ヌクレオシド-5’-一リン酸が豚肉からの筋原線維タンパク質の抽出とその加熱ゲル形成に及ぼす影響

(Effects of nucleoside-5’-monophosphate on the extraction of myofibrillar proteins from porcine meat and the formation of heat-induced gels from those proteins)

中村　幸信

ヌクレオシド-5’-一リン酸が豚肉からの筋原線維タンパク質の抽出とその加熱ゲル形成に及ぼす影響

(Effects of nucleoside-5’-monophosphate on the extraction of myofibrillar proteins from porcine meat and the formation of heat-induced gels from those proteins)

中村　幸信

日本獣医生命科学大学大学院獣医生命科学研究科

（指導教授：松石　昌典）

平成 26 年 4 月

目次

頁

序論 1

1. 食肉製品のソーセージについて 1

2. 食肉における筋原線維タンパク質について 2

3. ソーセージの製造工程における筋原線維タンパク質の挙動 7

3. 1. 塩漬工程における筋原線維タンパク質の挙動 7

3. 2. ピロリン酸塩によるミオシンの抽出 8

3. 3. ミオシン抽出機構の未解明な点について 9

3. 3. 1. ミオシンやアクチン以外のミオシン抽出抑制因子の例 10

3. 4. 加熱工程における筋原線維タンパク質の挙動 11

3. 4. 1. ミオシン加熱ゲル形成機構 11

4. アデノシン-5'-一リン酸（AMP）およびイノシン-5'-一リン酸（IMP）の基本的性質、アクトミオシンに対するヌクレオシド-5'-一リン酸（NMP）の作用 12

4. 1. AMP および IMP の基本的性質 12

4. 2. AMP および IMP によるアクトミオシンの解離 13

4. 3. 合成アクトミオシンの Mg^{2+}-ATPase 活性に対する AMP と IMP の作用 13

5. 本研究の目的 16

第一章 NMP によるアクトミオシンの解離作用 17

1. 1. 目的 17

1. 2. 実験材料および方法 17

1. 2. 1. 試薬 17

1. 2. 2. 試料 17

1. 2. 3. アクトミオシンの調製 17

1. 2. 4. グアノシン-5'-一リン酸（GMP）、シチジン-5'-一リン酸（CMP）、デオキシチミジン-5'-一リン酸（dTMP）およびウリジン-5'-一リン酸（UMP）とアクトミオシンのインキュベーション 17

1. 2. 5. SDS-ポリアクリドアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE） 18

1. 2. 6. タンパク質濃度の測定 18
1. 3. 結果と考察 18
1. 3. 1. GMP、CMP、dTMP および UMP によるアクトミオシンの解離作用 18

第二章 プリンヌクレオシド-5'-一リン酸(PrMP)による筋原線維タンパク質の抽出
～ピロリン酸塩との比較～ 22
2. 1. 目的 22
2. 2. 実験材料および方法 22
2. 2. 1. 試薬 22
2. 2. 2. 試料 22
2. 2. 3. 筋原線維タンパク質の抽出 22
2. 2. 4. ホモジネートの pH 測定 23
2. 2. 5. SDS-PAGE 23
2. 2. 6. デンシトグラフによるミオシンおよびアクチンの定量 23
2. 2. 7. 統計処理 24
2. 3. 結果と考察 24
2. 3. 1. ピロリン酸四カリウム(KPP)および PrMP を含む抽出液によって
調製したホモジネートの pH およびイオン強度 24
2. 3. 2. KPP によるミオシンおよびアクチンの抽出 27
2. 3. 3. IMP によるミオシンおよびアクチンの抽出 34
2. 3. 4. GMP によるミオシンおよびアクチンの抽出 38

第三章 PrMP と KPP の併用による筋原線維タンパク質の抽出 45
3. 1. 目的 45
3. 2. 実験材料および方法 45
3. 2. 1. 試薬 45
3. 2. 2. 試料 45
3. 2. 3. 筋原線維タンパク質の抽出 45
3. 2. 4. ホモジネートの pH 測定 46
3. 2. 5. SDS-PAGE 46

3. 2. 6. デンシトグラフによるミオシンおよびアクチンの定量 46
3. 2. 7. 統計処理 46
3. 3. 結果と考察 47
3. 3. 1. KPP と PrMP の混合抽出液によって調製したホモジネートの pH およびイオン強度 47
3. 3. 2. KPP と IMP の混合抽出液によるミオシンおよびアクチンの抽出 51
3. 3. 3. KPP とGMP の混合抽出液によるミオシンおよびアクチンの抽出 58

第四章 生理的イオン強度における IMP および KPP による筋原線維タンパク質の抽出様式 64
4. 1. 目的 64
4. 2. 実験材料および方法 64
4. 2. 1. 試薬 64
4. 2. 2. 試料 64
4. 2. 3. アクトミオシンの調製 64
4. 2. 4. 筋原線維の調製 65
4. 2. 5. IMP および KPP とアクトミオシンのインキュベーション 65
4. 2. 6. IMP および KPP と筋原線維のインキュベーション 65
4. 2. 7. SDS-PAGE 65
4. 2. 8. タンパク質濃度の測定 66
4. 3. 結果と考察 66
4. 3. 1. IMP がアクトミオシンの解離に要する時間 66
4. 3. 2. IMP および KPP によるアクトミオシンの解離に及ぼす KCl 濃度の影響 68
4. 3. 3. IMP および KPP による筋原線維からの筋原線維タンパク質の抽出様式 68
4. 3. 4. IMP と KPP の併用による筋原線維からの筋原線維タンパク質の抽出様式 75

第五章 IMP を添加した加熱ゲルの保水性、物性および官能特性

～KPP との比較～ 79
5. 1. 目的 79
5. 2. 実験材料および方法 79
5. 2. 1. 試薬 79
5. 2. 2. 試料 79
5. 2. 3. 保水性測定のための加熱ゲルの作製 79
5. 2. 4. 加熱ゲルの保水性測定 80
5. 2. 5. 物性測定および官能試験のための加熱ゲルの作製 80
5. 2. 6. 加熱ゲルの物性測定 81
5. 2. 7. 官能試験 81
5. 2. 8. 統計処理 81
5. 3. 結果と考察 81
5. 3. 1. 豚肉加熱ゲルの保水性に対するIMP の効果 81
5. 3. 2. 豚肉加熱ゲルの物性に対するIMP の効果 87
5. 3. 3. IMP 添加豚肉加熱ゲルの官能特性 90

総括 94

論文の要約 97

参考文献 106

謝辞 110

略語の説明

AMP ; adenosine-5'-monophosphate; アデノシン-5'-一リン酸

CMP; cytidine-5'-monophosphate; シチジン-5'-一リン酸

dTMP; deoxythymidine-5'-monophosphate; デオキシチミジン-5'-一リン酸

GMP; guanosine-5'-monophosphate; グアノシン-5'-一リン酸

IMP; inosine-5'-monophosphate; イノシン-5'-一リン酸

KPP; tetrapotassium pyrophosphate; ピロリン酸四カリウム

NMP; nucleoside-5'-monophosphate; ヌクレオシド-5'-一リン酸

PrMP; prine-nucleoside-5'-monophosphate; プリンヌクレオシド-5'-一リン酸

PyMP; pyrimidine-nucleoside-5'-monophosphate; ピリミジンヌクレオシド-5'-一リン酸

SDS; sodium dodecyl sulfate

UMP; uridine-5'-monophosphate; ウリジン-5'-一リン酸

序論

1. 食肉製品のソーセージについて

ハム、ベーコンおよびソーセージなどの食肉製品は、良質な動物性タンパク質や脂質の供給源であることから、日本人の社会活動を栄養面から支えている食品の 1 つであり、現代の日本の食卓には欠くことができない。これら食肉製品の国内生産重量は、平成 23 年 51.3 万トンであり（日本ハム・ソーセージ工業協同組合、2013）、この重量は日本の伝統的な食品である魚肉練り製品の生産重量 49.4 万トン（同年）に匹敵する（一般社団法人食品需給研究センター、2013）。食肉製品の中でもソーセージの国内生産重量（29.6 万トン）は、ハム（10.6 万トン）やベーコン（8.4 万トン）の国内生産重量に比べると格段に多い上、この 10 年間緩やかに増加する傾向にある（日本ハム・ソーセージ工業協同組合、2013）。さらに、ソーセージの年間 1 世帯当たりの購入数量も他の食肉製品に比べて多く（一般社団法人食肉科学技術研究所、2012）、各種食肉製品の購入数量に占めるソーセージの割合が 50%を超えることは、消費者がソーセージの品質に関心を持ち、高品質のソーセージを求めていることが考えられる。したがって、本研究では研究対象としてソーセージを取り上げることとした。

ソーセージとは、一般的には豚肉を主とする原料肉と豚脂、食塩、発色剤、調味料および香辛料を混合した練り肉を天然あるいは人工のケーシングに詰めたもの、あるいは、この詰めものを乾燥やくん煙、さらに湯煮や蒸煮によって加熱したものである。ソーセージはその製法により 4 つに分類することができる。上述した練り肉をケーシングに詰めたものを加熱処理しないフレッシュソーセージ、くん煙処理のみしたスモークドソーセージ、湯煮・蒸煮で加熱処理したクックドソーセージおよび乾燥熟成処理したセミドライ・ドライソーセージである。日本の市場に出回っているソーセージの多くがクックドソーセージであることから、本研究ではクックドソーセージを扱う。以下にクックドソーセージの一般的な製造工程を示す。

①原料肉の塩漬、②塩漬肉のチョッピング、③カッティングによる各種原料の細切・混和（練り肉）、④練り肉をケーシングへ充填、⑤乾燥・くん煙、⑥湯煮または蒸煮による加熱、⑦冷却、⑧包装

