

アミノ酸添加魚類筋原繊維の水の状態と温度安定性との関連性

野崎 征宣・田端 義明

Relationship between the States of Water and the Thermal Stabilities of Fish Myofibrils in Presence of Amino Acids

Yukinori NOZAKI and Yoshiaki TABATA

By adding various amino acids of 0.2 mol/kg to carp myofibrils, the relations between the states of water and the thermal stabilities were examined, from the standpoint of the amount of bound water obtained from thermal analysis as to the states of water, considering the rate constant (k_D) for inactivation of myofibrillar Ca-ATPase as an index of the myofibrils in quality.

The amount of bound water with the myofibrils in case such acidic amino acids as sodium asparaginate and sodium glutamate were added were greater than those in case either other or no amino acids were added; and their k_D values were very small showing high thermal stabilities. The amount of bound water with the myofibrils in case the acidic amino acids of asparagine and glutamine, the basic amino acids of ornithine and lysine, and the neutral amino acids (six kinds) such as glycine were added were greater than those in the case of no amino acid added; and their k_D values were smaller than those in the case of no amino acids. The amount of bound water with the myofibrils in case the basic amino acids of arginine and the neutral amino acids (five kinds) such as leucine were added were almost the same as those of no amino acid added, but their k_D values were great showing low thermal stabilities.

The above-mentioned results suggest that the higher the thermal stabilities of the amino acids, the greater are in most cases the amount of bound water; and the structuralization of the water surrounding myofibrillar proteins due to the added amino acids is an important factor to suppress the denaturation of the myofibrils upon heating.

魚肉タンパク質の加熱による温度安定性に関する研究は、Connell(1)が、魚肉タンパク質の温度に対する感受性は、魚類の棲息水温と深く関係していることを報告して以来、多くの研究が行われてきた。魚肉タンパク質の温度安定性は、アクトミオシン(2-6)、ミオシン(4, 7, 8)、筋原繊維(9-11)を用いて、主としてその Ca-ATPase の失活速度か

ら調べられており、これらの結果から、魚肉タンパク質の温度安定性は、魚類の棲息水温と強く相関すること、また、固有の安定度は、魚類にとって先天的な性質であることなどが明らかにされている。

一方、加熱に伴う魚肉タンパク質の変性抑制物質の影響に関する研究については、糖類では、アクトミオシン(2, 3)、ミオシン(12)及び筋原繊維(13-

本報告で用いたアミノ酸は、次の略号を使用する：Na-Asp, Sodium L-Asparaginate; Na-Glu, Sodium L-Glutamate; Asp (NH₂), L-Asparagine; Glu (NH₂), L-Glutamine; Orn, L-Ornithine Hydrochloride; Lys, L-Lysine Hydrochloride; Arg, L-Arginine Hydrochloride; Cit, L-Citrulline; His, L-Histidine; Gly, Glycine; Ala, L- α -Alanine; Ser, L-Serine; Thr, L-Threonine; Val, L-Valine; Leu, L-Leucine; Ileu, L-Isoleucine; Phe, L-Phenyl alanine; Tyr, L-Tyrosine; Trp, L-Tryptophan; Pro, L-Proline; Hypro, L-Hydroxyproline; Cys, L-Cysteine; Met, L-Methionine.

15), アミノ酸類では筋原繊維 (14-16), 有機酸類では筋原繊維 (15) を用いて, Ca-ATPase 活性を指標として行われている。それらの結果から, 変性抑制物質の効果の違い並びに共同効果が明らかにされ, 近年, 変性抑制効果を定量的に表示することが提唱されている。また, これらの変性抑制機構は, 変性抑制物質が, 魚肉タンパク質を懸濁あるいは溶解している溶媒 (水) の性質, 状態を変化させ, その結果として, 魚肉タンパク質の変性度合に影響を及ぼすことに原因していることが推察されている。上述のことは, 魚肉タンパク質と変性抑制物質との関連についての研究であり, 魚肉タンパク質の加熱変性に対する変性抑制物質の作用機構を, 水の状態の面から行った研究ではない。また, この観点からの研究は少なく, アミノ酸についての研究はみられない。

本研究では, 加熱に伴うアミノ酸 (23種) 添加魚類筋原繊維中の水の状態を, 熱分析による結合水の面から調べ, 魚類筋原繊維の品質 (Ca-ATPase 活性を指標) との関連性を検討した。

