



豚骨格筋からのパラトロポミオシンの調製に関する研究 : 屠殺直後肉と凍結貯蔵肉の比較

山之上, 稔
岩澤, 宏哲
佐古, 隆
岡山, 高秀
西川, 勲

(Citation)

神戸大学農学部研究報告, 19(2):163-170

(Issue Date)

1991-01

(Resource Type)

departmental bulletin paper

(Version)

Version of Record

(JaLCD0I)

<https://doi.org/10.24546/00200532>

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/00200532>



豚骨格筋からのパトロポミオシンの調製に関する研究

——屠殺直後肉と凍結貯蔵肉の比較——

山之上 稔*・岩澤宏哲*・佐古 隆*・岡山高秀*・西川 勲*

(平成2年8月10日受理)

A STUDY OF THE PREPARATION OF PARATROPOMYOSIN FROM PORCINE SKELETAL MUSCLES

—— Comparison of Frozen Porcine Muscle with Fresh Porcine Muscle ——

Minoru YAMANOUE, Hiroaki IWAZAWA, Takashi SAKO,
Takahide OKAYAMA and Isao NISHIKAWA

Abstract

Paratropomyosins were prepared from the fresh and frozen porcine muscle. The amounts of paratropomyosin prepared from 1 kg of muscle were 4.1mg and 2.1mg in the fresh and frozen porcine muscle, respectively. The rate of frozen muscle paratropomyosin to fresh muscle paratropomyosin was 51.2% and the cause of decrease of the yield consisted in both preparation steps of Ca-extract and Sephadex G-200 fraction. On SDS-PAGE, both of paratropomyosins migrated as a single band having the same chain weight of 32,000, which corresponded to the α -component of tropomyosin. In adding the paratropomyosins from the fresh and frozen porcine muscle to the reconstituted actomyosin, the clearing phase was respectively prolonged 2.8 and 2.6 times that of the control.

From these results, it is concluded that the frozen muscle paratropomyosin is the same as the fresh muscle paratropomyosin, and that the frozen porcine muscle also could be used as the material of paratropomyosin preparation, not considering the decrease of yield of paratropomyosin.

I. 緒 言

家畜、家禽などの高等脊椎動物の骨格筋を食肉に変換する場合、家畜の屠殺後、死後硬直、軟化という一連の熟成過程を経過することは、食肉の保水性、軟らかさ、風味などの改善のために必須である。

熟成に伴い食肉が軟化する要因の一つに、死後硬直時に形成されたアクチンとミオシンの硬直複合体が脆弱化し、短縮したサルコメアが静止長まで復元することが挙げられる¹⁸⁾。Takahashiらは食肉の熟成中に硬直結合がなぜ脆弱になるのかを追求する過程で、ある種のタンパク質の介在を見だし、このタンパク質を筋原線維か

ら単離、精製した。このタンパク質は細いフィラメントに存在するトロポミオシンと似た性質を持っているが、異なるタンパク質であり、パトロポミオシンと命名された¹⁹⁾。パトロポミオシンは生体の筋原線維においては太いフィラメントの両端部に局在しているが、食肉の熟成中に筋漿 Ca^{2+} 濃度が 10^{-4}M に上昇する¹²⁾と、その部分から遊離して細いフィラメントのアクチンと結合するようになり⁵⁾、死後硬直時に形成されたアクチンとミオシン間の結合を脆弱にする²⁰⁾。このパトロポミオシンによる硬直結合の脆弱化が、熟成中に起こるサルコメア長の復元要因であり、食肉の軟化を引き起こすことが明らかにされている²²⁾。パトロポミオシンの精製は、通常屠殺直後の骨格筋を材料として行うが、豚、牛等の大型家畜の場合、試料入手に制約を受け、パ

* 畜産製造学研究室

パトロポミオシンの精製を随時行えず不便である。もし凍結貯蔵し、適時解凍した肉からパトロポミオシンの精製を行うことができれば、必要な量を適時確保することができ大変便利である。しかし、一般に肉を凍結すると筋線維の内外に氷結晶ができ、それが大きくなるにつれ筋線維を圧縮、破壊し、微細構造の崩壊をもたらす。また肉の解凍時には、筋線維内外の氷結晶は溶けて筋線維に再吸収されるが、一部はドリップ（肉汁）として流出してしまい、その結果解凍した肉の状態は凍結する以前とは少し異なっている⁹⁾。このように屠殺直後肉とは状態の異なる凍結貯蔵肉からパトロポミオシンが精製できるかどうか、また精製されたとしてもその機能が屠殺直後肉のパトロポミオシンと同一であるかどうかは不明である。

本研究では、豚の屠殺直後肉と凍結貯蔵肉の2種類を材料としてパトロポミオシンの精製を行った。そして両者の間で、各精製段階におけるパトロポミオシンの精製状態や収量および精製したパトロポミオシンの活性の相違点について調べ、凍結貯蔵肉がパトロポミオシン精製の材料として適当かどうか検討した。

