

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	http://hdl.handle.net/2115/51428
Туре	theses (doctoral)
File Information	00000307522.pdf



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



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	デンシトメトリーによるα-アクチニンの定量	12
The second second		

 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
 14

 の同定

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
第3章	実験結果	20
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 ²⁺ 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	41
	Z線の脆弱化	
第3項	Z線構成脂質成分のCa結合性	56
第4章	考察	67
第5章	要約	82

謝辞

引用文献

85

84

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¹¹。

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

-1-

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²⁾。 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³⁾。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⁴⁻⁶⁾および Liuら⁷⁻⁹⁾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¹⁰⁻¹²⁾。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^{10,13-17)}。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^{18,19)}やネブリンのフィラメント^{20,21)}が断片

-2-

化する²²⁻²⁴⁾。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²⁵⁻²⁷⁾。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²⁸⁾。

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³⁰⁾。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³¹⁾。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 mMCa²⁺により最大に誘起されることを明らかにし,

-3-

数多くの実験事実に基づいてTakahashi^{30,32)}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 Ca²⁺によって 最大に誘起されるが^{33,34)}, 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Ca²⁺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³⁵⁾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Ca²⁺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℃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℃で1~2日間静置した。新鮮な同溶液と交換して、 -20℃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³⁶⁾あるいは TatsumiらによるEtlingerらの方法の改良法³⁷⁾により筋原線維を調製

-5-

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 MgCl₂, 2 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM NaN₃, 2 mM Na₄P₂O₇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 NaN₃および10 mM

-6-

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,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 によりゆっくり撹拌し、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℃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 KCI, 5 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM NaNa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³⁷⁾ 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 NaN₃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℃で20分間ゆっくり 撹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 NaN₃ および 10 mM トリス-マレイン酸緩 衝液 (pH

-7-

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³⁸⁾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2,400gで20分間遠 心分離し、その上澄液をさらに8,600g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 れた沈澱を筋小胞体の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、20,000gで70分間遠心分離した後、沈澱を少量の 50 mM KCI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 54,500gで30分間遠心分離し、得られた沈澱を筋小胞体の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 Na₄P₂O₇, 1 mM

-8-

MgCl₂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, 撹拌しながら4℃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 NaN₃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1-Z-I brush標品の懸濁液から1 mlずつスクリューキャッ プ付き試験管に採取し,BlighとDyerの方法³⁹⁾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 NaN₃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℃で保存した。

-9-

第8項凍結切片の調製

Tokuyasuの凍結超薄切片の作成方法⁴⁰に従い,光学顕微鏡用の切 片を作成した。-20℃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% NaNaから成る溶 液(PBS)に浸漬し、4℃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%に希釈したグルタールアルデヒド溶液を用い て4℃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 Na₂CO₃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

-10-

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% β-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℃で2分間加熱後、電気泳動用試料として-80℃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⁴¹⁾ 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 μl/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 μl/ml TEMED (N,N,N',N'-tetramethyl ethy

lene 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。

-11-

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 µl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⁴¹⁾、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 ℃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℃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充分 に脱色した。

第14項 デンシトメトリーによるα-アクチニンの定量

a-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42)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 µm) 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

-12-

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℃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% NaNa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% NaNa を含むPBS で500倍に希釈した抗α-アクチニン抗血清と25℃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%チメロサー 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℃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% CoCl₂, 0.3% (NH4)2Ni(SO4)2, 0.028% H2O2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α-アクチニン抗血清は鶏浅胸筋から SDS-PAGEにより精製したα-アクチニンを抗原として家兎を免疫し、 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

-13-

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⁴³⁾に従って調製した。 すなわち,三酸化モリブデン8gを70%硫酸200ml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, 0.4g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)⁴⁴による脂質の同定

-14-

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,ヤトロン,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-SIII,ヤトロン)を空焼きし て,表面をクリーニングした後に試料を1~2µl添加し,薄層クロマト グラフィーの際と同様にヘキサン:ジェチルエーテル:酢酸=80:30: 1の展開溶媒によって最初の展開を行い,80~90℃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⁴⁵⁾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 µl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,東京理化器械)を用いて窒素ガス気流下で,濃縮乾固した。これを500 µlのクロロホルムに溶解し, HPLC用試料とした。