実験方法

筋原繊維の調製 筋原繊維 (以下, 本文中 Mf と略記) の調製は, 供試魚にコイ (*Carp, Cyprinus carpio*) を用い, 加藤らの方法 (17) に準じた次の方法で行った。即ち, 活魚を即殺して筋肉を採取し, 細切したのち, 5 倍容の 0.1M KCl-20mm Tris-maleate 緩衝液 (pH 7.0) で 3 回攪拌洗浄した。次に 3 倍容の同緩衝液を加え泡立式ブレンダーでホモジナイズ (10000rpm, 90秒間) を行ったのち, ナイロンネット (#16) を通過させて結締組織を除去した。次いで 20% Triton X-100 溶液を終濃度が 1% となるように加え, 30分間放置後遠心分離 (750×g, 10分間) を行った。得られた沈殿を 5 倍容の同緩衝液を加えて攪拌したのち, 遠心分離 (750×g, 10分間) を行った。この操作 (攪拌洗浄及び遠心分離) をさらに 3 回繰返した。沈殿を 5 倍容の冷蒸留水を加えて攪拌洗浄したのち遠心分離 (5000×g, 10分間) を行い, さらに過剰の水を除去する目的で遠心分離 (12000×g, 20分間) し, 得られた沈殿を Mf 試料とした。Mf の一般成分は, 水分 90.4%, 粗タンパク質 9.1%, 粗脂肪 0.1%, 粗灰分 0.4% であった。

アミノ酸の添加 Mf を乳鉢にとり, Mf に対し 0.2mol 相当量のアミノ酸 (23種) をそれぞれ添

加し, 0.01N NaOH あるいは 0.01N HCl で pH 7.0 に調整したのち, 冷却しながら 5 分間混合した。なお, アミノ酸無添加の Mf を対照とし, 同様の処理を行った。

筋原繊維の加熱並びに筋原繊維 Ca-ATPase 活性の測定 アミノ酸を添加した Mf 1g を試験管に分取し, 種々の温度の恒温槽中に保持し, 経時的に取り出し氷冷して加熱を停止した。次に, この試料を 0.1mm KCl-20mm Tris-maleate 緩衝液 (pH 7.0) 20ml に懸濁させたのち, 遠心分離 (750×g, 10分間) を行った。得られた沈殿はテフロン製の Potter 型ホモジナイザーでホモジナイズし同じ緩衝液に懸濁させた。

MfCa-ATPase 活性は, 100mm KCl, 5mm CaCl₂, 25mm Tris-maleate (pH 7.0), 1mm ATP, Mf タンパク質 0.3~0.4mg を含む溶液組成で反応 (25℃) させたのち, 終濃度が 5% となるようにトリクロル酢酸を加えて反応を停止させ, 遊離する無機リン酸量を比色定量 (18) して求めた。また, Mf タンパク質濃度は, 牛血清アルブミン (フラクション V) を標準としてビュレット法 (19) によって比色定量して求めた。なお, 用いた牛血清アルブミンの純度は Kjeldahl 法によって補正した。

筋原繊維 Ca-ATPase の変性速度恒数の算出

一定温度における Mf Ca-ATPase の失活は, 一次反応式に従うので次式によって変性速度恒数 (以下, k_D と略記) を算出した (14)。

$$k_D (S^{-1}) = (\ln C_0 - \ln C_t) \cdot 1/t$$

ここで, C_0 と C_t は加熱前後における Ca-ATPase 活性の相対値であり, t は加熱時間 (秒) である。

示差熱分析による結合水量の測定 Mf 試料 (約 10mg) を開放型アルミニウム製セルに詰めて精秤し, Al₂O₃ を熱的基準物質として, 示差走査熱量計 (理学電気製サーモフレックス低温型) を用いて転移熱量を測定した。蒸留水についても同様に行った。測定温度範囲は 15~150℃, 昇温速度は 5℃/分である。Mf 試料の転移熱量は, サーモグラムの開始点と終了点を結んで得られる面積を重量法で測定し, 標準試料インジウム (和光純薬製) を基準熱量とし, その面積との比より求めた。これより Mf 試料の結合水量を算出した。なお, 標準試料の基準熱量及び蒸留水の面積測定は測定ごとに行った。