また、上述の工程と異なる手法として、原料肉の塩漬工程の前にチョッピング工程を行い、この後のカッティング工程において同時に塩漬工程を行う手法も頻繁に行われ

る。このような手法はカッターキュアリングと呼ばれ、この手法の場合、製造に要する時間を短縮することができる。

消費者が求める高品質のソーセージを構成する性質として味や香りが重要であることは当然であるが、これ以外に重要視される性質は、ソーセージらしい保水性および結着性である。保水性と結着性は、カッティング工程で加えられる水や脂肪が肉塊と共に接着し、ソーセージの中に保持される性質である。保水性と結着性の発現において重要な要素は 2 つあり、1 つは原料肉に由来する筋原線維タンパク質の存在、もう 1 つは塩漬工程と加熱工程である。筋原線維タンパク質が塩漬工程および加熱工程においてどのような挙動を示すかは詳細に調べられている。したがって、まず食肉における筋原線維タンパク質について述べ、次に塩漬工程と加熱工程について述べる。

2. 食肉における筋原線維タンパク質について

食肉製品の主原料は、家畜や家禽から得られる食肉であり、これら食肉は元来家畜や家禽の筋肉である。筋肉の種類は心筋、平滑筋、骨格筋の 3 つに分けられるが、食肉製品の原料として用いられるものは、基本的に骨格筋である。骨格筋は収縮して骨格を動かす運動器官であり、その組織は筋線維、結合組織、脂肪組織、血管、神経線維および細胞外液で構成される。特に骨格筋中の 75－92%を占める筋線維は言い換えると筋細胞であり、形質膜で覆われ、細胞内にはイオンや高分子などが溶解している水や核、ミトコンドリア、筋小胞体および筋原線維などの小器官が含まれるが、筋線維に占める割合は筋原線維がほとんどである。筋原線維は収縮装置であり、これを構成するタンパク質は筋原線維タンパク質と呼ばれる。（図 1）

筋原線維の構造は、サルコメアと呼ばれるコンパートメントが連続しており、それは筋収縮の最小単位である。サルコメアの基本的な構成要素は、アクチン分子を主体とした細いフィラメントとミオシン分子を主体とした太いフィラメントである。筋原線維を位相差顕微鏡下で観察すると、サルコメアには明るい部分と暗い部分があり、それぞれ I 帯、A 帯と呼ばれる。I 帯は細いフィラメントが存在する部分であり、A 帯は細いフィラメントと太いフィラメントが重なって存在する部分である。（図 2）

細いフィラメントは、サルコメアにおいてその一端（barbed end）が Z 線に固定されており、反対の端（pointed end）はサルコメアの中央へと伸びている。これを構成する

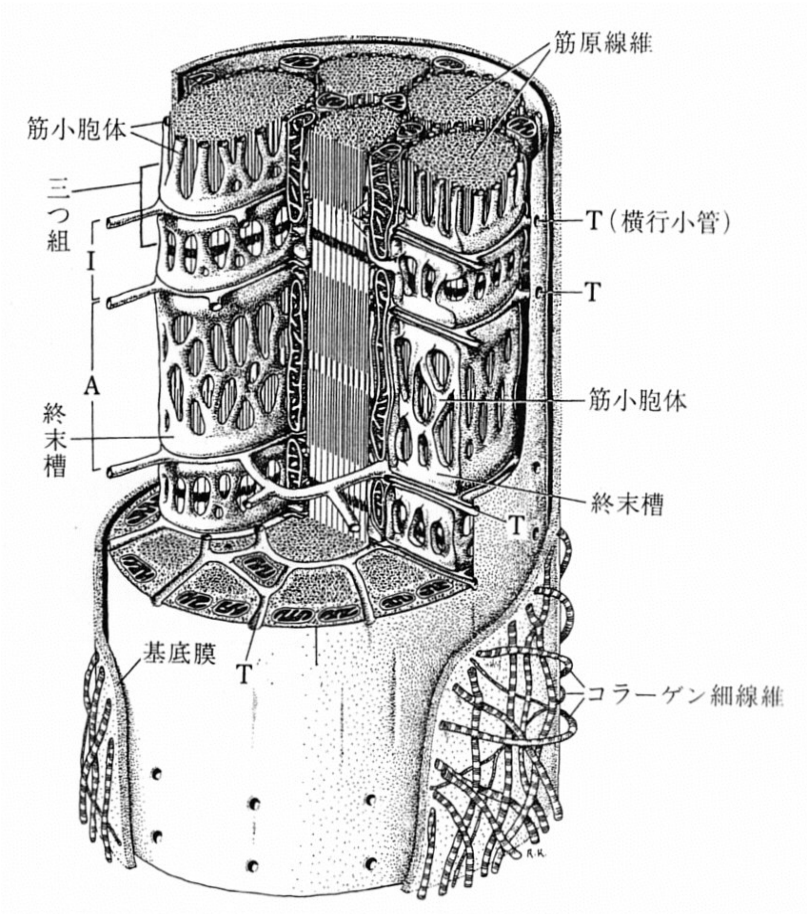


図 1　筋線維の構造 （服部（1996）、肉の科学、朝倉書店、p. 41 図 3.2）

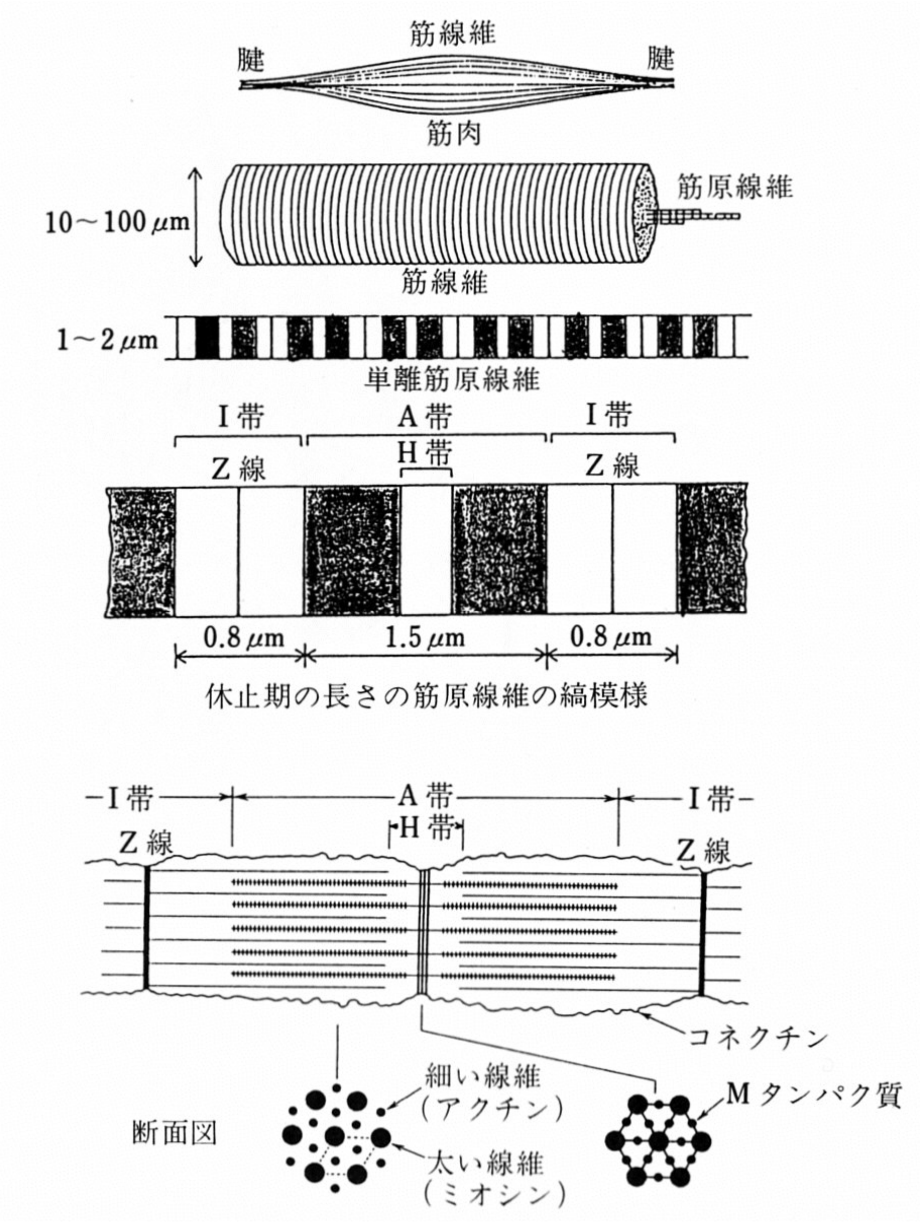


図 2　筋原線維の構造 （服部（1996）肉の科学、朝倉書店、p. 42 図 3.3）

筋原線維タンパク質は、アクチン以外にネブリン、トロポミオシン、トロポニン、トロポモジュリンおよび CapZ（β アクチニン）などである（図 3）。

主要成分のアクチンは、筋原線維タンパク質の 22%を占める。イオン強度が生理的な条件より低い場合、アクチンは単分子の状態となり、これは G-アクチンと呼ばれる。G-アクチンは 375 個のアミノ酸を含むポリペプチド鎖から出来ており、分子量は 42,000 である。他方、生理的なイオン強度の場合 G-アクチンは重合してフィラメントを形成する性質があり、これは F-アクチンと呼ばれる。細いフィラメントでは、2 本の F-アクチンがらせん状に絡み合っている。この 2 本の F-アクチンの溝にトロポミオシンが収まり、bared end には Cap-Z、pointed end にはカルモジュリンが結合している。

太いフィラメントは、サルコメアの中央に位置する。これを構成する筋原線維タンパク質はミオシン以外に、コネクチン（図ではタイチン）、C-タンパク質（MyBP-C）、AMP デアミナーゼ、ミオメシンおよび M-タンパク質などである（図 3）。

主要成分のミオシンは、筋原線維タンパク質の 43%を占める。分子量は約 500,000 で、ミオシン 1 分子は分子量約 200,000 の重鎖 2 本と約 20,000 の軽鎖 4 本で構成されている。特に重鎖に関しては、あるタンパク質分解酵素を作用させると、サブフラグメント-1 を含む頭部と α ヘリックスの coiled-coil 構造を有する尾部に分けることができる。この手法を用いることによってミオシンの性質が明らかにされた。ミオシンには 3 つの重要な性質があり、1 つは生理的なイオン強度で重合してフィラメントを形成する性質で、これは尾部に由来する。あとの 2 つは頭部に由来し、ATP を ADP とオルソリン酸に分解する ATPase の性質およびアクチンと結合してアクトミオシンと呼ばれる複合体を形成する性質である。太いフィラメントにおけるミオシン分子は、その尾部が中央から両方向に伸びるように重合しており、その中央部にはアクチンと結合するミオシン頭部が存在しない。この部分は H 帯と呼ばれ、その中心には M 線が存在する。M 線に認められる M-タンパク質およびミオメシンは、太いフィラメントを束ね連結している。またコネクチンは M 線から Z 線まで伸びており、太いフィラメントをサルコメアの中央に保持している。太いフィラメントはコネクチンを介して Z 線と結合している。

