



# HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	種々のKCI濃度下におけるコイ筋原繊維の顕微鏡観察像とATPase活性, 粘度, 膨潤度との関連性について
Author(s)	飛嶋, 千尋; TOBISHIMA, Chihiro; 猪上, 徳雄 他
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 40(1), 65-71
Issue Date	1989-02
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/24020">https://hdl.handle.net/2115/24020</a>
Type	departmental bulletin paper
File Information	40(1)_P65-71.pdf



種々のKCl濃度下におけるコイ筋原繊維の顕微鏡観察と  
ATPase活性, 粘度, 膨潤度との関連性について

飛嶋 千尋\*・猪上 徳雄\*\*・信濃 晴雄\*\*

Light Microscopic Observation and Changes in ATPase  
Activity, Viscosity and Swelling of Carp  
Myofibrils under 0-0.6M KCl Solutions

Chihiro TOBISHIMA\*, Norio INOUE\*\* and Haruo SHINANO\*\*

Abstract

Isolated carp myofibrils were observed under a light microscope (phase contrast) after dialysis against a buffer containing 0-0.6 M KCl (KCl-buffer). ATPase activity, viscosity and swelling were measured at the same time in connection with structural changes in the myofibrils.

After dialysis against distilled water, the myofibrils showed remarkable swelling accompanied with the disappearance of their cross striation and an increase in Mg-ATPase activity. These properties were then restored to their original states when the myofibrils were dialyzed against 0.16 M KCl-buffer. When the myofibrils were dialyzed against 0.025-0.16 M KCl-buffer, they seemed to be stable, because no significant change was observed under the light microscope, and was recognized in ATPase activity, viscosity and swelling. After dialysis against 0.2 M KCl-buffer, the myofibrils swelled and their cross striation disappeared partially, however restoration did not occur after the subsequent dialysis against 0.16 M KCl-buffer. Furthermore, no change was recognized in ATPase activity. Under 0.3-0.6 M KCl conditions, the myofibrils dissolved and swelled. No cross striation was observed under the light microscope and Mg-ATPase activity decreased to a low value. These properties were not restored after the subsequent dialysis against 0.16 M KCl-buffer.

A basic study of the carp myofibrils is of interest in order to gain a better understanding of Kamaboko processing.

筋原繊維タンパク質の水和性に関する研究から低塩濃度 (イオン強度  $I=0.005-0.1$ ) で水合が最低となり, さらに塩が存在しないときには水和性が著しく高まり, いわゆる水和膨潤がおこるが, 一方高塩濃度 ( $I=0.3$  以上) では塩による膨潤-ゾル化がおこることが知られている<sup>1,2)</sup>。このような現象を魚肉冷凍すり身製造時における水晒し, 脱水およびねり製品製造時の塩ずりの各工程でみられる3つのパターン, すなわち (1) 水晒しによるゲル膨潤, (2) 水晒し肉の脱水時における少量の食塩添加による離水, および (3) 食塩との混和 (塩ずり) による高イオン強度下での膨潤-ゾル化と対応させ, そのときの筋原繊維 (以下 **Mf** と略記) の形態変化について研究した例は少ない。

\* 北海道立根室高等学校

(*Nemuro High School, 146 Makino-uchi, Nemuro-city, Hokkaido 087, Japan*)

\*\* 北海道大学水産学部食品製造学講座

(*Laboratory of Marine Food Technology, Faculty of Fisheries, Hokkaido University*)

本報告では上記の現象を理解するためにコイ Mf 懸濁液を種々の KCl 濃度の溶液に透析し, Mf の形態を観察すると同時に, ATPase 活性, 粘度, 膨潤度の変化について検討した。