II. 実験材料と方法

1. 筋肉試料および筋肉モデルの調製

屠殺直後のランドレース豚（90～180日齢）の胸最長筋または半膜様筋から、脂肪と結合組織を除去したものを屠殺直後の筋肉試料とした。また豚を屠殺後、屠体を $4 \pm 1^\circ\text{C}$ で一晩放置した後、胸最長筋または半膜様筋を採取し、サランラップで包装して -80°C で凍結した。一定期間（1～3週間）貯蔵後再び $4 \pm 1^\circ\text{C}$ で一晩解凍し、脂肪と結合組織を除去したものを凍結貯蔵の筋肉試料とした。

筋原線維はそれぞれの筋肉試料からPerryとGreyの方法¹⁴⁾に従って調製した。

2. タンパク質の調製

ミオシンはPerryの方法¹⁵⁾によって、アクチンはReesとYoungの方法¹⁶⁾およびSpudichとWattの方法¹⁷⁾によって、トロポミオシンはBaileyの方法¹⁾の改良法²⁾によって調製した。合成アクトミオシンはNakamuraとHattoriの方法¹³⁾に従って、0.5M KClに溶解したミオシン（6 mg/ml）と0.1M KCl中のアクチン（2 mg/ml）を等量ずつ攪拌混合し、30分以上氷冷した後に緩衝液を用いて0.1M KClになるように希釈し、合成アクトミオシン懸濁液を得た。

3. パトロポミオシンの調製

パトロポミオシンの調製は、Takahashi ら¹⁹⁾による兎骨格筋からのパトロポミオシン調製法を一部改良して行った。屠殺直後肉および凍結貯蔵肉から調製した筋原線維をHattoriとTakahashiの方法⁶⁾に従って、0.1M KCl, 1mM DTT, 1mM NaN_3 , 1mM CaCl_2 , 10mM Tris-Maleate buffer (pH7.0) のCa-溶液に約20mg/mlのタンパク質濃度で懸濁し、 $4 \pm 1^\circ\text{C}$ でゆっくりと攪拌した。72時間経過後にブレードタイプのホモジナイザーで5,000rpm で15秒間ホモジナイズ後直ちに10,000rpm で20分間遠心分離し、得られた上澄液をCa-抽出物とした。Ca-抽出物を40-90%飽和で硫酸分画し、硫酸分画画分をさらにSephadex G-200 (Pharmacia Fine Chemicals 社製) ゲル濾過法により分離した。カラムは内径25mm、全長90cm（アトー社製 No. 2590）を使用した。試料を添加し、0.1M KCl, 1mM CaCl_2 , 20mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) 溶液で溶出した結果、4つのピークに分離された。パトロポミオシンの活性を有する第1ピーク画分²³⁾を、1M KCl, 10mM 2-メルカプトエタノール, 1mM CaCl_2 , 20mM Tris-HCl buffer (pH7.5) の溶液に平衡化し、1M HClでpH4.5に調整した。室温でゆっくり攪拌しながらpH4.5に1時間保持した後、10,000rpm で30分間遠心分離した。その沈澱物を少量の0.6M KCl, 1mM CaCl_2 , 10mM Tris-HCl buffer (pH7.5) の溶液に溶解し、大量の同溶液に対して $4 \pm 1^\circ\text{C}$ で一晩透析を行った。それを10,000rpmで30分間遠心分離し、上澄液を回収した。上澄液を10mM CaCl_2 , 10mM Tris-HCl buffer (pH7.5) の溶液に対して透析を行い、パトロポミオシンのパラクリスタルを形成させた後、18,000rpmで30分間遠心分離して沈澱物を回収した。その沈澱物をさらに2回洗浄した後、18,000rpmで30分間遠心分離して沈澱物を回収し、少量の0.1M KCl, 10mM Tris-HCl buffer (pH7.5) で溶解し、大量の同溶液に対して $4 \pm 1^\circ\text{C}$ で透析を行った。それを18,000rpmで30分間遠心分離後、上澄液を回収し精製パトロポミオシンを得た。

4. Ca-抽出物の抽出率の測定

屠殺直後肉および凍結貯蔵肉から調製した筋原線維を5倍量の、DTT, NaN_3 を除いた2種類のCa-溶液（0.1M KCl, (5mM EDTA または1mM CaCl_2), 10mM Tris-Maleate buffer, pH7.0) に懸濁し、2,200rpmで10分間遠心分離した。その沈澱物を、1mM DTT, 1mM NaN_3 を含むそれぞれのCa-溶液で約20mg/ml

になるように懸濁し、 $4 \pm 1^\circ\text{C}$ でゆっくりと絶えず攪拌、抽出した。一定時間経過毎に筋原線維懸濁液を採取し、5,000rpmで15秒間ホモジナイズした後、10,000rpmで20分間遠心分離し、その上澄液をCa-抽出物とし、タンパク質濃度を測定した。Ca-抽出物の抽出率は、筋原線維懸濁液のタンパク質濃度に対する割合（百分率）で示した。

5. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)