-15-

第19項 HPLCによる各リン脂質成分の同定

Sasakiの方法⁴⁶⁾に従い、10 µlの試料を Waters µBondasphere 5 µ NH₂ 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ホスファチジルセリンから成 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 µM カルパス タチン、1 mM DTT、1 mM NaN₃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時間ゆっくりと撹拌した後、 0.2 M CaCl₂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 CaCl₂、1.1 µM カルパスタチン、1 mM DTT、1 mM NaN₃、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増搾して筋原線維をCa加用した 10分級湯

クスターラーでゆっくりと撹拌して筋原線維を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 CaCl₂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℃で行い,カルパスタチンは,遺伝子組み換え技術

-16-

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¹⁰⁾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[Σ]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⁴⁷⁾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 µl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℃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 µlを加え、再び 150℃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 ⁴⁸⁾ (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、

-17-

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 µg リン/ml)を 0,0.2,0.4,1.0,2.0,4.0,8.0 µg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⁴⁹)およびTakahashiらの方法¹⁹)に準じて,⁴⁵Ca を用いたオートラジオグラフィーにより脂質の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 µm)を約0.5 cm×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 µCi/ml⁴⁵CaCl₂を含む0.1 M KCl,0.1 mM CaCl₂, 1 mM DTT,1 mM NaN₃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 NaN₃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,

-18-

-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 プロセッサー(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⁵⁰⁾および色素結合法⁵¹⁾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った。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った。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

-20-



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℃で21日間熟成した(C, D) 牛半腱様筋か ら厚さ2μm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5μmを示す。

-21-



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℃で7日間熟成した(C, D)豚半腱様筋から 厚さ2µm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 µmを示す。

-22-

離するために起こる可能性が大きい。熟成に伴う乙線の構造変化と構 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52,53)。 そこで、Z線の骨格構造を構成するタンパク質である a-アクチニンの 筋原線維に占める割合をSDS-PAGEのデンシ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a-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 a-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 a-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、デンシトグラムによる α-アクチニン含量の算出からは除外した。α-アクチニンの含量は牛, 豚の半腱様筋で100g筋原線維タンパク質当たり、それぞれ3.3g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、 a-アク チニンの含量は100gの筋原線維タンパク質当たり2.2g~3.3g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≒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 a-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α-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α-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

-23-



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54)に従い、調製した。

-24-



各種骨格筋のα-アクチニン含量 第4図

第3図に示したSDS-PAGE像のデンシトグラムから筋原線維

のタンパク質100g当たりのα-アクチニン含量を算出した。

-25-



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





第6図 食肉の熟成に伴うα-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α-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。

-27-

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α-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α-アクチニ ンは単一なバンドで存在し, 熟成中に α-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

Ζ線の骨格構造を形成するα-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TritonX-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

-28-



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

-30-

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。 -31-


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℃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。

The mixto (Larodannine Chemical AB) & HUT



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。 12, 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 2 Ist on the law and a The second secon

-33-



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

-34-



☑ 遊離脂肪酸
□ その他

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

0

F

OF

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³⁹⁾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)





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。

-36-

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回に示す。(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Ca²⁺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

-37-



HPLCによる牛半腱様筋のZ線構成リン脂質 第14図 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、µBondasphere 5µ NH2 100Åカラム (3.9 mm×150 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 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 ルイノシトール,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。

-38-



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。

-39-



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℃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。

-40-

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 Ca²⁺によって誘起される ことがすでに明らかにされている^{30,31,55)}ので,熟成に伴うリン脂質の Z線からの消失は,0.1 mM Ca²⁺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、Ca² +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 μM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 µM以上のカルパ スタチンを添加しなければ、Ca²⁺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

-41-



カルパスタチンの濃度(µM)

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 CaCl₂, 1 mM DTT,

1 mM NaN₃, 10 mM トリス-マレイン酸 緩衝液 (pH 7.0)) に浸漬して, ゆっく り撹拌しながら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(**O**) 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。