### 実 験 方 法

**Mf の調製** コイ *Cyprinus carpio* の背筋から加藤ら<sup>3)</sup>の方法にならい Yang ら<sup>4)</sup>の原報に準じて Mf を調製した。

**KCl 濃度の異なる溶液に対する Mf の透析** 調製した Mf の懸濁液 (0.16M KCl-40 mM Tris · HCl, pH 7.5; 3-5 mg/ml) を 10 ml ずつ透析用チューブに入れて実験に使用した。KCl 濃度が 0, 0.025, 0.05, 0.075, 0.1, 0.16, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 M となるように調製した 40 mM Tris · HCl (pH 7.5) 溶液 (以下本文中では, 例えば 0.025 M KCl 溶液というように略称する) 1000 ml に対し, それぞれ透析用試料を各 2 本ずつ用い 5°C で 18 時間透析した。透析終了後, 1 本目のチューブの Mf を光学顕微鏡観察, ATPase 活性, 粘度, 膨潤度の測定に使用した。もう一方の試料が入ったチューブは, 外液を新しく交換した 0.16 M KCl 溶液 500 ml で 5°C, 18 時間再透析した後, 前述と同様に各項目の測定を行った。

**Mf の光学 (位相差) 顕微鏡による観察およびその他の性状の測定** Mf 懸濁液 1 滴をスライドガラス上にのせカバーガラスでおおいニコン S-Ke 型位相差顕微鏡を用い 400 倍で観察した。

膨潤度は透析後の Mf 懸濁液 5 ml を目盛り付き遠心管に入れ, 1,000 rpm (150×g) で 10 分間遠心分離した後の Mf の沈降容積を測定し, 透析処理前の Mf 沈降容積に対する比で表わした。

粘度測定にはオストワルド型粘度計 (容量 2 ml) を用いた。溶媒の流下速度が 80-120 秒の粘度計を使用し, 10±0.1°C で測定した。

Mf の Ca-ATPase 活性は高土ら<sup>5)</sup>の方法に準じて 60 mM および 0.5 M KCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 25 mM Tris · maleate (pH 7.0), 1 mM ATP, Mf 0.1-0.2 mg/ml の反応組成で, Mg-ATPase 活性は 60 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 25 mM Tris · HCl (pH 7.0), 1 mM ATP, Mf 0.2-0.3 mg/ml の反応組成で, また EDTA-ATPase 活性については Yasui ら<sup>6)</sup>の方法に準じて, 0.5 M KCl, 10 mM EDTA, 25 mM Tris · maleate (pH 7.0), 1 mM ATP, Mf 0.15-0.2 mg/ml の反応組成で行った。25°C の反応温度で生成する無機リン酸を比色定量し<sup>7)</sup>, 比活性を求めた。タンパク質濃度はビウレット法<sup>8)</sup>によって定量した。