骨格筋の収縮と弛緩は、サルコメアにおける細いフィラメントと太いフィラメント、すなわちアクチン分子とミオシン分子の結合と解離によってもたらされる。この収縮に必要なエネルギー源は ATP である。ATP はアクトミオシンにおけるミオシン分子と結

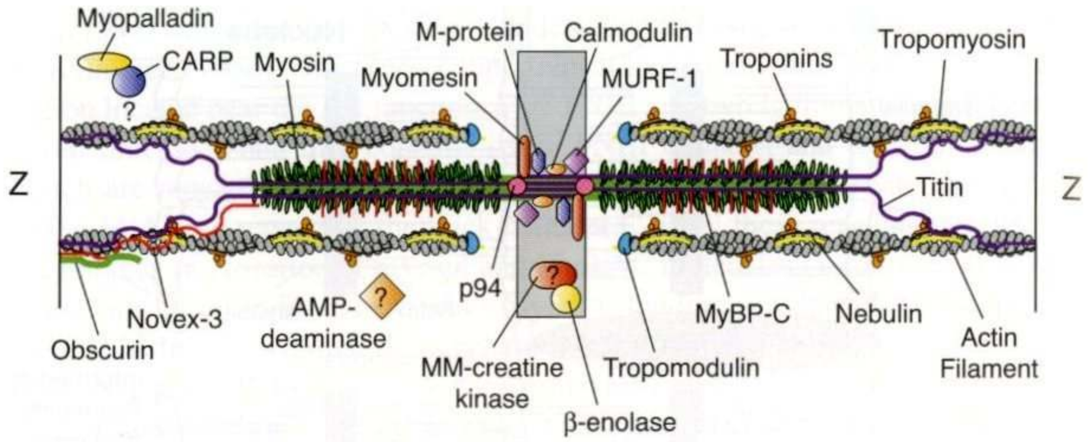


図 3 サルコメアの分子モデル（Clark ら, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* Vol. 18, 637-706, (2002)）Figure 2）

合してアクトミオシンをアクチンとミオシンに解離させる。ミオシン分子上で ATP は ADP とオルソリン酸に分解され、ミオシン分子は再びアクチン分子と結合することが可能となる。このミオシン分子とアクチン分子の結合により、ミオシン分子上の ATP 分解反応は促進され、最終的に収縮に必要なエネルギーがもたらされる。ATP はクレアチンリン酸と呼吸鎖で再合成されるので、骨格筋の収縮と弛緩が繰り返される。

他方、家畜や家禽のと畜後に得られる食肉は、通常細いフィラメントと太いフィラメントが結合した状態にとどまっている。すなわち食肉は硬直状態にある。この原因は家畜や家禽のと畜によって好気呼吸の ATP 合成が停止し、最終的にはアクトミオシンを解離する ATP が枯渇するためである。食肉において両フィラメントが結合した状態にあることは、ソーセージの製造条件や品質に影響する。次はソーセージの製造工程、特に塩漬工程および加熱工程における筋原線維タンパク質の挙動について述べる。

3. ソーセージの製造工程における筋原線維タンパク質の挙動

3. 1. 塩漬工程における筋原線維タンパク質の挙動

塩漬工程では、原則的に食品添加物として食塩および発色剤（亜硝酸等）が使用される。同時に重合リン酸塩が使用される場合もある。食塩や重合リン酸塩の役割は、ソーセージ独特の味や香りの発現に寄与すること、保水性や結着性を改善することである。

Fukazawa ら（1961a）は、加熱ゲル形成能に関与する筋肉タンパク質の探索を行った結果、ソーセージの保水性および結着性の発現に必要不可欠なのは筋原線維タンパク質のミオシンであることを明らかにした。したがって、塩漬工程におけるミオシンの挙動について述べる。

基本的に筋原線維からのタンパク質の抽出性とゲル強度の間には強い正の相関性が認められている（Fukazawa ら、1961b；Samejima ら、1985）。したがって、塩漬工程の目的の 1 つは、食肉からミオシンを抽出して溶解させることである。このミオシンの抽出の程度は、塩漬工程の食塩濃度に強く影響される。塩漬工程の食塩を 3% 以上の高濃度（約 0.5 M 以上）で使用した場合、食肉中のミオシンの多くはアクトミオシンの形で筋原線維から抽出され溶解される。ウサギの筋原線維を使った実験では、0.5 M 以上の NaCl 溶液（pH 7.4）によってミオシンが存在する A 帯が消失することが

示されている。（Offer and Trinick、1983）

この場合のミオシンの抽出メカニズムは、ミオシンの尾部に対するイオン強度の影響によって説明されている。前述したように、ミオシンは生理的なイオン強度（本論文では0.2とする（Offer and Knight、1988））でフィラメントを形成するが、高イオン強度ではモノマーとなることである。Trinick and Cooper（1980）は、0.10 M KCl、pH 7.0 の条件において形成される C-タンパク質が存在するミオシンフィラメントが、0.10 から 0.30 M への KCl 濃度の増加によって脱重合することを観察している。その詳細は 0.10から0.16 Mへの KCl濃度増加では、フィラメントの両端からの脱重合が始まり、0.17 M KCl 付近で、フィラメントに C-タンパク質が存在する領域での急激な脱重合が生じ、0.18 から 0.30 M への KCl 濃度の増加で、C-タンパク質が存在する領域より中央部のフィラメントの脱重合が進む。（図 3 参照）この結果は、ミオシンフィラメントが単独で存在する場合、生理的な塩濃度で脱重合することを示している。

他方、塩漬工程におけるアクチンの挙動についても調べられている。Okitani ら（1967、1968）は、ウサギのアクトミオシンを0.6 M KCl, pH 5.7, 3°C の条件で貯蔵すると、アクチンとミオシン間の結合が脆弱化して解離し、さらに同条件で F-アクチンが G-アクチンへと脱重合して不可逆的に変性することを示した。

食肉製品の製造条件とはかけ離れているが、高イオン強度のアルカリ性である Weber-Edsall 溶液によるアクトミオシンの抽出の様子が調べられている。Haga ら（1965、1966）は、Weber-Edsall 溶液による筋肉からの抽出物が、抽出時間の増加に伴ってミオシンからアクトミオシンへと変化していき、抽出時間に依存して抽出されるアクチン量が増えることを示した。さらに Weber-Edsall 溶液で処理された筋肉を電子顕微鏡観察した結果、Z 線近傍の I 帯に間隙が認められ、アクチンの抽出は細いフィラメントと Z 線の解離によって生じたとしている。また、ミオシンを完全に抽出した筋原線維試料から細いフィラメントを単離する方法があるが、この方法の要はトリプシンや界面活性剤を用いて筋原線維の Z 線を除去することである（丸山、1975）。以上の結果から、Z 線と筋原線維タンパク質間の相互作用の解除は、塩漬工程における筋原線維タンパク質の抽出においても重要であると考えられる。

3. 2. ピロリン酸塩によるミオシンの抽出

前述のとおり、3.0%以上の食塩濃度で塩漬することによって食肉からミオシンを

抽出し溶解させることが可能である。しかしながら、この食塩濃度で製造されたソーセージの味は、一般的な日本人の嗜好性からすると塩味が強い。そこで日本のソーセージの製造においては、1.5%程度（約 0.3 M）の食塩濃度が採用されているが、この食塩濃度では食肉からミオシンを抽出することは困難である。この現象は、ウサギ筋原線維を使った実験において、0.3 M 程度の NaCl 溶液では、A 帯が変化しないことで示されている（Offer and Trinick、1983）。1.5%程度の食塩濃度で、食肉からミオシンを抽出することが難しい原因の 1 つは、食肉におけるアクトミオシンの形成である。単離されたアクトミオシンは、イオン強度 0.27 で沈殿してしまうこと（Briskey and Fukazawa、1971）、完全に溶解させるためにはイオン強度 0.4 が必要なこと（Szent-Györgyi、1943a；Maruyama and Tonomura、1957）から理解できる。

0.3 M の低塩濃度条件でのミオシン抽出は、重合リン酸塩を使用することで可能となる。重合リン酸塩は、食品添加物であり、ソーセージの保水性および結着性を高めることから結着補強剤と呼ばれる。重合リン酸塩の中でも特にピロリン酸塩は、アクトミオシンをアクチンとミオシンに解離する作用があることが明らかにされており、ピロリン酸塩の添加によって食肉中のアクトミオシンはアクチンとミオシンに解離される（Bendall、1954；Yasui ら、1964a）。その結果、1.5%程度の食塩濃度でミオシンを抽出することが可能となる。（Yasui ら、1964b； Ishiwata、1981；Offer and Trinick、1983）。食肉中のアクトミオシンをアクチンとミオシンに解離することによってミオシンの抽出が容易になることは、単離されたミオシンの溶解性から理解できる。ミオシンは pH 7.4 で 0.05 より高いイオン強度から溶解し始め、イオン強度 0.2 では完全に溶解することが示されている（Szent-Györgyi、1943b；Brahms and Brezner、1961）。

また、塩漬工程におけるイオン強度は、タンパク質間の相互作用に対してダイレクトに影響する。アクチンとミオシンの結合は、イオン強度の増加に伴い弱められる（Greene、1981；Shen and Swartz 、2010）。したがって、ソーセージの製造条件のような高いイオン強度条件のアクトミオシンは、生理的なイオン強度条件に比べて解離されやすく、その結果アクチンおよびミオシンが抽出されやすくなることも考えられる。