実験結果

筋原繊維タンパク質の加熱変性に及ぼすアミノ酸

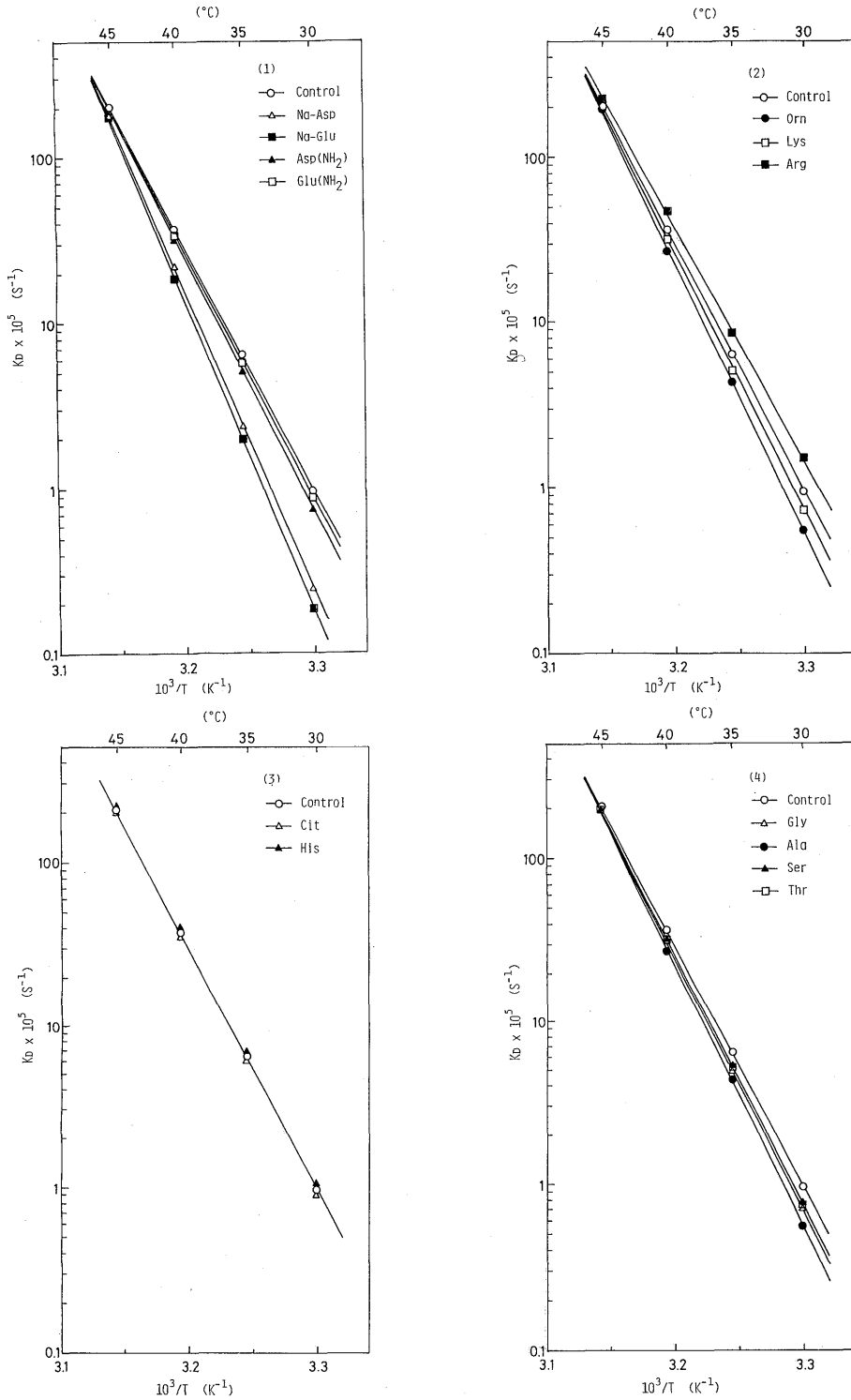