SDS-PAGEはLaemmliの方法¹⁰⁾に従って行った。試料をそれぞれ2% SDS, 1% 2-メルカプトエタノール, 0.125M Tris-HCl buffer (pH6.8)の溶液に対し室温で一晩透析を行った後、3分間煮沸し、冷却後、BPB溶液(0.1%ブロムフェノールブルー, 50%グリセロール, 10mM Tris-HCl buffer, pH6.8)と混合し、電気泳動用試料とした。12%分離ゲルと4.5%濃縮ゲルを用い、0.1% SDS, 0.025M Tris-0.192M Glycine (pH8.3)の泳動buffer中で、4時間泳動した。染色はCoomassie Brilliant Blue R-250で1時間行った。脱色は5%メタノール、7.5%酢酸溶液で行った。

6. パトロポミオシンの活性の測定

パトロポミオシンのアクチン・ミオシン間結合の阻害活性は、Takahashiらの方法¹⁹⁾に従って合成アクトミオシンの超沈澱中の透明化期間の測定で行った。反応は 25°C で行い、0.25mgアクチン, 0.75mgミオシン, 0.1MKCl, 1mM CaCl_2 , 5mM MgCl_2 , 4.5mM ATP, 20mM imidazole-HCl buffer (pH7.0)の反応溶液に、60 μg のパトロポミオシンを添加して透明化期間を測定した。

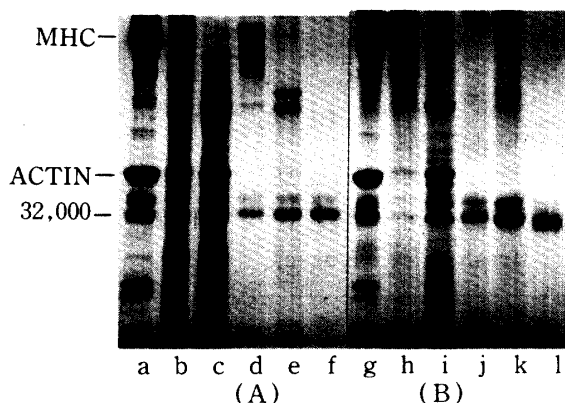


Fig. 1. SDS-PAGE pattern of paratropomyosin fractions obtained during purification of paratropomyosin. Paratropomyosin fractions were prepared from the fresh porcine muscle (A) and the frozen porcine muscle (B). (a, g) Myofibril; (b, h) Ca-extract; (c, i) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ fraction; (d, j) Sephadex G-200 fraction; (e, k) pH4.5 fraction; (f, l) 10mM CaCl_2 fraction.

7. タンパク質濃度の測定

タンパク質濃度はGornallら⁴⁾のビウレット法(波長550nm)および紫外外部吸収法⁷⁾(波長280nm)によって測定した。

III. 実験結果

1. パトロポミオシンの各調製段階におけるSDS-PAGE像の比較

屠殺直後肉および凍結貯蔵肉からのパトロポミオシンの各調製段階におけるSDS-PAGE像を比較し、Fig. 1に示した。屠殺直後肉および凍結貯蔵肉の両者共に筋原線維から抽出したCa-抽出物を、硫酸分画法、ゲル濾過法、等電点沈澱法と精製を進めるにつれ、パトロポミオシンに相当する32,000ダルトン成分以外のタンパク質が除去されたが、その様子は屠殺直後肉と凍結貯蔵肉ではわずかながら違っていた。すなわち、凍結貯蔵肉では筋原線維画分に屠殺直後肉ではみられない30,000ダルトン近傍のバンドが2本認められた。Ca-抽出物中には、32,000ダルトン成分をはじめ135,000、96,000、43,000、36,000ダルトン成分などが含まれていたが、屠殺直後肉では、43,000ダルトン付近のバンドが凍結貯蔵肉よりも明瞭に認められた。硫酸分画画分では、屠殺直後肉および凍結貯蔵肉共に同様のバンドがみられたが、屠殺直後肉に筋原線維画分ではみられなかった2本の30,000ダルトン付近のバンドが認められた。ゲル濾過第1ピークでは、32,000ダルトン成分が多くを占めたが、屠殺直後肉で認められた74,000ダルトン以上の高分子量成分が凍結

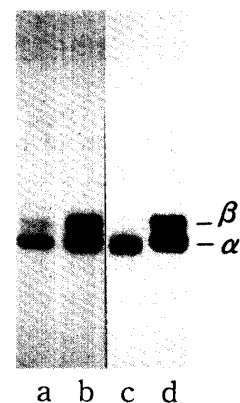


Fig. 2. SDS-PAGE pattern of purified paratropomyosin from porcine muscle.

(a) fresh muscle paratropomyosin; (c) frozen muscle paratropomyosin; (b, d) fresh muscle tropomyosin.