3. 3. ミオシン抽出機構の未解明な点について

塩漬工程における食肉からのミオシン抽出機構は、これまで述べたとおり、太いフィラメントが脱重合することとピロリン酸塩などによってアクチンから解離されること

の 2 つの現象によって説明される。しかしながら、筋原線維中のミオシン分子は、ミオシン分子相互の重合やアクチン分子との結合以外に、他の分子との結合が存在することから、2 つの現象のみによってミオシンの抽出機構を完全に説明しているとは言えないだろう。以下に、筋原線維からのミオシン抽出を抑制する可能性がある因子について述べる。

3. 3. 1. ミオシンやアクチン以外のミオシン抽出抑制因子の例

Funatsu ら（1990）は、生理的なイオン強度 0.2 で、ゲルゾリンを用いて筋原線維から細いフィラメントを選択的に除いた。その結果、得られた筋原線維中の太いフィラメントは、脱重合せずにコネクチンが結合した状態でサルコメアの中心に存在していた。前述したとおり、イオン強度 0.2 では、単離したミオシンフィラメントは脱重合する（Trinick and Cooper、1980）。また、Paterson ら（1988）は、牛肉において NaCl 濃度の増加やピロリン酸塩の添加によってコネクチン／タイチンの抽出量が増加すること、同時にミオシンの抽出量も増加することを示した。この結果はコネクチン／タイチンの存在がミオシンの抽出に影響している可能性を示唆している。以上の結果から、コネクチンがミオシン抽出抑制因子の可能性が考えられる。

Parsons and Knight（1990）は、筋線維型の組成が異なる筋線維を使って、高塩濃度、ピロリン酸塩存在下でのミオシンの抽出を観察した。その結果、遅筋型の筋線維は、速筋型の筋線維に比べて、ミオシンが抽出されにくいことを示した。さらに、Xiong ら（2000）は、ニワトリの遅筋と速筋を使って同様の結果を示し、筋線維型によるミオシンの抽出性の違いの原因の 1 つとして、遅筋の筋線維における Z 線の構造が、速筋のそれより厚いことを挙げている。Z 線はジグザグ構造をしているが、通常速筋の Z 線は 2 つのジグザグ構造で構成されているのに対して、遅筋の Z 線は 3 つから 4 つのジグザグ構造で構成されている。Z 線と太いフィラメントの間には直接的な結合はないが、Z 線はアクチンやコネクチンと結合していることから、これらのタンパク質を介して間接的にミオシンの抽出性を抑制していることが考えられる。

Ito ら（2003）は、超音波処理によって筋原線維のコネクチンを分解することや Z 線の構成要素である α アクチニンを除去することは、生理的なイオン強度での筋原線維からのミオシンの抽出・溶解を増強することを示している。この結果は、上述のミオシンの抽出に対するコネクチンや Z 線の抑制的な影響を支持している。

3. 4. 加熱工程における筋原線維タンパク質の挙動

3. 4. 1. ミオシン加熱ゲル形成機構

ソーセージの製造工程において、塩漬工程に続くカッティング工程では練り肉が得られる。練り肉は均一なエマルションである。エマルションには、塩漬工程によって溶解したミオシンや筋原線維が分散して存在している（Gordon and Barbut、1992）。このエマルションは、次の加熱工程でゲル化する。ここで得られたゲルがソーセージであり、ソーセージの保水性および結着性が完成する。練り肉が加熱によってゲル化する反応は、その原因物質であるミオシンを用いて詳細に調べられている。ミオシンの加熱ゲル化機構は、ミオシンの存在状態によって 2 つに分けられる。すなわち、イオン強度条件によってミオシンがモノマーであるか、フィラメントであるかで異なる。

ミオシンモノマーの加熱ゲル化機構は、0.5 M KCl、pH 6.0 の条件下で、43°C 付近でミオシン分子頭部間の疎水性相互作用による凝集体（40－50 nm）が生じ、55°C 付近でミオシン分子尾部間の架橋結合によってさらに大きな凝集体（200-400 nm）が生じ、60-70°C で大きな凝集体どうしが数珠状に連結して網目構造を形成することである。（安井および鮫島、1985；Hermansson ら、1986；Yamamoto、1990； 山本、2008）このようなミオシン分子の加熱ゲルは、aggregated type と呼ばれる。

ミオシンフィラメントの加熱ゲル形成機構は、フィラメントの表面に突き出たミオシン頭部の会合によるものである。生理的な KCl 濃度、pH 6.0 の条件下で加熱すると、同一フィラメント内のミオシン頭部が凝集して、フィラメントの表面に粒子状の構造が現れる。他のフィラメントとも頭部を介して会合することによって、フィラメントの束が形成される。さらに束どうしが交差する部分で架橋が形成され、線維状の網目から構成されるゲルが形成される。すなわち、フィラメントの形状は保たれ続けたままゲルを形成する（Ishioroshi ら、1983； Hermansson ら、1986；山本、2008）。このようなミオシンフィラメントの加熱ゲルは、strand type と呼ばれる。

ミオシンの加熱ゲル化機構に対するアクチンの影響も明らかにされている（Yasui ら 1980、1982）。F-アクチン単独の溶液を加熱してもゲルは形成されない。しかしながら、モノマーとして存在するミオシンの中に少量のアクチンが存在する条件下、具体的にはミオシン：アクチンの重量比が 15 のとき、ゲルの剛性率は劇的に増大し、この剛性率の増大にはアクトミオシンの形成が必須である。

天然アクトミオシンの加熱ゲル化については情報が少ないが、加熱に対する構造変化の概要がまとめられている（Ziegler and Acton、1984）。30-35°C でトロポミオシンやトロポニンが F-アクチンから解離する。トロポミオシンおよびトロポニンは、アクトミオシンのゲル形成に影響しない。38°C 付近で F-アクチンは 2 重らせんから 1 本鎖に解離する。40-45°C でミオシン頭部が構造変化し、45-50°C でアクトミオシンが解離する。50-55°C でミオシンの尾部がランダムコイル状となり、急速に凝集体を形成する。したがって、天然アクトミオシンもミオシンの加熱ゲル化機構と同様にゲルを形成すると推定される。

ミオシンを加熱することによって形成される 3 次元の網目構造は、ソーセージにも認められる（Gordon and Barbut、1992）。ミオシン分子の網目構造は水を保持することができる（Yasui ら、1979）。ミオシンの抽出率とソーセージの保水性の間に正の相関を示している（Morita ら、1983）。したがって、ソーセージにおける保水性と結着性の発現は、ミオシン分子が形成する網目構造の寄与が大きいだろう。

また、エマルションに存在する筋原線維も保水性があることがわかっている。Rome（1968）は、イオン強度の増加によって、太いフィラメント間の距離が増加することを示した。この現象は、NaCl に由来する塩化物イオンがタンパク質に結合することによって電気的反発力を増加させるために生じるとする説（Offer and Knight、1983；Belton、1987)、あるいは食肉加工における NaCl 濃度により筋原線維内の太いフィラメントが脱重合し、筋原線維内のエントロピーが増加するために生じるとする説（Offer ら、1989）がある。すなわち、太いフィラメント間の距離の増加によって現れるスペースは、水を保持することができるだろう。

4. AMP および IMP の基本的性質、アクトミオシンに対する NMP の作用

4. 1. AMP および IMP の基本的性質

AMP は D-リボースの 1’-位にアデニン、5’-位にリン酸が 1 つ結合した構造である（図 4）。オルソリン酸の pKa は 1.83、6.43、11.46 であることから、中性の pH で多くの AMP は、リン酸基において図 4 のように解離している。ATP の代謝物であり、うま味を呈するが非常に弱い。海産無脊椎動物のうま味に寄与していると考えられている。

IMP は D-リボースの 1’-位にヒポキサンチン、5’-位にリン酸が 1 つ結合した構造

である（図 5）。上述したオルソリン酸の pKa（1.83、6.43、11.46）より、中性の pH で多くの IMP は、リン酸基において図のように解離している。AMP と同様に ATP の代謝物である。と畜後の筋肉から食肉へと変換される熟成過程において、IMP は AMP が AMP デアミナーゼによってアデニンの 6 の位置のアミノ基が脱アミノ化されて生成する。代表的なうま味成分であり、IMP のナトリウム塩は食品添加物として様々な食品に用いられる。うま味の閾値は 0.025%で、もう 1 つの代表的なうま味成分であるグルタミン酸ナトリウムの閾値 0.03%にほぼ等しい。グルタミン酸ナトリウムは、濃度が高くなるとそれに比例してうま味の強度が強くなるのに対し、IMP は濃度が高くなってもほとんどうま味の強度は増加しない。天然物中には、魚肉、家禽肉および畜肉に含まれる物質であり、これら食肉のうま味や肉様の味に寄与していると考えられている。（沖谷、1996）

4. 2. AMP および IMP によるアクトミオシンの解離

Okitani ら（2008）は、AMP と IMP が無脊椎動物、鶏肉、豚肉および牛肉由来のアクトミオシンをアクチンとミオシンに解離し、他方、2 つのリン酸を持つアデノシン-5’-二リン酸（ADP）やヌクレオシドのイノシンやアデノシンは、アクトミオシンを解離しないことを発見した。特に IMP は熟成過程において食肉に蓄積すること（Terasaki ら、1965）、熟成期間中の食肉の軟化の原因の 1 つは、アクチンとミオシン間の相互作用の弱化であることから（Takahashi ら、1967）、IMP が熟成による軟化をもたらす原因物質の 1 つである可能性が示された。しかし、AMP や IMP によるアクトミオシン解離機構の詳細は、明らかになっていない。

4. 3. 合成アクトミオシンの Mg^{2+}-ATPase 活性に対する AMP と IMP の作用

筋収縮の生理学的な研究において、消耗的な筋収縮運動を施した筋肉に IMP が蓄積するという現象がある（Westra ら、1986）。このことから消耗的な運動における AMP と IMP の役割が、合成アクトミオシンの Mg^{2+}-ATPase 活性に対して調べられた（Westra ら、2001）。すなわち、アクチンとミオシンの結合によってオルソリン酸が放出される反応に対する AMP と IMP の影響を調べたものである。この結果は、アクチン濃度と Mg^{2+}-ATPase 活性の間の正の協同性、つまりアクチン濃度が高いほどアクチンとミオシンの結合が促進される性質が、AMP と IMP によって抑制されることを示し