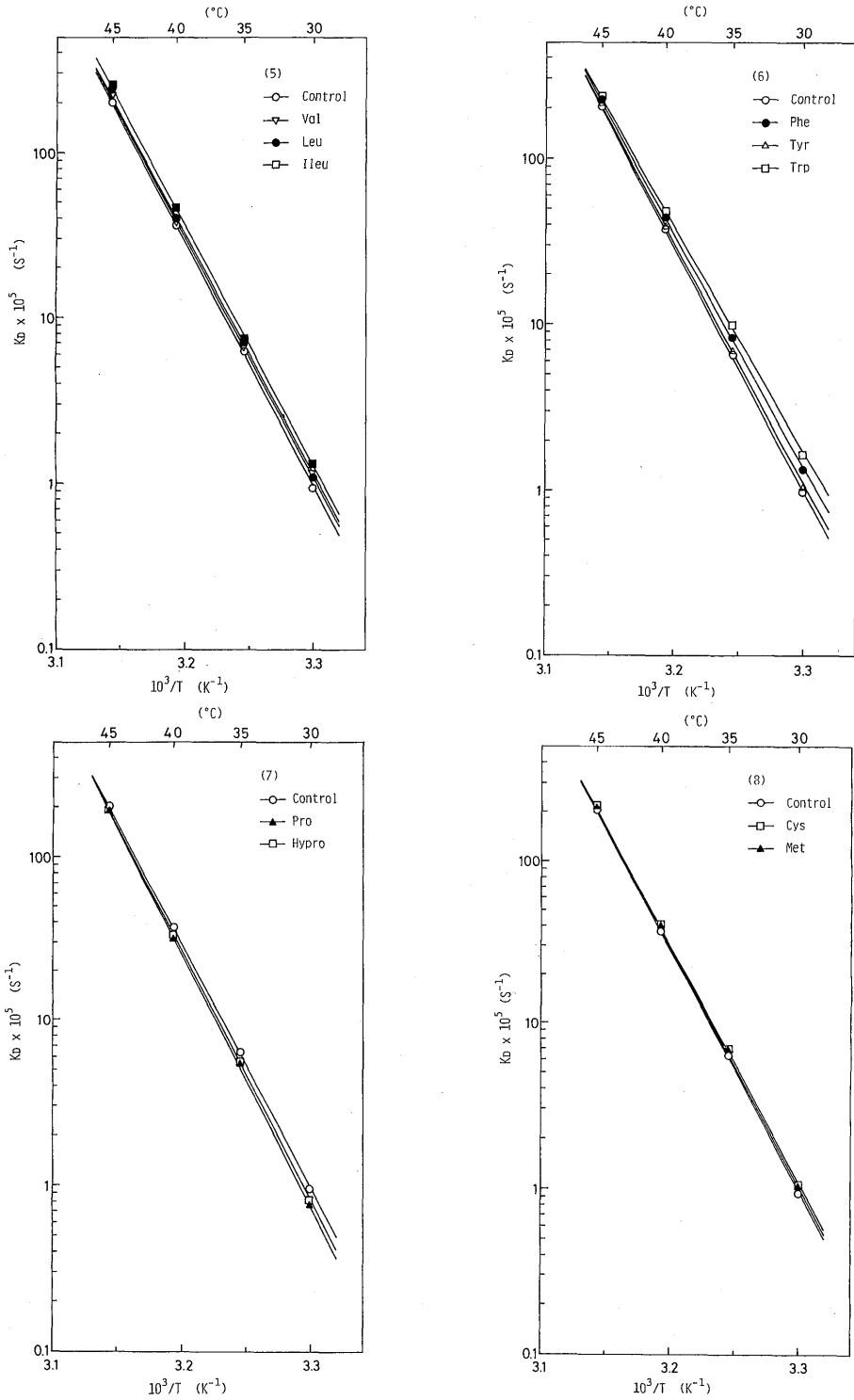


