

キレート化合物存在下におけるミオシン変性速度の解析

桑原浩一, 村田昌一¹, 今野久仁彦²

Estimation of myosin denaturation rate when the medium
includes chelate reagent

Koichi Kuwahara, Masakazu Murata¹ and Kunihiko Konno²

It is required to estimate the myosin denaturation rate when myofibrils were heated in the presence of sodium citrate that chelates calcium ion leading to a loss of activation of Ca^{2+} -ATPase. It was confirmed that addition of sodium citrate to Ca^{2+} -ATPase assay medium suppressed the activity due to its chelating ability of calcium ion although the effect was inferior to EDTA, apparent Ca^{2+} -ATPase activity measured with 0.5 M KCl was higher than that with 0.5 M NaCl indicating that addition of sodium citrate activated K^{+} -ATPase just like EDTA does. Therefore, KCl was replaced by NaCl in the Ca^{2+} -ATPase reaction medium when chelate reagent was involved in the system. Calcium ion concentration should be increased to 15 mM from 5 mM to achieve a sufficiently high activity (about 80 %). The inactivation rates measured in the modified assay medium gave the same value as estimated in the original medium. We established the Ca^{2+} -ATPase medium to estimate the thermal inactivation rate of myosin when the treated protein solution contains chelating reagent such as sodium citrate.

魚肉を食品として利用するために、重要な役割を果たすのが筋原線維タンパク質(Mf)、特にミオシンである。¹⁻⁶⁾これまで、ミオシンの変性を防止するため、数多くの試みや提案がなされている。スケトウダラ筋肉はミオシンが非常に不安定なため、長期間の保存は不可能であったが、それを克服したのがソルビトールやショ糖の添加^{7,8)}である。糖類の添加により、スケトウダラ筋肉をすり身として長期間凍結保存することが可能となり、新たな食品素材であるスケトウダラ「冷凍すり身」が開発され、「冷凍すり身」は国際的な水産製品となっている。その後も、ミオシンの変性を効果的に抑制する化合物の探索や開発⁹⁻¹³⁾がなされてい

る。大泉ら¹⁴⁾による各種化合物を用いた定量的な解析から、変性抑制の程度は化合物の濃度に依存することが明らかにされた。そして、化合物による変性抑制作用の大きさはそれぞれ固有であるから、使用する化合物の種類と濃度がわかれば、期待できる変性抑制作用を算出できることが報告された。その後、硫酸ナトリウム(Na)、硫酸カリウムおよび硫酸アンモニウムなどの無機塩も、ミオシンの変性を抑制することが報告された。¹⁵⁻¹⁷⁾いずれの場合も、Mf中ミオシンの変性指標として、定量的な解析が容易な Ca^{2+} -ATPase活性の失活が利用されている。この指標は、すり身中のミオシン変性の程度がすり身の品質を反映するという考

1 独立行政法人水産総合研究センター中央水産研究所

2 北海道大学水産科学研究院

え方に基づき、¹⁸⁾ すり身の生化学的品質評価にも使用されている。

そこで、有機酸塩がすり身の品質に及ぼす影響を解析しようと考えたが、クエン酸 Na などの有機酸塩は、金属キレート作用を有することが一般的に知られており、 Ca^{2+} -ATPase の活性化因子としての Ca^{2+} を反応系から取り除き、活性を阻害することが考えられるため、通常用いられている評価系をそのまま適用出来ない可能性がある。そこで、本研究ではキレート作用を有する化合物として、スルメイカ外套膜筋肉の自己消化抑制作用が報告されているクエン酸 $\text{Na}^{19)}$ を主対象として、キレート作用を有する化合物存在下で処理したときのミオシン変性速度を定量的に測定する条件を設定するため、 Ca^{2+} -ATPase 活性そのものに対する影響ならびに Ca^{2+} -ATPase を用いてミオシンの変性速度への影響を詳細に検討した。