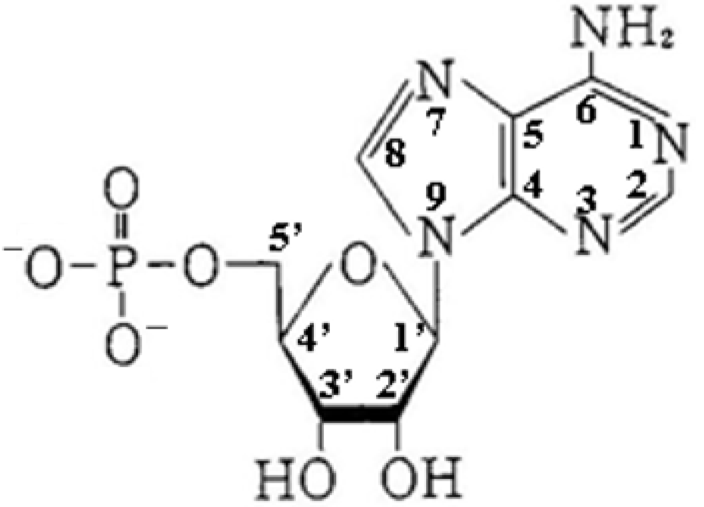


図 4　AMP の構造、中性 pH における解離の状態

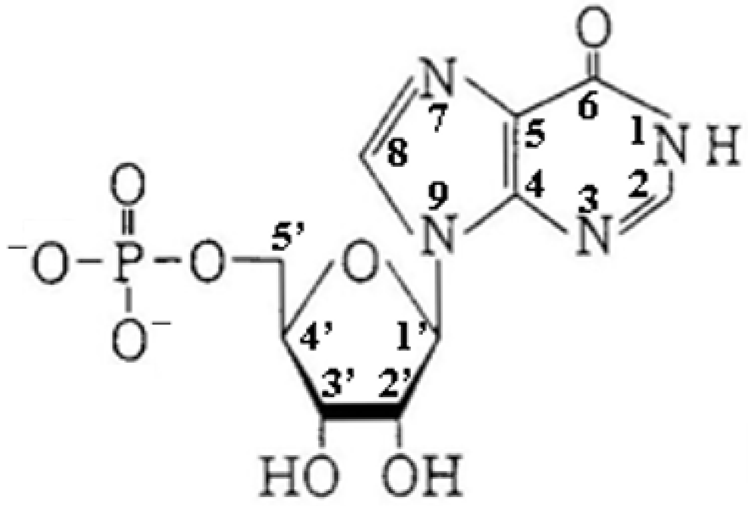


図 5 IMP の構造、中性 pH における解離の状態

ている。

5. 本研究の目的

以上に述べた背景をもとにした本研究の目的を以下に示す。

Okitaniら(2008)が示したAMPやIMPがアクトミオシンをアクチンとミオシンに解離させるという現象から、リン酸が1つ結合したヌクレオチド(ヌクレオシド-5'-一リン酸、NMP)も同様の現象を示すことが考えられる。第一章では、未だアクトミオシンの解離作用の有無が確認されていないNMPとしてGMP、CMP、dTMPおよびUMPを使って、そのアクトミオシン解離作用について調べた。GMP、CMP、dTMPおよびUMPは、それぞれ塩基の構造が異なる。これを調べることは、NMPによるアクトミオシン解離機構の解明に役立つと考えられる。

第二章および第三章では、NMPによって筋原線維タンパク質を抽出することを目的とした研究を行った。ピロリン酸塩が食肉中のアクトミオシンをアクチンとミオシンに解離することによってミオシンの抽出性を高めることから、アクトミオシンの解離作用を有するNMPも、食肉からのミオシンの抽出性を高めることが考えられる。第二章では、食肉からの筋原線維タンパク質の抽出に対するNMPの効果を調べた。

NMPとピロリン酸塩は、アクトミオシンの解離作用については共通しているが、各々の構造が異なるように、基本的には異なる性質を持った物質である。第三章では、食肉からの筋原線維タンパク質の抽出に対するNMPとピロリン酸塩の併用効果について調べた。

第四章では、IMPによる食肉からの筋原線維タンパク質の抽出機構を明らかにすることを目的とした。生理的なイオン強度下で、精製アクトミオシンに対するIMPの解離作用および精製筋原線維に対するIMPの筋原線維タンパク質抽出作用について調べた。第二章から第四章までの結果をふまえ、ピロリン酸塩の同作用と比較すること、またはピロリン酸塩との併用効果から検討した。

第五章では、NMPによってソーセージの品質を改善することを目的とした。NMPの中で食品添加物として最も汎用性の高いIMPを選択し、これを添加した加熱ゲルを作製した。IMPが加熱ゲルの保水性、物性および官能特性に及ぼす影響を調べた。

第一章　NMP によるアクトミオシンの解離作用

1. 1. 目的

AMP や IMP によるアクトミオシンをアクチンとミオシンに解離させるという現象は、NMP が同様の現象を起こす可能性を示唆した。本章では塩基の構造が異なる NMP として GMP、CMP、dTMP および UMP を使って、そのアクトミオシン解離作用について調べた。

1. 2. 実験材料および方法

1. 2. 1. 試薬

GMP、CMP、dTMP および UMP は、和光純薬工業製を用いた。その他の試薬はすべて特級品を用いた。

1. 2. 2. 試料

市販の豚肉の胸最長筋を用いた。脂肪組織および結合組織を取り除き、ミンチとした。

1. 2. 3. アクトミオシンの調製

アクトミオシンの調製は、定法に従った（Szent-Györgyi、1951）。ブタのミンチ肉に 6 倍量の Weber-Edsall 溶液（0.6 M KCl/0.04 M $NaHCO_3$/0.01 M $NaCO_3$、pH 9.2）を加えて撹拌した後、4°C で 24 時間静置した。このホモジネートを遠心分離（10,160 × *g*、10 分間、4°C）して得られた上清に 2 倍量の冷蒸留水を加えて撹拌し、遠心分離（5,720 × *g*、7 分間、4°C）した。この沈殿に等量の 1 M KClを加えて撹拌し、遠心分離（10,160 × *g*、10 分間、4°C）した。これらの操作を 2 回繰り返し、最終的に得られた上清をアクトミオシン（in 0.6 M KCl）とした。

1. 2. 4. GMP、CMP、dTMP および UMP とアクトミオシンのインキュベーション

0.4 mL のアクトミオシン溶液（5 mg/mL）に各種試薬を加えて 1.67 mg/mL のアクトミオシン、0.2 M KCl、20 mM Tris-HCl 緩衝液（pH 7.2）、2 mM NaN_3 および 8 mM NMP を含む混合溶液（全量 1.2 mL）とした。この混合溶液を 0°C で 16 時間インキュ

ベーションした後、12,000 × *g* で 10 分間遠心分離した。この上清を 0.67 倍量の 0.1 M NaCl/1 mM NaN_3/10 mM Tris-HCl（pH 7.2）（NT-buffer）で希釈して得た試料をSDS-PAGE に供した。ウェルに供した 13 μL の試料には、13.4 μg のアクトミオシンに由来するタンパク質が含まれる。

1. 2. 5. SDS-PAGE

SDS-PAGE は 10%のゲルを使って Laemmli（1970）の方法に従って行った。タンパク質をクマシー・ブリリアント・ブルーR250 で染色した。分子量マーカーとしてトリプシンインヒビター（Mr = 20,100）、カルボニックアンヒドラーゼ（29,000）、オボアルブミン（44,287）、ウシ血清アルブミン（66,409）、ホスホリラーゼ b（97,200）を用いた。

1. 2. 6. タンパク質濃度の測定

ウシ血清アルブミンを検量線としたビウレット法によって測定した。

1. 3. 結果と考察

1. 3. 1. GMP、CMP、dTMP および UMP によるアクトミオシンの解離作用

各種 NMP によるアクトミオシンの解離作用を調べる方法は、以下の原理に基づく。精製されたアクチンは水に、精製されたミオシンは 0.1 より高いイオン強度で溶解する（Szent-Györgyi、1943b）。これらの溶解性から、イオン強度 0.2 は、アクチンおよびミオシンを十分溶解させられる。他方、精製されたアクトミオシンはイオン強度 0.2 では溶解せず、0.3 より高いイオン強度で溶解し、0.4 では完全に溶解する。したがって、0.2 M KCl、中性 pH の溶液では、アクトミオシンは不溶であることから、遠心分離されると沈殿に現れるが、アクトミオシンをアクチンとミオシンに解離した場合、両タンパク質はこの溶液に溶解することから、遠心分離されると上清に現れる。

図 6 は 8 mM の各種 NMP とアクトミオシンを 0°C で 16 時間インキュベートした結果の SDS-PAGE 像である。NMP とインキュベートしておらず遠心分離もしていないホールのアクトミオシンのレーンには、ミオシン重鎖（MHC）とアクチンのバンドが認められた（図 6、レーン a）。このアクトミオシンを遠心分離した上清の MHC およびアクチン量は僅かであり（図 6、レーン b）、アクトミオシンのほとんどが解離していないことが確認された。

