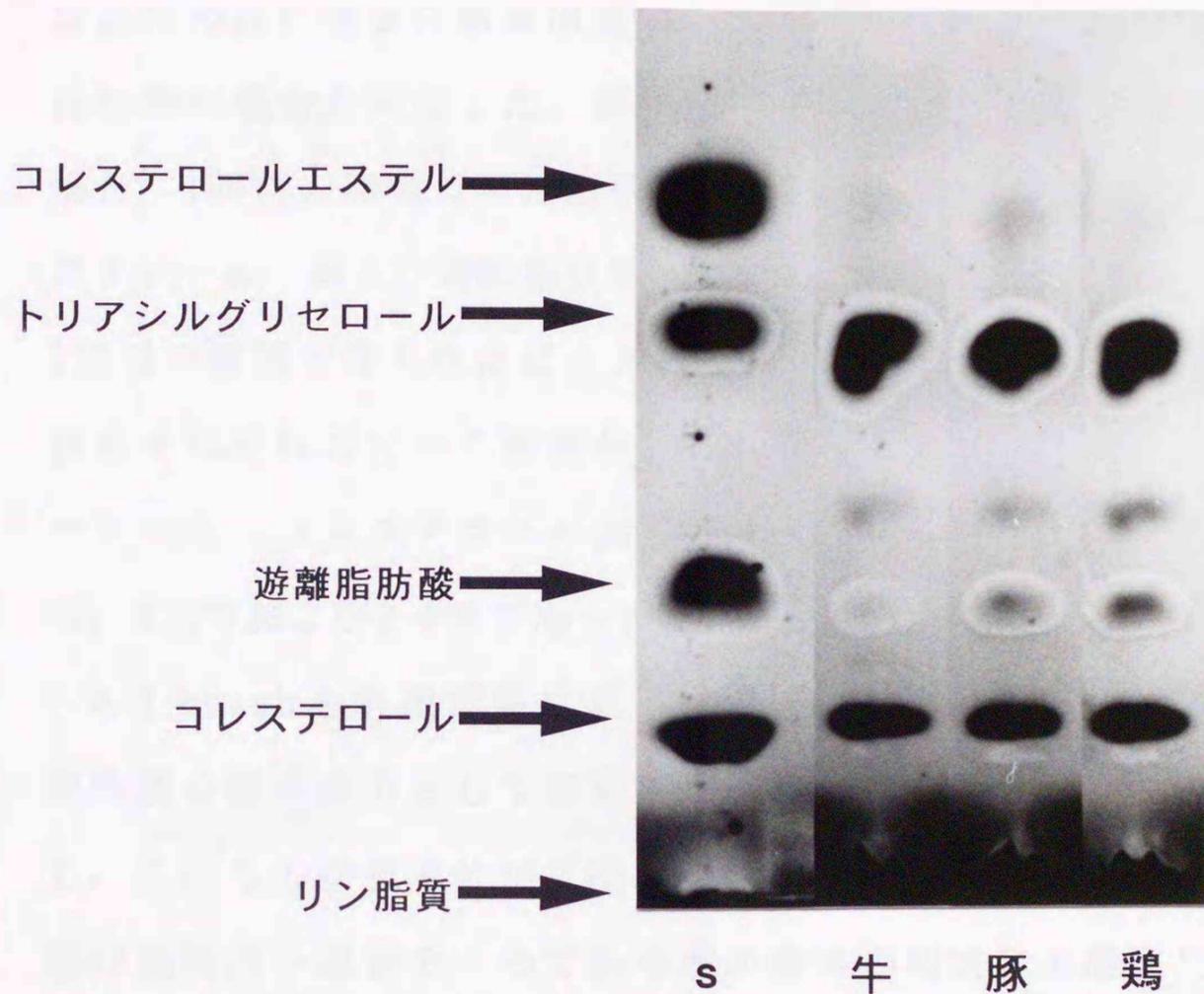
第8図 Triton X-100処理による鶏縫工筋筋原線維の構造変化

屠鳥直後の鶏の縫工筋から調製した筋原線維をTriton X-100で処理した際の位相差顕微鏡像および微分干渉像を示す。(a)は無処理の筋原線維を示し、(b)はTriton X-100で処理をした筋原線維を示す。上段は位相差顕微鏡像で、下段は微分干渉顕微鏡像である。



第9図 Triton X-100処理による鶏平目筋筋原線維の構造変化

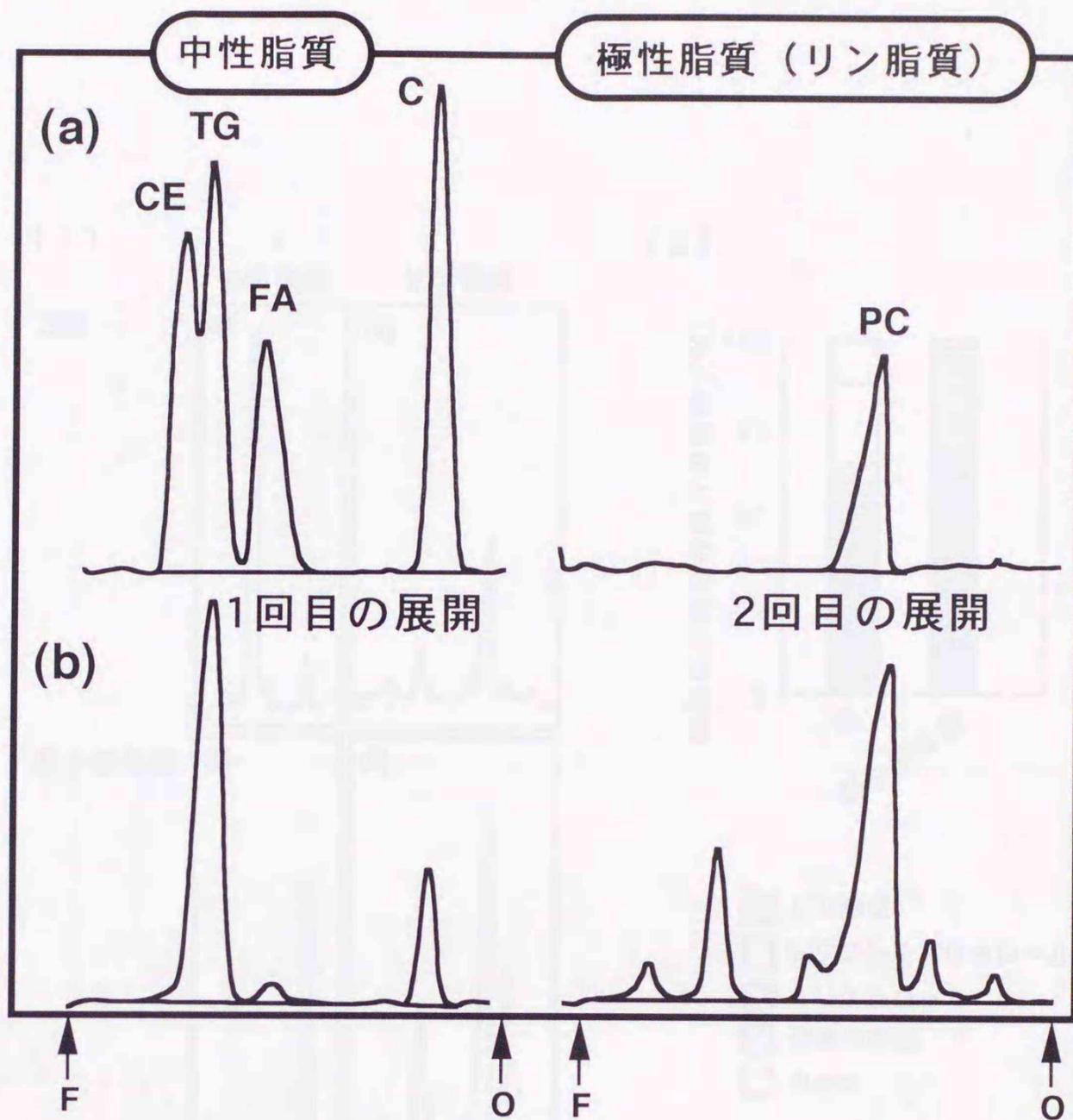
屠鳥直後の鶏の平目筋から調製した筋原線維をTriton X-100で処理した際の位相差顕微鏡像および微分干渉像を示す。(a)は無処理の筋原線維を示し、(b)はTriton X-100で処理をした筋原線維を示す。上段は位相差顕微鏡像で、下段は微分干渉顕微鏡像である。



第10図 I-Z-I brushから抽出された脂質の薄層クロマトグラフィー像

屠畜直後の牛，豚および鶏の半腱様筋から調製したI-Z-I brushから脂質を抽出し，ヘキサン：エーテル：酢酸=80：30：1 (v/v)から成る展開溶液で薄層クロマトグラフィーを行った。展開後に，モリブデンブルー溶液に浸漬し150°Cで加熱して発色させた。標準物質(s)はコレステロールエステル，トリオレイン（トリアシルグリセロール），オレイン酸（遊離脂肪酸），コレステロールおよび，ホスファチジルコリン（リン脂質）から成るTLC Mix40 (Larodan Fine Chemical AB)を用いた。

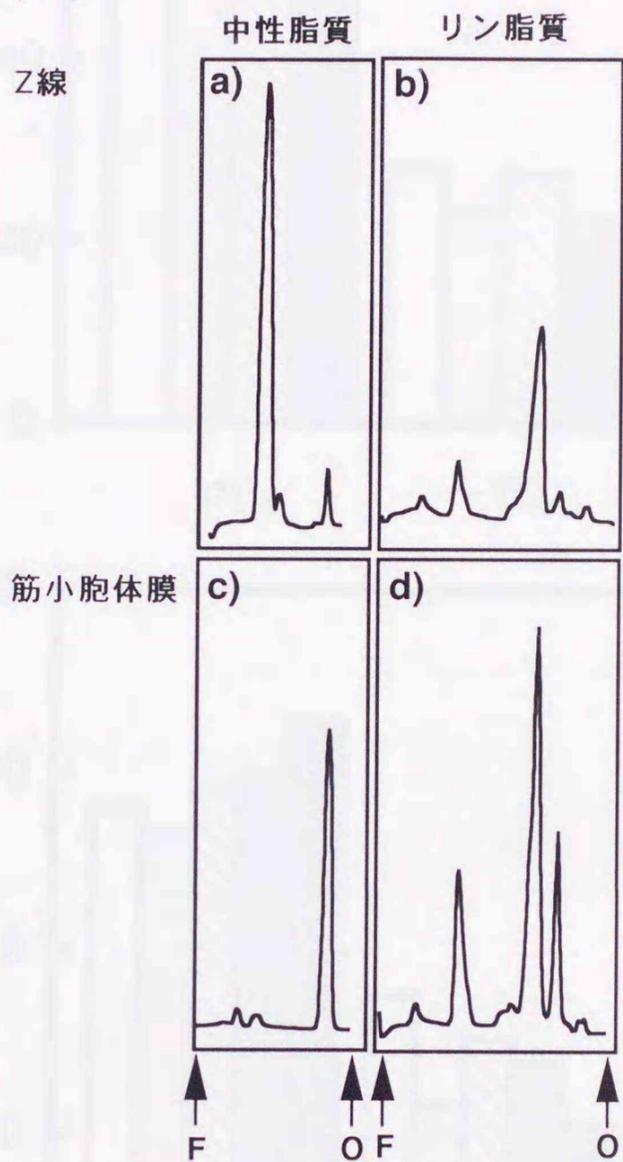
ル，遊離脂肪酸，コレステロール，およびリン脂質が含まれていた。他の畜種の半腱様筋においても同様の成分が含まれていた。さらに，定量性の高い薄層自動検出装置を用いて，第10図と同じ試料について抽出物の成分を同定した。第11図に示すように，牛半腱様筋のZ線の場合，1回目の展開で中性脂質としてはトリアシルグリセロール，コレステロール，および遊離脂肪酸の3つの成分を示すピークに分離された。2回目の展開で得られたピーク面積の合計をリン脂質とし，その構成割合をそれぞれのピーク面積から求めると，リン脂質，トリアシルグリセロール，コレステロールおよび遊離脂肪酸はそれぞれ65.8%，23.2%，8.6%および2.4%であった。筋原線維のTriton X-100処理およびI-Z-I brushを有機溶媒によって抽出した実験の結果からZ線の無定形物質の構成成分として脂質が存在することが強く示唆された。しかし，これらの脂質成分がZ線に固有の成分であるのか，あるいは筋線維の細胞内小器官の一つである筋小胞体の膜成分の混在によるものであるのかは不明である。そこで，鶏の浅胸筋からI-Z-I brushおよび脂質成分を多量に含有する筋小胞体を調製し，脂質を抽出して薄層自動検出装置により分析すると，両者は明らかに異なるクロマトグラムを示した(第12図(1))。第12図(2)にI-Z-I brushおよび筋小胞体膜の脂質成分の構成比を示す。I-Z-I brushは筋小胞体膜と比べてトリアシルグリセロールの含量が高く，筋小胞体膜は，リン脂質およびコレステロールの占める割合が大きかった。他の骨格筋についても同様にZ線の脂質構成を調べた(第13図)。Z線を構成する脂質は畜種や骨格筋の種類に関係なくいずれもリン脂質，トリアシルグリセロール，コレステロールおよび遊離脂肪酸の4成分で構成されており，構成比もほぼ



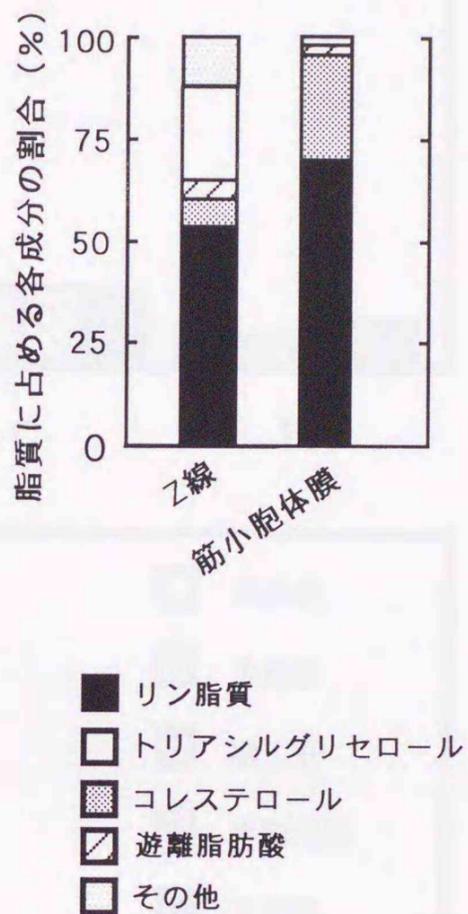
第11図 イアトロスキャンによる牛半腱様筋Z線の脂質成分の同定

第10図と同様の方法で脂質を抽出し、クロマロッドに供し、ヘキサン：エーテル：酢酸=80：30：1(v/v)から成る展開溶液で1回目の展開を行い、イアトロスキャンで原点を含まないところまで分析し、クロロホルム：メタノール：水=65：25：4(v/v)から成る展開溶媒で2回目の展開を行い、イアトロスキャンで分析した。標準物質(a)および牛半腱様筋のI-Z-I brush(b)のクロマトグラムを示す。1回目の展開では中性脂質が分離され、2回目の展開ではリン脂質が分離される。2回目の展開で分離されたピーク面積の合計をリン脂質とした。Oは原点を示し、Fは溶媒先端を示す。CE, コレステロールエステル; TG, トリアシルグリセロール; FA, 遊離脂肪酸; C, コレステロール; PC, ホスファチジルコリン

(1)

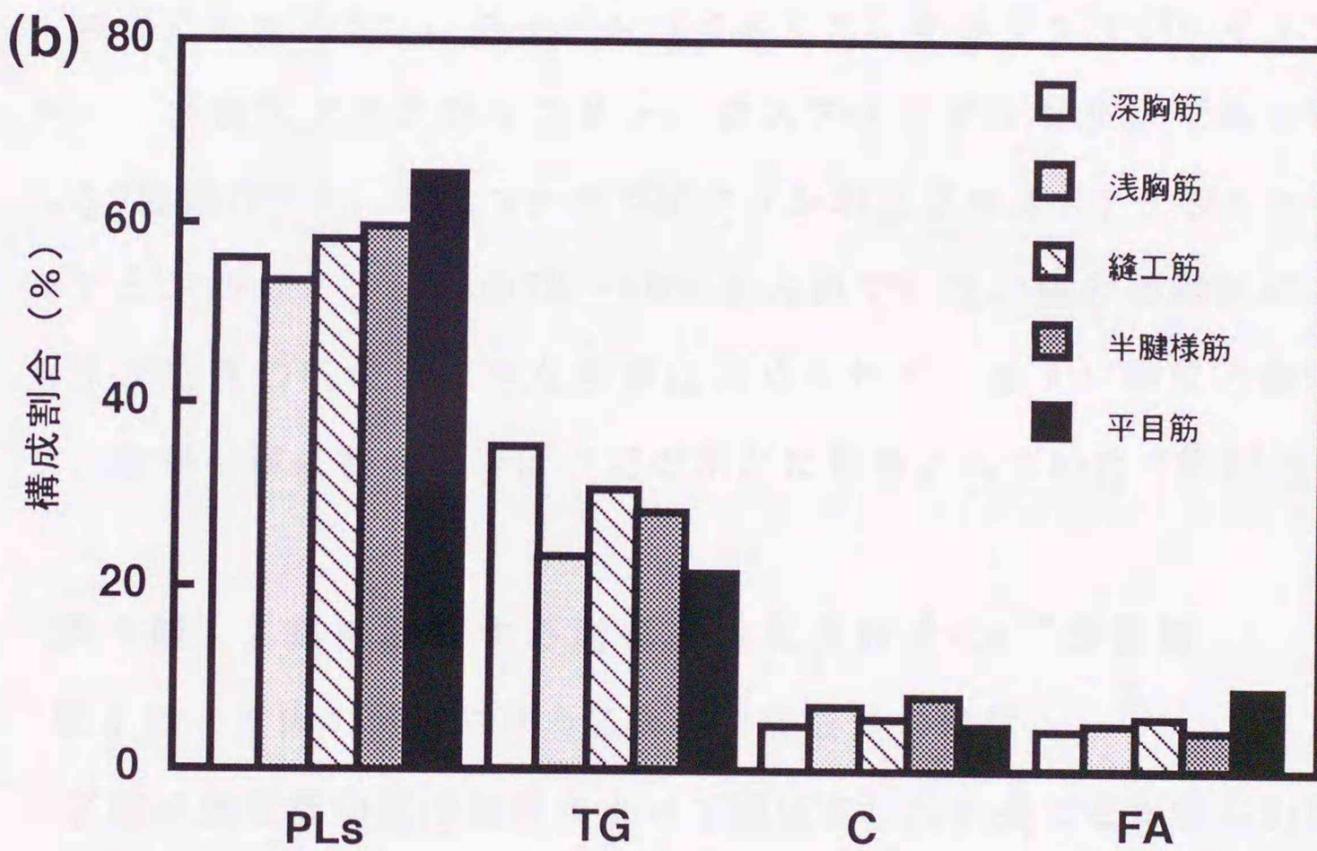
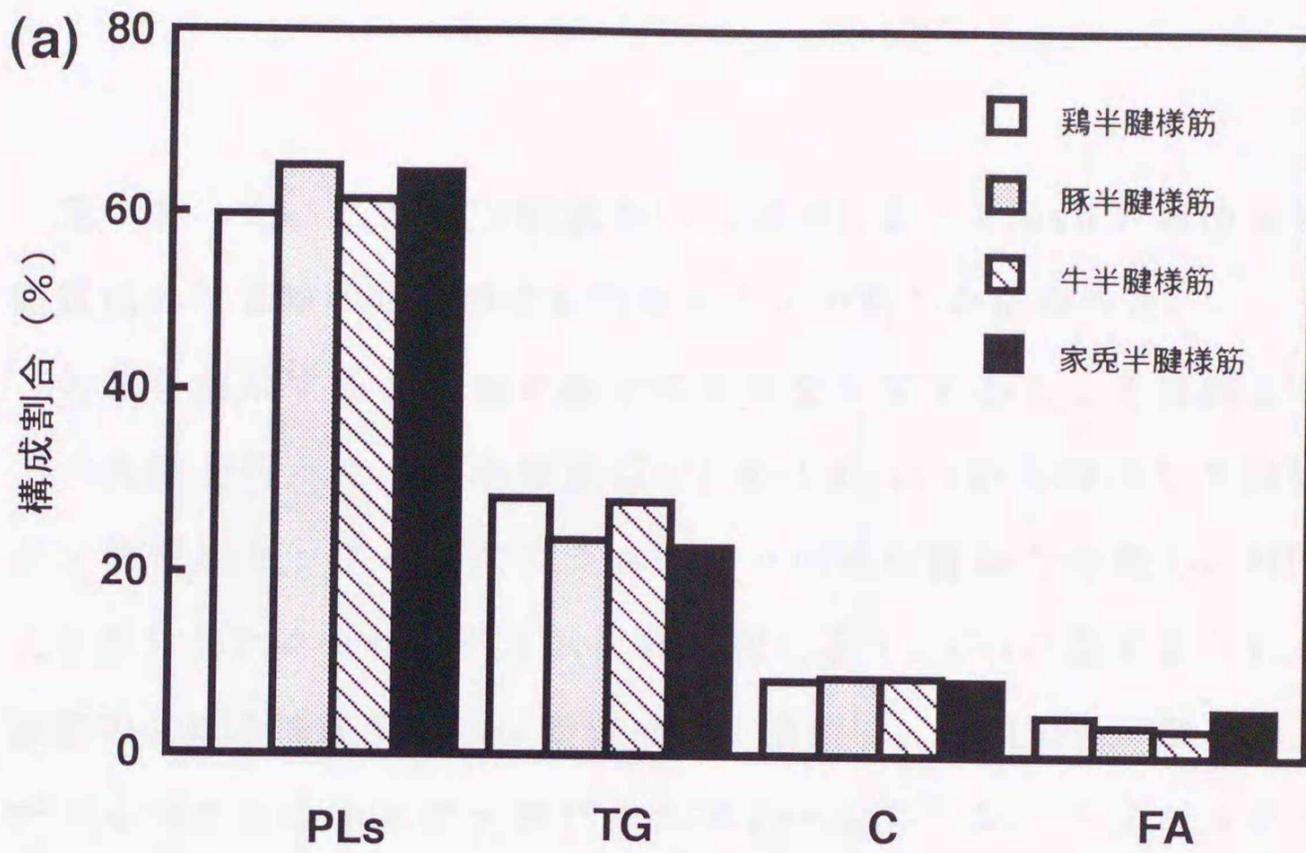


(2)



第12図 鶏浅胸筋のZ線および筋小胞体膜の脂質成分の比較

鶏の浅胸筋からI-Z-I brushおよび筋小胞体を調製し、BlighとDyerの方法<sup>39)</sup>により抽出した脂質を第11図と同様に1回目の展開(中性脂質)および2回目の展開(リン脂質)を行い、得られたクロマトグラムを(1)に、分離されたピーク面積から算出した構成割合を(2)に示す。



第13図 各種骨格筋のZ線の脂質構成

各種骨格筋より調製したI-Z-I brushから脂質を抽出し、第11図で示したようにイアトロスキャンにより分離して、ピーク面積から算出したリン脂質 (PLs)、トリアシルグリセロール (TG)、コレステロール (C) および遊離脂肪酸 (FA) が全体に占める割合を示した。(a) は各種家畜の半腱様筋で、(b) は鶏の各種骨格筋である。