方 法

試料 生きているコイ *Cyprinus carpio* を即殺し、その背肉を用いた。

キレート能の測定 50 mM CaCl_2 , 0.1 M KCl, 5 mM Tris-HCl (pH 7.0) 溶液に様々な濃度のクエン酸 Na を添加し、遊離の Ca^{2+} 濃度を堀場製作所製イオンメーター F-55 (Ca^{2+} 電極 6583-10C) で測定した。また、キレート滴定法を用い、一定濃度の Ca^{2+} をキレートするために必要なクエン酸 Na 濃度を Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) と比較しながらキレート能を測定した。すなわち、Ca 定量法²⁰⁾ に準じて、 Ca^{2+} 濃度が 0-1.25 mM になるよう調製した CaCl_2 溶液 100 ml に対し、20 % NaOH 1 ml, 10 % KCN 3 滴, 10 % 塩酸ヒドロキシルアミン 3 滴 (いずれも和光純薬工業製) を順に加えて攪拌後、5 分間静置し、ドータイト NN 粉末 (同仁科学研究所製) 0.1 g を加えて溶解させた。これに、0.01 M EDTA, 0.1 M クエン酸 Na, あるいは、0.1 M グルコン酸 Na を滴下していき、指示薬の色が赤から青に変化するために要した容量を

求めた。この容量から、それぞれの濃度の Ca^{2+} をキレートするのに必要な各化合物の濃度を算出した。

Mf 懸濁液の調製 細切りしたコイ背肉から、加藤らの方法²¹⁾ に準じて Mf を調製した。すなわち、氷水で冷却しながら 0.1 M NaCl (または KCl), 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) 緩衝液中でポリトロンホモジナイザー (Kinematica 社製, PT10-35) を用いて、30 秒の冷却時間を間に入れながら、30 秒ずつ 4 回ホモジナイズした。その後、同緩衝液中での懸濁と遠心分離 (3,000 rpm, 5 分) を繰り返して、最終的には懸濁液を 2 層のガーゼでろ過して得られたろ液を Mf とし、所定濃度の様々な化合物を混合して Mf 懸濁液とした。

Ca^{2+} -ATPase 活性の測定 Mf の Ca^{2+} -ATPase は 0.5 M NaCl (または KCl), 15 mM (または 5 mM) CaCl_2 , 1 mM ATP, 25 mM Tris-maleate (pH 7.5) からなる反応組成液を用い、25 °C で反応させた。反応停止は過塩素酸を最終濃度 5 % になるよう加えて行い、ATP から加水分解の結果生じた無機リン酸を比色定量した。²²⁾

Ca^{2+} -ATPase の失活速度の解析 Mf 中ミオシンの熱変性は、加熱による Ca^{2+} -ATPase の失活速度から解析した。Mf 懸濁液にクエン酸 Na を添加し、42 °C で経時的に加熱することで、クエン酸 Na の有無が失活速度に及ぼす影響を検討した。加熱後、水中にて加熱を停止させ、上記の条件で Ca^{2+} -ATPase 活性を測定した。失活速度は、得られた活性の失活様式が一次反応に従うと想定し、残存活性の対数値を加熱時間に対してプロットした直線の傾きから算出した。¹⁴⁾ すなわち、得られた失活速度の対数値を添加した化合物濃度に対してプロットすると、両者の間に直線関係が得られる。その直線の傾き、言い換えれば、各化合物を 1 M 添加した場合の変性速度 (対数値) の減少率が、各化合物の有する変性抑制作用 (E-value) として広く活用されている。従って、失活速度が同じであれば、加える化合物の変性抑制作用を解析できる。

結果および考察

Ca²⁺ キレート作用の確認 CaCl₂ 溶液にクエン酸 Na を徐々に加えた場合の遊離 Ca²⁺ 濃度を Ca²⁺ 電極で測定した。クエン酸 Na 濃度の増加に従って遊離 Ca²⁺ 濃度は次第に低下し、クエン酸 Na にはキレート作用があることを確認した。なお、クエン酸 Na が 10 mM のときの遊離 Ca²⁺ 濃度から、Ca²⁺ とクエン酸 Na の結合定数は $1.94 \times 10^2 (M^{-1})$ と算出された。