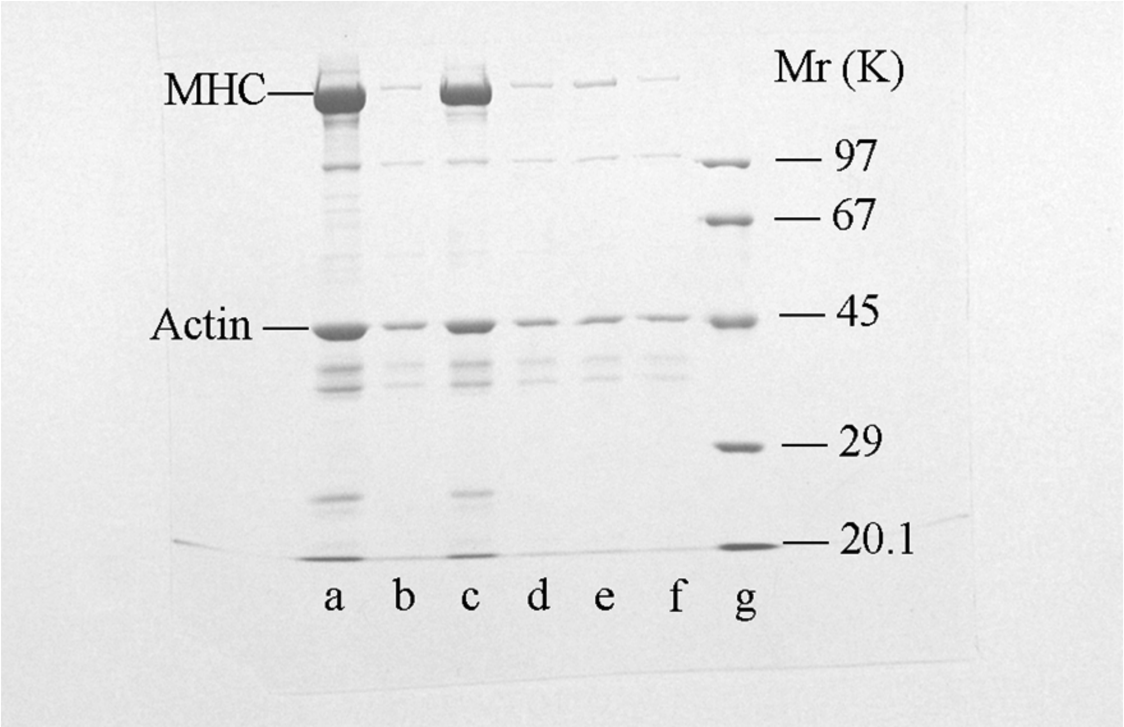


図 6、GMP、CMP、dTMP および UMP とインキュベートした豚肉アクトミオシンの電気泳動像

0.2 M KCl 溶液（pH 7.2）で、アクトミオシンを 8 mM の GMP、CMP、dTMP および UMP と 0°C で 16 時間インキュベートした後、遠心分離した。得られた上清を SDS-PAGE に供した。a、ホールアクトミオシン； b-f、アクトミオシンの上清； b、無添加； c、GMP； d、CMP； e、dTMP； f、UMP； g、分子量マーカー； MHC、ミオシン重鎖

GMP、CMP、dTMP および UMP をアクトミオシンとインキュベートした場合、GMP を添加して得られた上清には、ホールのアクトミオシンに匹敵するほどの MHC とアクチンのバンドが現れた（図 6、レーン c）。他方、CMP、dTMP および UMP を添加して得られた上清には、MHC およびアクチンのバンドはほとんど認められなかった（図 6、レーン d、e および f）。

これらの結果から GMP は AMP や IMP と同様にアクトミオシンを解離させることができるが、CMP、dTMP および UMP は、アクトミオシンを解離させることができないことが明らかになった。

アクトミオシン解離能を持つ AMP、IMP および GMP の塩基は、それぞれアデニン、ヒポキサンチン、グアニンであり、プリン骨格を持っている PrMP である。他方、アクトミオシン解離能を持たない CMP、dTMP および UMP の塩基は、シトシン、チミンおよびウラシルであり、ピリミジン骨格を持っている PyMP である。したがって、NMP によるアクトミオシンの解離には、ヌクレオシドの塩基がプリンであることが必要不可欠であることが示唆された。

アデノシン-5'-三リン酸（ATP）によるアクトミオシンの解離は、ATP がミオシン頭部に結合して、ミオシン頭部におけるアクチン結合部位が構造変化することに由来する。その結果、アクチンとミオシンの親和性が低下し、アクトミオシンは解離する（Geeves and Holmes、2005）。ATP とミオシン頭部の結合は、非共有結合である。したがって、PrMP によるアクトミオシンの解離のきっかけも、PrMP とアクトミオシンが結合することであろう。

NMP の構造（例として図 4 および 5）から起こり得るタンパク質との非共有結合について、以下に述べる。（1）リン酸基と正に荷電したアミノ酸側鎖との間の静電的な相互作用。（2）リン酸基、リボースのヒドロキシ基および塩基のアミノ基やイミノ基等と、親水性のアミノ酸側鎖やペプチド結合との間の水素結合。（3）塩基と芳香族アミノ酸側鎖との間のロンドン分散力による結合（スタッキング）。NMP は（1）-（3）によってアクトミオシンと結合することが可能であろう。今回の研究では、NMP の塩基がピリミジンではなく、プリンであることがアクトミオシンの解離に必須であることが示唆されたので、上述した(2)と(3)の結合に関して、プリンとピリミジンの違いに注目すべきである。

（2）の塩基とタンパク質間の水素結合に関して、プリンは 7 位の窒素原子においてタンパク質と水素結合することが可能であろう。他方、ピリミジンは六員複素環式の

構造であるから、これに該当する窒素原子を持っていない。プリンの 7 位の窒素原子とアミノ酸残基が水素結合することによって、プリンはピリミジンよりタンパク質と強く結合する可能性がある。(3)の塩基と芳香族アミノ酸側鎖間の結合に関して、プリンは九員複素環式の構造であるから、六員のピリミジンよりも π電子の数が多いため、複素環における π電子の一時的な分極(非局在化)が生じやすいだろう。この結果、プリンはピリミジンより芳香族アミノ酸側鎖とロンドン分散力によって強く結合する可能性がある。以上から、プリンはピリミジンよりアクトミオシンと強く結合すると推定される。

さらに、ATP はミオシン頭部のその結合部位におけるトリプトファン残基とスタッキングすること(Yoshino ら、1972a、b)、ATP や AMP とトリプトファン分子が形成する複合体の安定性は、熱力学的に同じであること(Morita、1974)が示されている。したがって、AMP、IMP および GMP は、ミオシン頭部に結合する可能性がある。以上のことから、AMP、IMP および GMP によるアクトミオシン解離のメカニズムの 1 つの可能性として、これら PrMP は、ATP と同様に、ミオシン頭部に結合して、ミオシン頭部におけるアクチン結合部位に構造変化が生じた結果、アクチンとミオシンの親和性が低下することを推定した。

しかしながら、PrMP がアクトミオシンのミオシン頭部以外の部位に結合する可能性もある。例えば、アクチンは ATP、ITP あるいは ADP と結合することから、PrMP とも結合するかもしれない。したがって、上述とは異なるアクトミオシン解離のメカニズムも考えられる。AMP、IMP および GMP によるアクトミオシン解離のメカニズムを明らかにするためにはさらなる研究が必要である。

また、Westra ら(2001)は、合成アクトミオシンを使って、アクチン濃度と Mg^{2+}-ATPase 活性の間の正の協同性における V_{max} および解離定数 K_d が、IMP によって減少することを示し、その阻害様式が不競合的であるとした。つまり、通常はアクチンとミオシンがアクトミオシンを形成することによって高い活性が得られるが、IMP は形成されたアクトミオシンに作用して活性を阻害している可能性を示している。彼らはこの原因については明らかにしていない。この結果と Okitani ら(2008)の結果を踏まえると、IMP によるアクトミオシンの Mg^{2+}-ATPase 活性の阻害は、IMP のアクトミオシン解離作用が原因であると示唆される。したがって、Westra ら(2001)の研究結果は、一連の PrMP によるアクトミオシンの解離を支持する結果であろう。

第二章　PrMP による筋原線維タンパク質の抽出～ピロリン酸塩との比較～

2. 1. 目的

ソーセージ製造において、食品添加物として使用されるピロリン酸塩は、食肉中のアクトミオシンをアクチンとミオシンに解離することによってミオシンの抽出性を高めることがわかっている。したがって、Okitani ら（2008）や前章において、アクトミオシンを解離することが明らかにされた AMP、IMP および GMP もピロリン酸塩と同様に、筋原線維タンパク質の抽出性を高めることが考えられる。本章では、アクトミオシン解離能を有する PrMP の中から食品添加物として使用される IMP と GMP を選択し、これらの、0.3-0.5 M NaCl（1.75-2.9%、ソーセージ製造に使用される塩濃度に近い）存在下での、食肉からの筋原線維タンパク質、特にミオシンおよびアクチンの抽出に対する効果を調べた。また、これらの効果をピロリン酸塩の 1 つである KPP と比較した。さらに、それらの効果に対する NaCl 濃度の影響、IMP、GMP あるいは KPP 濃度の影響および抽出時間の影響について検討した。

2. 2. 実験材料および方法

2. 2. 1. 試薬

IMP および GMP は東京化成工業製、KPP は和光純薬工業製を用いた。その他の試薬はすべて特級品を用いた。

2. 2. 2. 試料

市販の豚肉のモモ肉（半膜様筋、内転筋および薄筋）を用いた。脂肪組織および結合組織を取り除き、ミンチとした。

2. 2. 3. 筋原線維タンパク質の抽出

ミンチ（3 g）と 9 倍量の抽出液（27 mL）を 12,000 rpm で 30 秒間ホモジナイズした（Excel Auto、日本精機）。抽出液は 0、9、18 および 36 mM IMP、GMP あるいは 0、1.5、3、6 および 9 mM KPP を含む 0.3、0.4 および 0.5 M NaCl の溶液である。ミンチ肉の塩濃度を 0.2 M と仮定すると（Offer and Knight、1988）、0.3、0.4 および 0.5 M NaCl 溶液を加えたホモジネート中の全 KCl と NaCl を合わせた濃度は、各々0.29、

0.38 および 0.47 M である。ホモジネート中の IMP と KPP の濃度は、抽出液中の濃度の 0.9 倍である。これらの KPP 濃度は今日のソーセージ製造に適用されている濃度である。ホモジナイズ直後のホモジネートの一部を採取して、1 つは pH 測定、もう 1 つは遠心分離（12,000 × g、20 分間）した。遠心分離の操作は、ホモジナイズ後、30 分以内に終えた。この操作を 0 時間抽出とした。残りのホモジネートは 4°C で 12 時間静置した後、同様に遠心分離した。この操作を 12 時間抽出とした。これらの遠心分離処理によって得られた上清に溶解しているタンパク質を抽出されたタンパク質と定義した。上清とホモジネートは、2 倍量の NT-buffer で希釈して、SDS-PAGE に供した。ウェルに供した 10 µL の試料には、74 µg のミンチ肉に由来するタンパク質が含まれる。

2. 2. 4. ホモジネートの pH 測定

試料は 0 時間抽出で得られたホモジネートを採取した。測定にはガラス電極を装着した pH メータ（F-52、堀場製作所社製）を用いた。測定温度は 4°C とした。

