

養殖マダイの氷蔵中における普通筋中 α -アクチニンの限定分解

橋 勝康,^{1*} 鈴木 秀一,² 八木 基明,¹
三嶋 敏雄,¹ 原 研治,³ 槌本 六良¹

(2000年9月4日受付, 2001年1月24日受付)

¹長崎大学大学院海洋生産科学研究科水産栄養学研究室,

²長崎大学大学院水産学研究科水産栄養学研究室,

³長崎大学大学院海洋生産科学研究科海洋生物化学研究室

Limited Degradation of α -actinin in the Ordinary Muscle of Cultured Red Sea Bream during Storage in Ice

Katsuyasu Tachibana,^{1*} Hidekazu Suzuki,² Motoaki Yagi,¹
Tosio Mishima,¹ Kenji Hara,³ Mutsuyosi Tsuchimoto¹

¹Laboratory of Fishery Nutritional Science, Graduate School of Marine Science and Engineering, Nagasaki University, Nagasaki 852-8521, ²Laboratory of Fishery Nutritional Science, Graduate School of Fisheries, Nagasaki University, Nagasaki 852-8521, ³Laboratory of Marine Biochemistry, Graduate School of Marine Science and Engineering, Nagasaki University, Nagasaki 852-8521, Japan

Anti- α -actinin IgG was prepared from rat serum immunized with purified α -actinin in the ordinary muscle of red sea bream. Anti- α -actinin IgG showed immune reactivity against not only α -actinin in ordinary muscle but also papain-digests of the α -actinin. According to immunoelectron microscopic method, α -actinin was detected on Z line of ordinary muscle cells and non-specific reactions were not detected on another organelles. The changes of α -actinin in the ordinary muscle of cultured red sea bream during storage in ice were examined by SDS-PAGE followed by its immunoblotting. It was found that the limited digestion of α -actinin in ordinary muscle of cultured red sea bream started on day one in ice, then, native α -actinin was not detected on day 5 and 7. These results suggested that the weakening of Z-disks in ordinary muscle was caused by the disappearance of α -actinin and resulted in the softness of the flesh texture of cultured red sea bream.

キーワード： α -アクチニン, 養殖マダイ, イムノブロッティング, SDS-PAGE, 免疫電子顕微鏡, Z線, 筋原線維

魚肉の保存中における軟化は, 筋原線維構成タンパク質の分解^{1,2)}や構造タンパク質のコラーゲンの分解³⁾に起因する変化であり, 魚種による違いは周知のことながら同一魚種でも養殖と天然によって違いがある。⁴⁾ この肉質軟化の原因には魚肉自身の自己消化酵素の多寡⁵⁻⁷⁾やミオシン, アクチン等の構造タンパク質, トロポニンやトロポミオシンなどの調節タンパク質, コラーゲンタンパク質の質や量の違い^{8,9)}が関与するとされている。このような中, 著者らは電子顕微鏡を用いた研究でマダイ

の肉質軟化には筋原線維のZ線の崩壊が大きく影響していると報告した。¹⁰⁾ このZ線を構成する主なタンパク質は α -アクチニンであり, アクチンフィラメントをZ線に連結する役割を担うとされている。^{11,12)} 従って本タンパク質の保存中における筋肉内での分解の様相を明らかにすることは魚肉の軟化機構を解明する上で極めて意義深いと考えられる。しかし, α -アクチニンの保存中における変化を種々雑多なタンパク質が存在する筋肉中で解析することはこれまでの手法では極めて困難であ

* Tel : +81-95-847-1111, E-mail : orange@net.nagasaki-u.ac.jp

る。本研究ではマダイ α -アクチニンの特異的抗体を作成し、それを用いて養殖マダイ保存中における α -アクチニン分解の様相を SDS-PAGE とそのイムノブロッティングで調べた。

試料と方法

マダイ α -アクチニンの精製 α -アクチニンの精製は即殺養殖マダイ (*Pagrus major*) 普通筋から、大橋らの方法¹³⁾に準じて DEAE-Sephacel 陰イオン交換樹脂を用い粗精製した。粗精製した α -アクチニンは HPLC ゲルろ過 (Protein Pak 300, 0.78×60 cm, Waters) に供し精製標品とした。