次に、キレート滴定法により、クエン酸 Na のキレート作用を EDTA およびグルコン酸 Na と比較した。様々な濃度の Ca²⁺ を含む溶液をクエン酸 Na, グルコン酸 Na および EDTA 溶液で滴定し、用いた CaCl₂ 濃度に対して、キレートするために要した化合物の滴定量から算出した濃度をプロットして、Fig. 1 に示した。使用した溶液中の Ca²⁺ 濃度と滴定に用いた各種化合物の濃度との間には直線関係が得られたので、両者は定量的な反応をしていることが確認された。クエン酸 Na は、グルコン酸 Na に比べると明らかに低濃度で Ca²⁺ をキレートしたが (Fig. 1A), EDTA に比べると明らかに高濃度を必要とした (Fig. 1B)。たとえば、0.5 mM の Ca²⁺ をキレートするのに必要な EDTA 濃度は約 0.5 mM で十分であるのに対して、クエン酸 Na は 8 mM, グルコン酸 Na はさらに高濃度の 37 mM を必要とした。得られた直線の傾きから、キレート作用の大きさを EDTA と比較すると、クエン酸 Na は 1/17, グルコン酸 Na は 1/114 であった (Fig. 1C)。

KCl の影響 クエン酸 Na のキレート作用は、Ca²⁺-ATPase 活性の測定に様々な影響を与えることが予想される。まず、ATPase 活性測定のための無機リン酸の発色に対して、発色阻害があるのかを検討した。濃度既知の無機リン酸液を様々な濃度のクエン酸 Na 存在下で発色させ、吸光値への影響を調べた。その結果、Ca²⁺-ATPase 反応組成に 0.25 M 以上のクエン酸 Na が存在する場合に明らかな発色阻害が認められたが、0.1 M 以下であれば発色阻害が起こらないことを確か

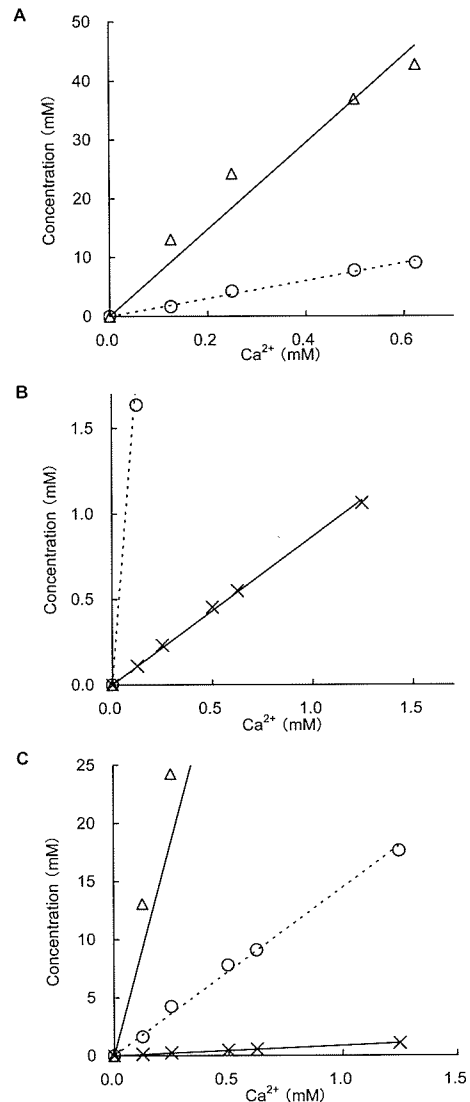


Fig. 1 Titration of calcium ion with EDTA and organic salts. Calcium ion at various concentrations were titrated with 0.01M EDTA (cross marks in B and C), 0.1 M sodium citrate (circles in A, B, and C) and 0.5 M sodium gluconate (triangles in A and C).