貯蔵肉では認めにくかった。等電点沈澱画分では、屠殺直後肉および凍結貯蔵肉共に32,000ダルトンのバンド以外に74,000ダルトンと80,000ダルトンのバンドが認められたが、屠殺直後肉では、この両バンドは特に明瞭だった。精製パラトロポミオシンでは、屠殺直後肉および凍結貯蔵肉共に32,000ダルトンのパラトロポミオシンの単一バンドが認められた。

Fig. 2に屠殺直後肉と凍結貯蔵肉のそれぞれから精製したパラトロポミオシンと屠殺直後肉から精製したトロポミオシンのSDS-PAGE像を示した。トロポミオシンは α 、 β の2本のバンドに泳動されたが、パラトロポミオシンは屠殺直後肉および凍結貯蔵肉共にトロポミオシンの α 成分に相当する32,000ダルトンの単一バンドとして泳動され、分子量に差があるものの、兎、鶏のパラトロポミオシンの泳動結果¹⁹⁾と一致した。

2. パラトロポミオシンのアクチン・ミオシン間結合の阻害活性

合成アクトミオシン懸濁液にATPを加えると直ちに透明化を起し、濁度が低下する状態が数分間持続する。その後濁度が急速に上昇して超沈澱を起こす³⁾。合成アクトミオシンにパラトロポミオシンを加えて超沈澱を起こすと無添加の場合に比べて透明化の期間が顕著に延長されることが明らかになっており²¹⁾、パラトロポミオシンの活性測定法として示されている。今回の条件では合成アクトミオシンにATPを添加し透明化を起こした後、超沈澱が起こるまでの時間は、パラトロポミオシンが存在しない対照実験では2.9分間だった (Fig. 3)。合成アクトミオシンに屠殺直後肉から精製したパラトロポミオシンを加えた場合、透明化期間は8.2分間で加え

ない時の約2.8倍に延長され、凍結貯蔵肉からのパラトロポミオシンを加えた場合、透明化期間は7.5分間で約2.6倍に延長された。この結果、屠殺直後肉と凍結貯蔵肉から精製したパラトロポミオシンはアクチンとミオシン間結合の阻害活性を有しており、また両者の阻害効果にはほとんど差がないことが明らかになった。

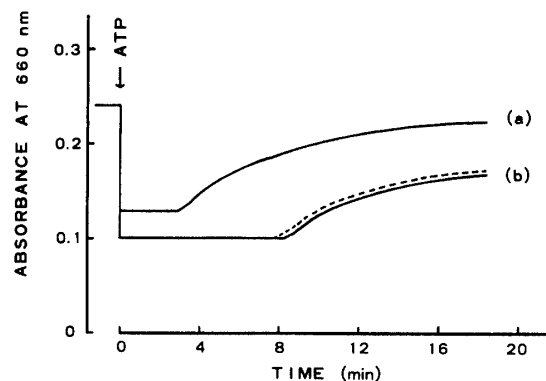


Fig. 3. Effect of paratropomyosin on the duration of the clearing phase of reconstituted actomyosin.

(a) control ; (b) fresh muscle paratropomyosin (—) and frozen muscle paratropomyosin (-----).

3. パラトロポミオシンの各調製段階におけるタンパク質収量の比較

Table 1に、屠殺直後肉と凍結貯蔵肉から調製され、回収される各タンパク質画分の量、筋原線維タンパク質量を100%とした時の回収率および屠殺直後肉のタンパク質量に対する凍結貯蔵肉のタンパク質量の割合を示した。屠殺直後肉では、筋原線維タンパク質は筋肉1 kgか

Table 1. Purification of paratropomyosin from myofibrils¹.

Fraction	Total protein (mg)		Recovery ² (%)		Rate ³ (%)
	(fresh)	(frozen)	(fresh)	(frozen)	
Myofibrils	94,340	96,120	100.0	100.0	101.9
Ca-extract	14,699	11,132	15.6	11.6	75.7
40-90% (NH ₄) ₂ SO ₄	1,518.9	1,124.6	1.61	1.17	74.0
Sephadex G-200	182.8	92.2	0.194	0.096	50.4
10mM CaCl ₂	4.1	2.1	0.0043	0.0022	51.2

¹ Myofibrils are prepared from fresh and frozen porcine muscle of 1 kg, respectively.

² Recovery is respectively expressed the amount of myofibrillar protein as 100%.

³ Rete is a percent of frozen muscle fraction to fresh muscle fraction.

ら94,340mg調製され、抽出されるCa-抽出物量は14,699mgで筋原線維タンパク質量の15.6%だった。硫酸分画面分量は1518.9mg、ゲル濾過により分離された第1ピーク画分量は182.8mgが得られ、それぞれ筋原線維タンパク質量の1.61%と0.194%の回収率だった。精製されたパトロポミオシン量は4.1mgで0.0043%の回収率だった。凍結貯蔵肉からは筋原線維タンパク質は96,120mg調製された。Ca-抽出物は11,132mg抽出され、筋原線維タンパク質量の11.6%だった。硫酸分画面分量は1124.6mgで1.17%、ゲル濾過第1ピーク画分量は92.2mgで0.096%の回収率だった。精製されたパトロポミオシン量は、凍結貯蔵肉では2.1mgが得られ、回収率は0.0022%だった。