2. 2. 5. SDS-PAGE

SDS-PAGE は 10%のゲルを使って Laemmli（1970）の方法に従って行った。定量性および再現性を向上させるため、以下の ATTO 社製の既成品を用いた。ゲルは e-PAGEL E-T 10L、泳動相は AE-1410 EzRun、染色液は AE-1340 EzStain Aqua である。分子量マーカーとしてミオシン重鎖（Mr = 200,000）、β-D-ガラクトシダーゼ（116,000）、BSA（79,000）、カルボニックアンヒドラーゼ II（30,000）、ミオグロビン（17,000）を用いた。

2. 2. 6. デンシトグラフによるミオシンおよびアクチンの定量

デンシトグラフ（AE-6933FXCF、ATTO 社製）およびソフトを使って泳動ゲルにおけるバンドの濃さについてのプロファイルを得て、各バンドに対応するピーク面積を測定した。抽出率は以下の式によって計算した。

$$\text{Extractability (\%)} = D_s / D_h \times 100$$

D_s および D_h は、それぞれ上清およびホモジネートに検出されたミオシン重鎖あるいは

アクチンのピーク面積を表している。

2. 2. 7. 統計処理

ミオシンおよびアクチンの抽出率は、3 回試行の平均値±標準誤差として表した。pH 測定の結果は、3 回試行の平均値を表した。

2. 3. 結果と考察

2. 3. 1. KPP および PrMP を含む抽出液によって調製したホモジネートの pH およびイオン強度

表 1 には、1.5-9 mM KPP、9-36 mM IMP および 9- 36 mM GMP を含むあるいはこれらを含まない 0.3-0.5 M NaCl 溶液によって調製したホモジネートの pH を示した。

KPP および PrMP 無添加の場合、各種 NaCl 濃度での pH は、全て 5.8 であった。

KPP 添加ホモジネートの pH は、0.3 M NaCl の 1.5 mM で 6.5、0.3-0.5 M NaCl の 3 mM で 6.4、0.3-0.5 M NaCl の 6 mM で 6.7-6.8、0.3-0.5 M NaCl の 9 mM で 7.0-7.2 であった。1.5 から 9 mM への KPP 濃度の増加によって pH は上昇したが、6.4-7.2 の範囲での変化であった。

IMP 添加ホモジネートの pH は、0.3-0.5 M NaCl の 9 mM で 6.3、0.3-0.5 M NaCl の 18 mM で 6.5、0.3-0.5 M NaCl の 36 mM で 6.7 であった。9 から 36 mM への IMP 濃度の増加によって pH は増加したが、6.3-6.7 の範囲での変化であった。

GMP 添加ホモジネートの pH は、0.3-0.5 M NaCl の 9 mM で 6.3-6.4、0.3-0.5 M NaCl の 18 mM で 6.7、0.3-0.5 M NaCl の 36 mM で 6.9-7.0 であった。9 から 36 mM への GMP 濃度の増加によって pH は増加したが、6.3-7.0 の範囲での変化であった。以上の結果から、KPP、IMP および GMP 添加ホモジネートにおける pH 変化の範囲は、同程度であったと言える。したがって、次項以降に示す筋原線維タンパク質の抽出は、KPP、IMP および GMP に関わらず、同程度の pH で観察された現象であると言える。

表 2 には、1.5-9 mM KPP、9-36 mM IMP および 9- 36 mM GMP を含むあるいはこれらを含まない 0.3-0.5 M NaCl 溶液によって調製したホモジネートのイオン強度（IS）を示した。この IS は、表 1 に示した各種ホモジネートの pH と KPP、IMP および GMP の pKa を用いて算出した理論値（化学便覧、2004）であり、解離したイオンがタ

表 1　各種抽出液から調製した 0 時間抽出ホモジネートの pH

	KPP or PrMP concentration	NaCl concentration		
		0.3 M	0.4 M	0.5 M
NaCl only	0 mM	5.8	5.8	5.8
KPP	1.5 mM	6.5	----	----
	3 mM	6.4	6.4	6.4
	6 mM	6.8	6.7	6.8
	9 mM	7.2	7.0	7.0
IMP	9 mM	6.3	6.3	6.3
	18 mM	6.5	6.5	6.5
	36 mM	6.7	6.7	6.7
GMP	9 mM	6.4	6.4	6.3
	18 mM	6.7	6.7	6.7
	36 mM	7.0	6.9	6.9

表 2　各種抽出液から調製したホモジネートのイオン強度の理論値

	KPP or PrMP concentration	NaCl concentration		
		0.3 M	0.4 M	0.5 M
NaCl only	0 mM	0.29	0.38	0.47
KPP	1.5 mM	0.30	-----	-----
	3 mM	0.30	0.39	0.48
	6 mM	0.32	0.41	0.50
	9 mM	0.34	0.43	0.52
IMP	9 mM	0.31	0.40	0.49
	18 mM	0.33	0.42	0.51
	36 mM	0.37	0.46	0.55
GMP	9 mM	0.30	0.39	0.48
	18 mM	0.32	0.41	0.50
	36 mM	0.37	0.45	0.54

ンパク質と全く相互作用しなかった場合を示している。

KPP および PrMP 無添加の場合、0.3、0.4 および 0.5 M NaCl での IS は、各々 0.29、0.38 および 0.47 であった。

各種 NaCl 濃度における 1.5-9 mM KPP 添加ホモジネートの IS の範囲は、0.3 M NaCl で 0.30-0.34、0.4 M NaCl で 0.39-0.43、0.5 M NaCl で 0.48-0.52 であった。KPP 添加ホモジネートの IS は、KPP 濃度の増加によって上昇したが、NaCl 濃度の増加による上昇の方が大きかった。

各種 NaCl 濃度における 9-36 mM IMP 添加ホモジネートの IS の範囲は、0.3 M NaCl で 0.31-0.37、0.4 M NaCl で 0.40-0.46、0.5 M NaCl で 0.49-0.55 であった。IMP 添加ホモジネートの IS は、IMP 濃度の増加によって上昇したが、NaCl 濃度の増加による上昇の方が大きかった。

各種 NaCl 濃度における 9-36 mM GMP 添加ホモジネートの IS の範囲は、0.3 M NaCl で 0.30-0.37、0.4 M NaCl で 0.39-0.45、0.5 M NaCl で 0.48-0.54 であった。IMP 添加ホモジネートの IS は、GMP 濃度の増加によって上昇したが、NaCl 濃度の増加による上昇の方が大きかった。以上の結果から、KPP、IMP および GMP 添加ホモジネートにおける IS 変化の範囲は、同程度であったと言える。したがって、次項以降に示す筋原線維タンパク質の抽出は、KPP、IMP および GMP に関わらず、同程度の IS で観察された現象であると言える。

2. 3. 2. KPP によるミオシンおよびアクチン抽出

図 7、8 および 9 には、それぞれ 0-9 mM KPP、0-36 mM IMP および 0-36 mM GMP と 0.4 M NaCl 溶液を用いて抽出されたタンパク質の SDS-PAGE 像を示した。これらのような画像中のミオシン重鎖およびアクチンのバンドの濃さからミオシンおよびアクチンの抽出率を測定した。この項では、IMP および GMP の効果を見るために、比較として用いた KPP によるミオシンおよびアクチン抽出の結果を述べる。結果は図 10 に示した。最初に、各種 NaCl 濃度におけるミオシン抽出の結果(図 10A、B および C)、次にアクチン抽出の結果(図 10D、E および F)を述べる。

0.3 M NaCl 溶液を用いて 12 時間抽出した場合(図 10A)、KPP 無添加での抽出率は 0.3%で、ミオシンはほとんど抽出されないことが示された。1.5 mM KPP での抽出率は 23.4%であった。3 mM KPP での抽出率は、62.5%という高い値が示された。