めた (図示せず)。Mf の加熱変性の実験では、反応液に 1/10 量の Mf 懸濁液を添加して活性測定を行っているので、用いる Mf 懸濁液中のクエン酸 Na 濃度が 1.0 M 以下であれば、発色への影響はないと判断した。次に、Ca²⁺-ATPase 活性に対する影響を検討した。前述したようにクエン酸 Na は Ca²⁺ をキレートするので、Ca²⁺-ATPase の活性化因子としての Ca²⁺ を反応系から取り除き、活性を阻害する可能性がある。また、ミオシンには 3 種のイオン (Ca²⁺, Mg²⁺, K⁺) で活性化さ

れる ATPase が認められるが、もし、反応系に高濃度 (0.5 M 程度) の KCl が含まれていれば、クエン酸 Na を添加することは EDTA を添加して K⁺-ATPase を測定するのと同じように、K⁺-ATPase の発現を誘発し、解析が非常に難しくなると予想された。そこで、0.5 M KCl あるいは NaCl を含む反応組成液に、様々な濃度のクエン酸 Na を加え、コイ Mf の Ca²⁺-ATPase (5 mM CaCl₂) を測定した。結果を Fig. 2 に示したが、KCl と NaCl との違いに関わらず、クエン酸 Na 濃度が高くなるにつれ、Ca²⁺-ATPase 活性は低下し、クエン酸 Na による阻害が認められた。しかし、Ca²⁺-ATPase の阻害程度は、NaCl を使用した方が KCl を使用した場合よりも大きかった。キレート作用による Ca²⁺ 濃度の減少のみが起きていると仮定すれば、両者は同じ変化をするはずである。KCl 存在下で見かけの Ca²⁺-ATPase の阻害が小さいのは、Ca²⁺ のキレートに伴い、次第に K⁺-ATPase 活性が発現するように変わったためと推定された。この結果から、反応組成に Mf を溶解するために加える中性塩は KCl ではなく NaCl を使用すべきであると判断した。

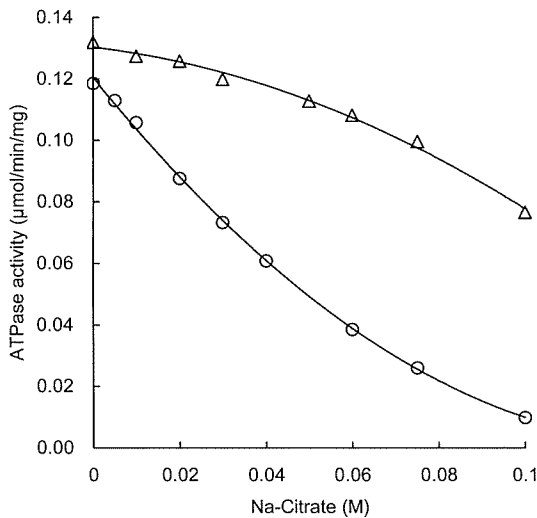


Fig. 2 Effect of Na-citrate on the Ca-ATPase activity. Ca-ATPase of carp myofibril was assayed at 25 °C in a medium containing 5 mM CaCl₂, 1 mM ATP, 25 mM Tris-maleate (pH 7.5) and 0.5 M either NaCl (circles) or KCl (triangles) together with various concentrations of Na-citrate.

EDTA およびクエン酸 Na が Ca²⁺-ATPase 活性に及ぼす影響

クエン酸 Na が Ca²⁺-ATPase (0.5 M NaCl, 5 mM CaCl₂) に及ぼす影響を EDTA と比較し、結果を Fig. 3 に示した。Ca²⁺-ATPase 活性は、反応液中の CaCl₂ 濃度と同程度の 5 mM EDTA 添加でほぼ喪失した。一方、クエン酸 Na の場合はほぼ完全に阻害するために、100 mM 程度まで濃度を上昇させる必要があった。この結果は、クエン酸 Na のキレート作用が EDTA に比べてかなり低いという Fig. 1 の結果を支持するものであった。