### 結 果 と 考 察

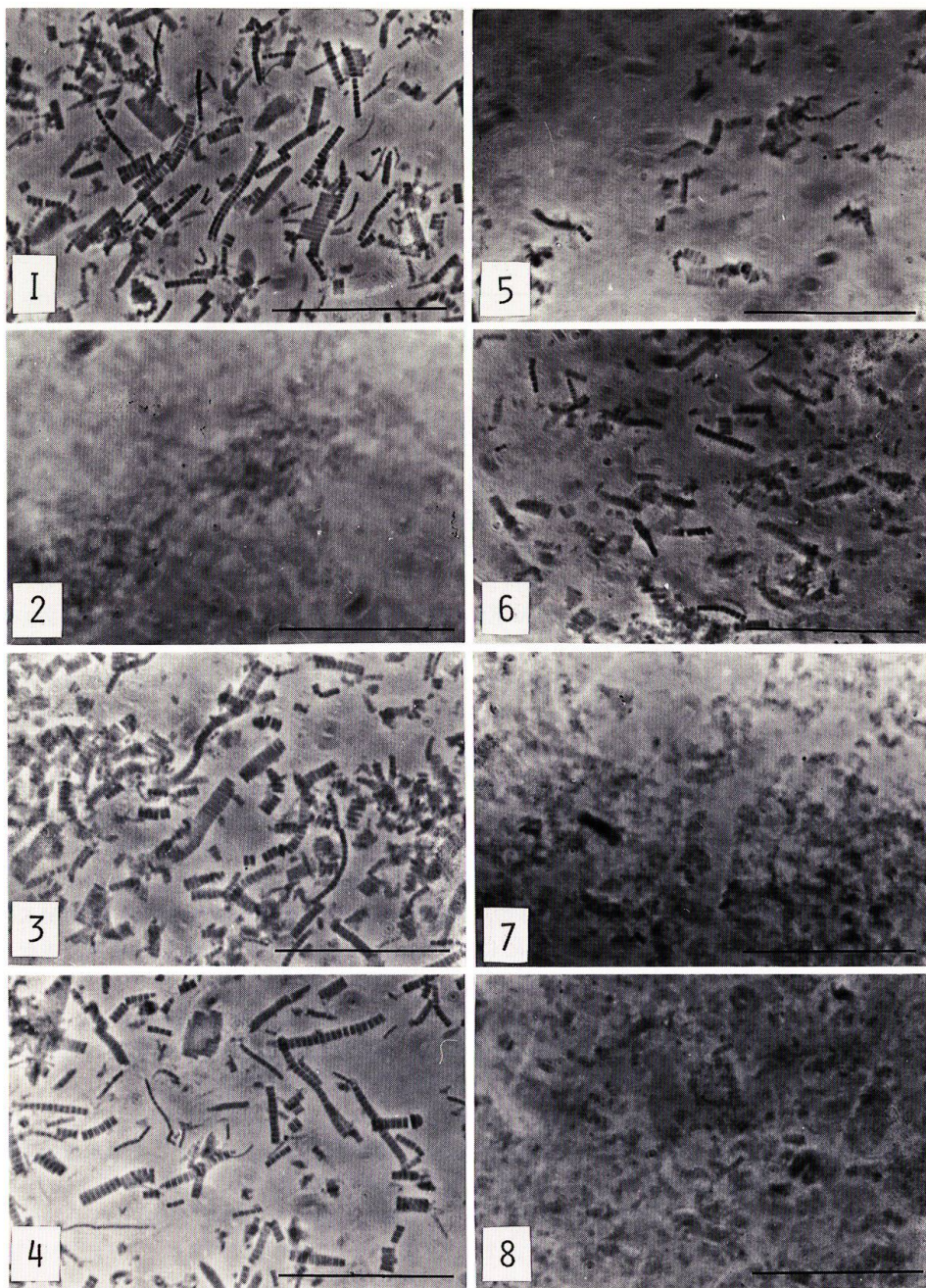
**Mf の形態変化** 筋繊維の水晒しによる水和膨潤と, 2.5-3.0% 食塩添加による解膠についてはよく知られているが, このときの筋繊維の形態変化について Mf レベルではよく調べられていな

Figs. 1-8. Light micrographs (phase contrast) of carp myofibrils isolated and exposed to KCl solutions of 0-0.3 M.

In all micrographs, the bars represent 50 μm. The numbers in the micrographs indicate the figure number.

Fig. 1. Freshly prepared myofibrils (Mf) in 0.16 M KCl solution. Figs. 2 and 3. Mf observed after dialysis against distilled water (Fig. 2) and after the subsequent dialysis against 0.16 M KCl solution (Fig. 3). Fig. 4. Mf observed after dialysis against 0.025 M KCl solution. Figs. 5 and 6. Mf observed after dialysis against 0.2 M KCl solution (Fig. 5) and after the subsequent dialysis against 0.16 M KCl solution (Fig. 6). Figs. 7 and 8. Mf observed after dialysis against 0.3 M KCl solution (Fig. 7) and after the subsequent dialysis against 0.16 M KCl solution (Fig. 8).

Each KCl solution contains 40 mM Tris·HCl buffer (pH 7.5).