-42-



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。



·静静,后有一个医胃的外周炎的原因不是在外心的,虽然不足不足。 "你不是我们不是。



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



実験は、Ca²⁺の直接的作用を観察するために1.1 µM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 mM Ca²⁺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 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 mM Ca²⁺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 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 mM Ca²⁺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 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 mM Ca²⁺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 mM Ca²⁺の作用によるZ線の脆弱化の

-46-



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 Ca²⁺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 µM カル パスタチン, 1 mM DTT, 1 mM NaN₃, 10 mM トリス-マレイン酸緩衝液 (pH 7.0)および0.1 mM CaCl₂ (●, O) あるいは5 mM EGTA (▲, △) か

ら成る溶液に浸漬して、ゆっくり撹拌しながら4℃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(O,Δ)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。

-47-





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







牛半腱様筋から調製した筋原線維(6.5 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(O, △, □)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。O, ●は 鶏の浅胸筋, △, ▲は豚の半腱様筋および□, ■は牛の半腱様筋



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Ca²⁺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Ca²⁺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 Ca²⁺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 Ca²⁺濃度が10 μMまでは変化しないが、10 μM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 μMまでは変化しないが、10 μM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Ca²⁺濃度依存性を示 したので、同じ2価金属であるMg²⁺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MgCl₂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Mg²⁺濃 度が1 mMまでは変化しないが、1 mM以上になるとMg²⁺濃度に依存 して増加した。Mg²⁺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。Mg²⁺がCa²⁺と同様の作用を発揮するためには

Ca²⁺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

-51-





鶏浅胸筋から調製した筋原線維標品を5.5 mg/mlとして、Ca²⁺濃度の異なる溶液(5 mM EGTA~10 mM CaCl₂, 0.1 M KCl, 1.1 µM カルパスタチン, 1 mM DTT, 1 mM NaN₃および10 mM トリス-マレイン酸緩衝液(pH 7.0))に

浸漬して、ゆっくり撹拌しながら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(**O**)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、Ca²⁺濃度は負の対数としてpCaで表わした。

-52-





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Ca²⁺ 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Mg²⁺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 µM カルパスタチン、5 mM EGTA、1 mM DTT、1 mM NaN3、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MgCl2あるいは5 mM EDTA に浸渍して、ゆっくり増払したがら4%での時間処理した後に、京見

EDTA に浸漬して、ゆっくり撹拌しながら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。なお、Mg²⁺濃度は負の対数として

-55-

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℃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℃ 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℃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Ca²⁺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、Ca²⁺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 µCi/ml⁴⁵Ca²⁺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 Ca2+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, 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 C^{45} 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

-56-



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 CaCl₂, 1.1 μM カ ルパスタチン, 1 mM DTTおよび1 mM NaN₃に浸漬して, ゆっくり撹拌しな

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。

-57-



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





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 CaCl₂, 1.1 µM カルパスタチン、1 mM DTT、1 mM NaN₃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℃にして ゆっくり撹拌しながら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。

-60-



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。 -62-



第35図 脂質とCa²⁺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 μ Ci/ml ⁴⁵CaCl₂を含んだ0.1 M KCl, 0.1 mM CaCl₂, 1 mM DTT, 1 mM NaN₃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.

-63-

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Ca²⁺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Ca²⁺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Ca²⁺結合能が見られた。





第36図 Z線を構成する脂質成分のCa²⁺結合能

鶏の各種骨格筋の I-Z-I brush (1) および各種家畜の半腱様筋の I-Z-I brush (2) から抽出した脂質の濃縮度を変えて、PVDF膜に結合させて、10 μ Ci/ml ⁴⁵CaCl₂を含んだ0.1 M KCl, 0.1 mM CaCl₂, 1 mM DTT, 1 mM NaN₃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、オートラジオグラフィーを行った、1、1/10/t それぞわ抽出原液お トび1/10濃縮液を示す





第37図 各脂質成分のCa²⁺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 ⁴⁵CaCl₂ を含んだ0.1 M KCl, 0.1 mM CaCl₂, 1 mM DTT, 1 mM NaN₃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 CaCl₂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。

-66-

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^{52,53)}。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