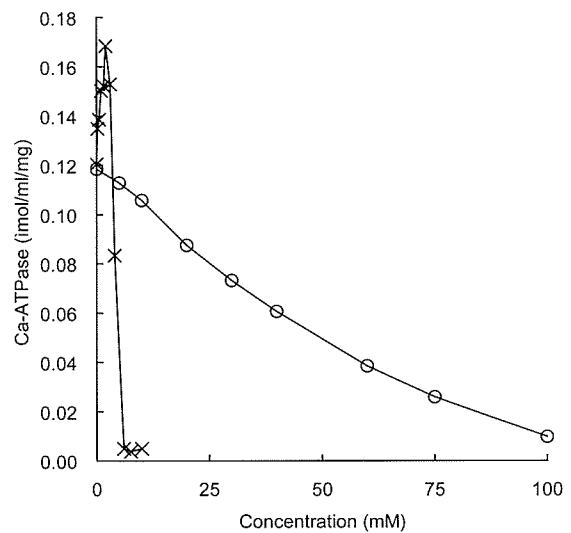


Fig. 3 Comparison of inhibitory effect of Na-citrate and EDTA on Ca-ATPase activity. The assay medium contained 0.5 M NaCl, 5 mM CaCl₂, 1 mM ATP, 25 mM Tris-maleate (pH 7.5) together with either EDTA (cross marks) or Na-citrate (circles).

クエン酸 Na 存在下での Ca²⁺-ATPase 活性の測定

クエン酸 Na による Ca²⁺ キレート作用を Ca²⁺-ATPase の Ca²⁺ 濃度要求性への影響から、定量的に解析した。すなわち、Ca²⁺-ATPase 活性は反応組成に含まれる遊離 Ca²⁺ 濃度によって決定されると想定し、クエン酸 Na が存在すると、Ca²⁺-ATPase の活性化に必要な Ca²⁺ 濃度がどのように変化するか解析した。そのため、0 M, 0.05 M, あるいは、0.1 M のクエン酸 Na 存在下に CaCl₂ 濃度を変えて Ca²⁺-ATPase 活性を測定し、結果を Fig. 4 に示した。クエン酸 Na により Ca²⁺ がキ

レートされれば, 同じ CaCl_2 濃度であっても, 遊離の Ca^{2+} 濃度が低下するため, 活性の低下が起こるはずである。また, 高濃度の CaCl_2 を加えれば, それが軽減されると考えられる。すなわち, クエン酸 Na は Ca^{2+} に対して拮抗的に活性を阻害すると推定される。

Fig. 4A に示したように, クエン酸 Na 無添加では約 6 mM の CaCl_2 濃度で最大活性化が起こり, 50% の活性化には約 0.6 mM で十分であった。ところが, 0.05 M のクエン酸 Na が存在すると, 10 mM まで CaCl_2 濃度を上昇させても, 最大活性化は得られなかった。最大活性が同じだと仮定して 50% 活性化に必要な CaCl_2 濃度を求めると, 4 mM であった。また, クエン酸 Na が 0.1 M になると, 0.05 M の場合よりも活性化の曲線は緩やかになり, 活性化にはさらに高濃度の CaCl_2 を必要とした。この Ca^{2+} による活性化曲線の変化は, Ca^{2+} をミオシンとクエン酸が競争して奪い合っている典型的な拮抗阻害の図形と考えられる。

そこで, 0 M および 0.05 M クエン酸 Na 存在下での CaCl_2 濃度および Ca^{2+} -ATPase 活性値の逆数をプロットして, 最大活性化および 50% 最大活性化に必要な CaCl_2 濃度を算出し, 結果を Fig. 4B に示した。Y 軸との交点はほぼ同じであるため, CaCl_2 を無限大にしたとき得られる最大活性値は同じであった。そして, X 軸との交点から 1/2 最大活性化のために必要な CaCl_2 濃度を求めると, クエン酸 Na 非存在下で 0.9 mM, 0.05 M 存在下で 6 mM と計算され, Fig. 4A で求めた結果とほぼ同じ値が得られた。