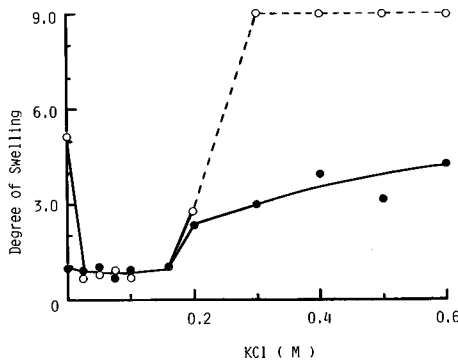


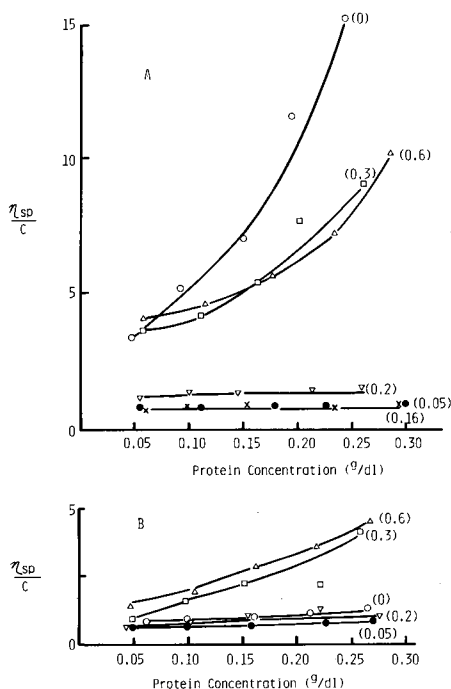
Fig. 9. Effect of KCl concentration on the swelling of myofibrils after dialysis.  
 ○, After dialysis against 0-0.6 M KCl solutions; ●, After the subsequent dialysis against 0.16 M KCl solution. The myofibrils dissolved in the range of 0.3-0.6 M KCl, therefore no precipitate occurred.  
 Each KCl solution contains 40 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5).

い。ここでは種々の KCl 濃度溶液に透析したときの Mf の形態変化を観察した。図 1 は調製後の 0.16 M KCl 溶液に懸濁した Mf の像で、5-20 個のサルコメアからなる明瞭な横紋構造を見ることが出来る。同溶液に 18-36 時間透析後も顕微鏡像に変化は認められなかった。Mf を蒸留水に透析した場合 ( $I=0$ ) Mf の横紋構造はきわめて不鮮明となったが (図 2), これを 0.16 M KCl 溶液に対して再透析すると、ほぼ正常な Mf の形態像に復元した (図 3)。同様に 0.025, 0.05, 0.075, 0.1 M KCl 溶液に透析しても鮮明な横紋構造は保持され、さらに 0.16 M KCl 溶液に再透析後も形態上の変化は認められなかった (図 4)。次に 0.2 M KCl 溶液に透析した場合は、部分的に横紋構造が崩壊しかけた像がみられ (図 5), これを 0.16 M KCl 溶液に再透析しても崩壊した部分は元の状態に復元しなかった (図 6)。さらに KCl 濃度を増加させた 0.3 M 溶液中では Mf の正常な像は全くみられず (図 7), これを 0.16 M KCl 溶液に再透析しても形態上の回復性はみられず崩壊像のままであった (図 8)。KCl 濃度が 0.4, 0.5, 0.6 M の場合も 0.3 M 溶液の場合と同様の結果であった。

**Mf の膨潤** 次に透析中におこる Mf の膨潤度の変化について測定した結果を図 9 に示した。KCl 濃度が 0.025-0.16 M の範囲で透析すると、Mf の膨潤度はほぼ 1.0 を示し、またそれらを 0.16 M KCl 溶液で再透析しても、膨潤度に変化は認められなかった。蒸留水で透析したものは約 5 倍の膨潤度を示し、これを 0.16 M KCl 溶液で再透析すると膨潤度は 1.0 に回復し、顕微鏡による観察結果と同様に可逆的であった。0.2 M KCl 溶液の場合では約 2.7 倍の膨潤度を示し、0.16 M KCl 溶液で再透析しても膨潤度は透析前の状態にもどらなかった。また 0.3-0.6 M KCl 溶液で透析した場合、Mf は肉眼的に溶解分散しており遠心分離によっても沈降しなかった。図 9 には見かけ上の膨潤度として点線で示し 9 倍として示した。これらを 0.16 M KCl 溶液に再透析すると 3-4 の膨潤度を示したが 1.0 にまでは回復しなかった。ここで得られた膨潤度の変化を前項の光学顕微鏡による観察結果に照してみると、相互によく対応していることがわかる。