筋原線維タンパク質量は屠殺直後肉と凍結貯蔵肉で差はほとんどなかったが、Ca-抽出物量は凍結貯蔵肉では屠殺直後肉の75.7%しか抽出されなかった。硫酸分画面分量は、凍結貯蔵肉では屠殺直後肉の74.0%であったが、ゲル濾過第1ピーク画分量は、屠殺直後肉の50.4%とさらに低下した。最終的に精製された凍結貯蔵肉からのパトロポミオシン量は、屠殺直後肉の51.2%だった。

4. 収量低下原因の検討

(1) Ca-抽出物量の減少

屠殺直後肉と凍結貯蔵肉からのパトロポミオシンの収量を比較した場合、屠殺直後肉では筋肉試料1kgから4.1mgのパトロポミオシンが回収されたのに対し、凍結貯蔵肉からは2.1mgしか回収されず、屠殺直後肉の回収量の51.2%にとどまった (Table 1)。この原因の1つとして、凍結貯蔵肉では筋原線維からCa-抽出物が抽

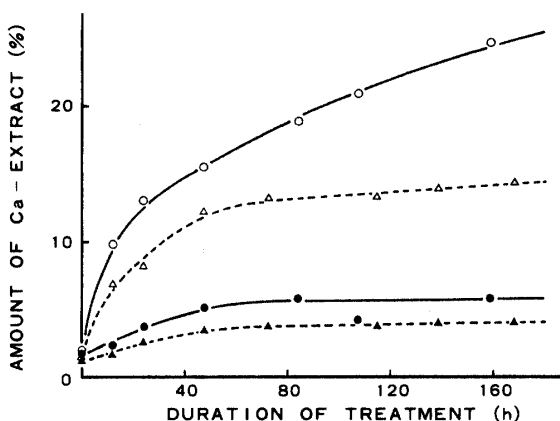


Fig. 4. Effect of the 1mM Ca^{2+} treatment on the amount of Ca-extract.

Ca-extracts were extracted from myofibrils with the Ca-solution containing 1mM CaCl_2 (○, △) or 5mM EDTA (●, ▲). Solid line, fresh porcine muscle ; Broken line, frozen porcine muscle.

出されにくいことが考えられ、屠殺直後肉の抽出率と比較するために、抽出時間に対するCa-抽出物の抽出率の変化を調べ、Fig. 4に示した。屠殺直後肉におけるCa-抽出物の抽出率は、凍結貯蔵肉の抽出率よりも抽出期間を通じて高い値を示した。屠殺直後肉の抽出率は抽出開始時には1.9%だったが、48時間目までに15.4%と急増し、その後漸次増加した。一方凍結貯蔵肉における抽出率は抽出開始時には1.4%で屠殺直後肉とほとんど差はなく、48時間目まで12.3%と増加したが、その後14%前後ではほぼ一定となった。1mM CaCl_2 の代わりに 5mM EDTA を添加した対照実験では、屠殺直後肉と凍結貯蔵肉共に抽出開始時の1.5%と1.2%から、48時間目以降5%前後と4%前後で一定となり、ほとんど抽出されなかった。72時間抽出後の屠殺直後肉に対する凍結貯蔵肉のCa-抽出物量の割合は74.9%で、Table 1に示したパトロポミオシン調製時の比率にほぼ一致した。

(2) ゲル濾過第1ピーク画分量の減少

凍結貯蔵肉から精製されるパトロポミオシンの収量低下は、さらにゲル濾過法による調製段階で認められた (Table 1)。そのため屠殺直後肉および凍結貯蔵肉からの硫酸分画面分を、それぞれ250mgずつゲル濾過法により分離し、その結果をFig. 5に示した。硫酸分画面分は屠殺直後肉および凍結貯蔵肉共に4つのピークに分離され、溶出された。パトロポミオシンが含まれる第

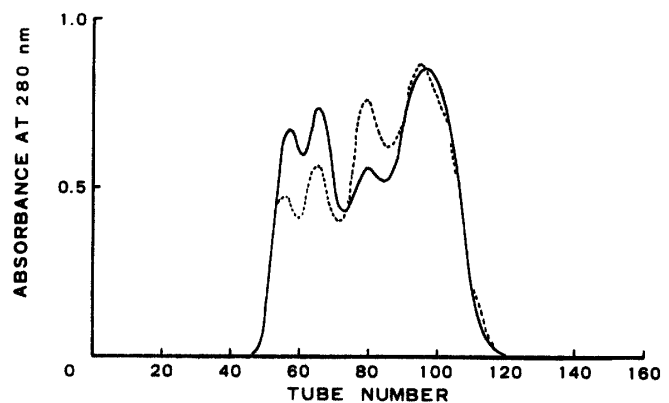


Fig. 5. Sephadex G-200 gel filtration of paratro-pomyosin. Each 250mg of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ fractions from fresh porcine muscle and frozen porcine muscle was applied to a column ($2.5 \times 90\text{cm}$) of Sephadex G-200 equilibrated and eluted in a solution of 0.1M KCl, 1mM CaCl_2 and 20mM Tris-HCl, pH7.5. Solid line, fresh porcine muscle ; Broken line, frozen porcine muscle.