Fig. 1. ARRHENIUS plots for the inactivation rate constant (k_D) of myofibrillar Ca-ATPase in the presence of amino acids.

Carp myofibrils (state of surimi, pH 7.0) was heated at various temperature in the presence of various amino acids of 0.2 mol/kg of myofibrils (water content, 90.4%). The heat treatment was stopped by cooling in ice-water and the loss of ATPase activity during heat treatment was measured. ATPase assay



was carried out at 25°C in a reaction medium containing 100 mM KCl, 5 mM CaCl₂, 25mM Tris-maleate (pH 7.0), 1 mM ATP and 0.3–0.4 mg/ml of protein. The rate constant (k_D) for inactivation of myofibrillar Ca-ATPase was calculated using the relation, $k_D = (\ln C_0 - \ln C_t) / t$, where C_0 and C_t are the ATPase activities before and after t second of heat treatment.

の影響 コイ Mf に0.2 mol 相当量の種々のアミノ酸 (23種) をそれぞれ添加し、種々の温度で加熱して Mf Ca-ATPase の失活を経時的に測定して求めた kd を絶対値の逆数 ($1/T$) に対してプロット (Arrhenius plot) した結果を、Fig. 1 に示した。この結果を総体的にみると、対照及びアミノ酸を添加したいずれの系でも $\log kd$ に対する $1/T$ の関係は直線となった (以下、この直線を関係直線と記す) が、その関係直線の温度に対する位置はアミノ酸の種類により相違がみられた。即ち、酸性アミノ酸添加系 (Fig. 1-(1)) の関係直線はいずれも対照より高温側 (安定な側) に位置しており、明らかに温度安定性が高かった。中でも Na-Asp 系や Na-Glu 系の関係直線は Asp(NH₂) 系や Glu(NH₂) 系に比べて高温側に大きく位置しており、温度安定性が高かった。また、Na-Asp 系と Na-Glu 系を比べると、前者の関係直線の勾配はやや緩く、しかも低温側に位置した。

塩基性アミノ酸添加系 (Fig. 1-(2), (3)) についてみると、Orn 系と Lys 系の関係直線は対照より高温側に位置し、温度安定性が高かった。なお、この両者では Orn 系の温度安定性が高かった。これに対して、Arg 系は対照より低温側 (不安定な側) に位置しており、温度安定性は低く、むしろ変性が促進される結果となった。また、Cit 系と His 系の関係直線は対照とほぼ近似した。

中性アミノ酸添加系 (Fig. 1-(4), (5), (6), (7), (8)) についてみると、Gly, Ala, Ser, Thr, Pro, Hypro の各系の関係直線は対照より高温側に位置し、温度安定性が高いことが示されたが、Val, Leu, Ileu, Phe, Trp の各系の関係直線は対照よりやや低温側へ移行しており、温度安定性が低かった。また、Tyr, Cys, Met の各系の関係直線は対照とほぼ近似した。

筋原繊維タンパク質中の結合水量に及ぼすアミノ酸の影響 コイ Mf に0.2 mol 相当量の種々のアミノ酸 (23種) をそれぞれ添加し、それらの Mf 試料を示差熱分析 (15~150℃) に供し、得られたサーモグラムの代表例を Fig. 2 に示した。ピークはすべて吸熱変化である。この結果をまず蒸留水についてみると、92℃付近に1つのピークを示すサーモグラムが得られた。対照及びアミノ酸添加系では、85~95℃にかけて大きなピーク (第1ピーク) と105~110℃にかけて小さなピーク (第2ピーク) の2つに分れた。開放型セルを使用しているため、これ

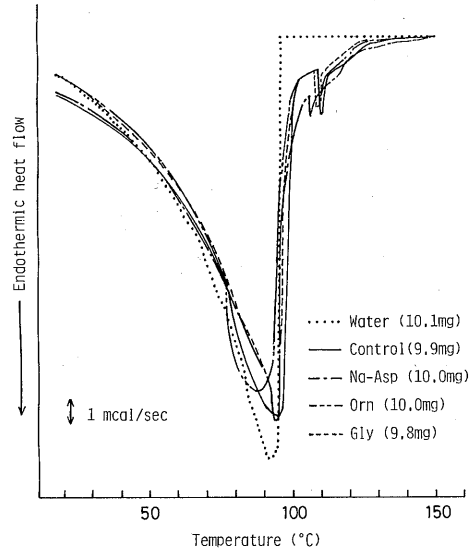


Fig. 2. Differential scanning calorimetry curves for water and carp myofibrils containing amino acid.

The added amount of amino acid was 0.2 mol to 1 kg of myofibrils (water content, 90.4%). Numerals in parentheses indicate sample weight. The heating rate was 5 °C min⁻¹, and the analytical sensitivity was 16 mcal sec⁻¹.

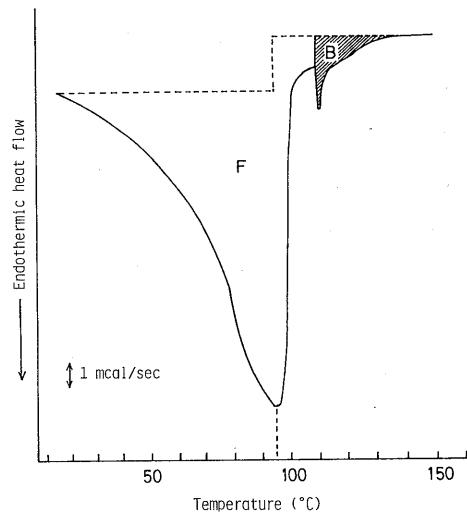


Fig. 3. Analysis of differential scanning calorimetry pattern.