**粘度の変化** Mf を蒸留水で洗浄して得られる Mf ゼル ( $I=0$ ) の粘度は著しく高くなること<sup>9)</sup>、また天然アクチン溶液では異常粘度を示すこと<sup>10)</sup> が知られているので、ここでも透析後の試料についてその粘度変化を検討した。還元粘度と Mf 濃度の関係について調べた結果を図 10 に示した。0.05, 0.16, 0.2 M KCl 溶液状態ではタンパク質濃度に対する依存性は認められず、0.2 M KCl 溶液の場合にのみやや高い値を示した。また、これらを 0.16 M KCl 溶液による再透析後も、上記の傾向は同様であった。一方、蒸留水で透析した Mf はタンパク質濃度の増加とともに粘度が著しく高くなり、タンパク質濃度依存性を示したが、これを 0.16 M KCl 溶液で再透析すると、このタンパク質濃度依存性は示さなくなった。この事実は水洗浄 Mf ゼルに塩類を 1-10 mM 加えたときに還元粘度が低下するという仁木ら<sup>11)</sup> の報告から理解できる。次に 0.3 および 0.6 M KCl 溶液における Mf は高い還元粘度とタンパク質濃度に依存する異常粘性を示した。さらにこれらの

Fig. 10. Reduced viscosity of carp myofibrils dialyzed first against 0-0.6 M KCl solutions (first-dialysis solutions) (A) and subsequently against 0.16 M KCl solution (B).  
The KCl concentration (M) of each first-dialysis solution is shown in parentheses. Each KCl solution contains 40 mM Tris·HCl buffer (pH 7.5).



試料の粘度は 0.16 M KCl 溶液で再透析後も異常粘性を示したが、還元粘度は全体として低下した。0.3 および 0.6 M という KCl 濃度下では Mf の主構成成分<sup>12)</sup> のミオシンとアクチンが溶出状態となってアクトミオシンを形成し、天然アクトミオシンの特性の一つである異常粘性<sup>10)</sup> を示したものと考えた。

**透析による ATPase 活性の変化** 透析による KCl 濃度の変化と ATPase 活性の関係を 図 11 および 12 に示した。Ca-ATPase 活性は 60 mM および 0.5 M KCl 存在下で測定したが、0-0.6 M KCl 溶液で透析しても、ほぼ一定値を示し、60 mM KCl 存在下で測定したもののほうが 0.5 M KCl 存在下で測定した場合よりも常に高い値を示した。またそれぞれ 0.16 M KCl 溶液による再透析後も変化はみられなかった( 図 11)。EDTA-ATPase 活性についても Ca-ATPase 活性と同様の傾向であった (図 12)。Mg-ATPase 活性は 0.05-0.2 M KCl 溶液の範囲では 0.8-0.9 の比活性値を示し、

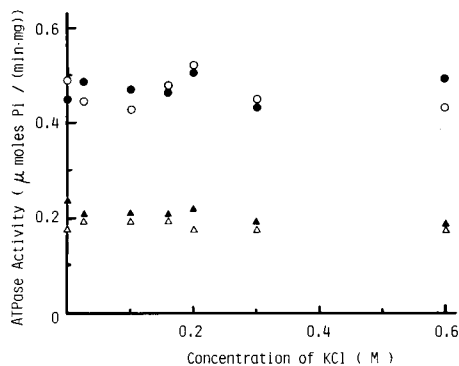


Fig. 11. Changes in Ca-ATPase activity of carp myofibrils dialyzed first against 0-0.6 M KCl solutions (first-dialysis) and subsequently against 0.16 M KCl solution (second-dialysis). Activities were measured at 60 mM KCl (○, ●) and at 0.5 M KCl (△, ▲). ○, △: After the first-dialysis; ●, ▲: After the second-dialysis. Each KCl solution contains 40 mM Tris·HCl buffer (pH 7.5).