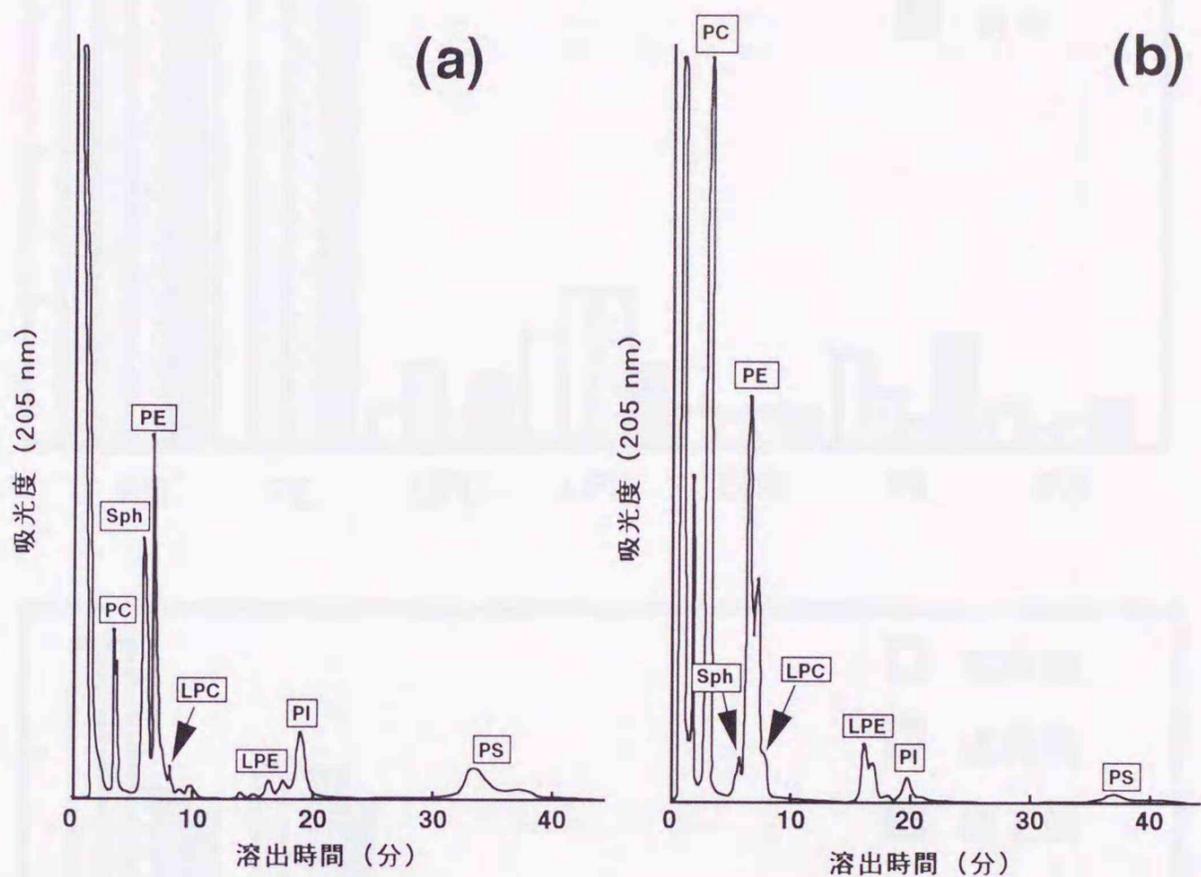
一定であった。これらの結果から上述のI-Z-I brushから抽出された脂質成分はZ線の固有の成分であることが明らかになった。

Z線を構成するリン脂質画分の組成を同定することを目的として以下の実験を行った。牛半腱様筋のI-Z-I brushから抽出した脂質中のリン脂質をセップパックカラムにより中性脂質から分離し、HPLCにより得られたクロマトグラムを第14図に示す。(b)に示すように牛半腱様筋のZ線を構成するリン脂質は計7種類で、含量の多い順にホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、リゾホスファチジルエタノールアミン、スフィンゴミエリン、ホスファチジルイノシトール、リゾホスファチジルコリン、ホスファチジルセリンであった。これら7種類のうち、ホスファチジルコリンおよびホスファチジルエタノールアミンが全リン脂質の70~80%を占めていた。他の骨格筋においてもリン脂質の組成に大きな差異は認められず、全リン脂質に対する各リン脂質の構成割合はほぼ一定の割合に保持されていた(第15図)。

### 第3節 Z線を構成する脂質成分に及ぼすCa<sup>2+</sup>の影響

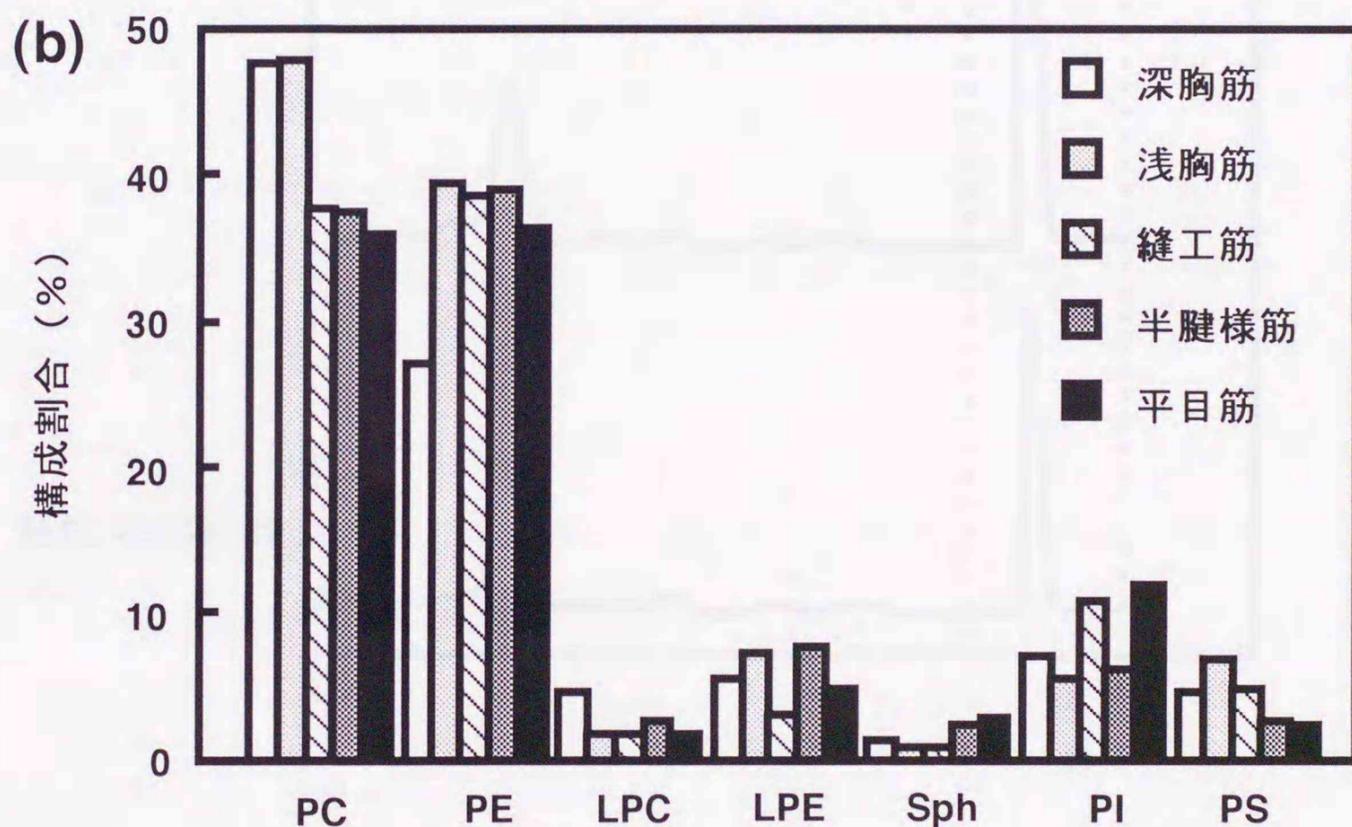
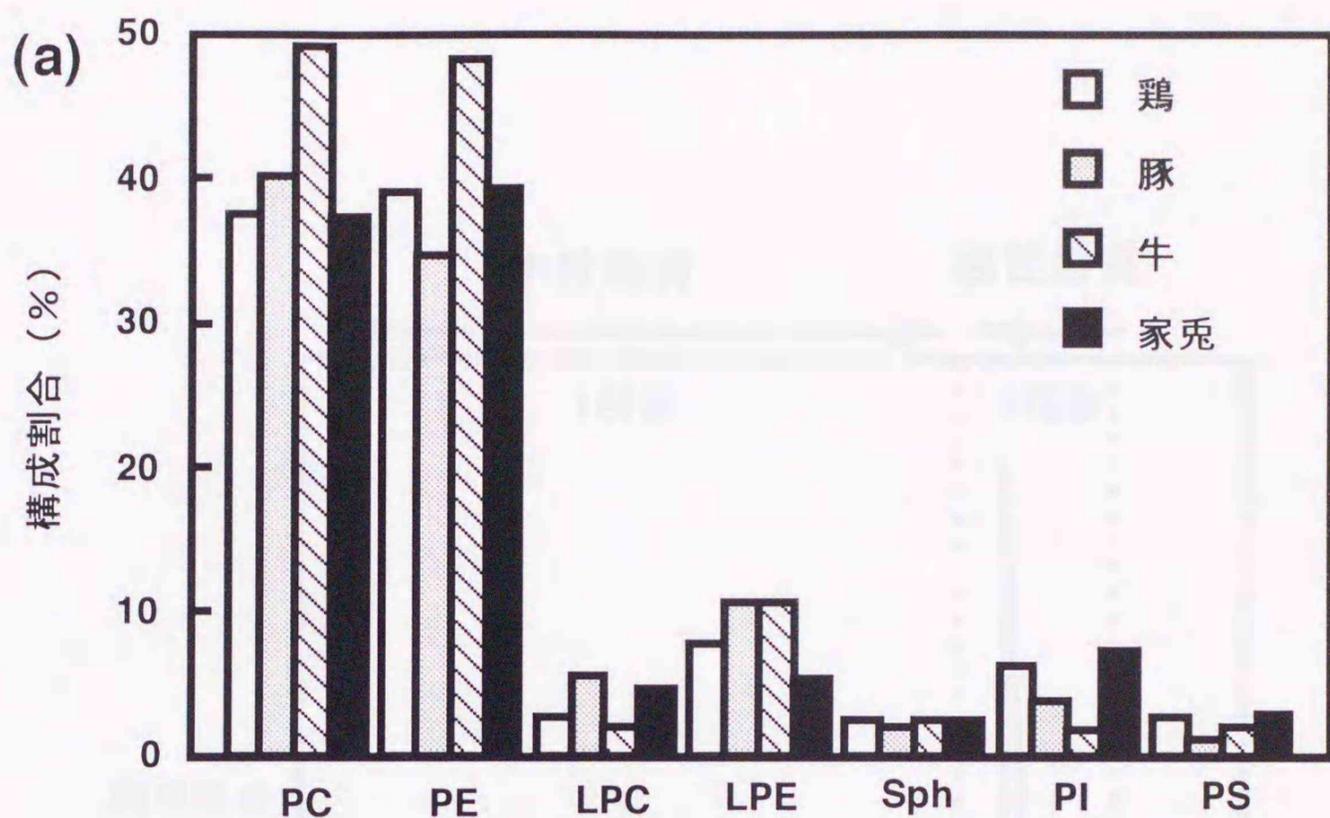
#### 第1項 食肉の熟成に伴うZ線の脂質成分の変化

Z線の無定形物質は脂質によって構成されていることが明らかになったので、食肉の熟成に伴う脂質成分の変化を追究した。屠鳥直後および48時間熟成した鶏浅胸筋から調製したI-Z-I brushから脂質を抽出してイアトロスキャンによって脂質成分の変化を調べた。第16図に示すように、トリアシルグリセロール、遊離脂肪酸およびコレステロールなどの中性脂質は、48時間の熟成後も、ほとんど変化しなかったが、リン脂質は熟成に伴って顕著に減少し、熟成48時間目で屠鳥直後の値



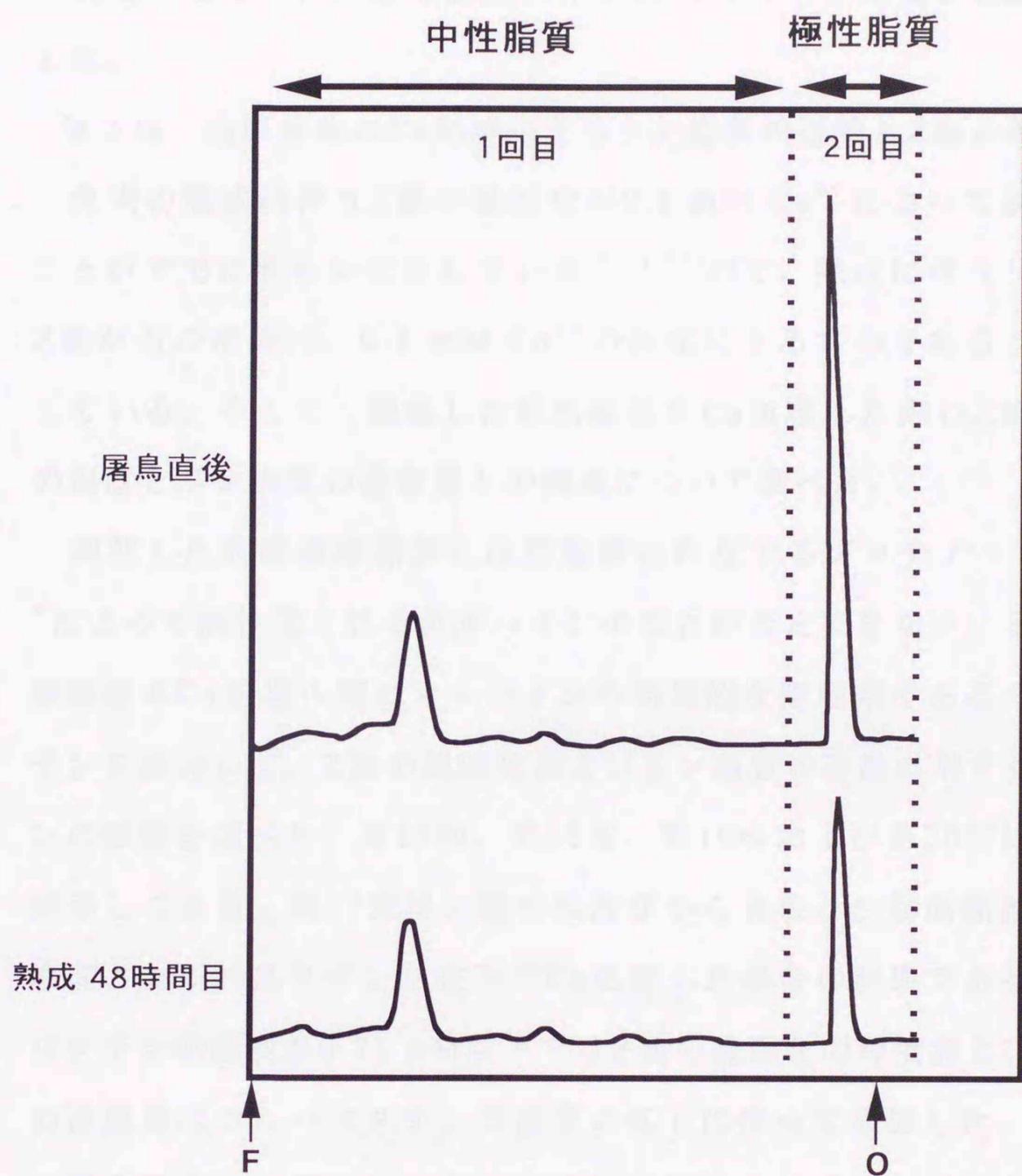
第14図 HPLCによる牛半腱様筋のZ線構成リン脂質の分離および同定

屠畜直後の牛の半腱様筋から調製したI-Z-I brushから脂質を抽出し、セップパックカラムによりリン脂質を中性脂質と分離し、 $\mu$ Bondasphere  $5\mu$   $\text{NH}_2$   $100\text{\AA}$ カラム ( $3.9\text{ mm}\times 150\text{ mm}$ ) に供試し、アセトニトリル：メタノール：0.2%トリエチルアミン水溶液=64：28：8 (v/v) から成る溶液 (pH 3.0) で、流速  $1.0\text{ ml/min}$  で溶出し、205 nmにおける吸光度を測定した (b)。(a) は、PC；ホスファチジルコリン，Sph；スフィンゴミエリン，PE；ホスファチジルエタノールアミン，LPC；リゾホスファチジルコリン，LPE；リゾホスファチジルエタノールアミン，PI；ホスファチジリンイノシトール，およびPS；ホスファチジルセリンから成る標準リン脂質を展開したものである。カラムの温度は室温で行った。



第15図 各種骨格筋のZ線のリン脂質の構成割合

各種骨格筋より調製したI-Z-I brushから脂質を抽出し、第14図で示したようにHPLCにより分離して、ピーク面積から算出したホスファチジルコリン(PC)、ホスファチジルエタノールアミン(PE)、リゾホスファチジルコリン(LPC)、リゾホスファチジルエタノールアミン(LPE)、スフィンゴミエリン(Sph)、ホスファチジルイノシトール(PI)、ホスファチジルセリン(PS)の全体に占める割合を示した。(a)は各種家畜の半腱様筋で、(b)は鶏の各種骨格筋である。



第16図 鶏浅胸筋の熟成に伴うZ線の構成脂質成分の変化

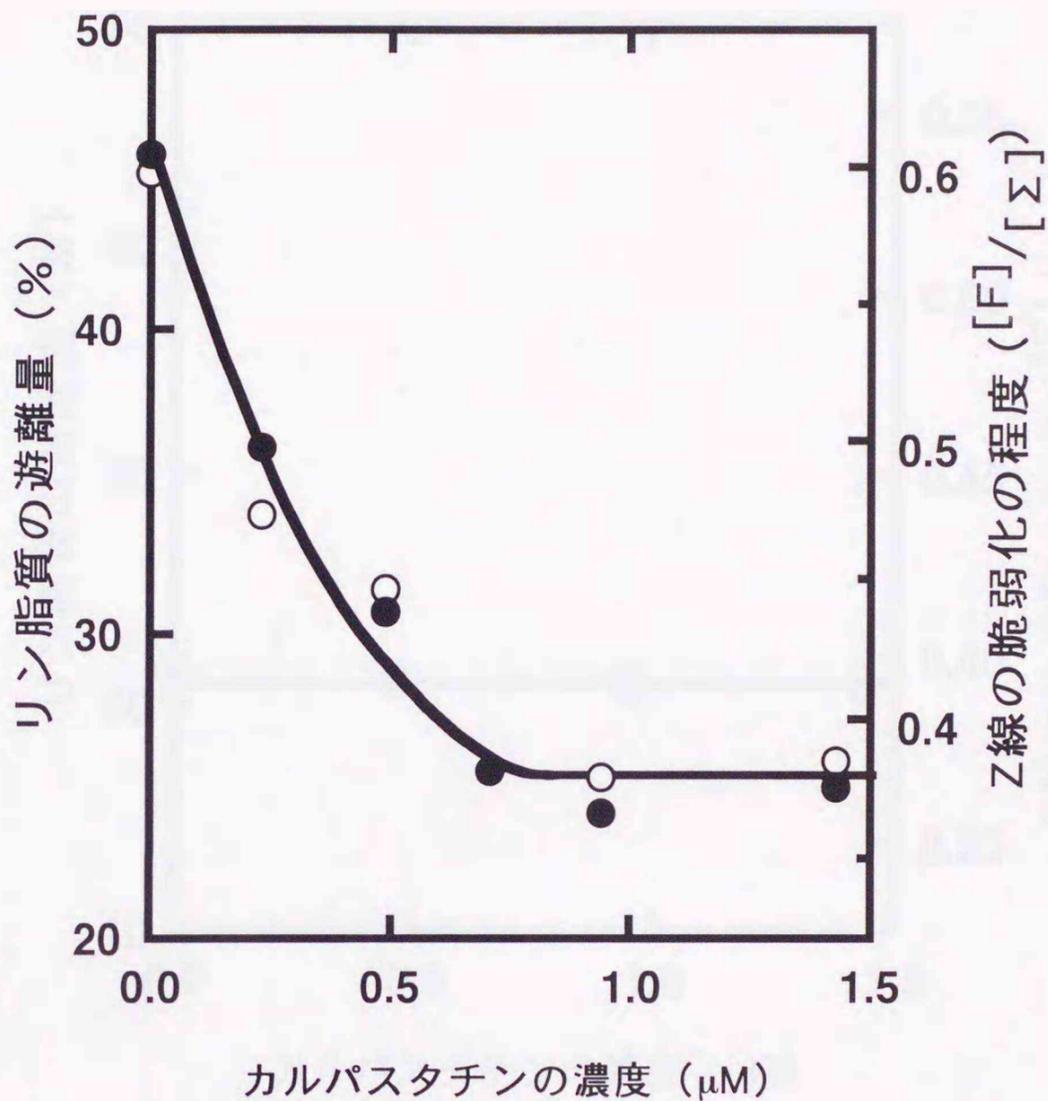
屠鳥直後、および4°Cで48時間熟成した鶏の浅胸筋から一定量を採取し、I-Z-I brushを調製して、脂質を抽出した。上昇法による1回目の展開により中性脂質を分離し、2回目の展開用溶媒で僅かに極性脂質を上昇させ、イアトロスキャンにより分析した。Oは原点を示し、Fは溶媒先端を示す。