さらに, 前述したクエン酸 Na と Ca^{2+} との結合定数 (1.94×10^2) を用いて遊離 Ca^{2+} 濃度を求め, Fig. 4A のクエン酸 Na 無添加および 0.05 M 添加の場合の活性値を添加 CaCl_2 濃度の代わりに遊離 Ca^{2+} 濃度の関数としてプロットすると, 2つの曲線は一本とみなすことができた (Fig. 4C)。これらの結果から, クエン酸 Na が Ca^{2+} とキレート化合物を形成し, 結果として活性化に使用できる Ca^{2+} 濃度が低下したことが裏付けられた。従って, クエン酸 Na 存在下において Ca^{2+} -ATPase を測定す

る場合は, 活性化のために CaCl_2 濃度が不足することが明らかであり, 添加 CaCl_2 濃度を 5 mM から 15 mM に上げることにした。それでも Fig. 4 の結果から共存するクエン酸 Na 濃度が変われば最大活性化が得られないことが予想された。しかし, 本研究で Ca^{2+} -ATPase 活性を測定する目的は, ミオシンの変性速度を求めることにあるので, 加熱に伴う相対的な失活が追跡でき, それがクエン酸 Na により影響を受けなければ問題は無い。

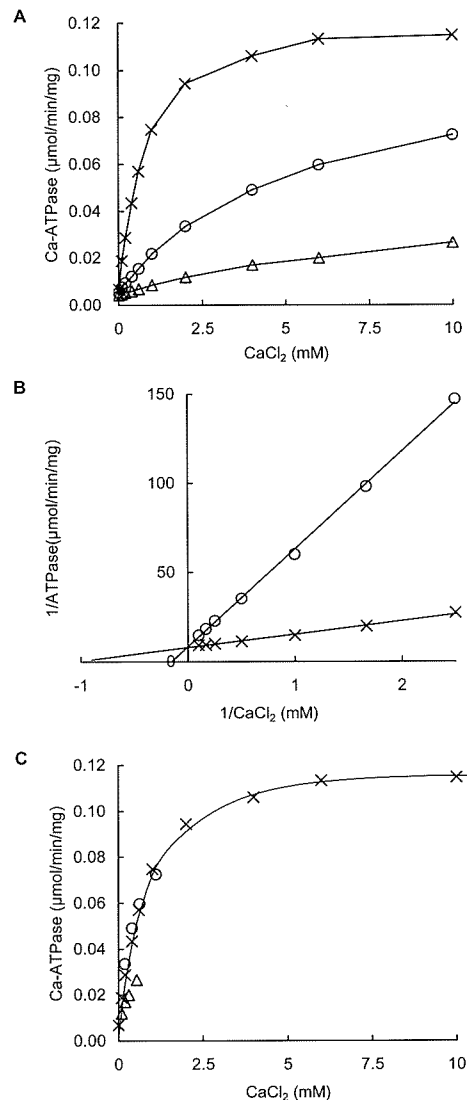


Fig. 4 Effect of Na-citrate on the Ca ion concentration dependent activation of Ca-ATPase. (A) Ca-ATPase activity was assayed under the same conditions as in Fig. 3 except that CaCl_2 concentration was varied. The medium also contained no (cross marks), 50 mM (circles) or 100 mM (triangles) Na-citrate. (B) The double-reciprocal plot of the results in (A). (C) Free Ca ion concentration requirement of Ca-ATPase activity by assuming a binding constant of $1.94 \times 10^2 \text{ (M}^{-1}\text{)}$ between Ca ion and Na-citrate.