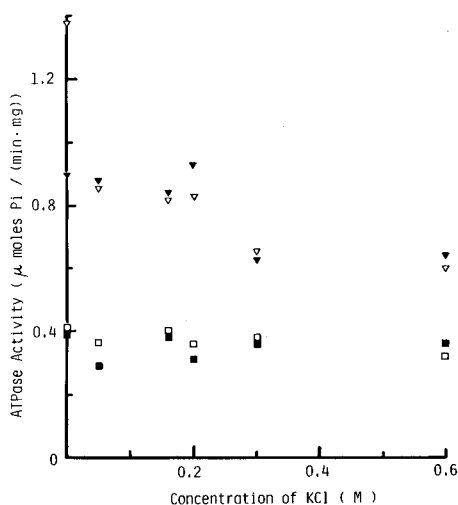


Fig. 12. Changes in Mg- and EDTA-ATPase activity of carp myofibrils dialyzed first against 0-0.6 M KCl solutions (first-dialysis) and subsequently against 0.16 M KCl solution (second-dialysis).  $\nabla$ ,  $\blacktriangledown$ : Mg-ATPase activity;  $\square$ ,  $\blacksquare$ : EDTA-ATPase activity;  $\nabla$ ,  $\square$ : After the first-dialysis;  $\blacktriangledown$ ,  $\blacksquare$ : After the second-dialysis. Each KCl solution contains 40 mM Tris·HCl buffer (pH 7.5).

0.16 M KCl 溶液で再透析しても同様であった。しかし、蒸留水で透析した Mf は比活性値が 1.3-1.5 と大きくなり、これを 0.16 M KCl 溶液で再透析すると比活性値は 0.05-0.2 M KCl 溶液の場合と同程度の値まで低下した。0.3 および 0.6 M KCl 溶液で透析した場合には、比活性値が透析前より小さくなり、0.16 M KCl 溶液による再透析後も変化は認められなかった (図 12)。このことは加藤ら<sup>3)</sup>がコイおよびニジマスの Mf について、一旦高塩溶液で溶解すると Mg-ATPase 活性は 50% 近く低下することを報告していることと同様な現象と考えた。

Mf を種々の KCl 濃度溶液で透析したときにおける形態変化は Mg-ATPase 活性、粘度、膨潤度の変化とよく対応することが観察された。このことから特徴づけられる塩濃度範囲を ① 蒸留水 (0 M KCl)、② 0.025-0.16 (0.2) M KCl および ③ 0.3-0.6 M KCl の 3 つに区分して考えると、それぞれ冷凍すり身製造時の水晒し工程、脱水工程およびねり製品製造時の塩ずり工程にあてはめることができる。蒸留水によって透析することはその過程で脱塩され、それにもない水和がおこって著しい膨潤を引きおこす。このことは水晒し回数を増すことによって肉は脱水され難くなること<sup>1)</sup>と一致する。そして 0.16 M KCl 溶液によって再透析し、塩が加えられると Mf からの離水が容易になり形態の回復がみられ、このとき ATPase 活性には何ら影響をおよぼしていないことが確認できた。このことは水晒し肉の脱水を容易にするためには少量の塩を加えることが妥当であることを示している。これら一連の処理による現象が可逆的であることは製造学視点からみると、このような過程でタンパク質の質的な面に対する影響がほとんどないという点で重要な意味を持っている。0.025-0.16 M KCl 溶液範囲では非常に安定した構造を維持しており、ATPase 活性、粘度、膨潤度からみても同様であった。0.2 M KCl 溶液では局部的な salting in (塩溶)<sup>13)</sup> の効果によると思われる膨潤と横紋構造の一部崩壊が認められたが、これはこの付近の塩濃度はエソ筋肉<sup>14)</sup> やタラ筋肉<sup>15)</sup> から塩溶性タンパク質の抽出が開始される点であることとよく一致した。0.3-0.6 M KCl 溶液での状態変化は Mf からミオシンとアクチンが溶解した状態であり塩ずり工程に相当するといえる。この過程は前述の水晒し、脱水過程が可逆的であったのに対して溶解することによって不可逆的になることが大きな相違点であり、その時の溶解性はねり製品のゲル強度と強い関係がある<sup>1)</sup>。