の65.2%になった。即ち熟成に伴い約35%のリン脂質がZ線から消失した。

## 第2項 筋原線維のCa処理によるリン脂質の遊離とZ線の脆弱化

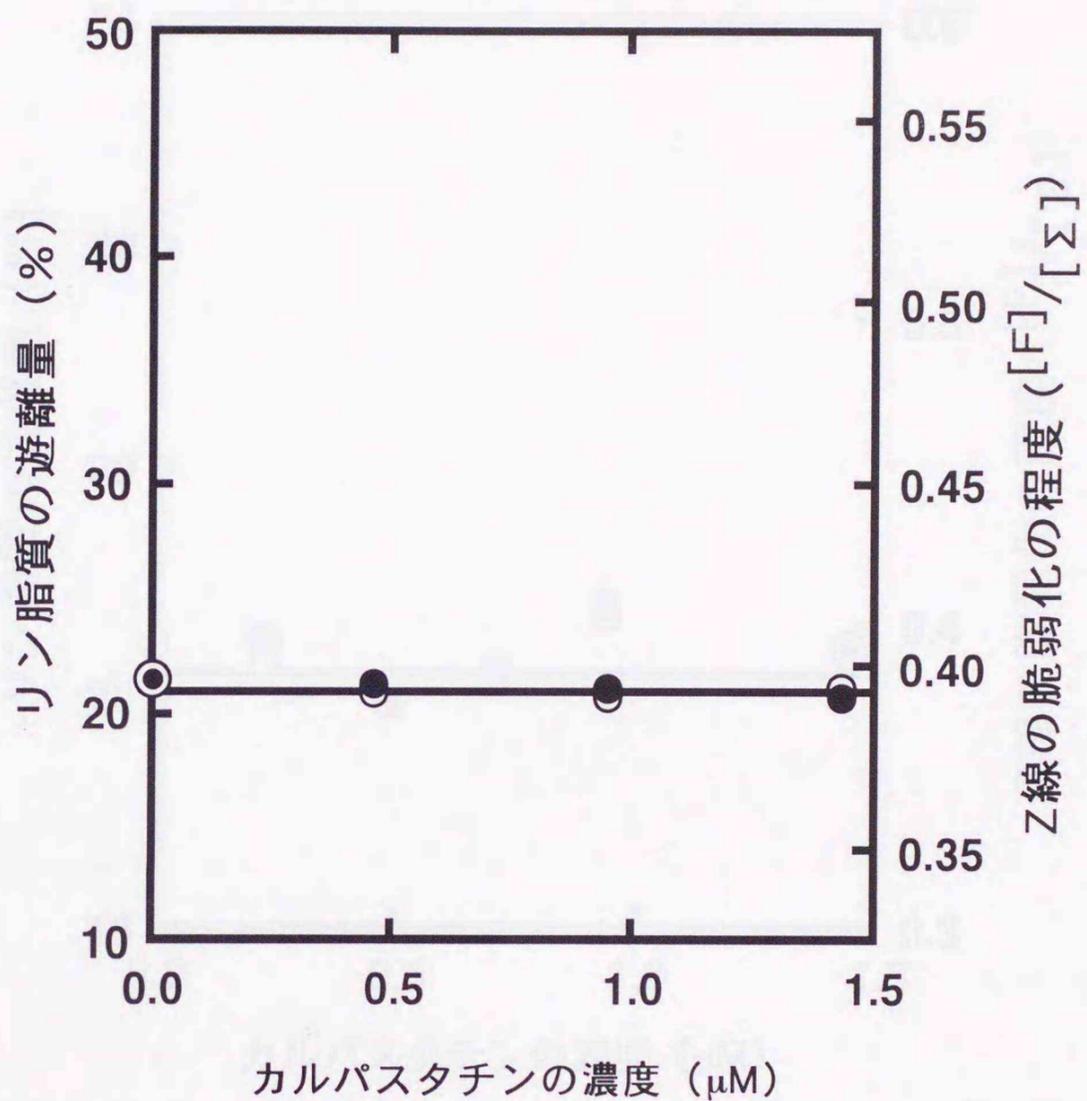
食肉の熟成に伴うZ線の脆弱化が0.1 mM  $\text{Ca}^{2+}$ によって誘起されることがすでに明らかにされている<sup>30,31,55)</sup>ので、熟成に伴うリン脂質のZ線からの消失は、0.1 mM  $\text{Ca}^{2+}$ の作用によるものであることを示唆している。そこで、調製した筋原線維をCa処理した際のZ線の脆弱化の程度とリン脂質の遊離量との関連について調べた。

調製した筋原線維標品には筋線維に内在するプロテアーゼで、 $\text{Ca}^{2+}$ によって活性化されるカルパインの混在が否定できない。そこで、筋原線維のCa処理の際にカルパインの特異的な阻害剤であるカルパスタチンを添加して、Z線の脆弱化およびリン脂質の遊離に対するカルパインの影響を調べた。第17図、第18図、第19図および第20図にその結果が示してある。第17図は、鶏の浅胸筋から調製した筋原線維を異なる濃度のカルパスタチン存在下でCa処理した場合の結果である。カルパスタチンの濃度が0.71  $\mu\text{M}$ 以下ではZ線の脆弱化の程度およびリン脂質の遊離量はカルパスタチンの濃度の低下に伴って増加した。このことは鶏浅胸筋から調製した筋原線維標品にはカルパインが混在することを示しており、筋原線維をCa処理する際には、0.71  $\mu\text{M}$ 以上のカルパスタチンを添加しなければ、 $\text{Ca}^{2+}$ の直接的作用を観察できないことがわかった。他方、鶏の半腱様筋（第18図）、豚の半腱様筋（第19図）および牛の半腱様筋（第20図）の場合には、カルパインに対するカルパスタチンの阻害効果は全くみられず、半腱様筋から調製した筋原線維標品にはカルパインが混在していないことを示している。以下の全ての



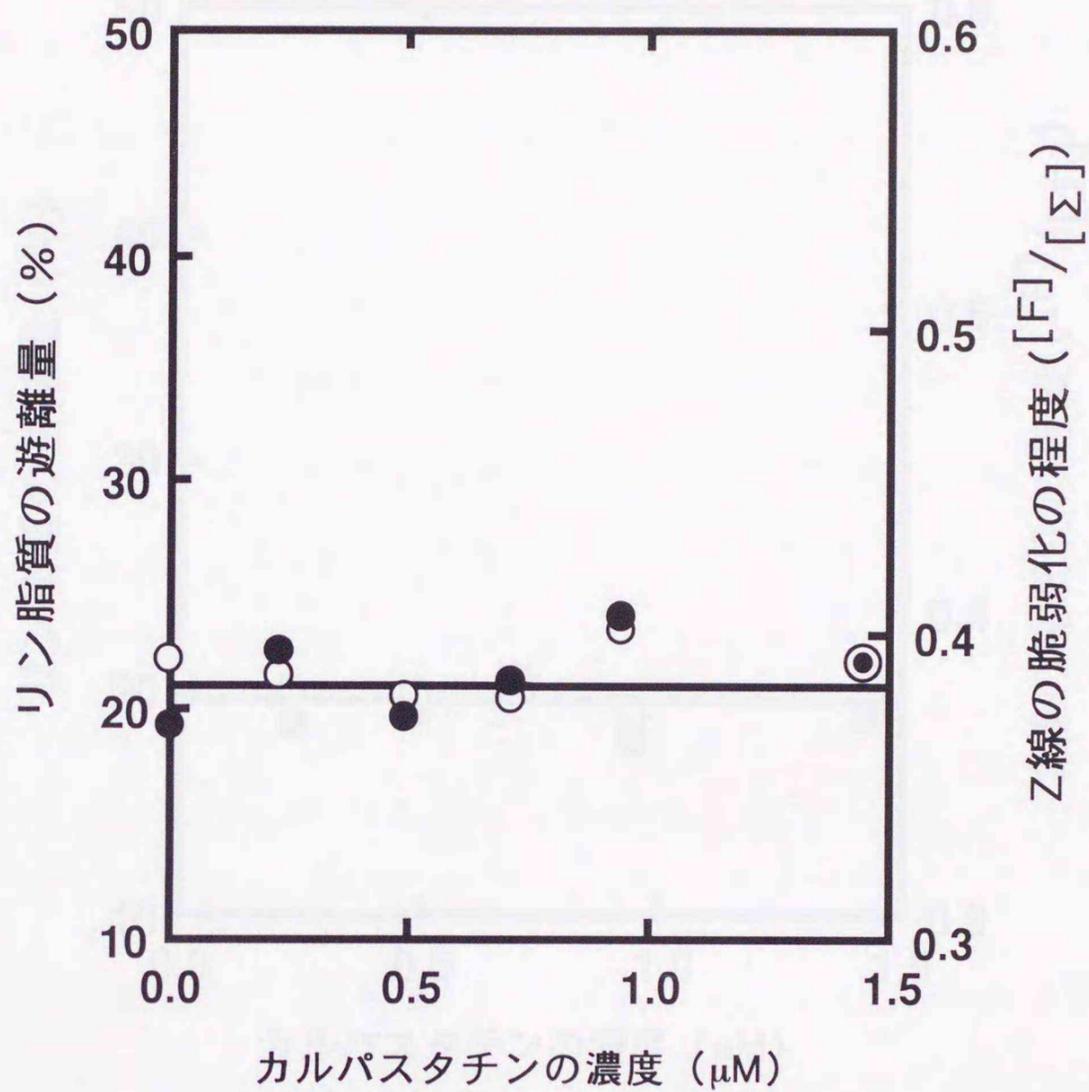
第17図 鶏浅胸筋筋原線維標品に混在するカルパインに対するカルパスタチンの阻害効果

鶏浅胸筋から調製した筋原線維を5.4 mg/mlとして、カルパスタチン濃度の異なる溶液（0~1.43 μM カルパスタチン, 0.1 M KCl, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 1 mM NaN<sub>3</sub>, 10 mM トリス-マレイン酸 緩衝液 (pH 7.0)）に浸漬して、ゆっくり攪拌しながら4℃で6時間処理した後に一定量を10,000 rpmで60秒間ホモジナイズし、Z線の脆弱化の程度（○）およびリン脂質の遊離量（●）を調べた。リン脂質の遊離量は、Ca処理前のリン脂質量に対する減少率で表わした。



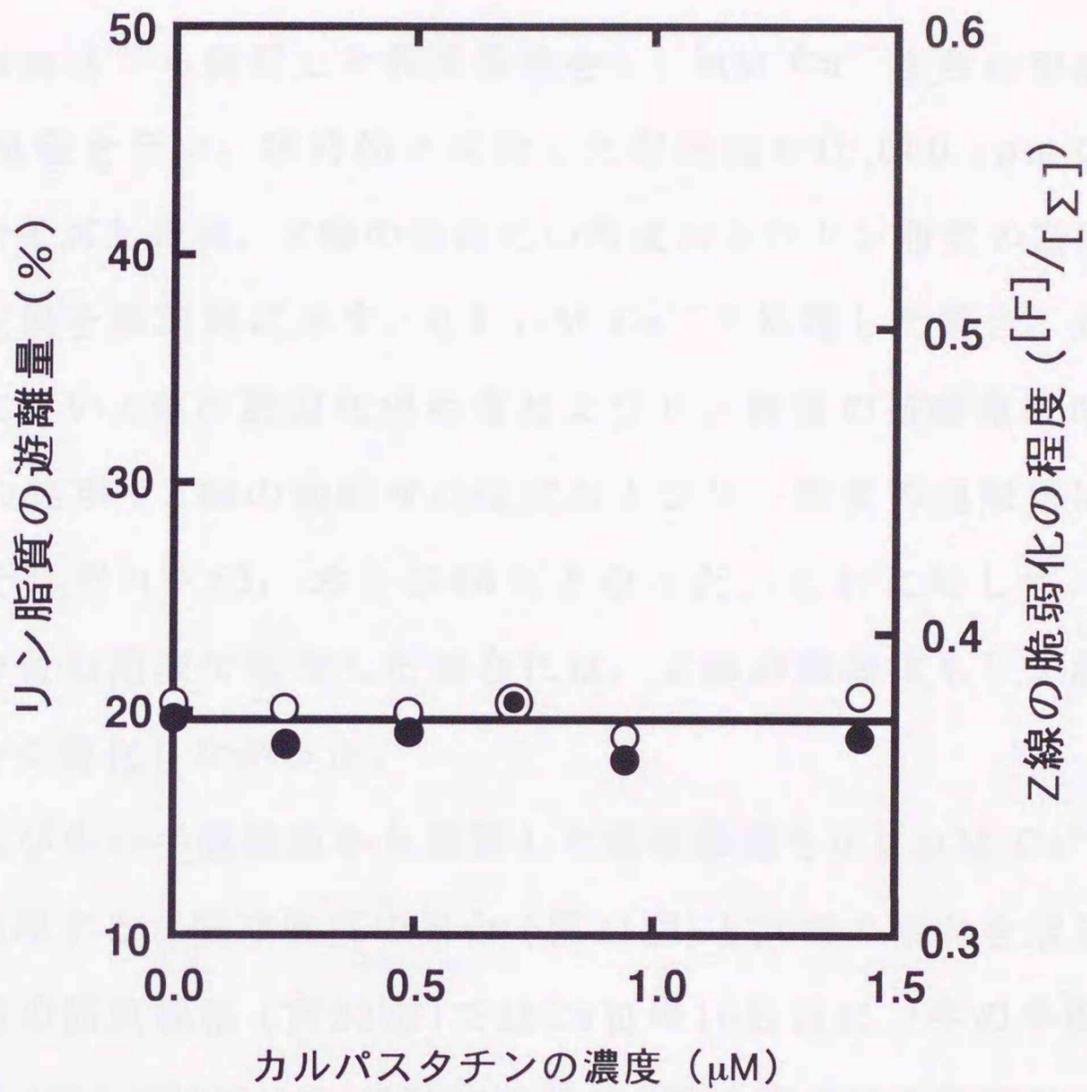
第18図 鶏半腱様筋筋原線維のCa処理におけるカルパスタチンの効果

鶏半腱様筋から調製した筋原線維 (5.4 mg/ml) を第17図と同様に処理した。  
シンボルは第17図と同じである。



第19図 豚半腱様筋筋原線維のCa処理におけるカルパスタチンの効果

豚半腱様筋から調製した筋原線維 (5.4 mg/ml) を第17図と同様の条件下で3日間処理した。シンボルは第17図と同じである。



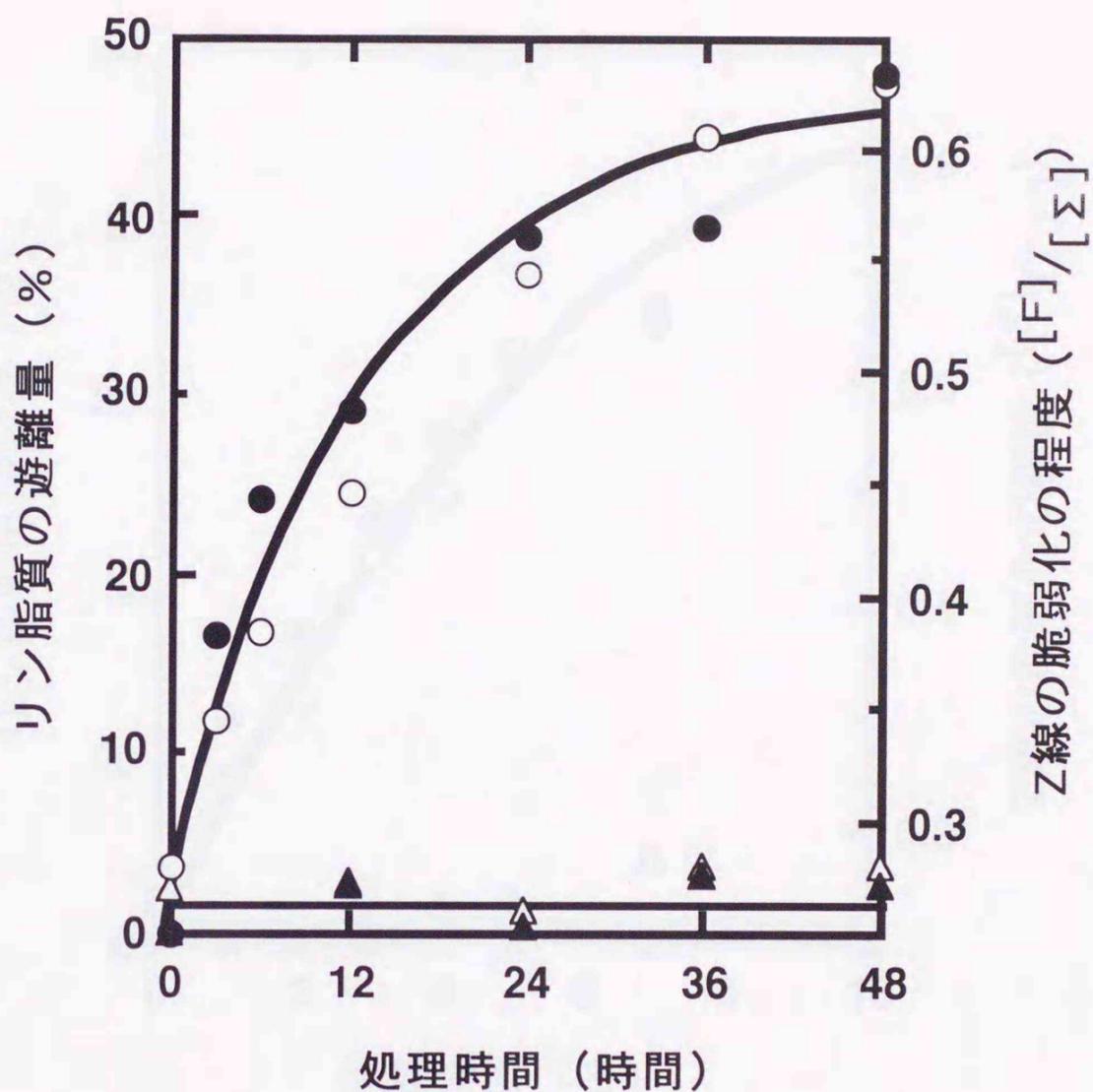
第20図 牛半腱様筋筋原線維のCa処理におけるカルパスタチンの効果

牛半腱様筋から調製した筋原線維 (6.9 mg/ml) を第17図と同様の条件下で6日間処理した。シンボルは第17図と同じである。

実験は、 $\text{Ca}^{2+}$ の直接的作用を観察するために $1.1 \mu\text{M}$ のカルパスタチン存在下で行った。

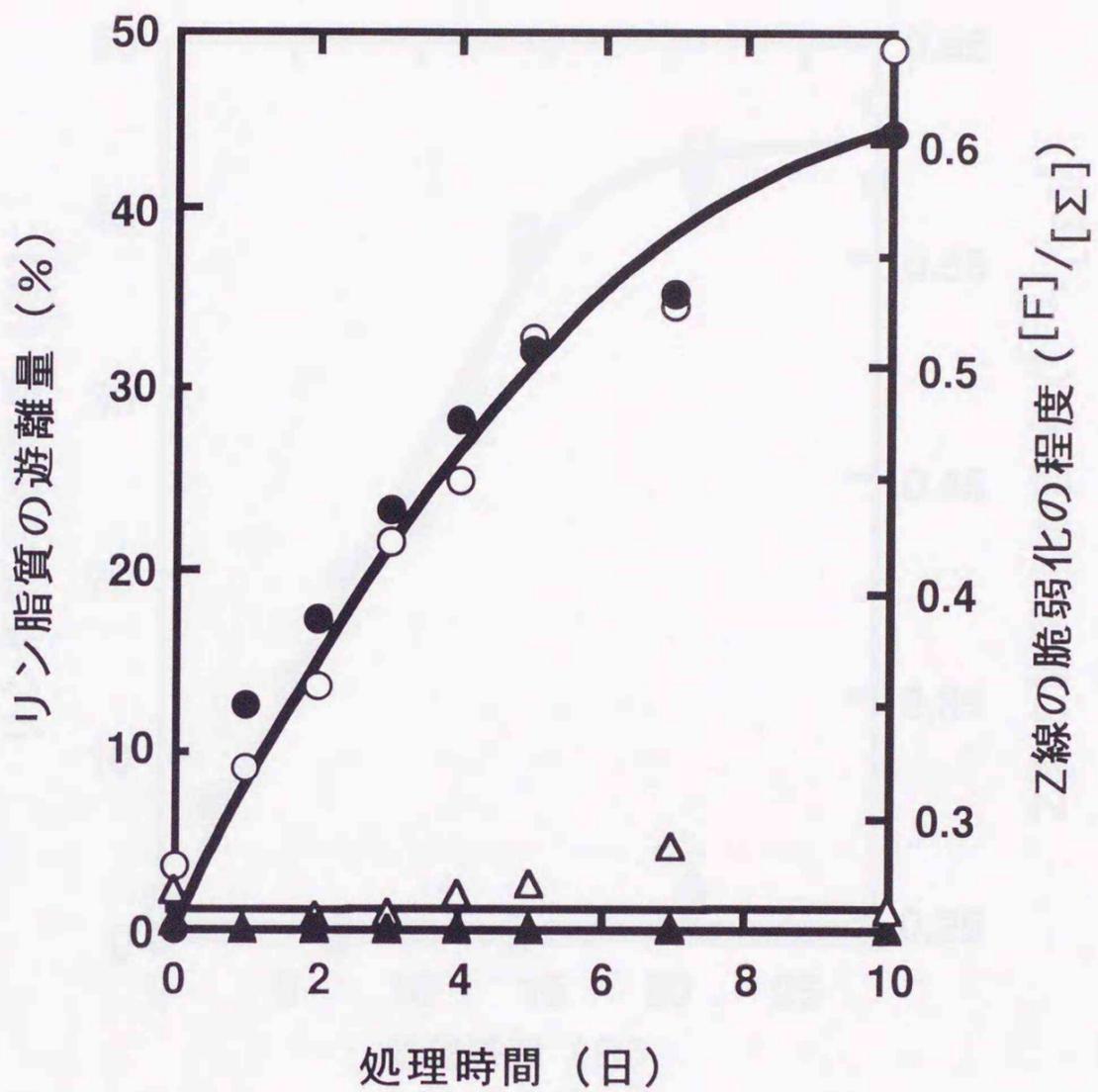
鶏の浅胸筋から調製した筋原線維を $0.1 \text{ mM Ca}^{2+}$ を含む溶液に浸漬してCa処理を行い、経時的に採取した懸濁液を $10,000 \text{ rpm}$ で60秒間ホモジナイズした後、Z線の脆弱化の程度およびリン脂質の遊離量を測定した結果を第21図に示す。 $0.1 \text{ mM Ca}^{2+}$ で処理した場合、処理時間の経過に伴いZ線の脆弱化の程度およびリン脂質の遊離量は増大し、48時間の処理でZ線の脆弱化の程度およびリン脂質の遊離量は最大となり、それぞれ $0.63$ 、および $48\%$ となった。これに対して、 $5 \text{ mM EGTA}$ を含む溶液で処理した場合には、Z線の脆弱化もリン脂質の遊離量も全く変化しなかった。

豚および牛の半腱様筋から調製した筋原線維を $0.1 \text{ mM Ca}^{2+}$ を含む溶液で処理すると鶏浅胸筋の場合(第21図)と同様の傾向を示し、豚の半腱様筋の筋原線維(第22図)ではCa処理10日目に、牛の半腱様筋の筋原線維(第23図)ではCa処理21日目でZ線の脆弱化の程度およびリン脂質の遊離量が最大となった。豚の半腱様筋の筋原線維ではCa処理10日目でZ線の脆弱化の程度は $0.63$ 、リン脂質の遊離量は $44\%$ となり、牛の半腱様筋の筋原線維ではCa処理21日目でZ線の脆弱化の程度は $0.62$ 、リン脂質の遊離量は $42\%$ であった。一方、これらの筋原線維を $5 \text{ mM EGTA}$ を含む溶液で処理するといずれの場合も全く変化が認められなかった(第22図および第23図)。第24図に、鶏の浅胸筋、豚および牛の半腱様筋から調製した筋原線維を $0.1 \text{ mM Ca}^{2+}$ で処理した際のZ線の脆弱化の程度およびリン脂質の遊離量をまとめて示した。いずれの場合も畜種に関係なく、 $0.1 \text{ mM Ca}^{2+}$ の作用によるZ線の脆弱化の