1 ピーク²³⁾の吸光値は、屠殺直後肉では0.665 (Tube No. 56)、凍結貯蔵肉では0.469 (Tube No. 55) と屠殺直後肉のほうが高く、タンパク質の回収量では、屠殺直後肉が79.3mgで、凍結貯蔵肉は屠殺直後肉の73.8%である58.5mgしか回収されなかった。また第2ピークの吸光値は0.733 (Tube No. 65) と0.561 (Tube No. 65) で屠殺直後肉が高く、逆に第3ピークでは、0.552 (Tube No. 80) と0.751 (Tube No. 79) で凍結貯蔵肉の方が高かった。第4ピークの吸光値は屠殺直後肉では0.850 (Tube No. 96)、凍結貯蔵肉では0.861 (Tube No. 96) で凍結貯蔵肉の方が少し高かったが、両者にはほとんど差がなかった。

ゲル濾過法によって分離した4つの溶出ピークを、それぞれSDS-PAGE法で分析し、比較した結果をFig. 6に示した。第1ピーク画分では、屠殺直後肉および凍結貯蔵肉共にパラトロポミオシンに相当する32,000ダルトン成分のバンドが多くを占めた。さらに屠殺直後肉では74,000ダルトン以上の高分子量成分が明瞭に認められたが、凍結貯蔵肉では認めにくかった。第2ピークでは、32,000ダルトンのバンドが屠殺直後肉ではわずかであるのに対し、凍結貯蔵肉では明瞭に認められ、また64,000および74,000ダルトン以上のバンドが多量に存在した。第3ピーク画分では屠殺直後肉および凍結貯蔵肉共にアクチンに相当する42,000ダルトンのバンドが認められ、また第4ピーク画分では両者に20,000ダルトン以下のバンドが混在しており、屠殺直後肉と凍結貯蔵肉間にそれほど顕著な差は認められなかった。

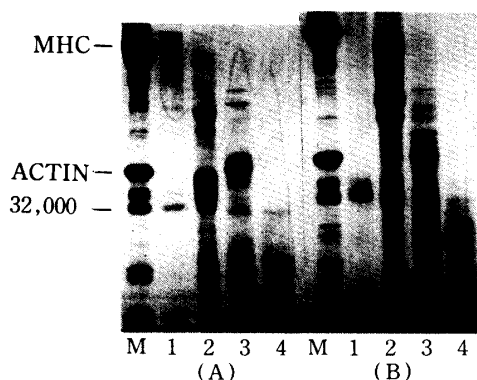


Fig. 6. SDS-PAGE pattern of Sephadex G-200 gel filtration fractions.

Each 250mg of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ fractions from fresh porcine muscle (A) and frozen porcine muscle (B) was applied to a column of Sephadex G-200 in the same condition as expressed in Fig. 5. (M) Myofibrils; (1) peak 1; (2) peak 2; (3) peak 3; (4) peak 4.

IV. 考 察

熟成中の食肉の軟化に伴うサルコメアの長さの復元は、生体時の弛緩とは全く異なる機構によって引き起こされ、アクチンとミオシン間の硬直結合が脆弱化するために細いフィラメントと太いフィラメントの間に位置のずれが生じて起こる^{20, 22)}。このアクチン・ミオシン間結合の脆弱化は筋原線維タンパク質であるパラトロポミオシンによって引き起こされるが、これまでにその物理化学的諸性質¹⁹⁾、機能^{20, 22)} および筋原線維内の局在⁵⁾ が明らかにされている。

パラトロポミオシンは通常屠殺直後の家畜の骨格筋から調製されるが、豚、牛等の大型家畜の場合試料入手に制約を受ける。もし凍結貯蔵肉を解凍し、それを材料として随時パラトロポミオシンを精製できれば大変便利であるが、状態の異なる凍結貯蔵肉と屠殺直後肉からのパラトロポミオシンの精製状態およびその機能の相違は不明である。これらの点を明らかにするために、屠殺直後肉と凍結貯蔵肉のそれぞれからパラトロポミオシンを調製し、パラトロポミオシンの収量や活性の相違点について比較検討した。

屠殺直後肉と凍結貯蔵肉から精製されたパラトロポミオシンはSDS-PAGEでは共にトロポミオシンの α 成分に相当する単一バンドとして泳動され (Fig. 2)、兎および鶏の骨格筋から精製したパラトロポミオシン¹⁹⁾ と同じだった。しかし、兎および鶏のパラトロポミオシンの分子量は34,000であるのに対し、豚の場合は共に32,000と推定され、異なる結果となった。これは今回分子量推定のために使用した標準タンパク質の違いによるものと考えられる。アクチンとミオシン間結合を阻害するパラトロポミオシンの活性は合成アクトミオシンの超沈澱の透明化期間を延長する作用で測定した。屠殺直後肉と凍結貯蔵肉のいずれのパラトロポミオシンも透明化期間を延長し (Fig. 3)、アクチンとミオシン間の結合を阻害した。その効果は屠殺直後肉では2.8倍、凍結貯蔵肉では2.6倍とほぼ同じだったが、兎での4.4倍¹⁹⁾ よりは少なかった。豚のパラトロポミオシンの活性が兎に比較して本来低いのか、または実験条件の違いによるのかは明らかではないが、今後同一条件下で豚と兎のパラトロポミオシンの活性を測定する必要がある。いずれにしても屠殺直後肉と凍結貯蔵肉のそれぞれから精製したパラトロポミオシンは、SDS-PAGEと活性測定の結果より同一であると考えられるが、正確な同定にはアミノ酸組成などの物理化学的諸性質や免疫学的な異同性を調べる