F, area corresponding to the evaporation of the free water;
B, area corresponding to the evaporation of the bound water.

らのピークは主として試料中の水の蒸発による吸熱シグナルとする示差熱のサーモグラム特性 (20) から、第1ピークは Mf 中の比較的自由な水 (自由水)、第2ピークは Mf に束縛されている水 (結合水) であると判断された。そして、Fig. 3 に示したように第1ピークの頂点を示す温度を境として、それ以下の温度域では吸熱開始点 (15°C) をベースラインとし、それ以上の温度域では第2ピークが終了した点をベースラインとした。また、第2ピークの立上りを境界線として、それより低温側を自由水 (F)、高温側を結合水 (B) とした。B の面積からそれぞれの試料の結合水量を求め、その結果を Table 1 に示した。なお、この表には、前述の35°C で加熱して Mf Ca-ATPase の失活を経時的に測定して求めた k_d も併せて示した。この結果を総括すると、酸性アミノ酸添加系のうち、特に Na-Asp 系や Na-Glu 系の結合水量は、対照や他のアミノ酸を添加した系に比べて多く、逆に k_d は非常に小さかった。また、Na-Asp 系と Na-Glu 系の両者を比べると、後者の結合水量がわずかに多く、 k_d は小さかった。Asp (NH₂) 系や Glu (NH₂) 系の結合水量も対照に比べて多く、 k_d は小さかった。塩基性アミノ酸添加系のうち Orn 系や Lys 系の結合水量は対照に比べて多く、 k_d は小さかった。また、Cit 系や His 系の結合水量及び k_d は対照と近似したが、Arg 系では、結合水量は対照とほぼ同じ値を示すものの、 k_d は大きな値を示した。中性アミノ酸添加系のうち Gly, Ala, Ser, Thr, Pro, Hypro の各系の結合水量は、対照に比べて多く、逆に k_d は小さい値となった。しかし、他の中性アミノ酸 (8 種) 添加系の結合水量は対照と近似したが、そのうち Leu, Ileu, Phe, Trp の各系の k_d は対照に比べて大きな値を示した。

以上のように、Mf 中の結合水量は添加したアミノ酸の種類により相違がみられるが、概ね結合水量の多い系は、 k_d が小さいという結果を得た。このことから、Mf の加熱におけるアミノ酸の変性抑制効果は、Mf 周囲の結合水量を高めるアミノ酸ほど大きいことが認められた。

考 察

Mf の加熱変性に及ぼすアミノ酸の変性抑制効果は、酸性アミノ酸の Na-Asp や Na-Glu が顕著であり、次いで、酸性アミノ酸の Asp (NH₂)、Glu

(NH₂)、塩基性アミノ酸の Orn, Lys、中性アミノ酸の Gly, Ala, Ser, Thr, Pro, Hypro であった。一方、アミノ酸添加 Mf 系の結合水量は、概ね変性抑制効果の大きいものほど多い。即ち、変性抑制効果の大きいアミノ酸ほど Mf 周囲の水を構造化する割合が大きいことが認められた。また、Arg, Leu, Ileu, Phe, Trp を添加した Mf 系では、加熱に伴って変性が促進されているが、これらの系中の結合水量は対照とほぼ同程度を示しており、このことについては十分に説明することができない。