Ca²⁺-ATPase 活性の失活速度 ATPase 活性測定のための反応混液にクエン酸 Na が含まれている場合の失活速度を解析した。まず、クエン酸 Na 無添加のコイ Mf を 42°C で経時的に加熱した。その Ca²⁺-ATPase の失活を解析するための反応組成液に 0.05 M クエン酸 Na を加え、それによって多少の活性阻害が起きてても、失活速度が影響を受けないかどうか無添加の場合と比較した (Fig. 5)。クエン酸 Na (0.05 M) が存在すると、Ca²⁺-ATPase 活性そのものは阻害を受け、82 % まで活性は低下したが、得られた傾き (失活速度) は同じであったため、速度そのものへの影響はないと判断した。また、同じ実験を反応組成液に NaCl の代わりに KCl を使用すると、クエン酸 Na 存在下では見かけの失活速度が小さくなった。アクチンと結合したミオシンの K⁺-ATPase は、活性が阻害されることが報告されているので、²³⁾ この結果は、加熱することによりアクチンによる K⁺-ATPase 阻害が小さくなり、結果として K⁺-ATPase 由来の活性が次第に現れてきたものと考えられた。そのため、この理由からも、KCl は使用できないと判断した。

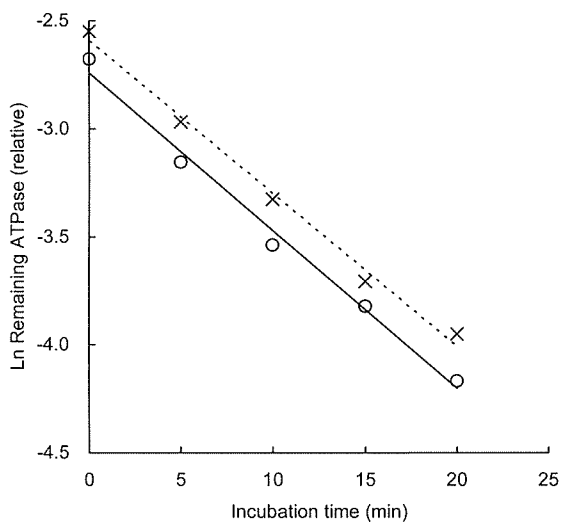


Fig. 5 Effect of Na-citrate in the assay medium on the thermal inactivation of carp myofibrils. Carp myofibrils were heated at 42 °C, and inactivation of their Ca-ATPase was assayed in a medium containing 15 mM CaCl₂, 0.5 M NaCl, 1 mM ATP together with 0.05 M Nacitrate (circles) or without it (cross marks).

比較的高い活性値が得られ、アクチンの影響を受けない Ca²⁺-ATPase 活性は、比較的解析が容易であるため、ミオシンの変性指標として多用されている。本試験の結果から、0.5 M NaCl, 15 mM CaCl₂ を ATPase 測定の反応組成液とすることによって、Ca²⁺ をキレートするクエン酸 Na が、ミオシンの変性に及ぼす影響を Ca²⁺-ATPase を用いて解析出来ることが明らかとなった。また、本手法はクエン酸 Na に限らずキレート作用を有する様々な化合物に应用可能と予想されるが、新規な化合物で試験を行う場合には、充分な予備試験が必要であることが示された。今後、本手法を用いて、キレート作用を有する食品添加物が、魚肉ミオシンの熱変性に及ぼす影響を解析する。

文 献

- 1) Samejima K, Hashimoto Y, Yasui T, Fukazawa T. Heat gelling properties of myosin, actin, actomyosin, and myosin subunits in a saline model system. *J. Food Sci.*, **34**: 242-245 (1969) .
- 2) Samejima K, Ishioroshi M, Yasui T. Relative roles of the head and tail portions of the molecule in heat-induced gelation of myosin. *J. Food Sci.*, **46**: 1412-1418 (1981) .
- 3) 高士令二, 新井健一, 齋藤恒行. 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 (1970) .
- 4) 高士令二. 魚類筋肉構成たんぱく質に関する研究 - VIII. コイおよびティラピア背筋肉ミオシンとウサギ骨格筋ミオシンの比較. *日水誌*, **39**: 197-205 (1973) .
- 5) Kawakami H, Morita J, Takahashi K, Yasui T. Thermal denaturation of myosin, heavy meromyosin and subfragment-1. *J. Biochem.*, **70**: 635-640 (1971) .
- 6) Yasui T, Ishioroshi M, Samejima K. Heat-induced gelation of myosin in the presence of actin. *J. Food Biochem.*, **4**: 61-78 (1980) .