α -アクチニン特異抗体の作成 α -アクチニン精製標品を抗原とし、ラット (Wister 系, 雄, 4週令) に Adjuvant Complete freund (DIFCO 社) と共に毎週 1 回, 計 4 回皮内免疫した。最終免疫後 1 週目に全採血し, 抗血清を得た。得られた抗血清を Affigel Protein A (MAPS II, BIO-RAD) カラムに供し IgG 画分を精製後, α -アクチニン抗原カラムに供し, α -アクチニン抗体とした。

α -アクチニンのパパイソ分解 マダイ筋肉の保存中に α -アクチニンは自己消化酵素等の作用を受けて分解されると考えられる。そこで本特異抗体が α -アクチニンの分解産物と反応するか否かについて検討した。パパイソで消化した精製 α -アクチニンを SDS-PAGE¹⁴⁾ に供し, 各分解タンパク質と α -アクチニン抗体との反応性をイムノブロッティング法¹⁵⁾ で調べた。なお α -アクチニンのパパイソ分解は 0.45 mL の α -アクチニン溶液 (2.5 mg/mL α -アクチニン, 10 mM EDTA, 10 mM システイン, 0.2 M Tris-HCl buffer, pH 7.5) に, 0.05 mL のパパイソ (0.1 mg/mL, Sigma Chemical, Type III) を加えて 37°C で行った。反応は E-64 (Peptide Institute Inc.) を終濃度 10^{-5} M となるように添加して停止した。

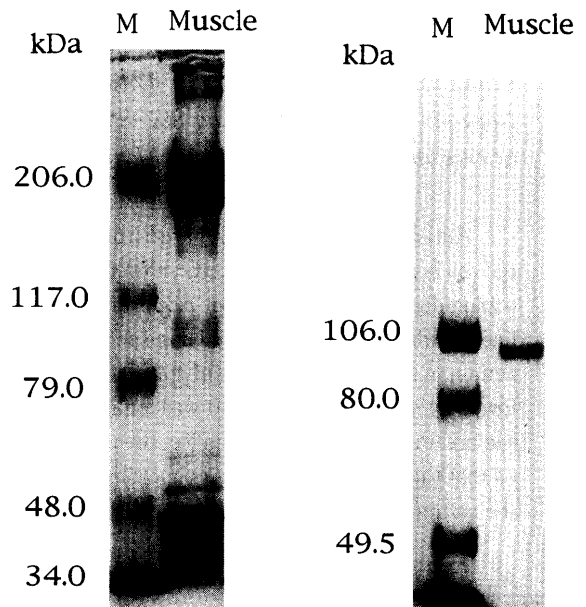
電子顕微鏡観察 普通電子顕微鏡観察は即殺養殖マダイを用い既報と同様にして行った。¹⁰⁾ 免疫電子顕微鏡観察は安田の方法¹⁶⁾ に準じて行った。すなわち, 即殺養殖マダイ普通筋を氷冷下で 2% パラホルムアルデヒド固定, 洗浄の後先の α -アクチニン抗体と室温で 2 時間反応させた。続いてペルオキシダーゼ標識抗ラット IgG ヤギ IgG と 1 時間反応後, 2% グルタルアルデヒドで 1 時間固定した。この試料を 0.02% ジアミノベンチジン, 0.005% H₂O₂, 0.05 M Tris-HCl buffer, pH 7.6 と 4 分間反応させ, 1% OsO₄ で 1 時間固定した。以上の試料を定法に従って, 上昇アルコールで脱水, エポキシ包埋, 薄切を行い, 透過電子顕微鏡 (日本電子社製 JEM-100S) を用い, 加速電圧 80 kV で観察した。

試料魚の氷蔵と採肉 試料魚には養殖マダイ 2 年魚

の 5 魚体を用い, MS-222 麻酔下で後脳部を切断後失血死させ, ポリエチレン袋に入れ碎氷水中で保存した。採肉は背部普通筋について即殺直後と氷蔵 1, 3, 5, 7 日の 5 回行った。

結 果

α -アクチニン抗体の特異性の検討 α -アクチニン抗体の特異性の検定は SDS-PAGE を用いたイムノブロッティングと免疫電子顕微鏡観察によった。イムノブロッティングによれば, 本抗体は精製 α -アクチニンに対して反応すると共に, マダイ普通筋中 α -アクチニンにも特異的に反応するが, α -アクチニン以外のタンパク質には反応を示さないことが明らかとなった (Fig. 1)。免疫電子顕微鏡観察によれば, 本抗体は普通電子顕微鏡観察で認められた Z 線のジグザク構造に沿って若干びまん性ではあるが, 本酵素抗体法の最終産物であるオス