アミノ酸添加 Mf 系中の結合水量は、アミノ酸の化学構造と深いかかわりがあり、構造中の親水基やそれらの結合位置などが関係していることが考えられる。即ち、-COOH 基を2個有する Na-Asp や Na-Glu を添加した Mf 系の結合水量は、それを1個有するアミノ酸を添加した Mf 系より非常に高い値を示している。また、この両アミノ酸を比べると、Na-Glu を添加した Mf 系の結合水量は Na-Asp のそれよりも多く、-Na の -COOH 基への結合位置 (Na-Asp は α 位、Na-Glu は γ 位) あるいはアルキル基の炭素数が関係していると考えられる。また、 β 位あるいは γ 位の -COOH 基に -NH₂ 基が結合した Asp (NH₂) あるいは Glu (NH₂) を添加した Mf 系の結合水量は、対照に比べてわずかに高い値を示しているが、Na-Asp や Na-Glu を添加した Mf 系に比べて低い。また、-NH₂ 基を2個有する塩基性アミノ酸では、Orn や Lys を添加した Mf 系の結合水量は、対照に比べてわずかに多いが、Arg, Cit や His を添加した Mf 系の結合水量は対照とほぼ同程度であることから、-NH₂ 基の結合水量の多寡に及ぼす効果は、-NH₂ が結合している炭素鎖あるいは配位基などによるものと考えられる。なお、-COOH 基と -NH₂ 基をそれぞれ1個有する中性アミノ酸では、炭素鎖の短い、Gly, Ala, Ser を添加した Mf 系の結合水量は、ほぼ同程度の値を示し、対照に比べてわずかに多い。さらに中性アミノ酸の -OH 基の影響についてみると、Ser は Ala の β 位の炭素に結合している -H が -OH 基で置換された構造であるが、Ser を添加した Mf 系の結合水量は Ala のそれに比べて少ない。他方、Thr は Val の β 位の炭素に結合している -CH₃ 基が -OH 基で置換された構造であるが、Thr を添加した Mf 系の結合水量は Val のそれに比べて多く、-OH 基の結合水量に及ぼす効果は区々であった。また、Thr は Ser の β 位の炭素に結合している -H が -CH₃

Table 1. The amount of bound water in myofibrils and the rate constant (k_D) for inactivation of myofibrillar Ca-ATPase at 35°C in the presence of amino acids

System	Bound water (g/100 g of myofibrils)	$k_D \times 10^5$ (sec ⁻¹)
Control	2.7	6.4
Monoamino dicarboxylic acid (Acidic amino acid)		
Na-Asp	6.3	2.3
Na-Glu	7.9	2.0
Asp (NH ₂)	4.1	5.0
Glu (NH ₂)	5.4	5.7
Diamino Monocarboxylic acid (Basic amino acid)		
Orn	5.1	4.5
Lys	4.5	5.4
Arg	2.9	8.7
Cit	2.9	6.4
His	2.9	6.4
Monoamino monocarboxylic acid (Neutral amino acid)		
Gly	4.7	5.1
Ala	5.3	4.4
Ser	4.1	5.4
Thr	4.3	5.4
Val	2.6	6.8
Leu	2.7	7.2
Ileu	2.4	7.7
Phe	2.6	8.4
Tyr	2.7	6.6
Trp	2.6	10.0
Pro	4.6	5.7
Hypro	5.3	5.8
Cys	2.4	6.5
Met	2.7	6.8

The added amount of amino acid was 0.2 mol to 1 kg of myofibrils (water content, 90.4%). The amount of bound water in myofibrils was obtained from differential scanning calorimetry shown as in Fig. 2 and 3. The data shown in Fig. 1 was used to calculate the k_D values for myofibrillar Ca-ATPase at 35°C.

基で置換された構造であるが、Thr を添加した Mf 系の結合水量は Ser のそれに比べて少なく、-OH 基の寄与には同一炭素に結合する基などによって相違がみられる。中性アミノ酸の複素環の影響についてみると、Try を添加した Mf 系の結合水量は対照とほぼ同じであるが、Pro や Hypro のそれは対照に比べて多く、複素環の構造による相違がみられる。また、芳香環を含む Phe や Tyr 並びに -SH 基を含む Met や Cys を添加した Mf 系の結合水量は、対照とほぼ同じ値を示し、効果が認められていない。以上のように、結合水量はアミノ酸の構造中の親水基の種類、数あるいは炭素鎖の長短などに強く影響を受けることが認められた(21)。

Mf の加熱変性に及ぼすアミノ酸の影響については、大泉ら (12, 15) がマサバ Mf の懸濁液につい

て検討し、酸性アミノ酸及び数種の中性アミノ酸に変性抑制効果を認めており、本実験結果もそれとほぼ一致がみられる。また、Mf の加熱変性に対するこれらのアミノ酸の変性抑制機構については、これらが水に溶解することによって溶媒(水)の構造と性質が変化し、その結果として Mf の変性の度合にも影響がおよぶことによるものと推定されているが、本実験結果はこのことを実験的に支持するものであった。しかし、大泉ら (12, 15) が塩基性アミノ酸のすべてが変性を促進させることを報告しているのに対し、本実験では Orn と Lys に変性抑制効果がみられた。この原因については十分に言及することはできないが、1つの原因として、Mf の加熱状態 (Mf の懸濁液とすり身の状態) の差異によるのかもしれない。