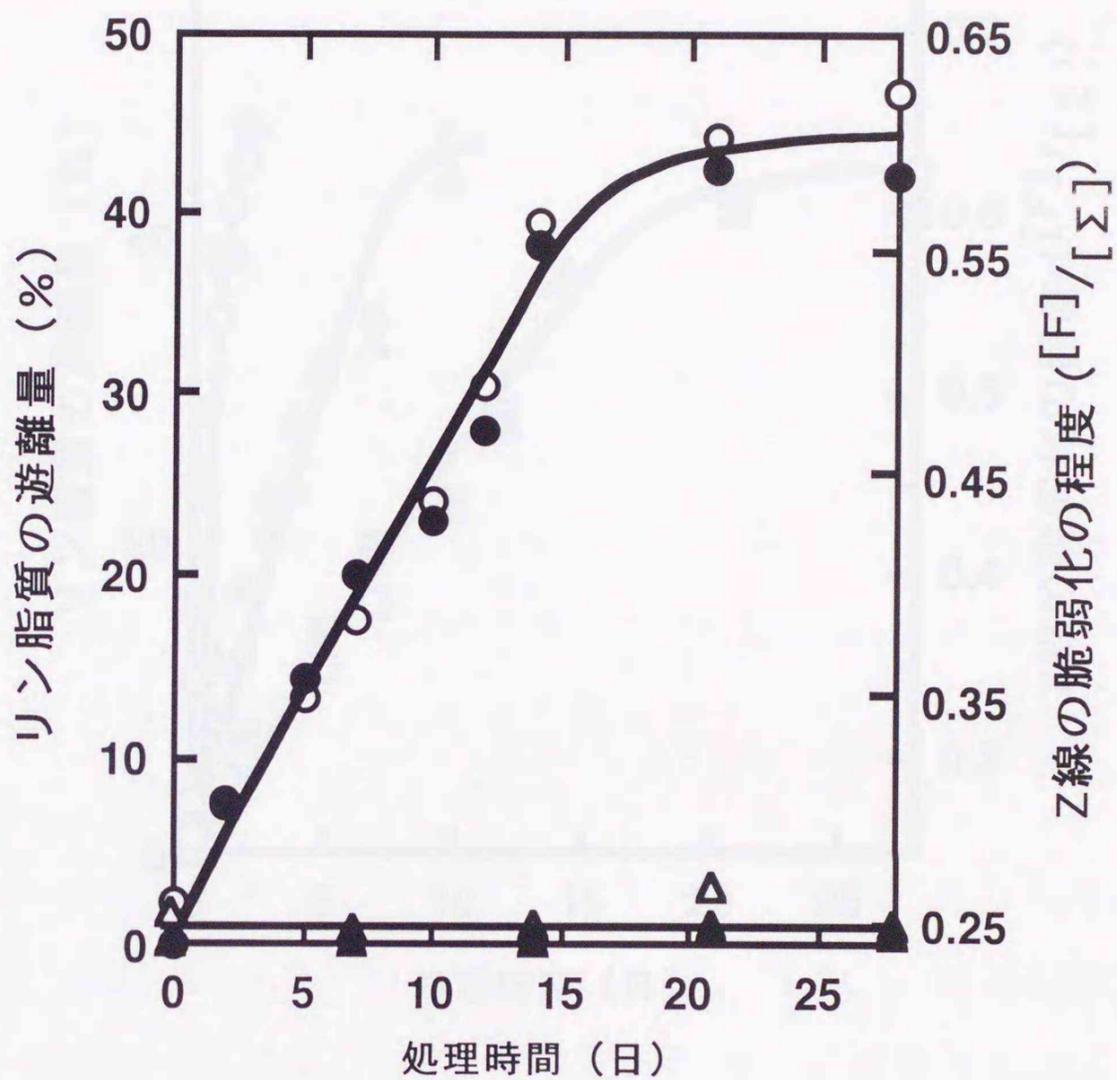
第21図 鶏浅胸筋筋原線維のZ線の脆弱化とリン脂質の遊離に対する0.1 mM  $\text{Ca}^{2+}$  の効果

鶏浅胸筋から調製した筋原線維 (5.6 mg/ml) を0.1 M KCl, 1.1  $\mu\text{M}$  カルパスタチン, 1 mM DTT, 1 mM  $\text{NaN}_3$ , 10 mM トリス-マレイン酸緩衝液 (pH 7.0) および0.1 mM  $\text{CaCl}_2$  (●, ○) あるいは5 mM EGTA (▲, △) から成る溶液に浸漬して, ゆっくり攪拌しながら4°Cで貯蔵し経時的に一定量を採取した後に10,000 rpmで60秒間ホモジナイズし, Z線の脆弱化の程度 (●, ▲) およびリン脂質の遊離量 (○, △) を調べた。リン脂質の遊離量は, Ca処理前のリン脂質量に対する減少率で表わした。



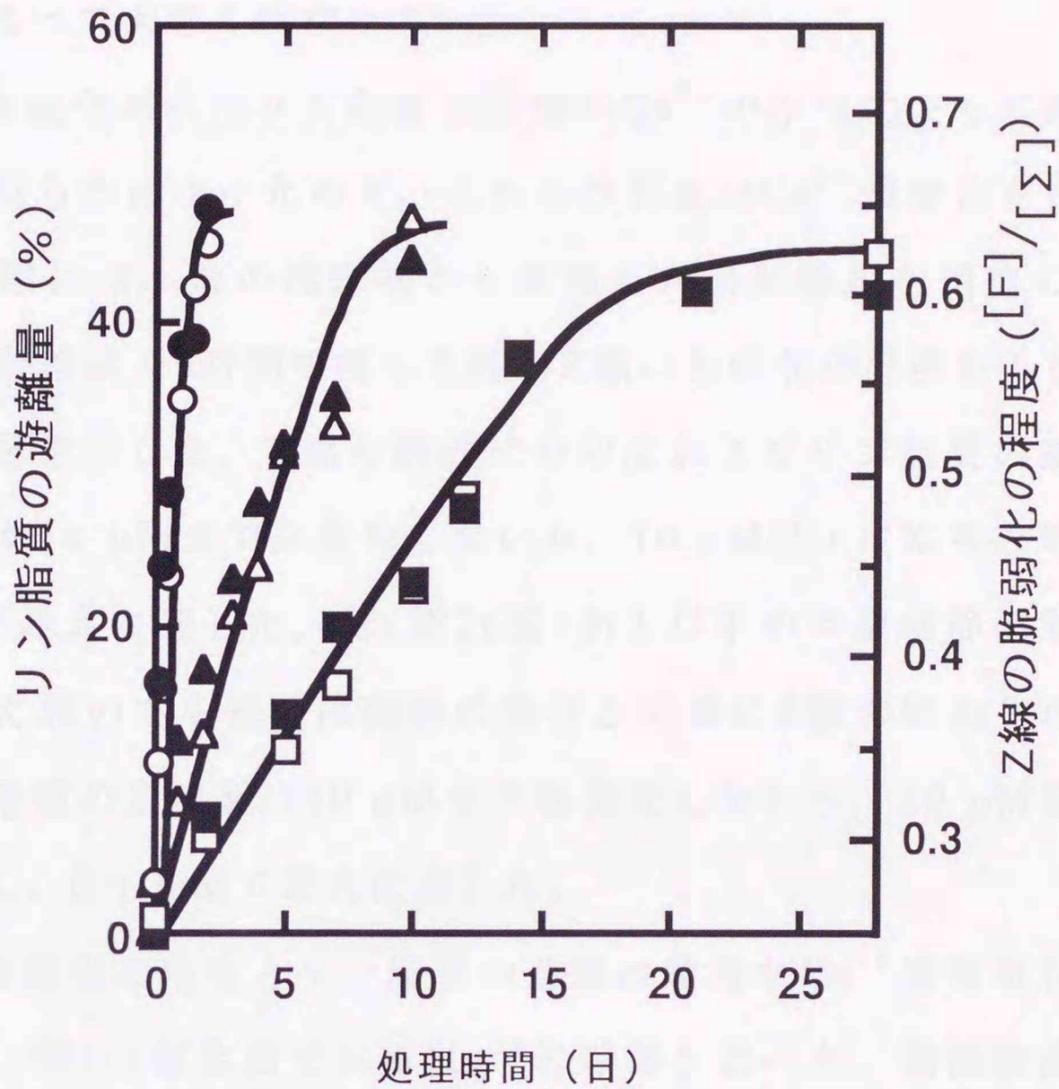
第22図 豚半腱様筋筋原線維のZ線の脆弱化とリン脂質の遊離に対する0.1 mM Ca<sup>2+</sup>の効果

豚半腱様筋から調製した筋原線維 (5.6 mg/ml) を第21図と同様の条件下で処理した。シンボルは第21図と同じである。



第23図 牛半腱様筋筋原線維のZ線の脆弱化とリン脂質の遊離に対する $0.1 \text{ mM Ca}^{2+}$ の効果

牛半腱様筋から調製した筋原線維 ( $6.5 \text{ mg/ml}$ ) を第21図と同様の条件下で処理した。シンボルは第21図と同じである。



第24図 Ca処理に伴うZ線の脆弱化とリン脂質の遊離の関係

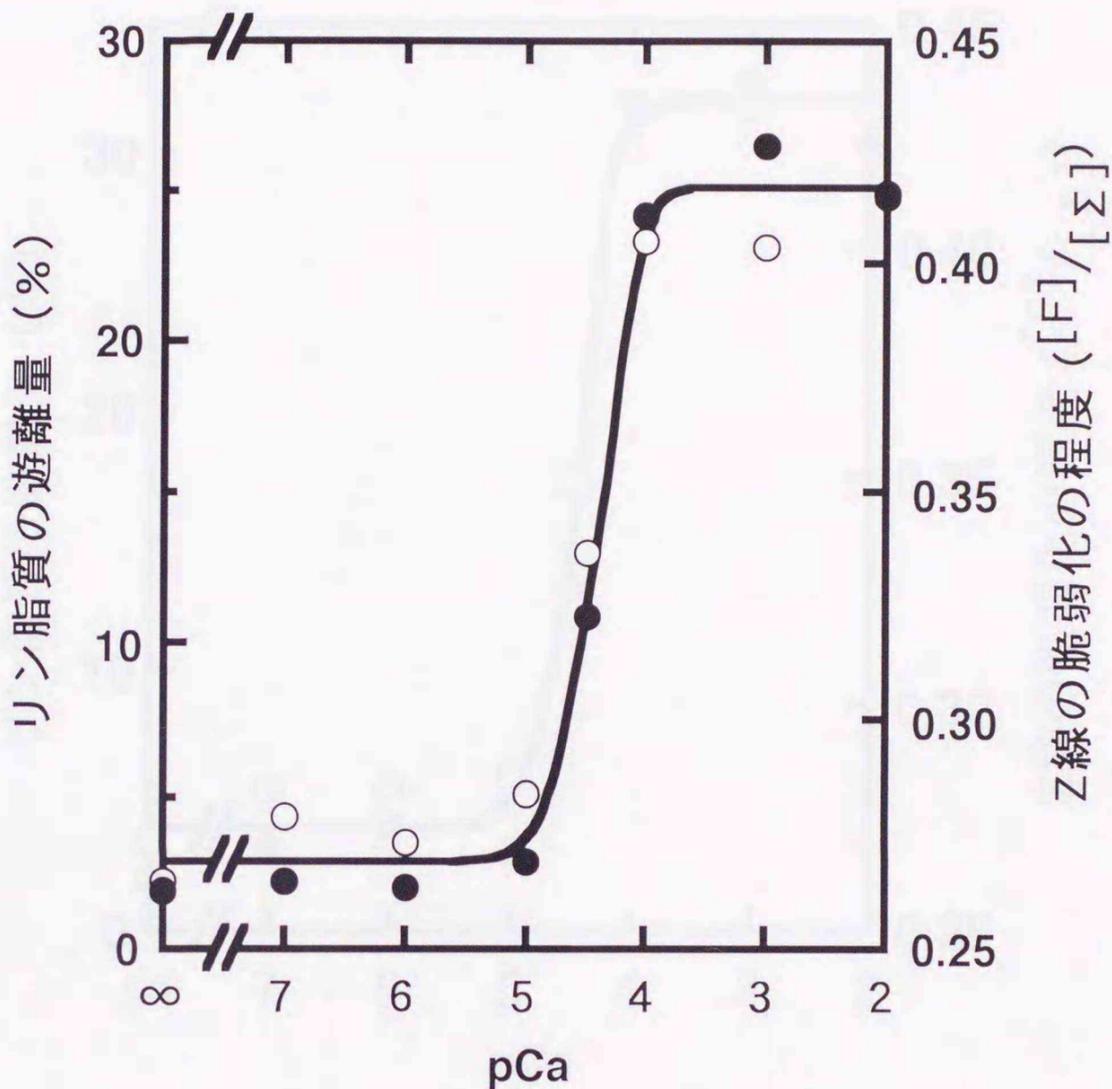
第21図、第22図および第23図で示した筋原線維のCa処理の結果をまとめて、Z線の脆弱化の程度 (○, △, □) およびリン脂質の遊離量 (●, ▲, ■) の処理時間に伴う関係を示した。○, ●は鶏の浅胸筋, △, ▲は豚の半腱様筋および □, ■は牛の半腱様筋から調製した筋原線維を示す。

程度およびリン脂質の遊離量の関係はよく一致していたが、その速度は畜種によって大きく異なっていた。

Z線の脆弱化およびリン脂質の遊離が $\text{Ca}^{2+}$ の作用によって誘起されることが明らかになったので、これらの現象の $\text{Ca}^{2+}$ 濃度依存性を調べた。第25図には、鶏の浅胸筋から調製した筋原線維を濃度の異なる $\text{Ca}^{2+}$ を含む溶液で6時間処理した際のZ線の脆弱化の程度およびリン脂質の遊離量を示した。Z線の脆弱化の程度およびリン脂質の遊離量は $\text{Ca}^{2+}$ 濃度が10  $\mu\text{M}$ までは変化しないが、10  $\mu\text{M}$ 以上になると増加し、0.1 mMで最大に達した。豚(第26図)および牛の半腱様筋の筋原線維(第27図)においても鶏の浅胸筋の場合と同様にZ線の脆弱化の程度およびリン脂質の遊離量は10  $\mu\text{M}$ までは変化しないが、10  $\mu\text{M}$ 以上になると増加し、0.1 mMで最大に達した。

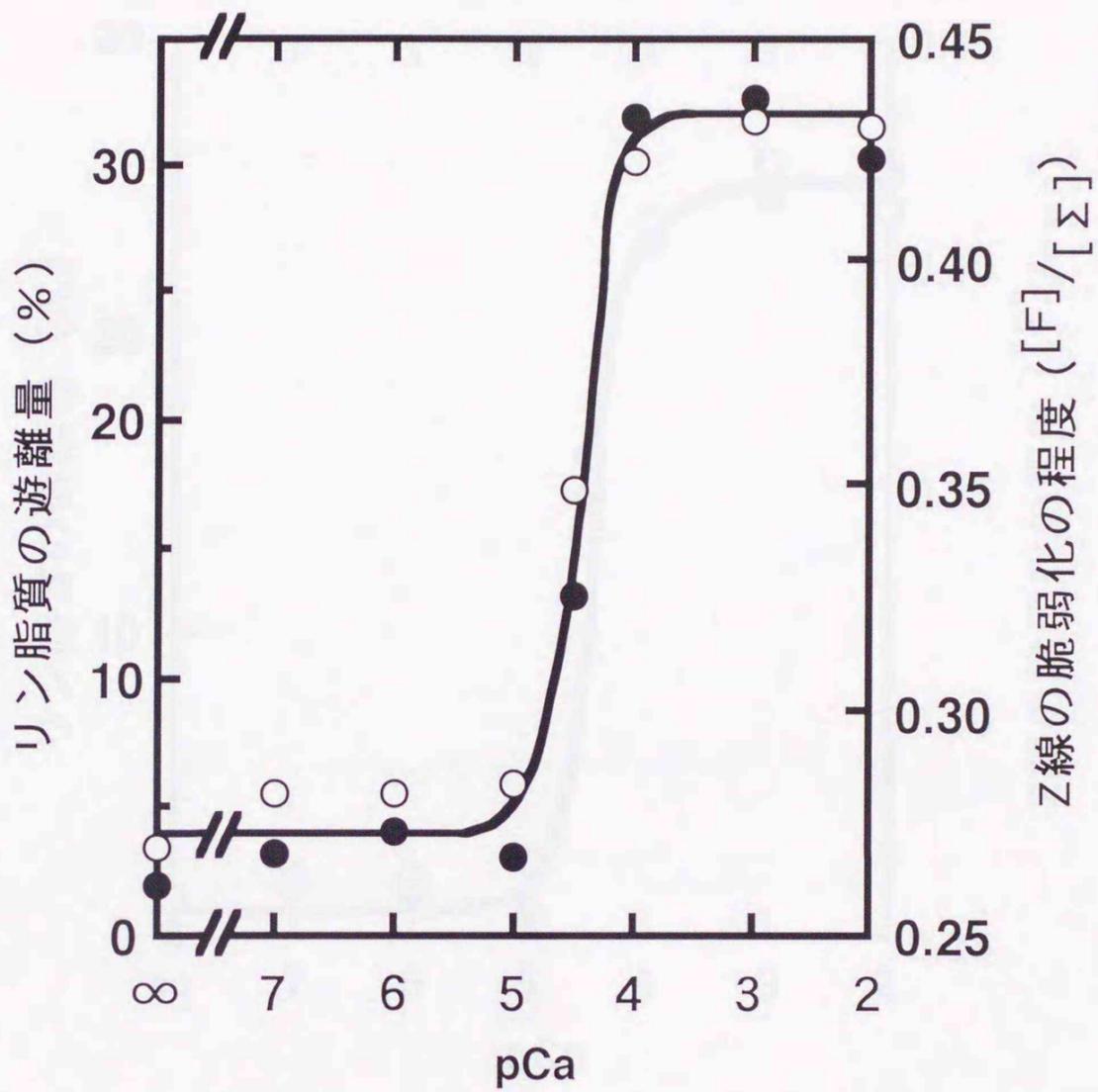
Z線の脆弱化の程度とリン脂質の遊離は顕著な $\text{Ca}^{2+}$ 濃度依存性を示したので、同じ2価金属である $\text{Mg}^{2+}$ の影響を調べた。鶏浅胸筋から筋原線維を調製して5 mM EGTAの存在下で異なる濃度の $\text{MgCl}_2$ を含む溶液で処理した際のZ線の脆弱化の程度およびリン脂質の遊離量を第28図に示した。Z線の脆弱化の程度およびリン脂質の遊離量は $\text{Mg}^{2+}$ 濃度が1 mMまでは変化しないが、1 mM以上になると $\text{Mg}^{2+}$ 濃度に依存して増加した。 $\text{Mg}^{2+}$ 濃度が100 mMになると筋原線維の構造が膨潤して異常をきたした。 $\text{Mg}^{2+}$ が $\text{Ca}^{2+}$ と同様の作用を発揮するためには $\text{Ca}^{2+}$ よりも100倍以上の濃度が必要であることが明らかになった。

鶏の浅胸筋から調製した筋原線維をpH 5.5~8.0の範囲でCa処理した際のZ線の脆弱化の程度およびリン脂質の遊離量の変化を調べた(第29図)。Z線の脆弱化の程度およびリン脂質の遊離量はpHに依存して



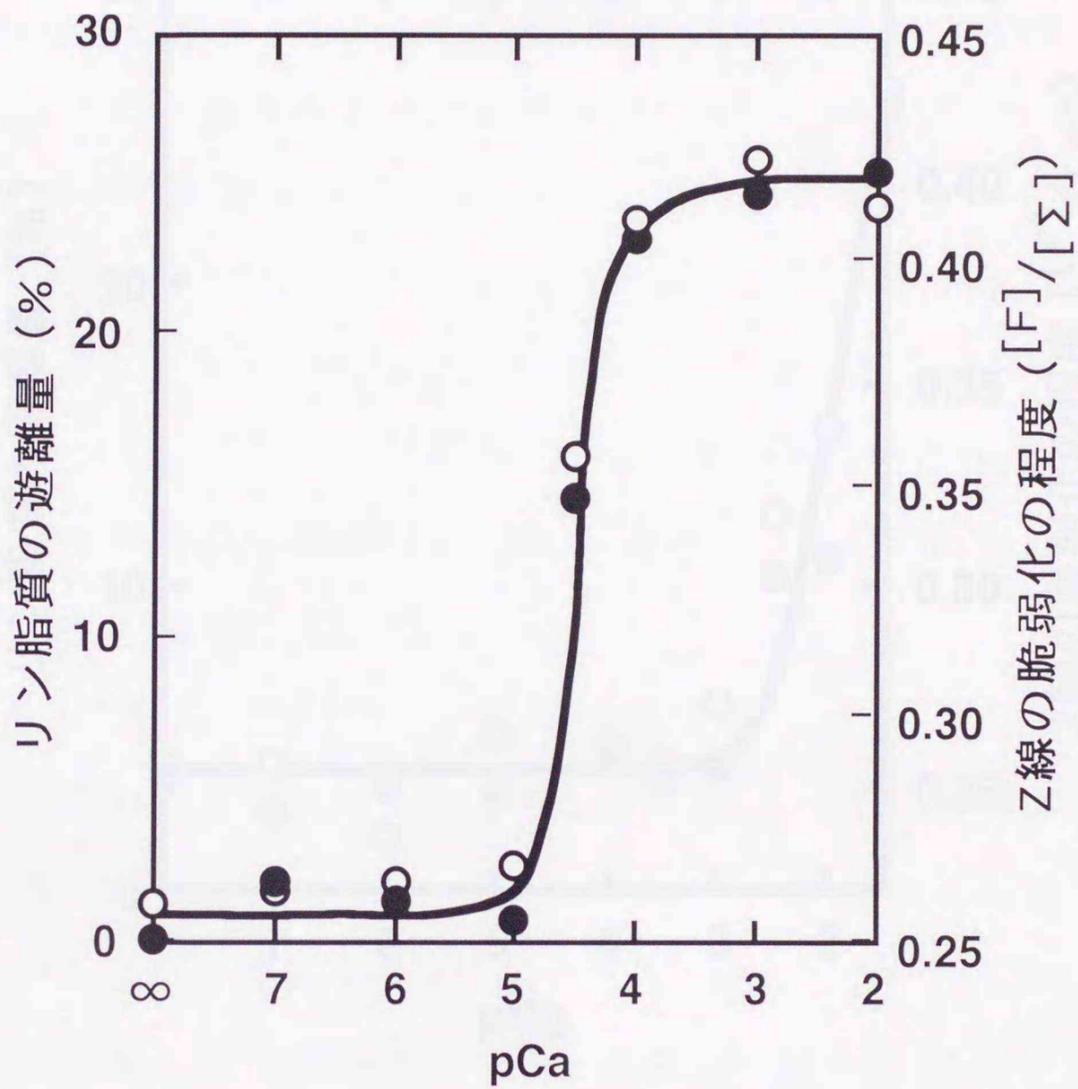
第25図 鶏浅胸筋筋原線維のZ線の脆弱化とリン脂質の遊離のCa<sup>2+</sup>濃度依存性

鶏浅胸筋から調製した筋原線維標品を5.5 mg/mlとして、Ca<sup>2+</sup>濃度の異なる溶液（5 mM EGTA～10 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.1 M KCl, 1.1 μM カルパスタチン, 1 mM DTT, 1 mM NaN<sub>3</sub>および10 mM トリス-マレイン酸緩衝液 (pH 7.0)）に浸漬して、ゆっくり攪拌しながら4℃で6時間処理した後一定量を10,000 rpmで60秒間ホモジナイズし、Z線の脆弱化の程度（○）およびリン脂質の遊離量（●）を調べた。リン脂質の遊離量は、Ca処理前のリン脂質量に対する減少率で表わした。なお、Ca<sup>2+</sup>濃度は負の対数としてpCaで表わした。