本研究では、存在する塩濃度の違いによる形態上的変化、ATPase 活性からみたタンパク質の質的变化、粘度および膨潤度からみたタンパク質分子の水和、離水状態の変化から Mf の性状を調

べ、それらは相互によく関連していることを明らかにした。ここで得られた結果は、冷凍すり身あるいはねり製品製造時の水晒し、脱水、塩ずりの各工程を理解する上で役立つものとする。

## 文 献

- 1) 岡田 稔 (1974). ねり製品の足とその増強. pp.180-201. 魚肉ねり製品—理論と応用. 431 p. 恒星社厚生閣, 東京.
- 2) 村岡一弘 (1960). 魚肉ねり製品の研究-VII. 生魚肉の吸水力におよぼす各種塩類の影響 (その1). 日水誌 **26**, 60-65.
- 3) 加藤 登・内山 均・塚本志朗・新井健一 (1977). 魚類筋原繊維 ATPase の生化学的研究. 日水誌 **43**, 857-867.
- 4) Yang, R., Okitani, A. and Fujimaki, M. (1970). Studies on myofibrils from the stored muscle Part I. Post-mortem changes in ATPase activity of myofibrils from rabbit muscle. *Agr. Biol. Chem.* **34**, 1765-1772.
- 5) 高士令二・新井健一・斎藤恒行 (1970). 魚類筋肉構成たんぱく質に関する研究 I. コイ筋肉からのミオシンの調製について. 日水誌 **36**, 165-168.
- 6) Yasui, T., Sumita, T. and Tsunogae, S. (1975). Stability of myofibrillar EDTA-ATPase in rabbit psoas fiber bundles. *J. Agr. Food Chem.* **23**, 1163-1168.
- 7) Gomori, G. (1942). A modification of the colorimetric phosphorous determination for use with the photoelectric colorimeter. *J. Lab. Clin. Med.* **27**, 955-960.
- 8) Gornall, A.G., Bardawill, C.J. and David, M.M. (1949). Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.* **177**, 751-766.
- 9) 仁木 弘・加藤恒夫・五十嵐清一郎 (1984). 鮮肉活性魚肉粉末 (AFPP) と魚肉ゾルの高粘性. 日水誌 **50**, 681-687.
- 10) 高士令二・新井健一・斎藤恒行 (1970). 魚類筋肉構成たんぱく質に関する研究 II. コイ筋肉からアクトミオシンの調製について. 日水誌 **36**, 169-172.
- 11) 仁木 弘・加藤恒夫・五十嵐清一郎 (1984). 鮮肉活性魚肉粉末 (AFPP) と魚肉ゾルの低粘度化. 日水誌 **50**, 689-694.
- 12) 関 伸夫・新井健一 (1974). SDS 存在下におけるコイ筋原繊維たんぱく質のゲル濾過と電気泳動. 日水誌 **40**, 1187-1194.
- 13) Bailey, K. (1954). The interaction of actin and myosin in solution. pp. 986-988. In Neurath, H. and Bailey, K. (ed.), *The Proteins* Vol. II Part B. 1418 p. Academic Press, New York.
- 14) Shimizu, Y. and Simidu, W. (1958). On the extractability of fish muscle proteins. *Memories of the College of Agriculture, Kyoto University, Fisheries Series*, 68-76.
- 15) Dyer, W.J., French, H.V. and Snow, J.M. (1950). Proteins in fish muscle I. Extraction of protein fractions in fresh fish. *J. Fish. Res. Bd. Can.* **7**, 585-593.