SDS-PAGE Immunoblotting

Fig. 1. SDS-PAGE of α -actinin and ordinary muscle from cultured red sea bream and immunoblotting developed with anti- α -actinin IgG. α -Actinin and ordinary muscle from cultured red sea bream were solubilized in the SDS-urea solution and applied on SDS-PAGE using 7.5% polyacrylamide gel. Then, proteins on the polyacrylamide gel were transferred to nitrocellulose membrane and detected with anti- α -actinin IgG. Standard proteins for SDS-PAGE (M): 206.0 kDa, myosin; 117.0 kDa, β -galactosidase; 79.0 kDa, bovine serum albumin; 48.0 kDa, ovalbumin; 34.0 kDa, carbonicanhydrase. Standard proteins for immunoblotting: 106.0 kDa, phosphorylase B; 80.0 kDa, bovine serum albumin; 49.5 kDa, ovalbumin.

ミウムブラックによる高電子密度の反応生成物を生じさせることが明らかとなった (Fig. 2)。また、図示しなかったが本抗体はミトコンドリア、核等の筋肉のZ線

以外の細胞内小器官に対する非特異的反応性を示さなかった。

α -アクチニン特異抗体の α -アクチニン分解産物に対

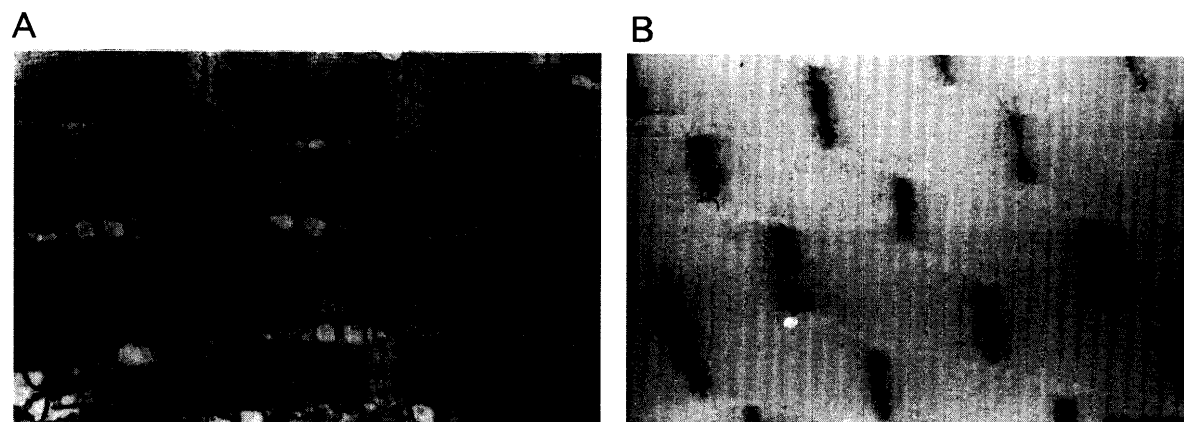


Fig. 2. Electron micrograph (A) and immunoelectron micrograph (B) of dorsal ordinary muscle of cultured red sea bream just after killing. (A) The ordinary muscle was prefixed with 2% glutaraldehyde and postfixed with 1% osmium tetroxide. The fixed muscle was dehydrated and embedded in epoxy resin. The longitudinal sections of the specimen were cut by ultramicrotome and the sections were doubly stained with uranyl acetate and lead citrate. The Z line had a zigzag structure. (B) The ordinary muscle was fixed with 2% paraformaldehyde and incubated with rat anti- α -actinin IgG and peroxidase conjugated goat anti-rat IgG. Then, the muscle sample was fixed with 2% glutaraldehyde and postfixed with 1% osmium tetroxide. The fixed muscle was dehydrated and embedded in epoxy resin. The longitudinal sections of the specimen were cut by ultra microtome. An antigenic activity of α -actinin was clearly on the Z line. Z: Z line. Scale bars represent 1 μ m length.