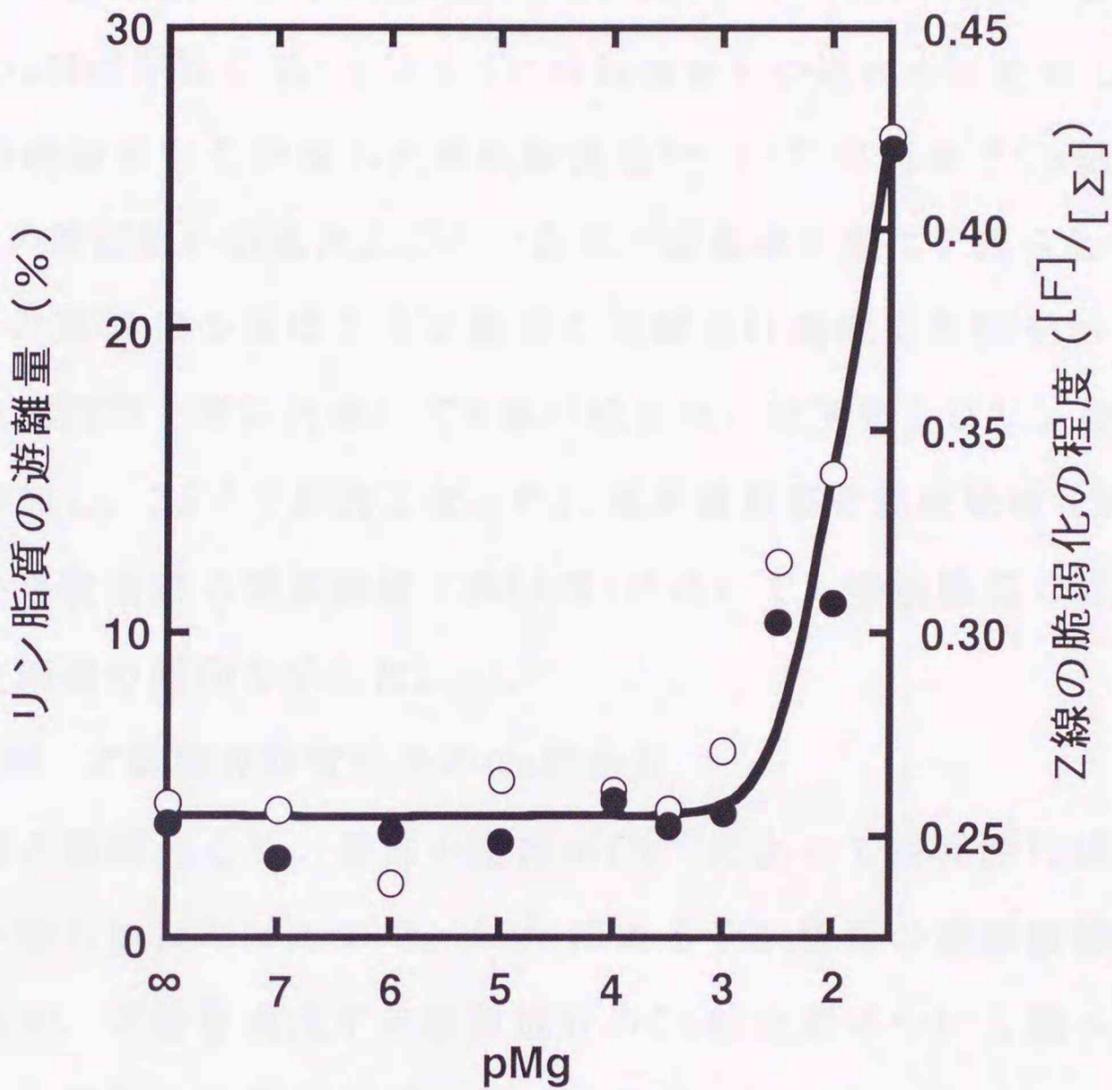
第26図 豚半腱様筋筋原線維のZ線の脆弱化とリン脂質の遊離のCa<sup>2+</sup>濃度依存性

豚半腱様筋から調製した筋原線維 (5.5 mg/ml) を第25図と同様の条件下で3日間処理した。シンボルは第25図と同じである。



第27図 牛半腱様筋筋原線維のZ線の脆弱化とリン脂質の遊離の $\text{Ca}^{2+}$ 濃度依存性

牛半腱様筋から調製した筋原線維 (6.5 mg/ml) を第25図と同様の条件下で6日間処理した。シンボルは第25図と同じである。



第28図 鶏浅胸筋筋原線維のZ線の脆弱化とリン脂質の遊離の $Mg^{2+}$ 濃度依存性

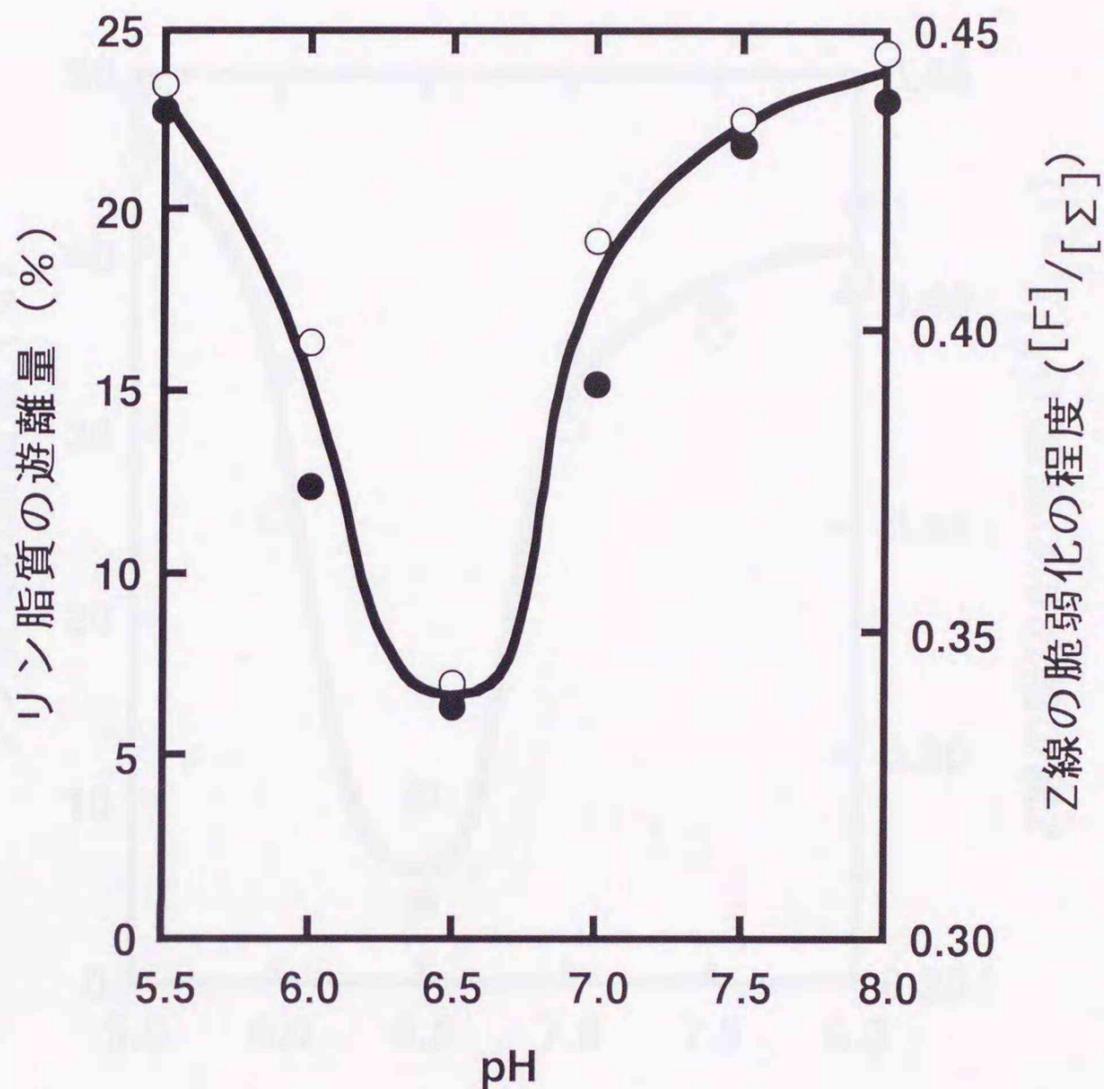
鶏浅胸筋から調製した筋原線維標品を7.6 mg/mlとして、0.1 M KCl, 1.1  $\mu$ M カルパスタチン, 5 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM  $NaN_3$ , 10 mM トリス-マレイン酸緩衝液(pH 7.0) および異なる濃度の $MgCl_2$ あるいは5 mM EDTA に浸漬して、ゆっくり攪拌しながら4°Cで6時間処理した後に一定量を10,000 rpmで60秒間ホモジナイズし、Z線の脆弱化の程度 (○) およびリン脂質の遊離量 (●) を調べた。リン脂質の遊離量は、Ca処理前のリン脂質量に対する減少率で表わした。なお、 $Mg^{2+}$ 濃度は負の対数としてpMgで表わした。

変化し、pH 6.5に最低値をもつ逆ベル型を示した。豚（第30図）および牛の半腱様筋の筋原線維（第31図）においても鶏浅胸筋の筋原線維と同様のpH依存性を示しpH 6.5に最低値をもつ逆ベル型を示した。

鶏の浅胸筋から調製した筋原線維を5~45°Cの範囲でCa処理した際のZ線の脆弱化の程度およびリン脂質の遊離量の変化を調べた（第32図）。Z線の脆弱化の程度とリン脂質の遊離量は温度依存性を示し、35°Cまでは温度の上昇に比例してZ線の脆弱化の程度およびリン脂質の遊離量は増加し、35°Cで最大となった。豚半腱様筋の筋原線維（第33図）および牛半腱様筋の筋原線維（第34図）においても鶏浅胸筋の筋原線維の場合と同様の傾向を示した。

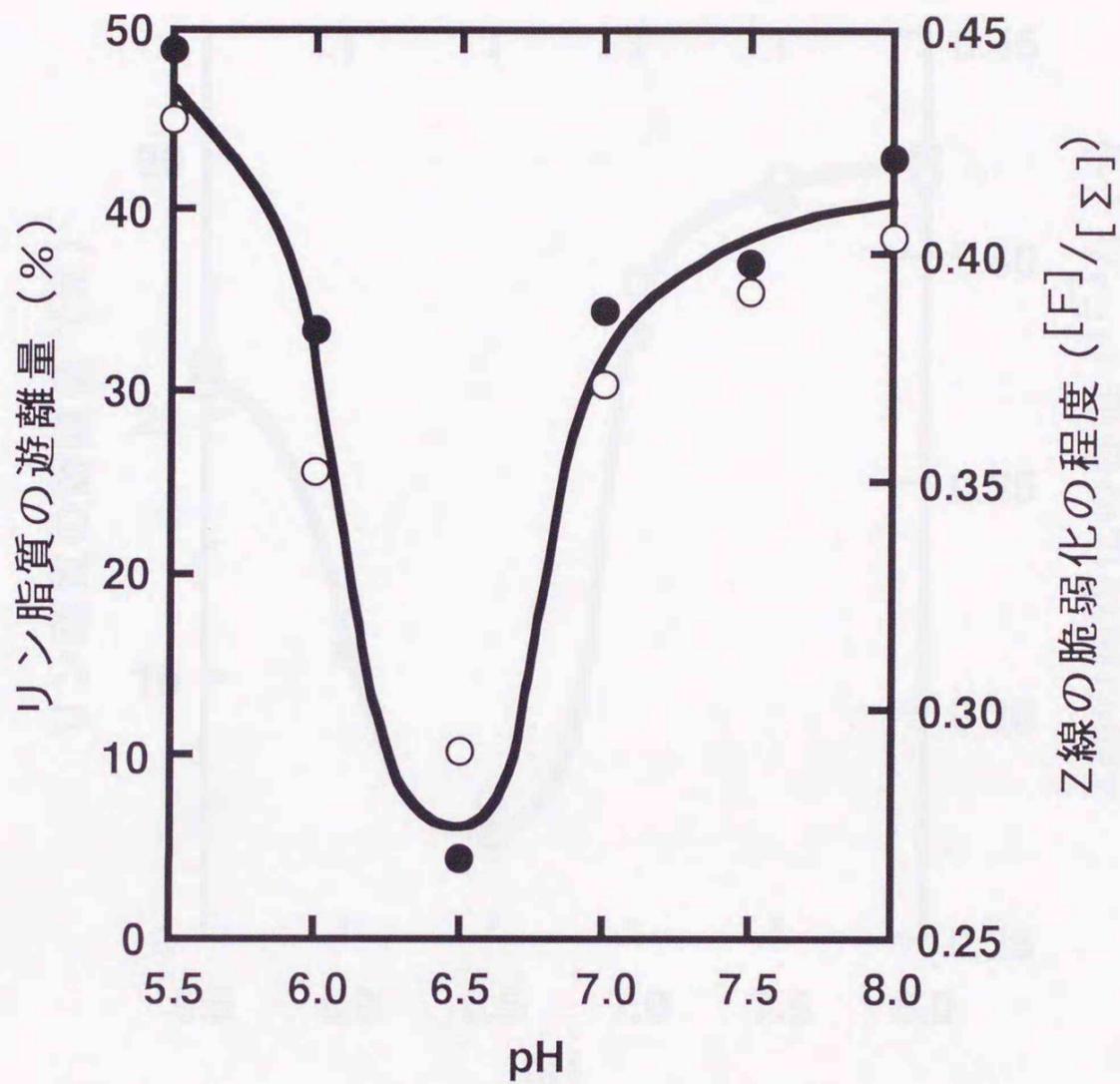
### 第3項 Z線構成脂質成分のCa結合性

Z線の脆弱化とリン脂質の遊離が $\text{Ca}^{2+}$ によって特異的に誘起されることが明らかになったので、 $\text{Ca}^{2+}$ によるリン脂質の遊離機構を解明するために、Z線を構成する脂質成分のCa結合能について調べた。鶏浅胸筋から調製した筋原線維およびI-Z-I brushから抽出した脂質濃度を変えてPVDF膜に吸着させ、 $10 \mu\text{Ci/ml } ^{45}\text{Ca}^{2+}$ を含む溶液でCa処理し、オートラジオグラフィーによって脂質の $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 結合性を調べた。筋原線維から抽出した脂質では抽出原液を1/50から1/100に濃縮したものの、I-Z-I brushから抽出した脂質では抽出原液を1/10に濃縮したものに $^{45}\text{Ca}$ の結合を示す黒色の陽性反応が認められ（第35図(1)）、I-Z-I brushから抽出した脂質成分の方が筋原線維の場合より強いCa結合能を有することが示唆された。さらに、バイオイメージングアナライザーによって黒色強度を定量的に測定すると、両者にCa濃度に依存した結合性が認められたが、その程度は筋原線維から抽出した脂質



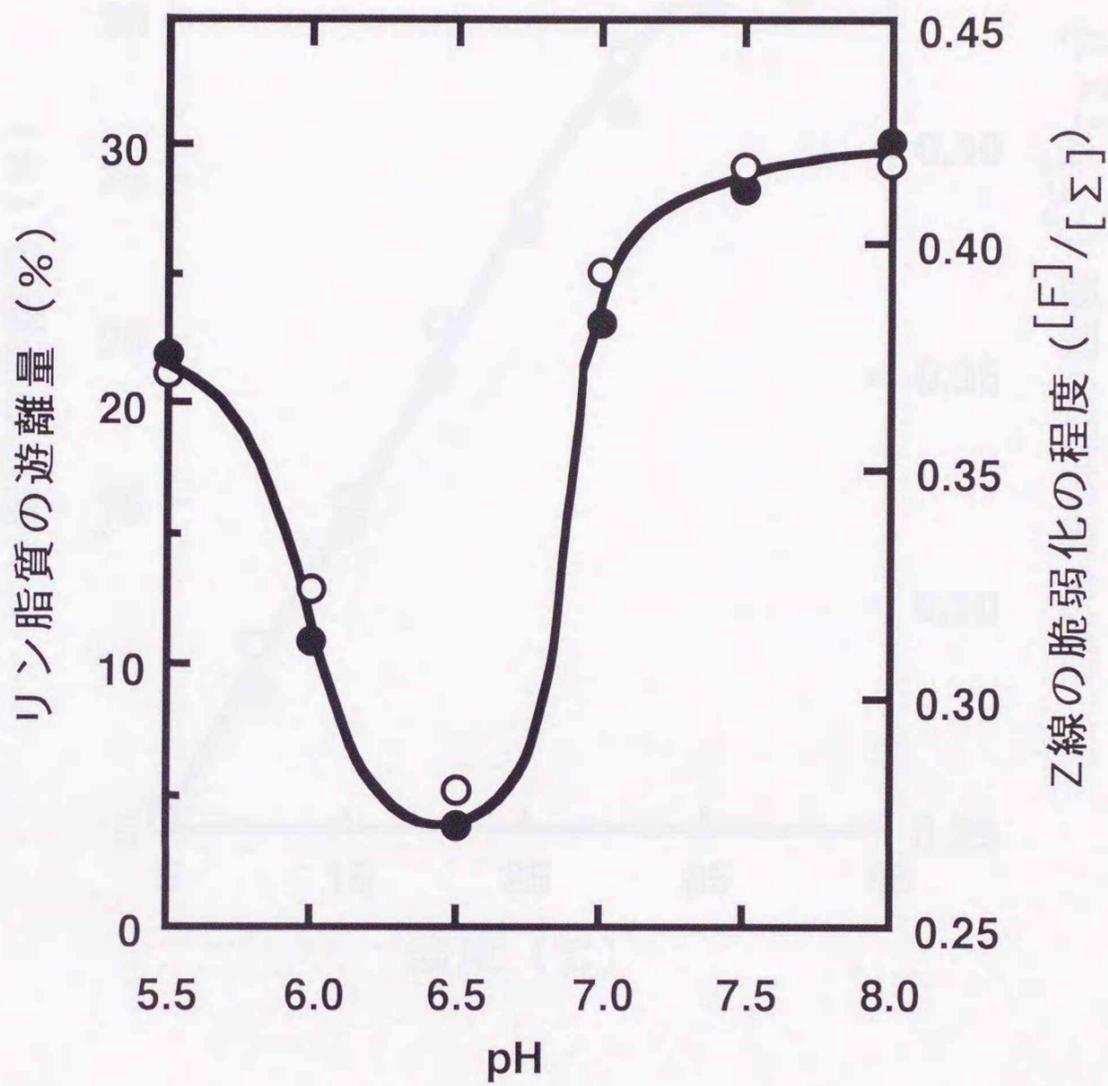
第29図 鶏浅胸筋筋原線維のZ線の脆弱化とリン脂質の遊離のpH依存性

鶏浅胸筋から調製した筋原線維を5.5 mg/mlとして、pHの異なる10 mM トリス-マレイン酸緩衝液 (pH 5.5~8.0), 0.1 M KCl, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.1 μM カルパスタチン, 1 mM DTTおよび1 mM NaN<sub>3</sub>に浸漬して、ゆっくり攪拌しながら4°Cで6時間処理した後に一定量を10,000 rpmで60秒間ホモジナイズし、Z線の脆弱化の程度 (○) およびリン脂質の遊離量 (●) を調べた。リン脂質の遊離量は、Ca処理前のリン脂質量に対する減少率で表わした。