必要があろう。

今回パラトロポミオシンは屠殺直後肉の1 kgから4.1 mg精製されたが、凍結貯蔵肉からは2.1 mgしか精製されず、屠殺直後肉での収量の51.2%にとどまった (Table 1)。兎骨格筋では筋原線維100 gから22 mgのパラトロポミオシンが精製されている¹⁹⁾が、この差異が畜種の違いによるものか、または従来の精製法が豚骨格筋のパラトロポミオシンに適さないのかは不明である。しかし、兎ではパラトロポミオシン調製法の改良により、収量が従来の約4倍に改善されており⁸⁾、豚骨格筋でも調製法の改良により収量の増加が期待される。

凍結貯蔵肉のパラトロポミオシン収量の低下は、Ca-抽出物とSephadex G-200によるゲル濾過画分の調製段階に原因があると考えられた (Table 1)。屠殺直後肉と凍結貯蔵肉間のCa-抽出物の抽出率の違いを調べるために、筋原線維をCa-溶液に約20 mg/mlの濃度で懸濁し、一定時間経過毎に抽出率を測定し、比較した (Fig. 4)。パラトロポミオシンの精製に使用される1 mM Ca^{2+} 溶液による72時間後における抽出率は、屠殺直後肉では筋原線維濃度の17.2%、凍結貯蔵肉では13.2%であり、屠殺直後肉の75.2%の回収量しかなかった。パラトロポミオシンは、死後筋肉の筋漿中で 10^{-4} Mに増加した Ca^{2+} により生体時の局在位置である筋原線維のA帯の両端部から遊離し、細いフィラメント上のアクチンと不可逆的に結合することが示されている⁵⁾。また屠殺直後肉と凍結貯蔵肉ではCa-抽出物の成分組成にわずかながら差がある (Fig. 1) ことから、死後一定時間経過した凍結貯蔵肉からのCa-抽出物量の減少は、アクチンと不可逆的に結合したパラトロポミオシンの抽出性の低下だけでなく、Ca-溶液による他のタンパク質成分の抽出性に変化が生じたためと考えられる。

凍結貯蔵肉のパラトロポミオシン収量低下のもう1つの原因と考えられるゲル濾過の調製段階について調べた。それぞれ250 mgの硫酸分画画分をゲル濾過すると、屠殺直後肉と凍結貯蔵肉共に4つのピークに分離され (Fig. 5)、パラトロポミオシンの存在する第1ピークのタンパク質量は、屠殺直後肉では79.3 mg、凍結貯蔵肉では屠殺直後肉の73.8%に相当する58.5 mgだった。第1ピークのSDS-PAGE像では屠殺直後肉と凍結貯蔵肉共にパラトロポミオシンに相当する32,000ダルトンの成分が多くを占めたが、屠殺直後肉に顕著に認められた74,000ダルトン以上の高分子量成分は凍結貯蔵肉にはわずか (Fig. 6) で、このことがゲル濾過におけるパラトロポミオシン収量低下の原因と考えられた。すなわちパラトロポミ

オシンは生体時には筋原線維のA帯の両端部で他の高分子量タンパク質、おそらくコネクチン¹¹⁾と複合体をつくって局在しており⁵⁾、屠殺直後肉ではこれが Ca^{2+} により抽出され、さらにゲル濾過により第1ピークに分離されるものと考えられる。しかし凍結貯蔵肉では死後時間の経過に伴いパラトロポミオシンがA帯の両端部から遊離し、またコネクチン自体も変化して⁵⁾高分子量の複合体が低分子化する、あるいは複合体を形成できなくなるにより、第1ピークに含まれるパラトロポミオシンの量が減少したことが考えられる。また凍結貯蔵肉では第2ピークに32,000ダルトン成分のバンドが屠殺直後肉に比べて顕著に認められる (Fig. 6) ことから、高分子量の複合体を形成できないパラトロポミオシンが第2ピークに分離された¹⁹⁾ものと考えられる。屠殺直後肉に対する凍結貯蔵肉のタンパク質量の割合がゲル濾過段階の50.4%から精製後の51.2%に上昇した (Table 1) のは、第1ピークに含まれるパラトロポミオシン以外のタンパク質成分が屠殺直後肉に多く、精製後にそれらが除かれたためだろう。