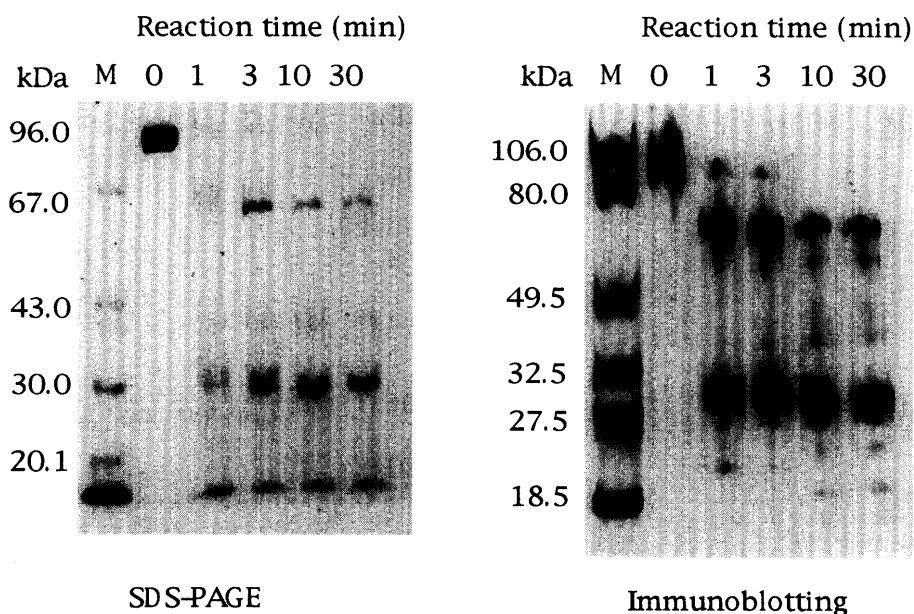


Fig. 3. SDS-PAGE of papain-digested α -actinin and its immunoblotting developed with anti- α -actinin IgG. α -Actinin (2.5 mg/mL) was incubated with papain (0.005 mg/mL) in the medium containing 10 mM EDTA, 10 mM cysteine, 0.2 M Tris-HCl buffer, pH 7.5 at 37°C. The reaction was terminated by adding E-64 (10^{-5} M, final concentration). Digested α -actinin was applied on SDS-PAGE using 7.5–12.5% gradient polyacrylamide gel. Digested α -actinin on the polyacrylamide gel was transferred to nitrocellulose membrane and developed with anti- α -actinin IgG. Standard proteins for SDS-PAGE: 96.0 kDa, phosphorylase B; 67.0 kDa, bovine serum albumin; 43.0 kDa, ovalbumin; 30.0 kDa, carbonicanhydrase; 20.1 kDa, soybean trypsin inhibitor. Standard proteins for immunoblotting: 106.0 kDa, phosphorylase B; 80.0 kDa, bovine serum albumin; 49.5 kDa, ovalbumin; 32.5 kDa, carbonicanhydrase; 27.5 kDa, soybean trypsin inhibitor, 18.5 kDa, lysozyme.

する反応性 SDS-PAGEの結果では, 反応前の α -アクチニンは分子量約100 kDa付近に単一のバンドとして認められたが, パパインによる消化時間の延長に伴って急速に分解され, 1分消化では30 kDa-67 kDaの低分子の分解産物が生成された。10分以上の消化では67 kDa以下の分解産物が大半を占め, 100 kDa付近にはほとんどタンパク質バンドは検出されなかった。イムノブロットングの結果では, 先のSDS-PAGEの α -アクチニン分解産物の変化に呼応した位置に抗原陽性反応が検出され, 10分以上の反応では100 kDa付近に抗原陽性反応を認めなくなった (Fig. 3)。

氷蔵中における養殖マダイ普通筋中 α -アクチニンの分解 氷蔵中における養殖マダイ普通筋のSDS-PAGEパターンの変化を調べた結果, 氷蔵5日目以降で43 kDa~67 kDaのタンパク質バンドの減少が認められ, それに対応して43 kDa以下のバンドの増加が認められた。しかし, α -アクチニンに相当する100 kDa付近のタンパク質バンドの変化を明瞭に観察することはできなかった。一方, イムノブロットングの結果では, 即殺直後に106 kDaのマーカより若干低分子域に検出されていた α -アクチニンのバンドは, 氷蔵1~3日目には若干低分子域に拡大して検出されるようになった。氷蔵5日目および7日目ではその検出位置が低分子側にほぼ収束した (Fig. 4)。また, 図示しなかったが, 氷蔵7