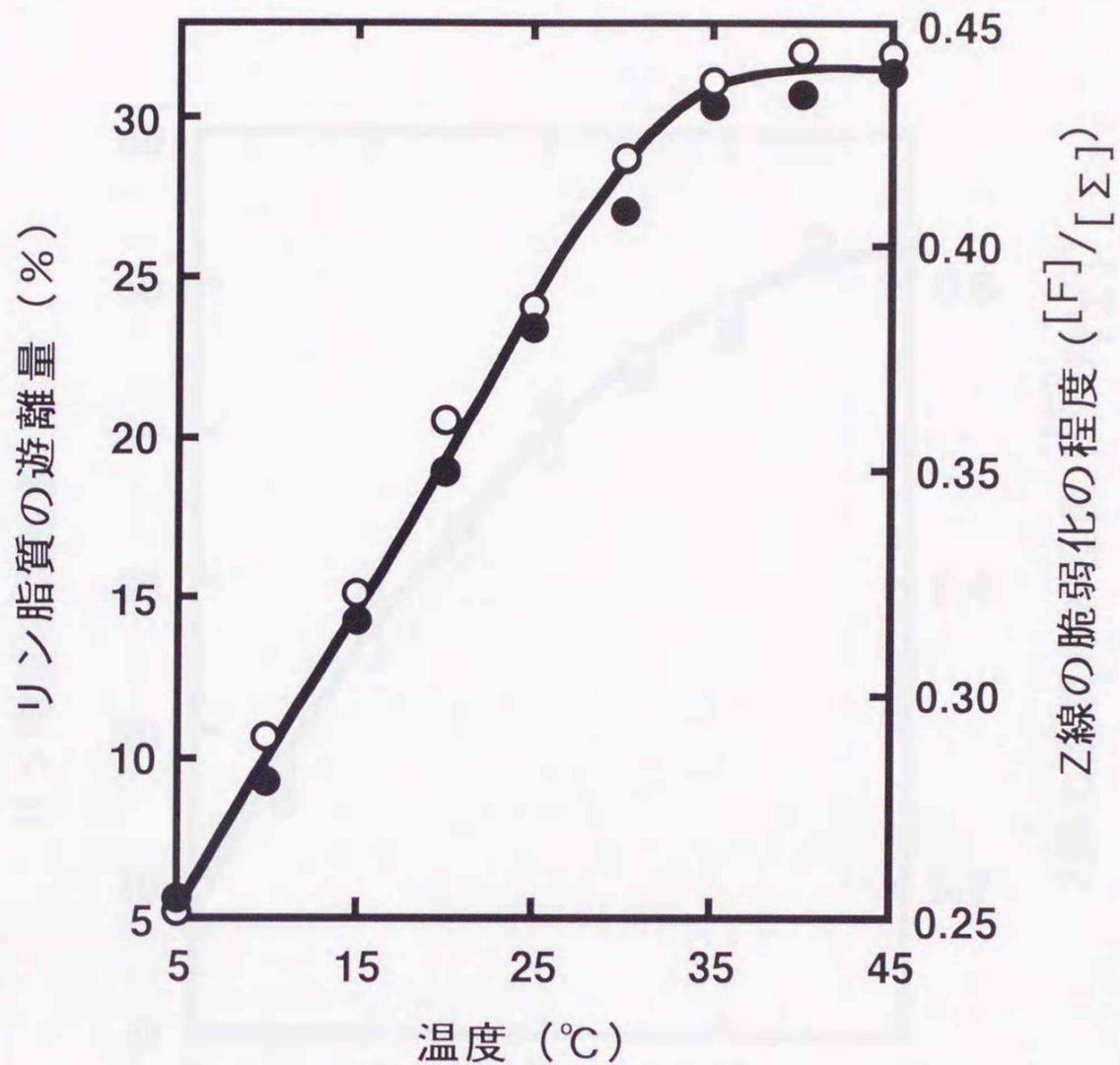
第30図 豚半腱様筋筋原線維のZ線の脆弱化とリン脂質の遊離のpH依存性

豚半腱様筋から調製した筋原線維 (6.6 mg/ml) を第29図と同様の条件下で3日間処理した。シンボルは第29図と同じである。



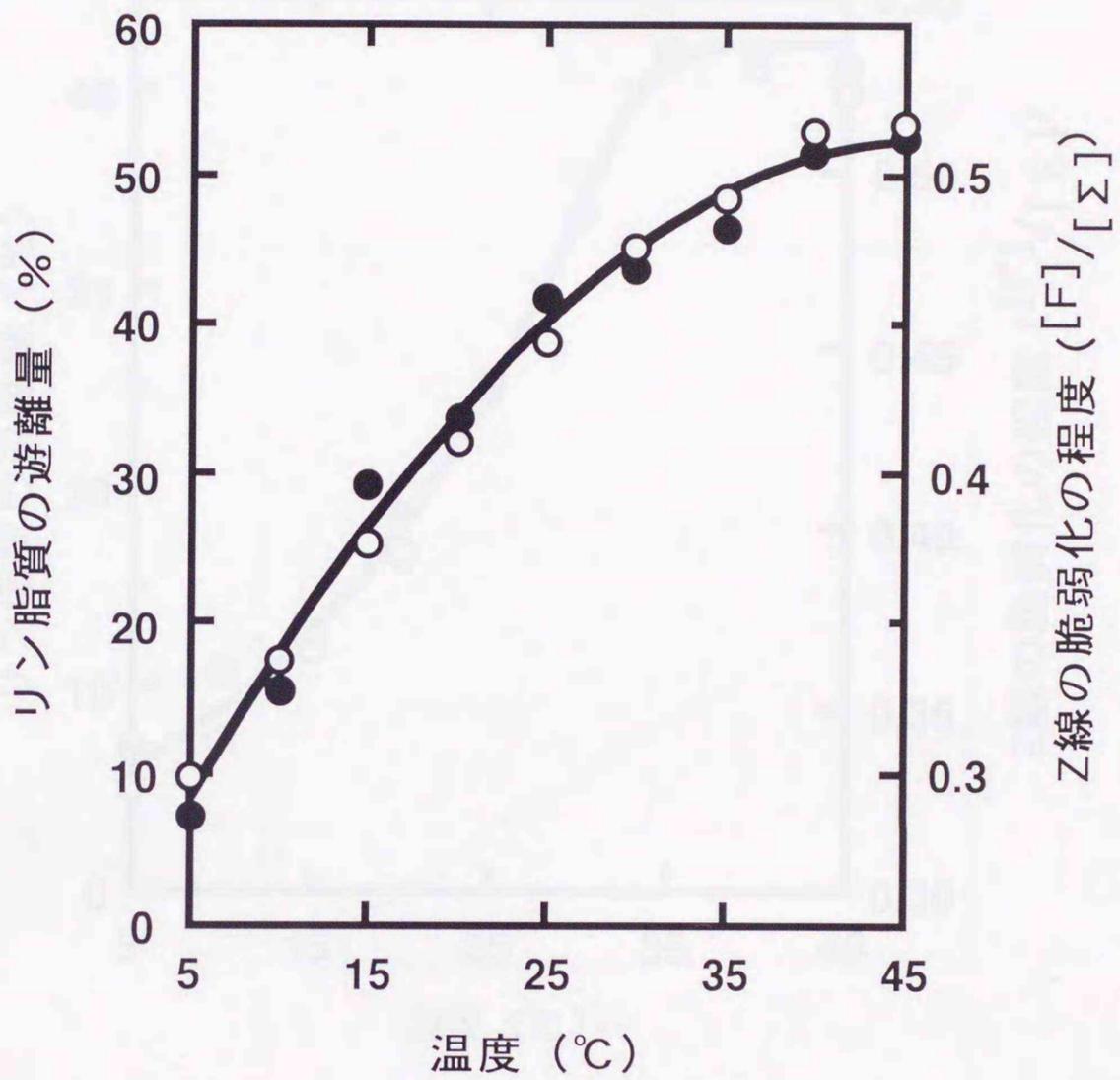
第31図 牛半腱様筋筋原線維のZ線の脆弱化とリン脂質の遊離のpH依存性

牛半腱様筋から調製した筋原線維 (6.6 mg/ml) を第29図と同様の条件下で6日間処理した。シンボルは第29図と同じである。



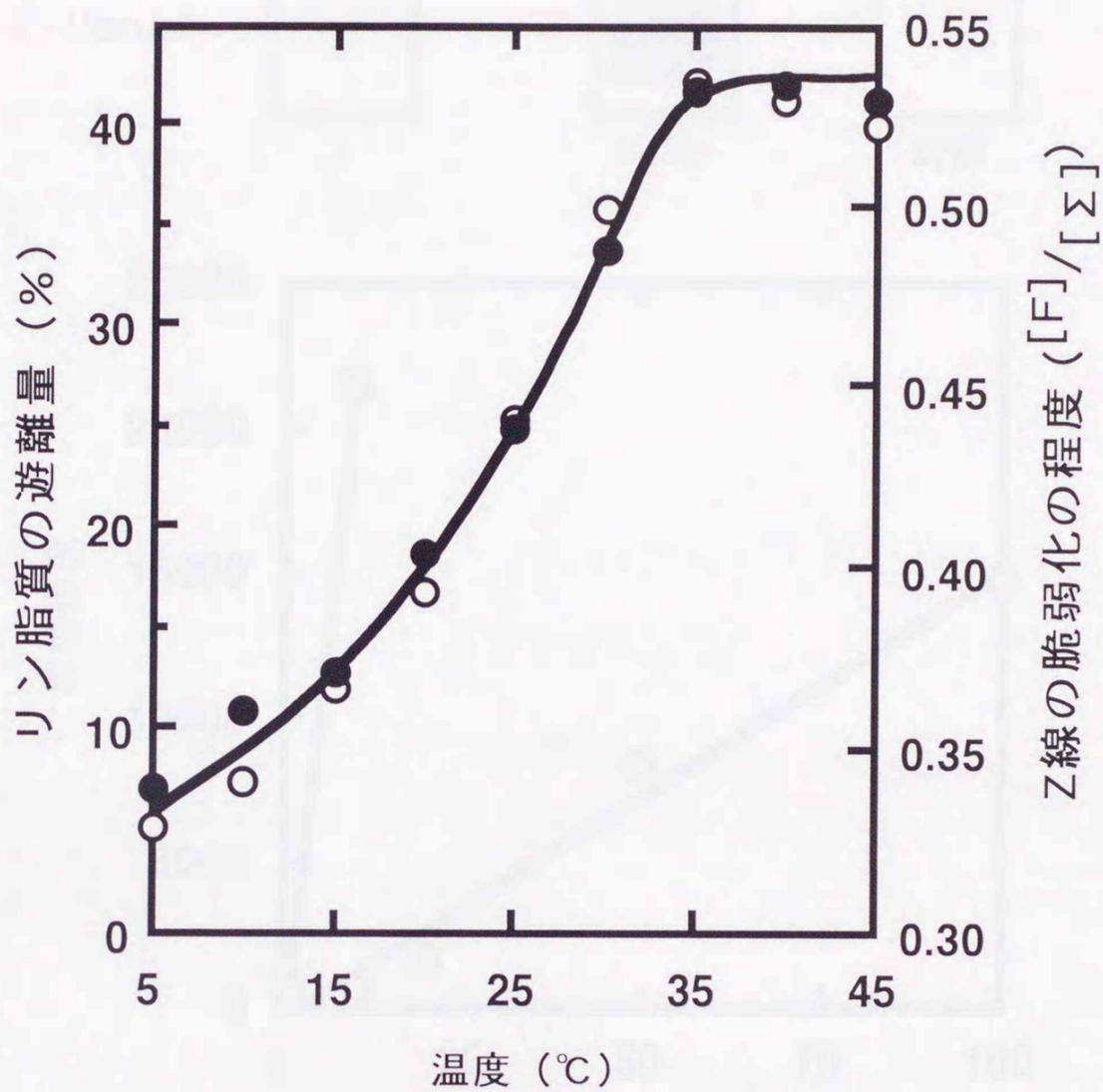
第32図 鶏浅胸筋筋原線維のZ線の脆弱化とリン脂質の遊離の温度依存性

鶏浅胸筋から調製した筋原線維を6.0 mg/mlとして、0.1 M KCl, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.1 μM カルパスタチン, 1 mM DTT, 1 mM NaN<sub>3</sub>および10 mM トリス-マレイン酸緩衝液 (pH 7.0) から成る溶液に浸漬して、温度を5~45°Cにしてゆっくり攪拌しながら3時間処理した後に一定量を10,000 rpmで60秒間ホモジナイズし、Z線の脆弱化の程度 (○) およびリン脂質の遊離量 (●) を調べた。リン脂質の遊離量は、Ca処理開始前のリン脂質量に対する減少率で表わした。



第33図 豚半腱様筋筋原線維のZ線の脆弱化とリン脂質の遊離の温度依存性

豚半腱様筋から調製した筋原線維 (5.6 mg/ml) を第32図と同様の条件下で1日間処理した。シンボルは第32図と同じである。

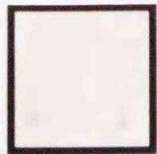


第34図 牛半腱様筋筋原線維のZ線の脆弱化とリン脂質の遊離の温度依存性

牛半腱様筋から調製した筋原線維 (6.6 mg/ml) を第32図と同様の条件下で3日間処理した。シンボルは第32図と同じである。

(1)

筋原線維



1

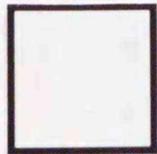


1/50

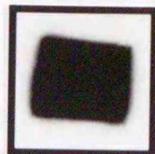


1/100

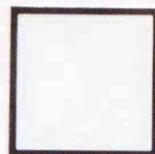
I-Z-I brush



1

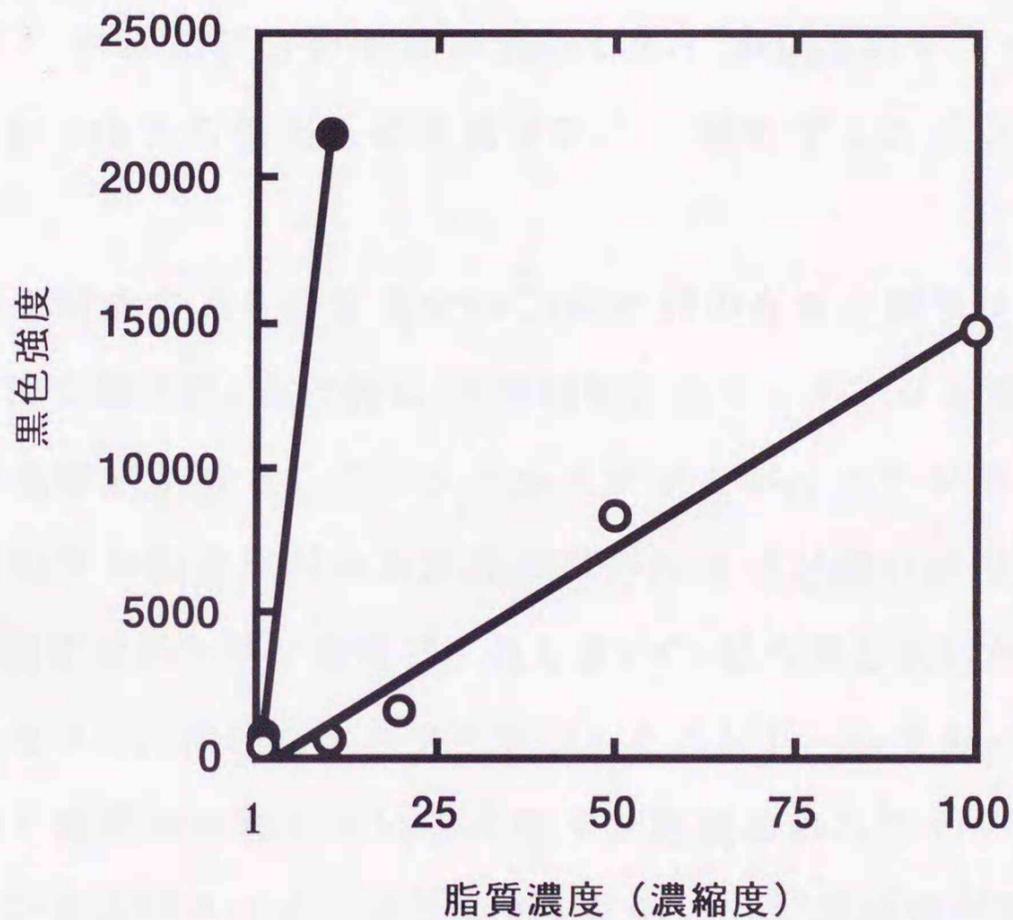


1/10



対照

(2)



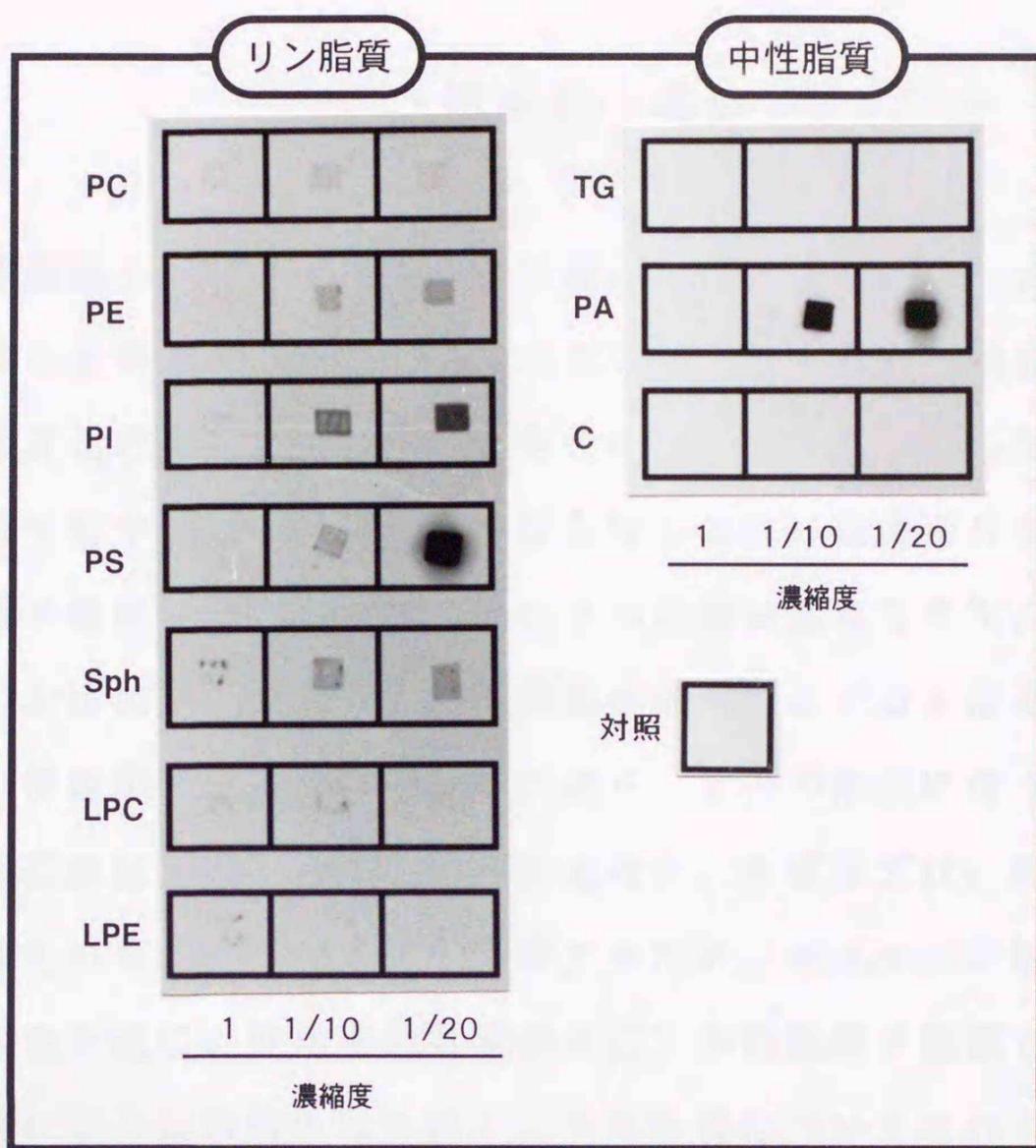
第35図 脂質とCa<sup>2+</sup>の結合能の関係

鶏の浅胸筋から調製した筋原線維およびI-Z-I brushから抽出した脂質をそれぞれの濃縮度に濃縮し、PVDF膜に結合させて、10  $\mu\text{Ci/ml}$  <sup>45</sup>CaCl<sub>2</sub>を含んだ0.1 M KCl, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 1 mM NaN<sub>3</sub>および10 mM トリス-マレイン酸緩衝液 (pH 7.0) から成る溶液でCa処理した後、良く洗浄し、オートラジオグラフィーを行った。(1) はそのままX線フィルムに露光した場合である。(2) はイメージングプレートに露光してバイオイメージングアナライザーBAS 1000で放射線量を測定し、測定値から脂質の結合していない場合の値を差し引いて黒色強度とし、横軸はPVDF膜への結合に用いた脂質成分の濃縮の程度で、1は抽出原液を、100は1/100倍に濃縮したことを示す。○, 筋原線維; ●, I-Z-I brush.

よりもI-Z-I brushの方が顕著に大きかった(第35図(2))。これらの結果は筋原線維から抽出された脂質成分のCa結合性は主としてZ線を構成している脂質成分に由来するものであることを示唆している。他の骨格筋についてもZ線を構成する脂質がCa<sup>2+</sup>と結合するか否かを調べた(第36図)。鶏の浅胸筋、半腱様筋および平目筋のI-Z-I brush、さらに豚、牛および兎の半腱様筋のI-Z-I brushのいずれにおいてもI-Z-I brushから抽出した脂質がCa<sup>2+</sup>と結合することが明らかになった。

Z線を構成する各脂質成分のCa結合能の有無を標準脂質を用いて同様の方法で調べた(第37図)。中性脂質としてトリアシルグリセロール、および遊離脂肪酸としてトリパルミチンとパルミチン酸を用いた。中性脂質のうち結合能がみられたのはパルミチン酸のみであった。また極性脂質すなわちリン脂質で、最も強いCa結合能を示したのはホスファチジルセリン、次いでホスファチジルイノシトールであった。さらに、分子内で電荷が中和している中性リン脂質のホスファチジルエタノールアミンおよびスフィンゴミエリンに弱いCa<sup>2+</sup>結合能が見られた。





第37図 各脂質成分のCa<sup>2+</sup>結合性

各脂質溶液 (5 mg/ml) の濃縮度がそれぞれ1, 1/10, 1/20になるようにした脂質溶液にPVDF膜 (5 mm×5 mm) を浸漬した後, 取り出して乾燥後に10 μCi/ml <sup>45</sup>CaCl<sub>2</sub> を含んだ0.1 M KCl, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 1 mM NaN<sub>3</sub>および10 mM トリス-マレイン酸緩衝液 (pH 7.0) から成る溶液でCa処理し, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>を含まない溶液で洗い, X線フィルムに露光した。標準リン脂質は, ホスファチジルコリン (PC), ホスファチジルエタノールアミン (PE), ホスファチジルイノシトール (PI), ホスファチジルセリン (PS), スフィンゴミエリン (Sph), リゾホスファチジルコリン (LPC), リゾホスファチジルエタノールアミン (LPE) を, 標準中性脂質は, トリアシルグリセロールとして, トリパルミチン (TG), 遊離脂肪酸として, パルミチン酸 (PA), コレステロール (C) を用いた。対照として, 脂質を吸着させなかったPVDF膜を試料と同様に処理した。PSおよびPAについては, 濃縮度を10 (10倍希釈), 1, 1/10とした。

## 第4章 考察

筋原線維のZ線の構造は食肉の熟成に伴い脆弱となり食肉の軟化を誘起する主要な要因の一つとなっている。これまで、熟成に伴うZ線の構造変化は単離した筋原線維を位相差顕微鏡で観察したり、熟成した食肉を化学固定して脱水および包埋した後に超薄切片を作成して透過型電子顕微鏡で観察することによって研究されてきた。しかし、これらの方法に基づく観察結果は試料作成中に生ずる人工産物のために正しい情報が得られない可能性が高く、食肉の熟成に伴うZ線の構造変化を正確に把握したものとは言えない。本研究では、熟成中の食肉のZ線そのものの構造変化を観察するため、グリセリン処理筋から凍結切片を作成し、位相差顕微鏡および干渉顕微鏡で観察した。位相差顕微鏡による観察結果は単離した筋原線維についてこれまでに報告されている結果と同様のものではあったが、干渉顕微鏡による観察からは、新しい知見を得ることができた。即ち、屠畜直後の骨格筋ではサルコメアにおけるZ線部分が豊富な物質の存在により高く隆起した構造物として認められるが、熟成に伴ってその高さが明らかに減少し、Z線から構成物質が失われていることを明瞭に示している。このことは、位相差顕微鏡によって観察されるZ線の消失という現象はZ線を構成する物質がZ線から遊離することを示すものであり、このことがZ線の脆弱化を惹き起こすことは疑う余地がないことである。Z線は骨格構造を形成するZ-フィラメントとその間隙を埋める無定形物質から構成されている<sup>52,53)</sup>。従って、熟成に伴うZ線の脆弱化はこれら2つのいずれか、あるいはその両者を構成する成分の消失に由来しているも

のと考えられる。先ず第1に、Z-フィラメントを形成している $\alpha$ -アクチニンが食肉の熟成中にプロテアーゼによって加水分解されること、あるいは加水分解されずにZ線から遊離することによってZ線の脆弱化を惹き起こす可能性が考えられた。この可能性の是非を論ずるためには、Z線を構成する $\alpha$ -アクチニンが筋原線維でどの程度の量で存在しているのか、熟成に伴い量的に変化するのか、加水分解が起こるのか、およびZ線部分から消失するのかという点を確認しなければならない。屠畜直後の骨格筋から調製した筋原線維では骨格筋の種類に関係なく、概ね筋原線維のタンパク質100 g当たりの $\alpha$ -アクチニン含量は2.2 g~3.3 gで、この含量は牛肉を21日間熟成しても、豚肉を7日間熟成してもほとんど減少しない。安も牛および豚の半腱様筋を用いて同様の結果を示している<sup>35)</sup>。Takahashiらは家兎の胸最長筋の熟成に伴う $\alpha$ -アクチニン含量の変化は4日間以上熟成しても0.8%しか変化しないと報告している<sup>34)</sup>。一方、ChouらはSDS-PAGEによってブロイラーの胸筋および脚筋でいずれも熟成に伴い $\alpha$ -アクチニン(100 kDa)のバンドが減少し、 $\alpha$ -アクチニンのすぐ下に98 kDa成分が生成し、この原因がカルパインの作用による $\alpha$ -アクチニンの分解であることを示唆している<sup>56)</sup>が、GollらはカルパインはZ線から $\alpha$ -アクチニンを加水分解せずに遊離させる<sup>57)</sup>と報告しているので、両者の報告には矛盾がある。第6図に示したように抗 $\alpha$ -アクチニン抗血清を用いたイムノブロット法によっても熟成した牛および豚の半腱様筋のいずれの場合も $\alpha$ -アクチニンのバンドは単一であり、これらの結果から食肉の熟成に伴って $\alpha$ -アクチニンは変化しないと結論することができる。さらに、間接免疫抗体法を用いた予備的な実験において、熟成後の牛半腱

様筋から調製した筋原線維を抗 $\alpha$ -アクチニン抗体で処理すると、小片になった数個のサルコメアから成る筋原線維の両端には $\alpha$ -アクチニンの局在を示す蛍光が観察されるという実験結果を得ている。このことも、また、熟成に伴い筋原線維の構造が脆弱になるのは、Z線の骨格構造を形成する $\alpha$ -アクチニンの変化によるものではなく、骨格構造の間隙を埋める無定形物質の減少によるものであることを強く示唆している。

それではZ線の無定形物質はどのような成分によって構成されているのだろうか？ 無定形物質として、すでに多くのタンパク質が報告されているがいずれも含量が少なく、これら微量タンパク質が熟成に伴う食肉の軟化の要因となるようなZ線の構造変化を惹き起こすとは考え難い。そこで、タンパク質以外の成分でZ線の構造変化を誘起するのに十分な量の物質の存在が考えられた。これまでに、昆虫の飛翔筋を用いた研究では、筋原線維にリパーゼ<sup>58,59)</sup>や有機溶媒<sup>60)</sup>を作用させるとZ線が消失することが報告されている。リン脂質の1種類であるホスファチジルイノシトール4,5-ビスリン酸が鶏胸筋のZ線に局在する<sup>61)</sup>という報告があり、Z線に脂溶性の物質が存在することが示唆されている。もし、脂質が存在するならば、脂質を可溶化する薬剤で筋原線維を処理することによりZ線の構造変化を掌握できるようになるはずである。この考えに基づき、非イオン系の界面活性剤であるTriton X-100で筋原線維を処理すると、位相差顕微鏡像ではZ線が殆ど観察されなくなり、微分干渉顕微鏡像では、Z線部分の隆起が低下し、豊富に存在していた物質が少なくなることがわかった。この現象は食肉の熟成に伴うZ線の構造変化と一致し、界面活性剤で可溶化される物