加熱によるタンパク質の変性は、タンパク質が高温にさらされるに従い、水素結合が不安定となることにより水分子の攪乱がおこり、その結果、疎水結合がこわれること並びにタンパク質分子内の水素結合の不安定さが増大することによって、タンパク質の高次構造が変化するためと考えられている(22)。また、変性抑制物質についての検討ではないが、逢坂ら(23, 24)はラット皮肉の浮腫組織あるいは豚の異常肉(ふけ肉)中の水の状態を、高温域における熱分析(15~140℃)によって検討し、これらの組織では、正常肉に比べ結合水量が少ないことを報告している。このことは、タンパク質周囲の水、即ち、結合水がタンパク質の安定性に寄与していることをうかがわせるものである。本実験結果が示すように、結合水量と変性の程度とは関連性を有することから、Mfの加熱における変性抑制には、アミノ酸によるMf周囲の水の構造化(Water structure making)(25, 26)が重要な因子となっていることが示唆された。

本研究を遂行するに当たり種々の御教示、御討議を頂いた北海道大学水産学部故秋場稔教授、信濃晴雄教授、木村昇氏、猪上徳雄博士並びにMfCa-ATPase活性の測定について御助言を頂いた同学部新井健一助教授に謝意を表わします。

文 献

- 1) J. J. Connell (1961) : *Biochem. J.*, **80**, 503-509.
- 2) 新井健一・福田道代 (1973) : 日水誌, **39**, 625-631.
- 3) 新井健一・川村久美子・林千恵子 (1973) : 日水誌, **39**, 1077-1085.
- 4) 室塚剛志・高士令二・新井健一 (1976) : 日水誌, **42**, 57-63.
- 5) 福田裕・掛端甲一・新井健一 (1977) : 日水誌, **43**, 717-725.
- 6) 山下敬子・新井健一・西田清義 (1978) : 日水誌, **44**, 485-489.
- 7) 室塚剛志・新井健一 (1976) : 日水誌, **42**, 65-70.
- 8) 田中晴生・木村郁夫・新井健一・渡辺静雄 (1982) : 日水誌, **48**, 445-453.
- 9) 内山均・加藤登・工藤雄司・新井健一 (1978) : 日水誌, **44**, 491-497.
- 10) 橋本昭彦・新井健一 (1978) : 日水誌, **44**, 1389-1393.
- 11) 橋本昭彦・小林章良・新井健一 (1982) : 日水誌, **48**, 671-684.
- 12) 松浦基・大泉徹・新井健一 (1984) : 日水誌, **50**, 521-529.
- 13) 大泉徹・橋本浩二・小倉潤子 (1981) : 日水誌, **47**, 901-908.
- 14) 大泉徹・山村寛仁・新井健一 (1982) : 日水誌, **48**, 219-226.
- 15) 大泉徹・奈良泰信・新井健一 (1984) : 日水誌, **50**, 875-882.
- 16) 大泉徹・黒田哲弘・新井健一 (1985) : 日水誌, **51**, 1717-1722.
- 17) 加藤登・内山均・塚本志郎・新井健一 (1977) : 日水誌, **43**, 857-867.
- 18) 新井健一 (1974) : 水産生物化学・食品学実験書(斎藤恒行・内山均・梅本滋・河端俊治編), 恒星社厚生閣, 東京, pp. 189-202.
- 19) A. G. Gornall, C. T. Bardwill, and M. M. David (1949) : *J. Biol. Chem.*, **177**, 751-766.
- 20) 中野広・秋場稔・安井勉 (1979) : 日食工誌, **26**, 514-522.
- 21) 野口敏 (1971) : ニューフードインダストリー, **13**-(12), 56-60.
- 22) J. F. Brandts (1968) : *Thermolobiology* (ed. H. D. Anthony), Academic Press, New York, pp. 25-72.
- 23) 逢坂昭 (1981) : 理学電気ジャーナル, **12**, 14-20.
- 24) 逢坂昭・上平恒 (1982) : 食の科学, No. 64, 6-13.
- 25) K. Gekko (1981) : *J. Biochem.*, **90**, 1643-1652.
- 26) K. Gekko and S. Koga (1983) : *J. Biochem.*, **94**, 199-205.