日目のSDS可溶化タンパク質を多量に泳動したものをイムノブロットングしてもFig. 4に示した検出位置以外の部位に抗原性を認めなかった。

考 察

養殖マダイ保存中における α -アクチニン分解の様相をSDS-PAGEとそのイムノブロットングで検討するため, 養殖マダイより α -アクチニンを精製し, その特異的抗体を作成した。この抗体は α -アクチニン精製標品のみならず養殖マダイ普通筋中の α -アクチニンとも特異的に反応した。さらに免疫電子顕微鏡法により本抗体は α -アクチニンが局在するとされる筋原線維Z線のみ反応性を示し, 他の細胞内小器官に対する非特異的反応性を示さなかった。さらに, 作成した α -アクチニン特異抗体を α -アクチニンのパパイン消化物と反応させたところ, 本抗体は未分解の α -アクチニンのみならずその複数の分解産物とも反応した。これらのことより, 本実験で作成した抗体はマダイ普通筋 α -アクチニンに特異的な抗体であり, α -アクチニンの分解産物をも検出可能であろうと考えられた。

そこでこの抗体を用いて氷蔵中における養殖マダイ普通筋中 α -アクチニンの変化をSDS-PAGEとイムノブロットングで調べたところ, 氷蔵1~3日目に抗原陽性部位の低分子域への拡大, 氷蔵5日目以降に低分子

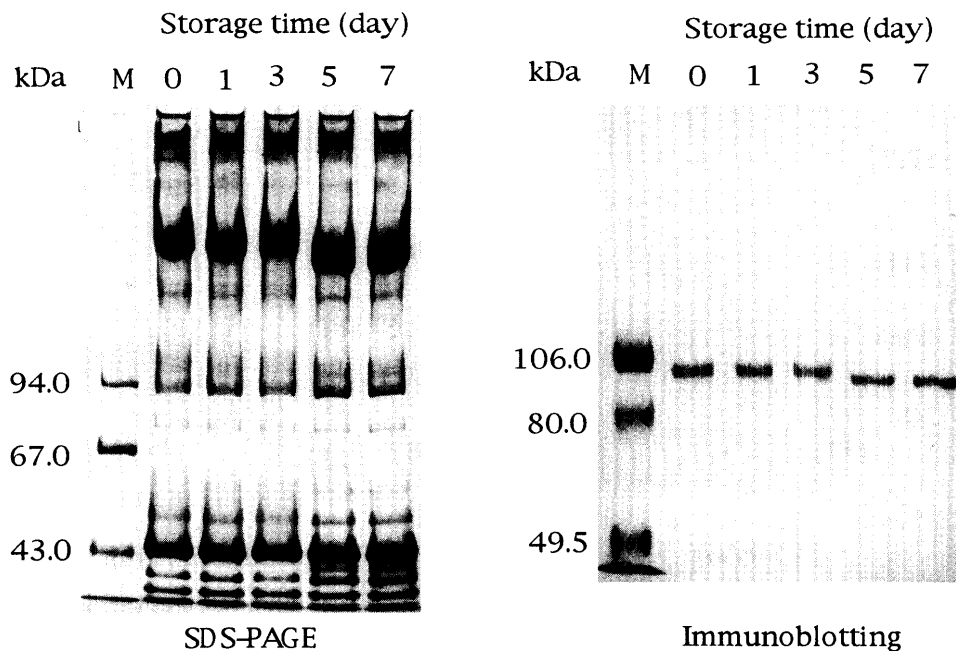


Fig. 4. SDS-PAGE of dorsal ordinary muscle of red sea bream during storage in ice and its immunoblotting developed with anti- α -actinin IgG. Each muscle sample was solubilized in the SDS-urea solution and applied on SDS-PAGE using 6-8% gradient polyacrylamide gel. Proteins on the polyacrylamide gel were transferred to nitrocellulose membrane and developed with anti- α -actinin IgG. Standard proteins for SDS-PAGE: 94.0 kDa, phosphorylase B; 67.0 kDa, bovine serum albumin; 43.0 kDa, ovalbumin. Standard proteins for immunoblotting: 106.0 kDa, phosphorylase B; 80.0 kDa, bovine serum albumin; 49.5 kDa.