質が食肉の熟成中にZ線から遊離することを示唆している。Z線の骨格構造を形成する $\alpha$ -アクチニンが脂肪酸の1種であるパルミチン酸と相互作用するというMeyerらの報告<sup>62)</sup>も、脂質がZ線に存在するという見解を支持している。

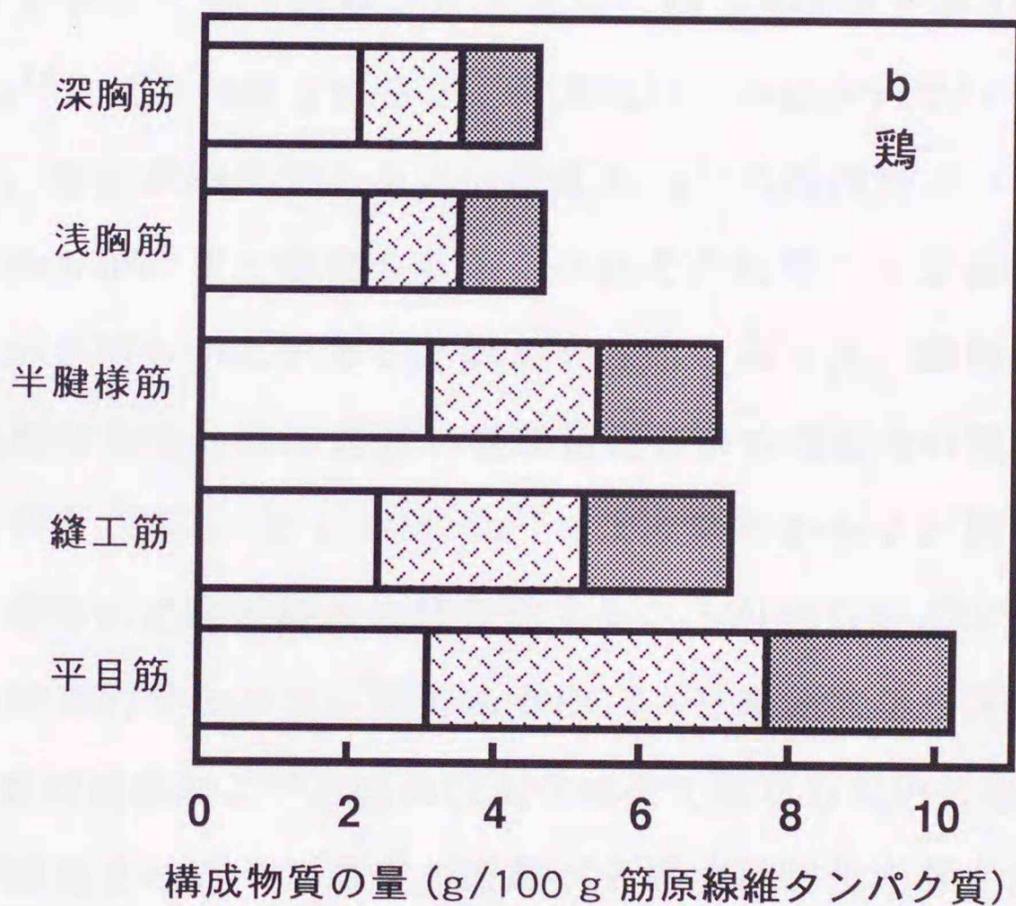
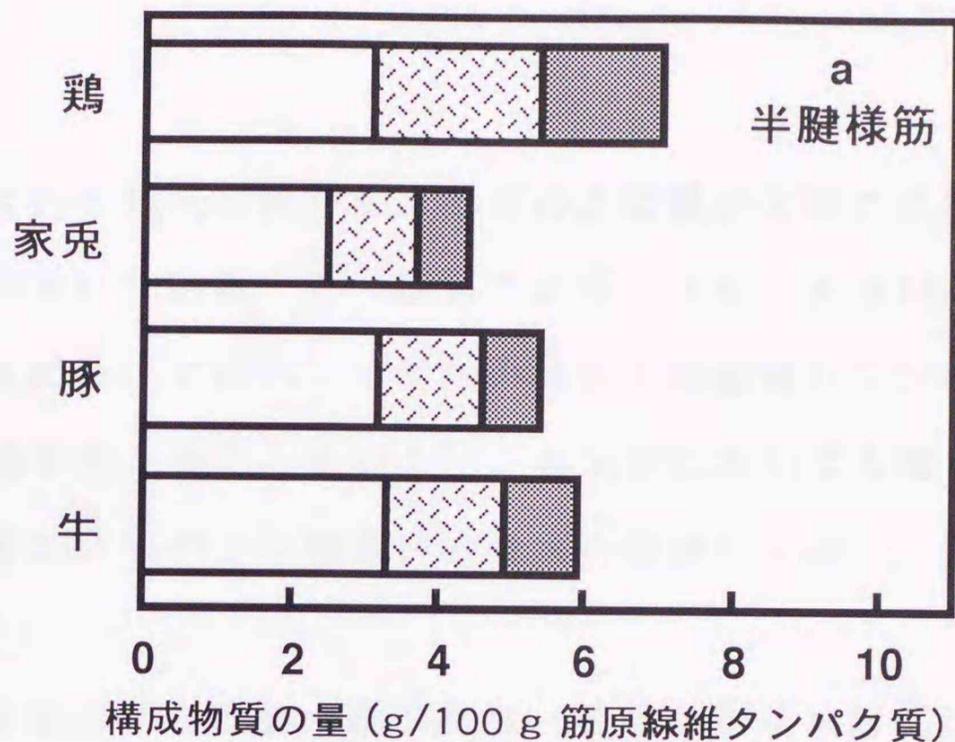
Z線に存在する脂質成分を同定するためI-Z-I brushから脂質を抽出し、薄層クロマトグラフィーおよびイアトロスキャンによりその成分の分離・同定を行うと再現性のある結果が得られた。筋原線維標品には膜様構造物である筋小胞体の混在の可能性が否定できない。もし、筋小胞体の膜成分がI-Z-I brushに混在するならば、同定された脂質成分が筋小胞体膜に由来する可能性もある。I-Z-I brushから抽出された脂質がZ線に特異的な組成をしているか否かを調べるため、鶏浅胸筋から調製したI-Z-I brushと筋小胞体の膜脂質の組成を比較すると、筋小胞体膜の脂質組成とZ線の脂質組成の間には大きな差異が認められた(第12図)。鶏の浅胸筋から調製した筋小胞体膜はリン脂質が70%、コレステロールが26%で、両者で96%を占めており、残りはトリアシルグリセロールおよび遊離脂肪酸であった。これに対して、I-Z-I brushの脂質はリン脂質とコレステロールがそれぞれ53.7%、6.8%で、筋小胞体膜を構成する脂質よりもトリアシルグリセロールの占める割合が多く、リン脂質とコレステロールの比を両者で比べると、筋小胞体では2.7であるのに対し、I-Z-I brushでは7.9と大きく異なる。従って、I-Z-I brushから抽出されるのはZ線に特異的な脂質であると結論される。

リン脂質を更に分画して構成比を調べると、Z線には7種類のリン脂質が存在し、全リン脂質に占める割合はホスファチジルコリンが41.6

%, ホスファチジルエタノールアミンが37.8%, ホスファチジルイノシトールが6.7%, ホスファチジルセリンが3.4%, リゾホスファチジルコリンが3.0%, リゾホスファチジルエタノールアミンが6.8%およびスフィンゴミエリンが1.8%で, ホスファチジルコリンおよびホスファチジルエタノールアミンで70~80%を占めており, 構成比は畜種や骨格筋の種類において大きな差異は認められなかった。

各種家畜の半腱様筋から調製した筋原線維のZ線を構成する脂質の含量および $\alpha$ -アクチニンの含量をまとめて第38図(a)に示す。リン脂質量とその他の脂質量を合計した総脂質量と $\alpha$ -アクチニン含量を合計すると, いずれの畜種の半腱様筋においても筋原線維のタンパク質100g当り5~7gになり, ほぼ一定であった。HuxleyとHanson<sup>63)</sup>は家兎の大腰筋から調製した筋原線維の各部位の物質量を干渉顕微鏡で測定した結果, Z線には筋原線維全体の約6%の物質が存在することを報告している。上記の値はこのことを実証するものである。しかし, 第38図(b)に示すように鶏の各種骨格筋から調製した筋原線維においては, Z線を構成する総脂質と $\alpha$ -アクチニンの含量はZ線の厚さに依存しており, Z線が最も薄い(33 nm)深胸筋の筋原線維では5gであるのに対し, 最も厚い(101 nm)平目筋の筋原線維では10gであった。これらの事実は, Z線の構造と機能が各種骨格筋の生理機能の違いによって大きく変動することを明示している。

Z線の無定形物質を構成する脂質のうち中性脂質は食肉の熟成に伴って変化しないが, Z線に残存するリン脂質量は減少することが明らかになった。即ち, 食肉の熟成に伴ってリン脂質が遊離することによって, Z線の脆弱化が誘起されることを示唆している。このことは, 安



第38図 各種骨格筋筋原線維のZ線の構成成分

第10図と同様に屠畜直後の家畜の各種骨格筋から調製した筋原線維を用いてI-Z-I brushを単離し、それから抽出した脂質の無機リン酸量を定量し、25倍してリン脂質含量を求め、第13図のリン脂質の割合から脂質の含量を算出し、リン脂質含量(▨)およびその他の脂質含量(▩)を求め、第4図に示したα-アクチニン含量(□)と合わせて100gの筋原線維タンパク質当たりのg数として表わした。aは各種家畜の半腱様筋、bは鶏の各種骨格筋における割合を示す。

が示した食肉の熟成に伴うリン脂質の遊離量がZ線の脆弱化の程度と相関が高いという結果<sup>35)</sup>と一致している。また、安は鶏，豚および牛の半腱様筋について調べ，いずれの場合も熟成後のリン脂質の遊離量は30%に達すると報告している<sup>35)</sup>。本実験においても鶏浅胸筋の場合には熟成後に35%のリン脂質がZ線から遊離しており，安の報告と一致している。

食肉の熟成に伴うZ線の脆弱化は，Z線からリン脂質が遊離することに起因することが明確になったが，*in vitro*でZ線の脆弱化は0.1 mM  $\text{Ca}^{2+}$ により誘起されることが既に明らかにされている<sup>33,34,55,64)</sup>。従って，無定形物質であるリン脂質が $\text{Ca}^{2+}$ の作用によってZ線から遊離するか否か，また遊離する場合にはそれに伴ってZ線が脆弱になるかどうかを明らかにすることが次の課題となった。調製した筋原線維をCa処理すると，リン脂質の遊離量とZ線の脆弱化の程度は極めて良く一致する。即ち，0.1 mM  $\text{Ca}^{2+}$ によりZ線からリン脂質が最大に遊離し，同時にZ線が最大に脆弱化することが明らかになった。また， $\text{Ca}^{2+}$ の特異的なキレート剤であるEGTAを十分に存在させておくと，リン脂質の遊離およびZ線の脆弱化は全く起こらないことは，0.1 mM  $\text{Ca}^{2+}$ で誘起されるリン脂質の遊離がZ線の脆弱化を惹き起こすことを示している。 $\text{Ca}^{2+}$ による筋原線維の構造変化を追究する際に常に問題となるのが $\text{Ca}^{2+}$ 活性化プロテアーゼであるカルパインの関与である。本研究を遂行するに当たってもこの点が問題となった。即ち，鶏浅胸筋から調製した筋原線維標品にはカルパインの混在が確認されたので，カルパインの活性を完全に阻害する濃度のカルパスタチンの存在下で実験を行い， $\text{Ca}^{2+}$ の直接的作用によりリン脂質の遊離が起こることが

実証された。Ca<sup>2+</sup>によるリン脂質の遊離は顕著なCa<sup>2+</sup>濃度依存性を示し、10 μMまでは変化しないが、それ以上になると遊離量が増加して0.1 mMで最大になった。この変化はZ線の脆弱化と完全に一致するとともに、HattoriとTakahashi<sup>33)</sup>により兎大腰筋の筋原線維を用いて調べられたZ線の脆弱化のCa<sup>2+</sup>濃度依存性とも一致する。生筋においては、筋線維のサイトゾルのCa<sup>2+</sup>濃度は0.1~5 μMの範囲で厳密に調節されているが、この濃度のCa<sup>2+</sup>ではZ線の構造は全く変化しない。熟成中の食肉では、筋線維内が非生理的な環境になるために、細胞内小器官のミトコンドリアの膜や筋小胞体の膜の崩壊に伴いサイトゾルのCa<sup>2+</sup>濃度が0.2 mMにまで上昇することが報告されている<sup>65)</sup>。従って、熟成中の食肉では、Ca<sup>2+</sup>の作用によって、リン脂質の遊離が最大となりZ線の脆弱化も最大に達するものと考えられる。Ca<sup>2+</sup>の作用のpH依存性および温度依存性のいずれもがCa<sup>2+</sup>濃度依存性と同様にZ線からのリン脂質の遊離とZ線の脆弱化は極めて良く対応している。従って、Z線からリン脂質が遊離することによりZ線が脆弱になることを示している。また、Ca<sup>2+</sup>の作用が最大に発揮される条件はいずれも熟成中の食肉の非生理的な条件<sup>27)</sup>と一致する。つまり、熟成に伴うZ線の脆弱化はCa<sup>2+</sup>単独の作用によりリン脂質がZ線から遊離することによって惹起されることを示している。

以上に述べたことにより、0.1 mM Ca<sup>2+</sup>によってZ線からリン脂質が遊離し、Z線の脆弱化が誘起されることが明らかになったが、Z線のリン脂質に対するCa<sup>2+</sup>の作用機作については不明であった。この点を解明するためには、まずZ線のリン脂質がCa<sup>2+</sup>に対して結合能を有すか否かを明らかにしなければならない。<sup>45</sup>Caを用いたオートラジオ

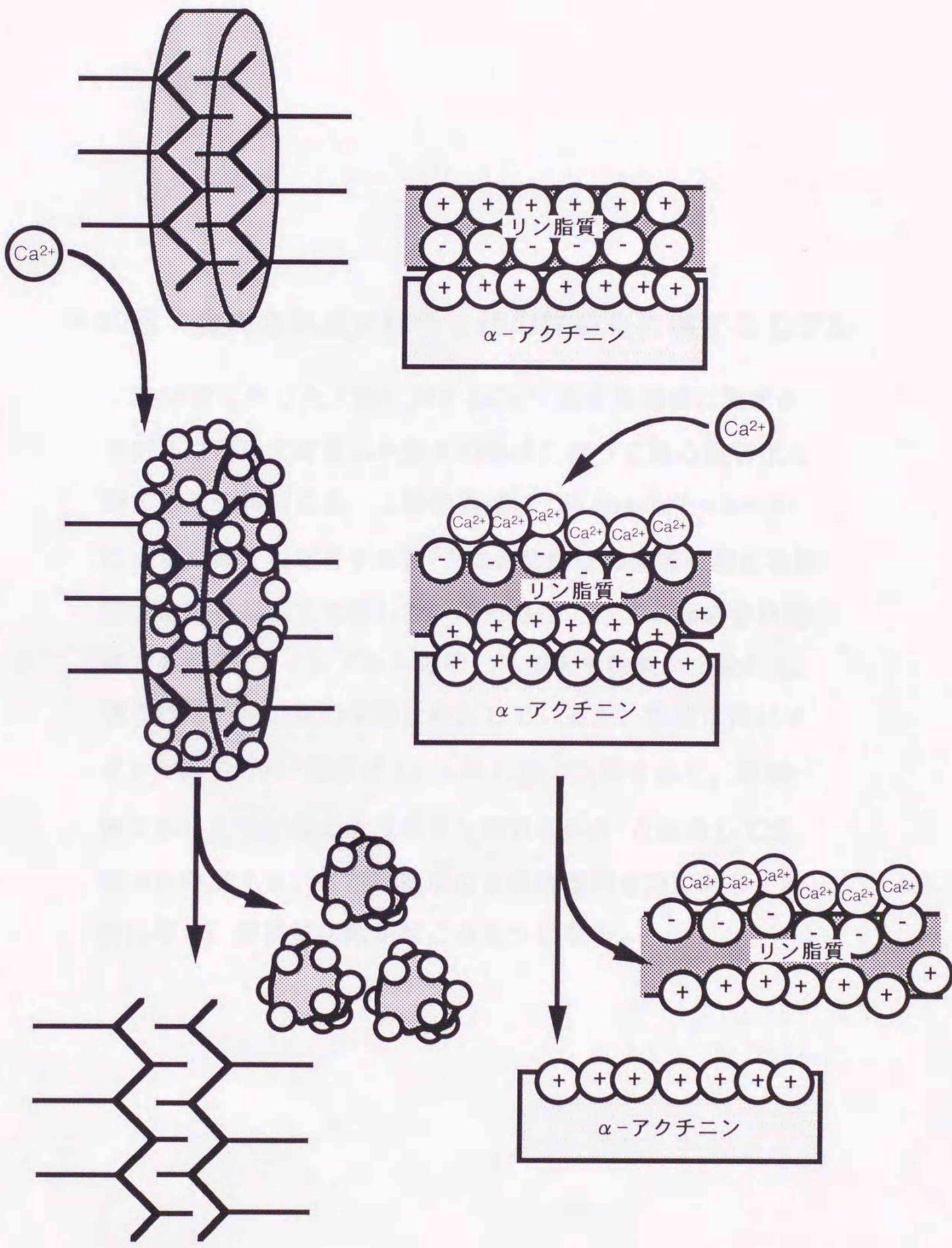
グラフィーの結果はZ線の脂質がCa<sup>2+</sup>と結合能を有することを示している。また、筋原線維から抽出した脂質よりもI-Z-I brushから抽出した脂質の方に強い結合能が見られ、筋原線維から抽出された脂質が示すCa結合能はZ線を構成する脂質に由来することが示唆された。Z線を構成する脂質のうち、どの成分がCaと結合性を有するのであろうか？標準脂質を用いて調べた結果、中性脂質では遊離脂肪酸であるパルミチン酸のみがCaに対する結合性を、極性脂質では負に荷電しているホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、スフィンゴリエリンが強い結合能を、分子内に正と負の電荷を持つホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、リゾホスファチジルコリン、およびリゾホスファチジルエタノールアミンは弱い結合能を有することが分かった。中性脂質のパルミチン酸とCa<sup>2+</sup>との結合は、解離したカルボキシル基がCa<sup>2+</sup>と結合していることを示している。パルミチン酸 1 mol当たり0.15 molのCa<sup>2+</sup>が結合するというWatrasらの報告<sup>66)</sup>もあるが、筋原線維のZ線において中性脂質がCa<sup>2+</sup>に結合するか否か、結合する場合にはどのような機序によるのかについては現段階では不明である。一方、リン脂質に関しては、リン脂質と金属イオンの結合は、その解離定数がホスファチジルセリンではKd=83 mM、ホスファチジルエタノールアミンではKd=333 mM、およびホスファチジルコリンではKd=72~333 mMという報告<sup>67)</sup>があり、ホスファチジルセリンとCa<sup>2+</sup>の結合が最も強く、ホスファチジルコリンおよびホスファチジルエタノールアミンもCa<sup>2+</sup>と結合するという本研究の結果と一致する。一般に、ホスファチジルコリンのように正と負の電荷を有し分子内で電荷が中和されている分子はCa<sup>2+</sup>と結合しないといわれ

ているが、本研究結果はこのことに合致しない。リン脂質と $\text{Ca}^{2+}$ の結合はリン酸基による結合が基礎となっていると考えられている<sup>68)</sup>が、リン酸基以外の解離基の関与も否定できない。最も強い結合性を示すホスファチジルセリンの場合にはアミノ基およびカルボキシル基の関与が考えられる。 $\text{Ca}^{2+}$ とホスファチジルセリンの結合はpH依存性を示し、pH 6.0~9.0の範囲ではアルカリ性になるにつれて結合量が増えるが、同じ酸性リン脂質のホスファチジルイノシトールと $\text{Ca}^{2+}$ の結合の場合はpH依存性を示さないという報告<sup>69)</sup>がある。Z線からのリン脂質の遊離に対する $\text{Ca}^{2+}$ の作用はpH依存性を示し、pH 6.5から8.0まではpHの上昇に伴ってリン脂質の遊離量が増加しており、ホスファチジルセリンのCa結合性に対するpH依存性と一致する。イノシトールリン脂質のホスファチジル4,5-ビスリン酸はZ線の骨格成分である $\alpha$ -アクチニンと結合し、結合部位は第168残基~第184残基で正電荷を持つリジン残基が重要であることが報告<sup>70)</sup>されている。これらの報告および本研究結果から、生体内の骨格筋の筋原線維においてはZ線の骨格構造を形成する $\alpha$ -アクチニン中のアミノ酸残基の正電荷とリン脂質の負電荷がイオン結合するために、骨格構造の間隙がリン脂質で満たされ、Z線の構造は高い光学密度を示すと考えられる。他方、熟成中の食肉では、筋線維のサイトゾル中で0.2 mMに上昇した遊離の $\text{Ca}^{2+}$ の作用により $\alpha$ -アクチニンと結合しているリン脂質の負電荷の密度が減少し、 $\alpha$ -アクチニンとリン脂質の間に斥力が生じて結合が開裂するために、リン脂質が遊離するものと考えられる。即ち、脂質成分による補強効果が失われるので、Z線が脆弱になる。この考えに基づいて $\text{Ca}^{2+}$ の作用機構に関するモデルを第39図に、食肉の熟成に伴うZ線の脆弱化に



### 第39図 Z線に対するCa<sup>2+</sup>の作用機構に関するモデル

TakahashiとHattoriによるZ線の骨格構造モデル<sup>53)</sup>と本研究で得られた実験結果に基づき、Z線の脆弱化に対するCa<sup>2+</sup>の作用機構に関するモデルを考案した。サイトゾルのCa<sup>2+</sup>濃度が10 μM以上になるとCa<sup>2+</sup>はリン脂質と結合するようになる。そのため、Z線の骨格構造の主体を成すα-アクチニンのリジン残基(正電荷)とリン脂質(負電荷)の間に形成されていた結合<sup>70)</sup>に斥力が生じて、α-アクチニンとリン脂質間の結合が開裂し、リン脂質の遊離が誘起される。