以上のように屠殺直後肉と凍結貯蔵肉のいずれからでもパラトロポミオシンの精製は可能であり、精製されたパラトロポミオシンのアクチン・ミオシン間結合の阻害機能もまた屠殺直後肉と凍結貯蔵肉でほぼ同じである。しかし凍結貯蔵肉からのパラトロポミオシンの収量は屠殺直後肉の収量の51.2%にとどまった。これらのことは凍結貯蔵肉からパラトロポミオシンを随時精製できることを示しており、収量が低下する欠点はあるが、凍結貯蔵肉は屠殺直後肉と同様、パラトロポミオシンの調製材料として使用できると結論される。

V. 要 約

豚の屠殺直後肉および凍結貯蔵肉からパラトロポミオシンの調製を行った。筋肉試料1 kgから精製されるパラトロポミオシン量は、屠殺直後肉では4.1 mg、凍結貯蔵肉では2.1 mgで屠殺直後肉の収量の51.2%だった。凍結貯蔵肉での収量低下は、Ca-抽出物とSephadex G-200によるゲル濾過画分の調製段階で認められた。SDS-PAGEによると、両パラトロポミオシンは共に32,000の分子量を持つ単一バンドとして泳動され、トロポミオシンの α 成分と対応していた。アクチン・ミオシン間結合の阻害活性を調べた結果、屠殺直後肉と凍結貯蔵肉のパラトロポミオシンは、合成アクトミオシンの超沈殿の透明化期間を、対照のそれに比べてそれぞれ2.8倍と2.6倍に延長した。

これらの結果から屠殺直後肉および凍結貯蔵肉から精製されたパルトロポミオシンは同一であり、収量が減少する欠点を除けば、凍結貯蔵肉をパルトロポミオシン精製の材料として使用できることを示した。

謝 辞

本実験を行うにあたり、家畜育種学講座から豚骨格筋を提供頂きました。また畜産学科の中川成男技官から種々御助力頂きました。ここに記して深く感謝の意を表します。

引 用 文 献

- 1) BAILEY, K.: *Biochem. J.*, 43, 271-279, 1948.
- 2) EBASHI, S., KODAMA, A. and EBASHI, F.: *J. Biochem.*, 69, 441-445, 1971.
- 3) EBASHI, S.: *J. Biochem.*, 50, 236-244, 1961.
- 4) GORNALL, A. G., BARDWILL, C. S. and DEVL, M. M.: *J. Biol. Chem.*, 177, 751-766, 1949.
- 5) HATTORI, A. and TAKAHASHI, K.: *J. Biochem.*, 103, 809-814, 1988.
- 6) HATTORI, A. and TAKAHASHI, K.: *J. Biochem.*, 92, 381-390, 1982.
- 7) KALCKAR, H. M.: *J. Biol. Chem.*, 167, 461, 1947.
- 8) 近藤 正明・高橋 興威: 第80回日本畜産学会大会大会要旨, 東京, p.103, 1988.
- 9) LAWRIE, R. A.: *Meat Science*, 3rd ed., pp.216-220, Pergamon Press, New York, 1979.
- 10) LAEMMLI, U. K.: *Nature*, 227, 680-685, 1970.
- 11) MARUYAMA, K., MATUBARA S., NATORI R., NONOMURA, Y., KIMURA, S., OHASHI, K., MURAKAMI, F., HANDA, S. and EGUCHI, G.: *J. Biochem.*, 82, 317-337, 1977.
- 12) NAKAMURA, R.: *Anal. Biochem.*, 53, 531-537, 1973.
- 13) NAKAMURA, F. and HATTORI, A.: *Mem. Fac. Agric. Hokkaido Univ.*, 16, 359-367, 1989.
- 14) PERRY, S. V. and GREY, T. C.: *Biochem. J.*, 64, 184-192, 1956.
- 15) PERRY, S. V.: *Methods in Enzymology*, Vol. 2, pp. 582-588, Academic Press, New York, 1955.
- 16) REES, M. K. and YOUNG, M.: *J. Biol. Chem.*, 242, 4449-4458, 1967.
- 17) SPUDICH, J. A. and WATT, S.: *J. Biol. Chem.*, 246, 4866-4871, 1971.
- 18) TAKAHASHI, K., FUKAZAWA, T. and YASUI, T.: *J. Food Sci.*, 32, 409-413, 1967.
- 19) TAKAHASHI, K., NAKAMURA, F., HATTORI, A. and YAMANOE, M.: *J. Biochem.*, 97, 1043-1051, 1985.
- 20) TAKAHASHI, K., YAMANOE, M., MURAKAMI, T., NISHIMURA, T. and YOSHIKAWA, R.: *J. Biochem.*, 102, 1187-1192, 1987.
- 21) TAKAHASHI, K., NAKAMURA, F. and OKAMOTO, M.: *J. Biochem.*, 92, 809-815, 1982.
- 22) YAMANOE, M. and TAKAHASHI, K.: *J. Biochem.*, 103, 843-847, 1988.
- 23) 山之上 稔・岩澤 宏哲・岡山 高秀・西川 勲: 第81回日本畜産学会大会大会要旨, 東京, p.89, 1989.