-67-
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a-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 a - 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100g当たりのa-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³⁵⁾。Takahashiらは家兎の胸最長筋の熟成に 伴うα-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³⁴⁾。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 a-アクチニン(100 kDa) のバンドが減少し、 a-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α-アクチニンの分解であることを 示唆している⁵⁶⁾が, GollらはカルパインはZ線からa-アクチニンを 加水分解せずに遊離させる57)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α-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a-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α-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

-68-

様筋から調製した筋原線維を抗α-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α-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α-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 のに充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58,59)や有機溶媒60)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 ⁶¹⁾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

-69-

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 a-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⁶²⁾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

-70-

%,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a-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含量とα-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100 g当り5~7gになり, ほぼ一定であった。HuxleyとHanson⁶³⁾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α-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10 g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

-71-





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100 g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。

-72-

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³⁵⁾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³⁵⁾。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 Ca²⁺により誘起されることが既に明らかにされている^{33,34,55,64)}。 従って、無定形物質であるリン脂質がCa²⁺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 Ca²⁺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、 Ca²⁺の特異的なキレート剤であるEGTAを充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 Ca²⁺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。Ca²⁺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Ca²⁺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, Ca²⁺の直接的作用によりリン脂質の遊離が起こることが

-73-

実証された。Ca²⁺によるリン脂質の遊離は顕著なCa²⁺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Takahashi³³⁾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Ca²⁺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Ca²⁺濃度は0.1~5μMの範囲で厳密に調 節されているが、この濃度のCa²⁺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Ca²⁺濃度が0.2 mMにまで上昇することが報告されている⁶⁵⁾。従っ て, 熟成中の食肉では, Ca²⁺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。Ca²⁺の作用の pH依存性および温度依存性のいずれもがCa²⁺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、Ca²⁺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27)と一致する。つまり、熟成に伴うZ線 の脆弱化はCa²⁺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 Ca²⁺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Ca²⁺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Ca²⁺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。⁴⁵Caを用いたオートラジオ

-74-

グラフィーの結果はZ線の脂質がCa²⁺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 ミ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Ca²⁺との結合は,解 離したカルボキシル基がCa²⁺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Ca²⁺が結合するというWatrasらの 報告⁶⁶⁾もあるが,筋原線維のZ線において中性脂質がCa²⁺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⁶⁷⁾があり,ホスファチ

ジルセリンとCa²⁺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Ca²⁺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Ca²⁺と結合しないといわれ

-75-

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Ca²⁺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⁶⁸⁾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。Ca²⁺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Ca²⁺の結合 の場合はpH依存性を示さないという報告⁶⁹⁾がある。Z線からのリン脂 質の遊離に対するCa²⁺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α-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70)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α-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Ca²⁺の作用 により*a*-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,

a-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Ca²⁺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

-76-

関するモデルを第40図に提起する。今後,乙線における脂質成分の三次元構造を解明し,0.1 mM Ca²⁺による*α*-アクチニンとリン脂質の結合の開裂が実証されれば,Ca²⁺による乙線の脆弱化の分子機構がより詳細に明らかにされるであろう。





第39図 Z線に対するCa²⁺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⁵³⁾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Ca²⁺の作用機構に 関するモデルを考案した。サイトゾルのCa²⁺濃度が 10 μM以上にな るとCa²⁺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⁷⁰⁾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 α-アクチニン

-79-

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 Ca²⁺の作用機構に関する モデルに基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⁵³⁾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 Ca²⁺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 Ca²⁺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。





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℃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α-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Ca²⁺存在下で, 無定形物質を構成す る脂質はCa²⁺と結合する。(6)Ca²⁺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Ca²⁺結合能が高く,正と負の電荷を持つホスファチジ ル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 し本協士フのけ いての機構にとてくのしけかしょ

-82-

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。如此是自己的意思。

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付属農場畜産製造部,畜産第一部,畜産第二部,北海道大 学付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仭助手には,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

-84-

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

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

-86-

- 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.
```

-88-

- 42) Towbin, H., Staeherin, 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. Lpid 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.

-89-

- 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 查成果報告書(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.