Z-フィラメントを形成する  
 $\alpha$ -アクチニン

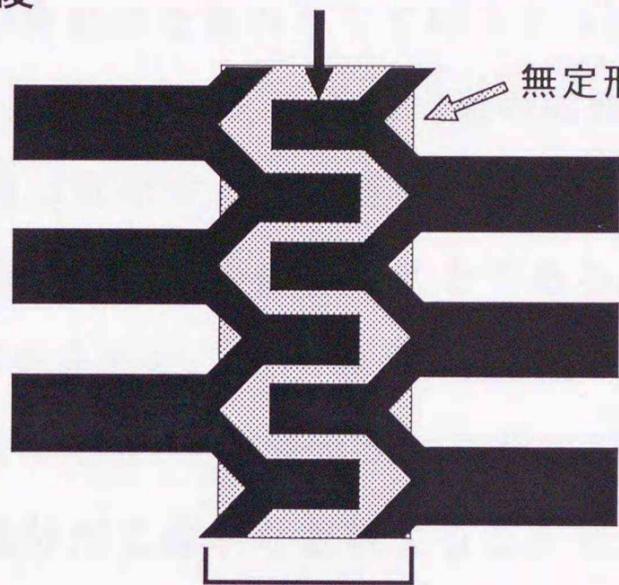
#### 第40図 食肉の熟成に伴うZ線の脆弱化に関するモデル

第39図に示したZ線に対する $\text{Ca}^{2+}$ の作用機構に関するモデルに基づいて考案した食肉の熟成に伴うZ線の脆弱化に関するモデルである。Z線の構造はTakahashiとHattoriにより提案されたモデル図<sup>53)</sup>に骨格構造の間隙を埋める無定形物質を斜線で加筆した。屠畜直後では、Z線の骨格構造であるZ-フィラメントの間には無定形物質が多量に充填されていてZ線の構造を補強しているが、熟成に伴いサイトゾルの $\text{Ca}^{2+}$ 濃度が0.2 mMにまで上昇すると、第39図に示したモデルのようにリン脂質が $\text{Ca}^{2+}$ と結合してZ線から遊離する。Z線は咀嚼などの物理的な力に対して脆弱になり、容易に切断が起こるようになる。

屠畜直後

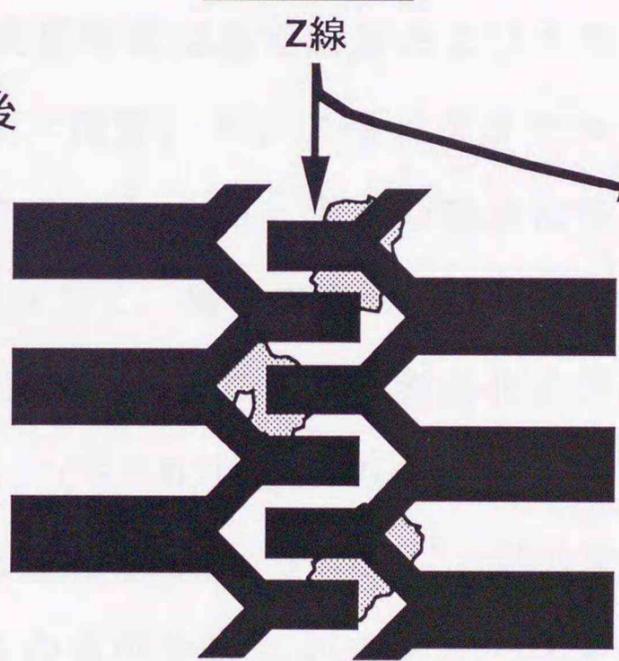
Z-フィラメント ( $\alpha$ -アクチニン)

無定形物質 (脂質)

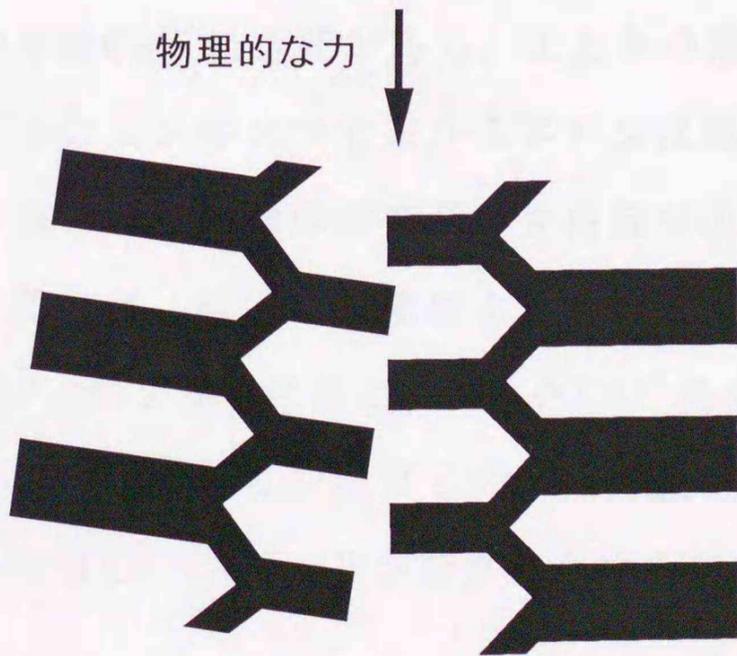


熟成後

$Ca^{2+}$  リン脂質  
 $Ca^{2+}$   
 $Ca^{2+}$



物理的な力



## 第5章 要約

家畜や家禽の骨格筋を食肉として利用するためには、一定期間、3～5°Cで熟成する必要がある。この熟成過程において筋原線維のZ線が脆弱になり、食肉は軟化する。本研究の目的は食肉の熟成に伴うZ線の脆弱化の分子機構を明らかにすることである。本研究において、新たに以下の知見が得られた。(1) 食肉の熟成中に起こるZ線の脆弱化は、骨格構造を形成する $\alpha$ -アクチニンの変化に起因するのではなく、無定形物質の構成成分がZ線から遊離することによって引き起こされる。(2) Z線の無定形物質は極性脂質および中性脂質で構成されており、脂質の組成はリン脂質、トリアシルグリセロール、コレステロールおよび遊離脂肪酸である。(3) 食肉の熟成に伴いZ線から遊離する成分は、中性脂質ではなく、極性脂質のリン脂質である。(4) *In vitro*で、筋原線維のCa処理によってZ線の脆弱化を誘起する際にZ線からリン脂質が遊離する。(5) 0.1 mMの $\text{Ca}^{2+}$ 存在下で、無定形物質を構成する脂質は $\text{Ca}^{2+}$ と結合する。(6)  $\text{Ca}^{2+}$ と結合する脂質は、主としてリン脂質であり、負の電荷を持つホスファチジルセリンやホスファチジルイノシトールは $\text{Ca}^{2+}$ 結合能が高く、正と負の電荷を持つホスファチジリエタノールアミンやスフィンゴミエリンは結合能が低い。以上の結果から、家畜および家禽の屠畜後、骨格筋が次第に軟らかくなり食肉へと変換するのは、以下の機構によるものと結論した。すなわち、非生理的条件下で0.2 mMにまで上昇した $\text{Ca}^{2+}$ は骨格構造を成す $\alpha$ -アクチニンと無定形物質のリン脂質との間に形成されたイオン結合に対して競合的に作用し、 $\text{Ca}^{2+}$ ・リン脂質複合体を形成する。その結果、 $\alpha$ -

アクチニンとリン脂質間の結合が開裂するのでZ線からリン脂質が遊離し、Z線の脆弱化が惹起される。

## 謝辞

本研究の企画から進行に至るまで終始御指導，御鞭撻を頂きました北海道大学農学部 畜産科学科の高橋 興威教授に深く感謝します。また，論文作成にあたり，御校閲ならびに貴重な御意見を頂きました島崎 敬一教授ならびに服部 昭仁助教授に深く感謝の意を表します。

本研究の遂行ならびに論文の作成に際して，懇切丁寧な御指導を頂きました北海道大学農学部畜産科学科の服部 昭仁助教授に深く感謝します。

本研究に供試した鶏，豚および牛を提供して頂き，その際に多大な便宜を御計り頂いた北海道大学農学部附属農場畜産製造部，畜産第一部，畜産第二部，北海道大学附属牧場および北海道立 新得畜産試験場の皆様に厚く御礼申し上げます。殊に，畜産製造部の板谷 一技官，加藤 秀男技官，日置 昭二技官には試料採取の際に格別な便宜を御計り頂き，厚く御礼申し上げます。

本研究で行った凍結切片作成の際に，大変御世話になりました北海道大学農学部 共同利用電子顕微鏡センターの伊藤 利章技官に感謝します。また，共焦点レーザー顕微鏡の観察の際に大変御世話になりました北海道大学農学部 森林科学科の船田 良助教授および北海道大学農学部森林科学科木材生物学講座の皆様に感謝申し上げます。薄層自動展開装置（イアトロスキャン）を使用させて頂いた北海道大学 低温科学研究所 低温基礎科学部門の片桐 千仞助手には，機器の操作以外にも貴重な御意見を頂いた上に，脂質の標準試料を頂き，大変御世話になりましたことを厚く御礼申し上げます。また，北海道大学農学部 畜産科学科の玖村 朗人助手にも脂質の標準試料を頂いたことを御礼申し上げます。

北海道大学農学部 中村 富美男助教授，西邑 隆徳助手，辰巳 隆一助手，ならびにそれ以外の北海道大学農学部 畜産科学科の先生方にも本研究を遂行するにあたり

公私に渡り貴重な御意見を頂き、大変御世話になりましたことを厚く御礼申し上げます。また、研究のみならず、様々な面で御世話になりました中林ゆかり事務官、北海道大学農学部畜産科学科畜産食品開発学講座の学生諸氏ならびに、それ以外の畜産科学科の学生諸氏にも深く感謝します。

帯広畜産大学の三浦弘之 名誉教授、三上正幸教授、および関川三男助教授には本研究を遂行するにあたり、有益な御助言および暖かい励ましを頂きましたことに深く感謝の意を表します。

終わりに、1994年4月から1997年3月の3年に渡って日本育英会の奨学生に採用され、経済的に安定した研究生生活を続けられたこと、そして恵まれた研究設備、良き指導教官および素晴らしい研究スタッフの下で充実した研究生生活を送れたことに感謝します。また、長い間、暖かく励まし続け、経済的にも援助して頂いた両親に深謝の意を表します。

## 引用文献

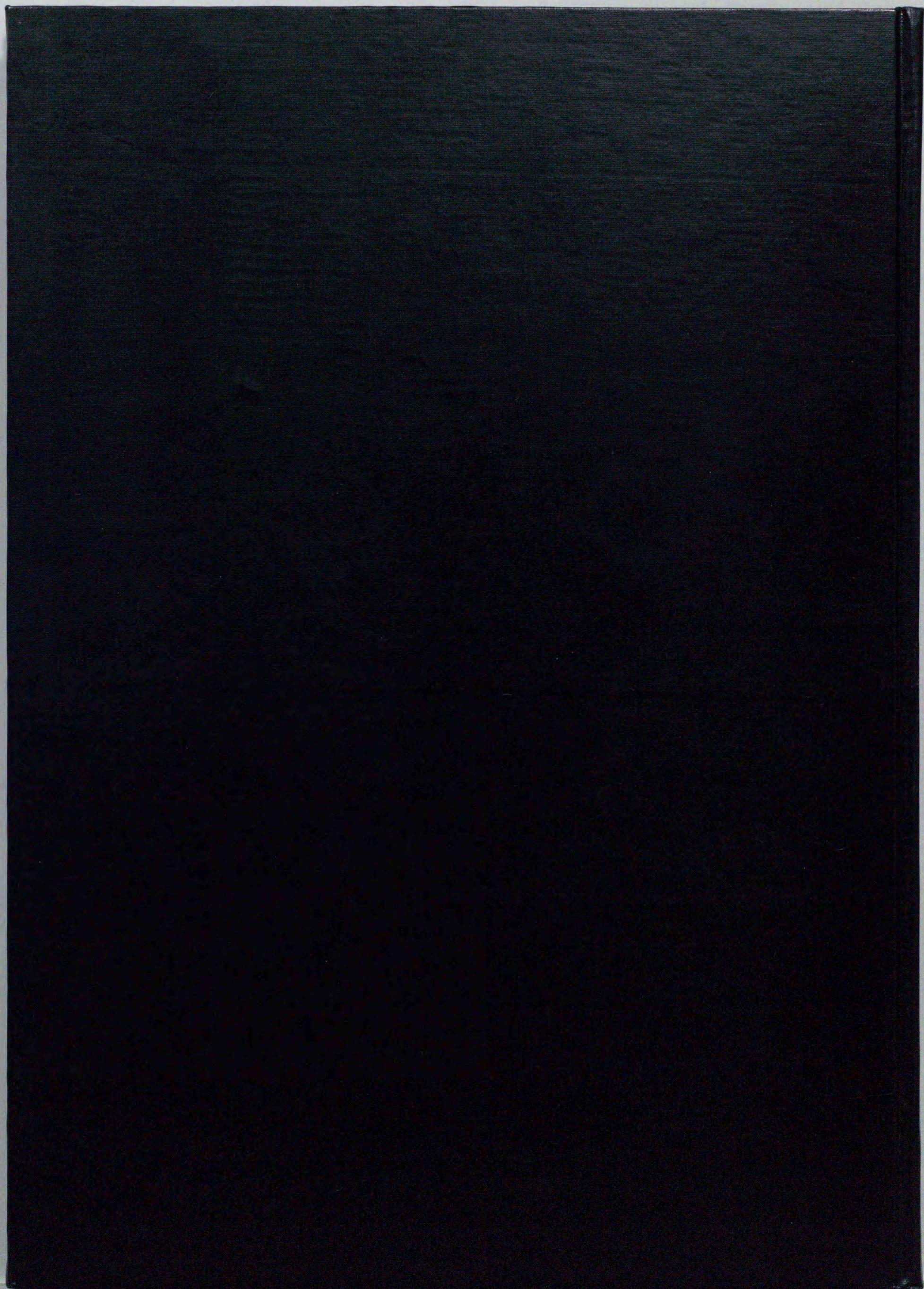
- 1) Dransfield, E., Jones, R. C. D. and Macfie, H. J. H. (1981) Meat Sci., **5**, 139-147.
- 2) Scopes, R. K. (1970). In " *The Physiology and Biochemistry of Muscle Food2*", Briskey, E.J., Cassens, R. G. & Marsh, B.B. eds.) The University of Wisconsin Press, 471-492.
- 3) 高橋興威 (1983) 日本畜産学会報, **54**, 423-436.
- 4) Nishimura, T., Hattori, A. and Takahashi, K. (1995) Meat Sci., **39**, 127-133.
- 5) Nishimura, T. and Takahashi, K. (1995) 酪農科学・食品の研究, **44**, A165-A176.
- 6) Nishimura, T., Hattori, A. and Takahashi, K. (1996) Meat Sci., **42**, 251-260.
- 7) Liu, A., Nshimura, T. and Takahashi, K. (1994) Meat Sci., **38**, 315-328.
- 8) Liu, A., Nshimura, T. and Takahashi, K. (1995) Meat Sci., **39**, 135-142.
- 9) Liu, A., Nshimura, T. and Takahashi, K. (1996) Meat Sci., **43**, 43-49.
- 10) Takahashi, K., Fukazawa, T. and Yasui, T. (1967) J. Food Sci., **32**, 409-413.
- 11) Davey, C. L. and Gilbert, K. V. (1969) J. Food Sci., **34**, 69-74.
- 12) Sayre, R. N. (1970) J. Food Sci., **35**, 7-10.

- 13) Parrish JR, F. C., Young, R. B., Miner, B. E. and Andersen, L. D. (1973) *J. Food Sci.*, **38**, 690-695.
- 14) Takahashi, K., Yamanoue, M., Murakami, T., Nishimura, T. and Yoshikawa, R. (1987) *J. Biochem.*, **102**, 1187-1192.
- 15) Yamanoue, M. and Takahashi, K. (1988) *J. Biochem.*, **103**, 843-847.
- 16) Hattori, A. and Takahashi, K. (1988) *J. Biochem.*, **103**, 809-814.
- 17) Takahashi, K., Hattori, A. and Kuroyanagi, H. (1995) *Meat Sci.*, **40**, 413-423.
- 18) Takahashi, K. and Saito, H. (1979) *J. Biochem.*, **85**, 1539-1542.
- 19) Takahashi, K., Hattori, A., Tatsumi, R. and Takai, K. (1992) *J. Biochem.*, **111**, 778-782.
- 20) Fritz, J. D., Mitchell, M. C., Marsh, B. B. and Greaser, M. L. (1993) *Meat Sci.*, **33**, 41-50.
- 21) Tatsumi, R. and Takahashi, K. (1992) *J. Biochem.*, **112**, 775-779.
- 22) Paxhia, J. M. and Parrish, F. C. (1988) *J. Food Sci.*, **53**, 1599-1601.
- 23) Anderson, T. J. and Parrish, F. C. (1989) *J. Food Sci.*, **54**, 748-749.
- 24) Fritz, J. D. and Greaser, M. L. (1991) *J. Food Sci.*, **56**, 607-610.
- 25) Young, O. A., Graafhuis, A. E. and Davey, C. L. (1981) *Meat Sci.*, **5**, 41-55.

- 26) Koohmaraie, M., Kennick, W. H., Elgasin, E. A. and Anglemier, A. F. (1984) *J. Food Sci.*, **49**, 290-291.
- 27) Hwan, S. F. and Bandman, E. (1989) *J. Food Sci.*, **54**, 1426-1430.
- 28) Lazarides, E. and Hubbard, B. D. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **73**, 4344-4348.
- 29) Taylor, R. G., Geesink, G. H., Thompson, V. F., Koohmaraie, M. and Goll, D. E. (1995) *J. Anim. Sci.*, **73**, 1351-1367.
- 30) Takahashi, K. (1996) *Meat Sci.*, **43**, S67-80.
- 31) Davey, C. L. and Gilbert, K. V. (1966) *J. Food Sci.*, **31**, 135-140.
- 32) Takahashi, K. (1992) *Biochimie*, **74**, 247-250.
- 33) Hattori, A. and Takahashi, K. (1982) *J. Biochem.*, **92**, 381-390.
- 34) Takahashi, K., Kim, O. H. and Yano, K. (1987) *J. Biochem.*, **101**, 767-773.
- 35) 安東賢, 高橋興威 (1994) 第88回日本畜産学会要旨集, 251頁.
- 36) Perry, S. V. and Grey, T. C. (1956) *Biochem. J.*, **64**, 184-192.
- 37) Tatsumi, R., Hattori, A. and Takahashi, K. (1993) *J. Biochem.*, **113**, 797-804.
- 38) Ogawa, Y. (1970) *J. Biochem.*, **67**, 667-683.
- 39) Bligh, E. G. and Dyer, W. J. (1959) *Can. J. Biochem. Physiol.*, **37**, 911-917.
- 40) Tokuyasu, K. T. (1980) *Histochem. J.*, **12**, 381-403.
- 41) Leammli, U. K. (1970) *Nature*, **227**, 680-685.

- 42) Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979) **76**, 4350-4354.
- 43) Ryu, E. K. and MacCoss, M. (1979) *J. Lipid Res.*, **20**, 561-563.
- 44) Ackman, R. G. (1981) *Methods in Enzymology*, **72**, 205-252.
- 45) Hanilton, J. G. and Comai, K. (1984) *J. Lipid Res.*, **25**,  
1142-1148.
- 46) Sasaki, S. (1990) 第63回 日本生化学学会大会発表抄録集, 737頁.
- 47) Bartlett, G. R. (1959) *J. Biol. Chem.*, **234**, 466-468.
- 48) Fiske, C. H. and Subbarow, Y. (1925) *J. Biol. Chem.*, **66**,  
375-400.
- 49) Maruyama, K., Mikawa, T. and Ebashi, S. (1984) *J. Biochem.*,  
**95**, 511-519.
- 50) Gornall, A. G., Bardawill, C. J. and David, M. M. (1949) *J. Biol. Chem.*, **177**, 751-766.
- 51) Bradford, M. M. (1976) *Anal. Biochem.*, **77**, 248-254.
- 52) Kelly, D. E. and Cahill, M. A. (1972) *Anat. Rec.*, **172**, 623-642.
- 53) Takahashi, K. and Hattori, A. (1989) *J. Biochem.*, **105**,  
529-536.
- 54) Pinter, K., Jancso, A., Biro, E.N.A. (1980) *Acta Biochim. et Biophys. Acad. Sci. Hung.* **15**, 217-222.
- 55) Hattori, A. and Takahashi, K. (1979) *J. Biochem.*, **85**, 47-56.
- 56) Chou, R.G. R., Lin, K.J., Tseng, T.-F. and Wu, C.P. (1995) *J. Sci. Food. Agr.*, **68**, 293-297.
- 57) Goll, D. E., Dayton, W. R., Sigh, I. and Robson, R. M. (1991) *J. Biol. Chem.*, **266**, 8501-8510.

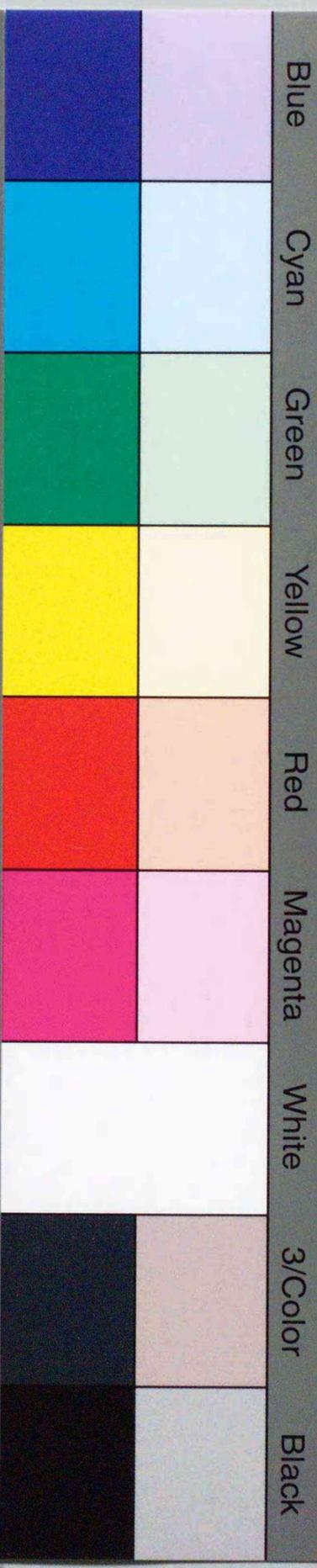
- 58) Garamvölgyi, N. (1965) *J. Ultrastruct. Res.*, **13**, 425-434.
- 59) Bullard, B. and Sainsbury, M. (1977) *Biochem. J.*, **161**, 399-403.
- 60) Saide, J. D. and Ullrick, W. C. (1974) *J. Mol. Biol.*, **87**, 671-683.
- 61) Fukami, K., Furuhashi, K., Inagaki, M., Endo, T., Hatano, S. and Takenawa, T. (1992) *Nature*, **359**, 150-152.
- 62) Meyer, R. K., Schneider, H. and Burger, M. M. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **79**, 4280-4284.
- 63) Huxley, H. E. and Hanson, J. (1957) *Biochim. Biophys. Acta*, **23**, 161-181.
- 64) Hattori, A. and Takahashi, K. (1979) *J. Biochem.*, **85**, 47-56.
- 65) Ji, J. and Takahashi, K. (1992) 平成3年度食肉に関する助成研究調査成果報告書 (財) 伊藤記念財団, **10**, 212-216.
- 66) Watras, J., Messineo, F. C. and Herbette, L. G. (1984) *J. Biol. Chem.*, **259**, 1319-1324.
- 67) Gennis, R. B. (1990) 生体膜 分子構造と機能 (西島 正弘 他共訳), 254-256頁, シュプリンガー・フェアラーク東京 (株) .
- 68) Träuble, H. and Eible, H. (1974) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **71**, 214-219.
- 69) Maeda, M., Nishijima, M., Takenaka, Y., Kuge, O. and Akamatsu, Y. (1984) *Biochim. Biophys. Acta*, **794**, 298-306.
- 70) Fukami, K., Sawada, N., Endo, T. and Takenawa, T. (1996) *J. Biol. Chem.*, **271**, 2646-2650.



Inches 1 2 3 4 5 6 7 8  
cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

# Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak



# Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

**A** 1 2 3 4 5 6 **M** 8 9 10 11 12 13 14 15 **B** 17 18 19