域への蓄積が認められたが、他にその分解産物を検出できなかった。関らはコイを用いた研究で α -アクチニンはカルパインの作用を受けて Z 線より遊離すると報告している。^{5,6)} これらのことより、本実験における普通筋 Z 線の α -アクチニンはカルパインなどの自己消化酵素によって分子量 90 kDa~100 kDa の分子と本抗体に対する抗原エпитープを持たない低分子化合物に限定分解されたと考察された。

一般に養殖マダイは氷蔵しても肉質の軟化が極めて早く、著者らも氷蔵中の筋原線維の切れ易さの点からこのことを明らかにしてきた。Shimada らは鶏肉では死後の Ca^{2+} の遊離に伴う Z 線からのリン脂質の遊離が起こり Z 線の脆弱化の原因になると述べている。¹⁷⁾ 一方、 α -アクチニンは筋原線維上でアクチンフィラメントを Z 線につなぎ止める役割を果たしているとされている。^{11,12)} これらのことより、先に報告した氷蔵初期における筋原線維の脆弱化や電子顕微鏡的にみた Z 線の崩壊の要因として、 Ca^{2+} の遊離に伴う Z 線からのリン脂質の遊離や、本実験で認められた α -アクチニンの分解による Z 線の構造崩壊が考えられたが、そのどちらが主因になるかは明確ではなく、さらに詳細な検討が必要と考えられた。

ともあれ、養殖マダイの氷蔵初期における肉質軟化には筋原線維の Z 線脆弱化が一因となっていると考えられ、コラーゲンタンパク質の自己消化等と相まって肉質軟化の原因になると考えられた。

文 献

- 関 伸夫. 魚類筋原線維タンパク質と生鮮度. 「魚の低温貯蔵と品質評価法」(小泉千秋編) 恒星社厚生閣, 東京, 1986; 66-76.
- Davie PS, Sparksman RI. Burnt tuna: An ultrastructural study of postmortem changes in muscle of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) caught on rod and reel and southern bluefin tuna (*Tunnus maccoyii*) caught handline or longline. *J. Food Sci.* 1986; **51**: 1122-1128.
- 豊原治彦, 安藤正史. 「水産学シリーズ 86 魚類の死後硬直」(山中英明編) 恒星社厚生閣, 東京, 1991; 42-49.
- 橋 勝康, 土居達也, 植本六良, 三嶋敏雄, 小倉理一, 保田正人. 養殖マダイの肉質に対する運動飼育の効果. *日水誌* 1988; **54**: 677-681.
- Tsuchiya H, Seki N. Action of calpain on α -actinin within and isolated from carp myofibrils. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1991; **57**: 1133-1139.
- 種田貴司, 渡辺孝博, 関 伸夫. コイ筋肉中のカルパインの精製と一般的性質. *日水誌* 1983; **49**: 219-228.
- Tsuchiya H, Kita S, Seki N. Postmortem changes in α -actinin and connectin in carp and rainbow trout muscles. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1992; **58**: 793-798.
- Sato K, Yoshinaka R, Sato M, Shimizu Y. Collagen content in the muscle of fishes in association with their swimming movement and meat texture. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1986; **52**: 1595-1600.
- 畑江敬子, 飛松聡子, 竹山まゆみ, 松本重一郎. 魚肉の物性とその魚種差に対する結合組織の寄与. *日水誌* 1986; **52**: 2001-2007.
- 橋 勝康, 三嶋敏雄, 植本六良. 養殖マダイと天然マダイの氷蔵中における普通筋の微細構造と細胞化学的 Mg^{2+} -ATPase 活性の変化. *日水誌* 1993; **59**: 721-727.
- 関 伸夫. 「水産学シリーズ 76 水産動物タンパク質の比較生化学」(新井健一編) 恒星社厚生閣, 東京, 1989; 73-80.
- 関 伸夫. 「水産学シリーズ 86 魚類の死後硬直」(山中英明編) 恒星社厚生閣, 東京, 1991; 31-41.
- Ohashi K, Maruyama K. A new structural protein located in the Z lines of chicken skeletal muscle. *J. Biochem.* 1979; **85**: 1103-1105.
- Weber K, Osborn M. The reliability of molecular weight determination by dodecyl sulfate-polyacrylamid gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 1969; **244**: 4406-4412.
- Hawkes R, Niday R, Gordon J. A dot-immunobinding assay for monoclonal and other antibodies. *Anal. Biochem.* 1982; **199**: 142-147.
- 安田健次郎. 「新酵素組織化学」(武田忠男, 小川和朗編) 朝倉書店, 1980; 485-519.
- Shimada K, Ahn DH, Takahashi K. Liberation of phospholipids from Z-disks of chicken skeletal muscle myofibrils by 0.1 mM calcium ions: Weakening mechanism for Z-disks during post-mortem aging of meat. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1998; **62**: 919-926.