- 7) 新井健一, 高橋英明, 齋藤恒行. 魚類筋肉構成たんぱく質に関する研究 - III. コイ筋肉アクトミオシンの凍結貯蔵における Sorbitol および Sucrose の変性防止について. 日水誌, **36**: 232-236 (1970) .
- 8) 川島孝省, 新井健一, 齋藤恒行. 魚類筋肉構成たんぱく質に関する研究 - X. スケトウタラ冷凍すり身中のアクトミオシン含量について. 日水誌, **39**: 525-532 (1973) .
- 9) 大泉 徹, 山村寛仁, 新井健一. サバ筋原繊維の加熱変性に対するアミノ酸類および糖類の協同保護効果. 日水誌, **48**: 219-226 (1982) .
- 10) 大泉 徹, 奈良泰信, 新井健一. サバ筋原繊維の熱変性に対するカルボン酸, ソルビトール及びグルタミン酸ナトリウムの保護効果. 日水誌, **50**: 875-882 (1984) .
- 11) 松浦 基, 大泉 徹, 新井健一. コイミオシンの熱変性に対する糖の保護効果. 日水誌, **50**: 521-529 (1984) .
- 12) Noguchi S, Matsumoto J J. Studies on the control of the denaturation of fish muscle proteins during the frozen storage I. Preventive effect of Na-glutamate. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **36**: 1078-1087 (1970) .
- 13) Noguchi S, Matsumoto J J. Studies on the control of the denaturation of fish muscle proteins during the frozen storage II. Preventive effect of amino acids and related compounds. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **37**: 1115-1122 (1971) .
- 14) 大泉 徹, 橋本浩二, 小倉潤子, 新井健一. 魚類筋原繊維の加熱変性に対する糖および糖アルコールの保護効果の定量的考察. 日水誌, **47**: 901-908 (1981) .
- 15) Torigai M, Konno K. Pyrophosphate-accelerated actin denaturation mechanism in myofibril. *Fish.Sci.* **62**: 307-311 (1996) .
- 16) Konno K. Suppressive effect of sulfate on fish myosin denaturation. *Fish. Sci.* **64**: 848-849 (1998) .
- 17) Hayashi K, Konno K. Stabilization of myosin by ionic compounds as affected by F-actin. *Fish. Sci.* **72**: 1306-1312 (2006) .
- 18) 川島孝省, 新井健一, 齋藤恒行. 魚類筋肉構成たんぱく質に関する研究 - IV. スケトウタラ冷凍すり身中のアクトミオシン定量条件の検討. 日水誌, **39**: 207-214 (1973) .
- 19) Kuwahara K, Osako K, Okamoto A, Konno K. Solubilization of myofibrils and autolysis of squid mantle muscle by sodium citrate. *J. Food Sci.*, **71**: 358-362 (2006) .
- 20) 日本薬学会. 「衛生試験法・注解 1990 付. 追補(1995)」金原出版, 東京, 1995; 50-52.
- 21) 加藤 登, 野崎 恒, 小松一宮, 新井健一. スケトウダラ冷凍すり身の一品質判定法 冷凍すり身の筋原繊維 ATPase 活性とかまぼこ形成能の関係. 日水誌, **45**: 1027-1032 (1979) .
- 22) 吉富文司, 今野久仁彦. スルメイカミオシン ATPase の酵素的特性. 日水誌, **48**: 581-586 (1982) .
- 23) 若目田 篤, 新井健一. 高濃度の塩存在下におけるコイのミオシン B の変性機構. 日水誌, **50**: 635-643 (1984) .