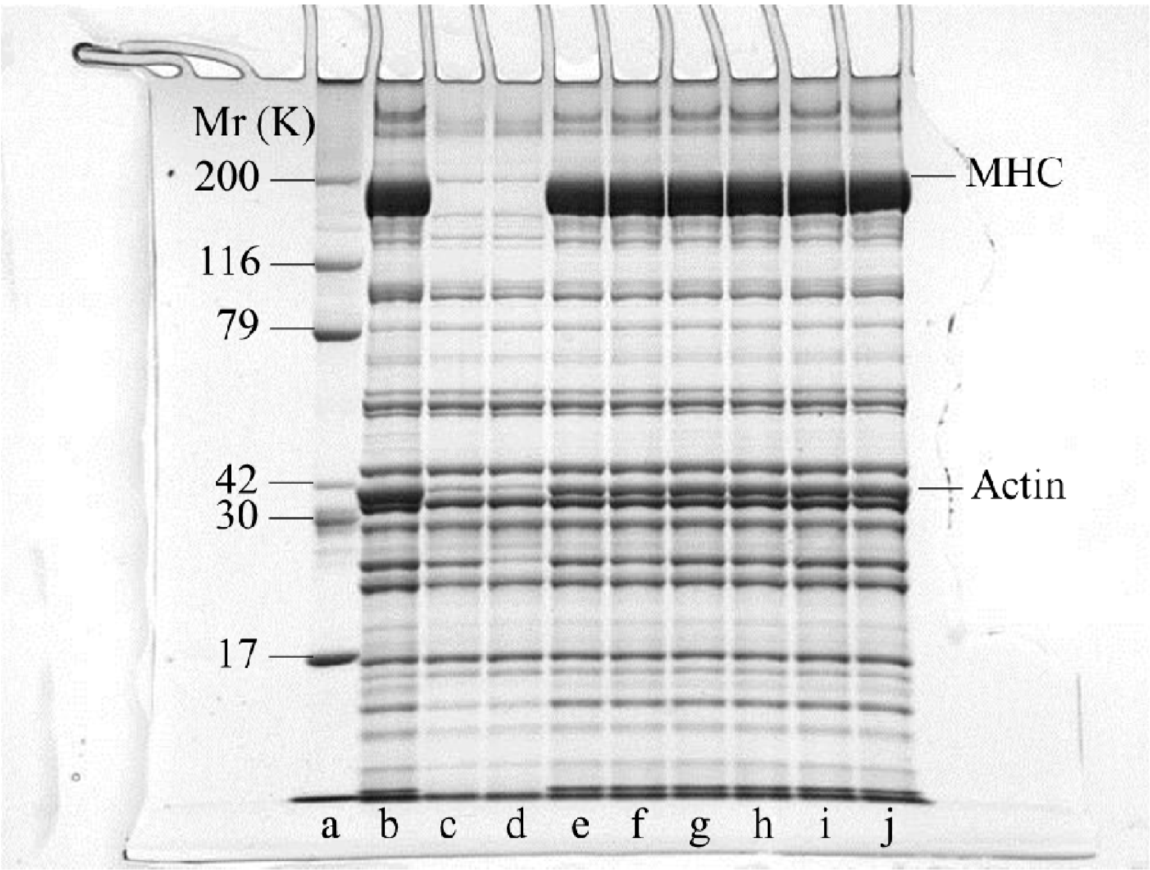


図 7、各種濃度の KPP を含む 0.4 M NaCl 溶液で抽出されたタンパク質の典型的な SDS 電気泳動パターン

ミンチ肉と 9 倍量の抽出液をホモジナイズした。ホモジナイズ後、4°C で 0 と 12 時間インキュベートしたホモジネートを採取して、遠心分離した。得られた上清に溶解しているタンパク質を抽出されたタンパク質と定義した。上清とホモジネートを SDS-PAGE に供した。a、分子量マーカー; b、KPP を含まない 0.4 M NaCl 溶液で 0 時間抽出して得られるホールのホモジネート; c-j、は各種濃度の KPP を含む 0.4 M NaCl 溶液から得られた上清; c、e、g および i、0、3、6 および 9 mM KPP で 0 時間抽出; d、f、h および j、0、3、6 および 9 mM KPP で 12 時間抽出; MHC、ミオシン重鎖

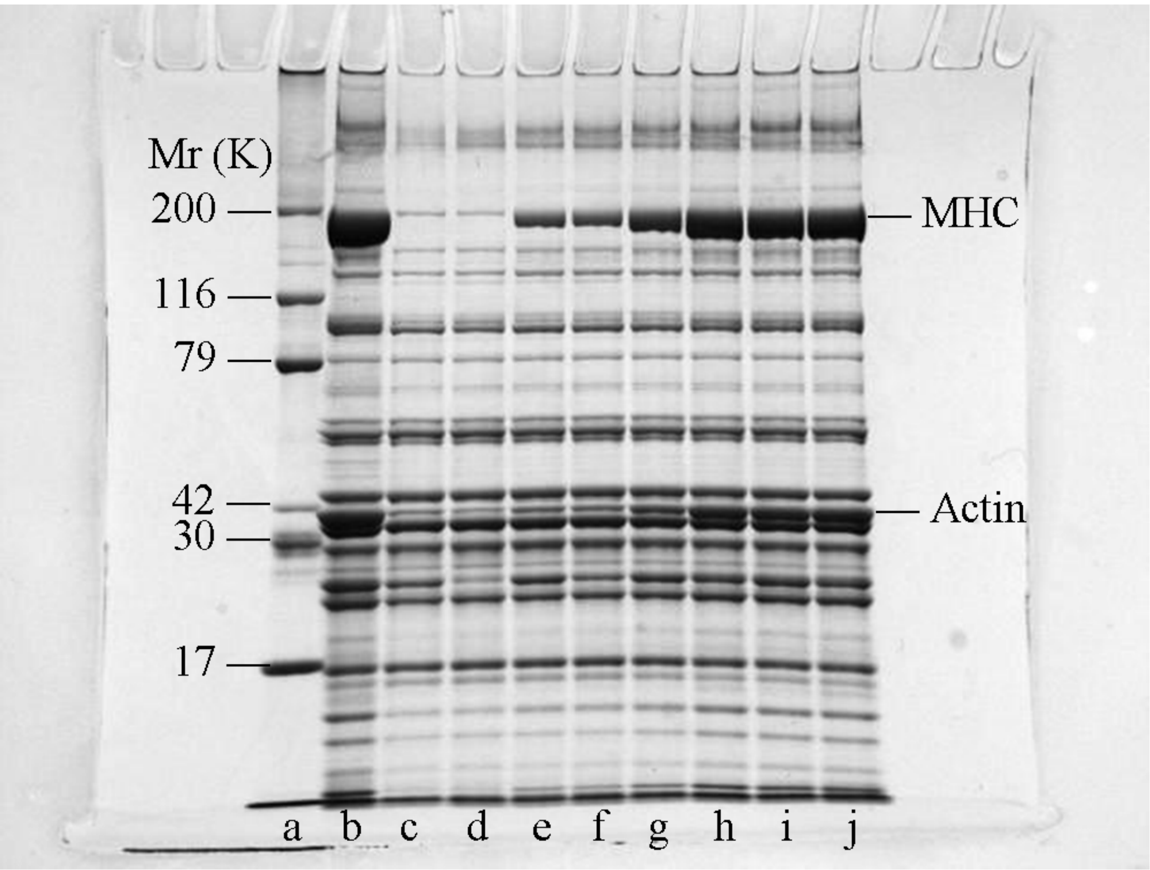


図 8、各種濃度の IMP を含む 0.4 M NaCl 溶液で抽出されたタンパク質の典型的な SDS 電気泳動パターン

ミンチ肉と 9 倍量の抽出液をホモジナイズした。ホモジナイズ後、4°C で 0 と 12 時間インキュベートしたホモジネートを採取して、遠心分離した。得られた上清に溶解しているタンパク質を抽出されたタンパク質と定義した。上清とホモジネートを SDS-PAGE に供した。a、分子量マーカー; b、IMP を含まない 0.4 M NaCl 溶液で 0 時間抽出して得られるホールのホモジネート; c-j、は各種濃度の IMP を含む 0.4 M NaCl 溶液から得られた上清; c、e、g および i、0、9、18 および 36 mM IMP で 0 時間抽出; d、f、h および j、0、9、18 および 36 mM IMP で 12 時間抽出; MHC、ミオシン重鎖

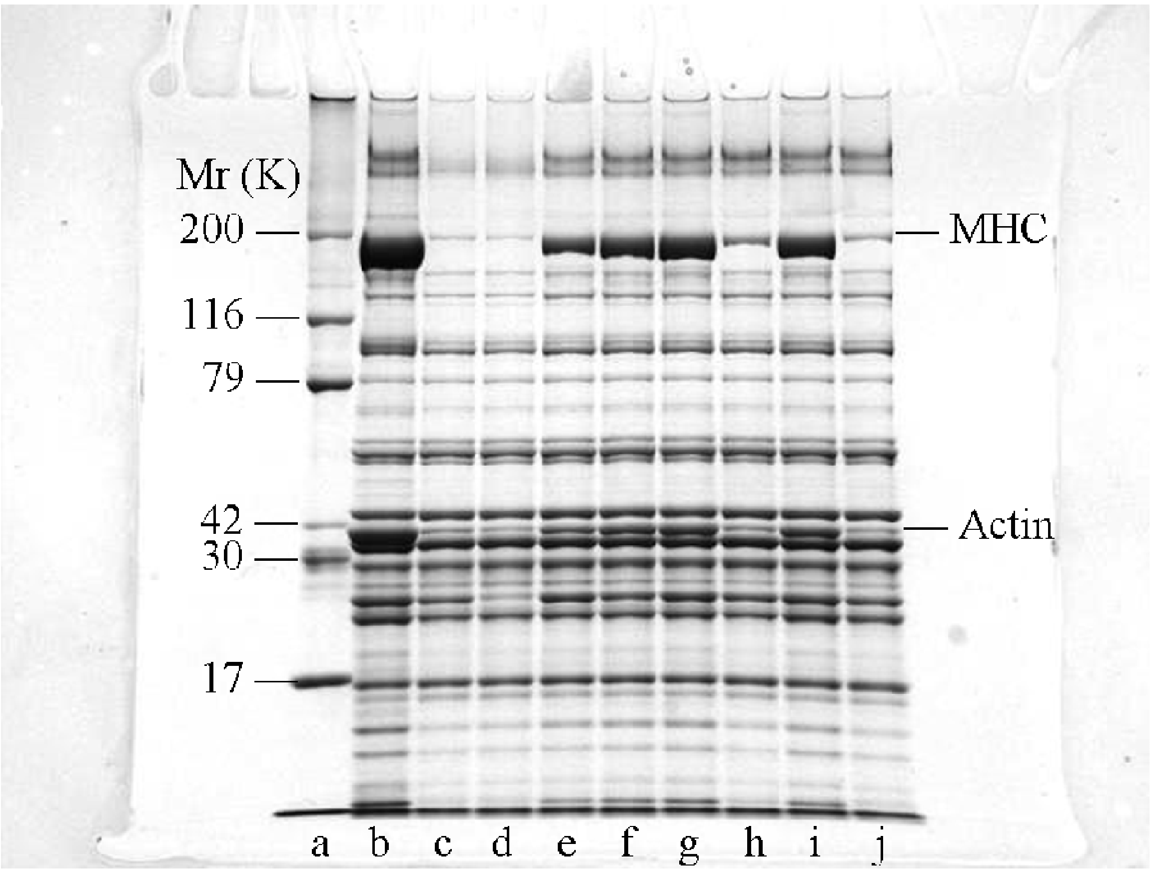


図 9、各種濃度の GMP を含む 0.4 M NaCl 溶液で抽出されたタンパク質の典型的な SDS 電気泳動パターン

ミンチ肉と 9 倍量の抽出液をホモジナイズした。ホモジナイズ後、4°C で 0 と 12 時間インキュベートしたホモジネートを採取して、遠心分離した。得られた上清に溶解しているタンパク質を抽出されたタンパク質と定義した。上清とホモジネートを SDS-PAGE に供した。a、分子量マーカー；b、GMP を含まない 0.4 M NaCl 溶液で 0 時間抽出して得られるホールのホモジネート；c-j、は各種濃度の GMP を含む 0.4 M NaCl 溶液から得られた上清；c、e、g および i、0、9、18 および 36 mM GMP で 0 時間抽出；d、f、h および j、0、9、18 および 36 mM GMP で 12 時間抽出；MHC、ミオシン重鎖

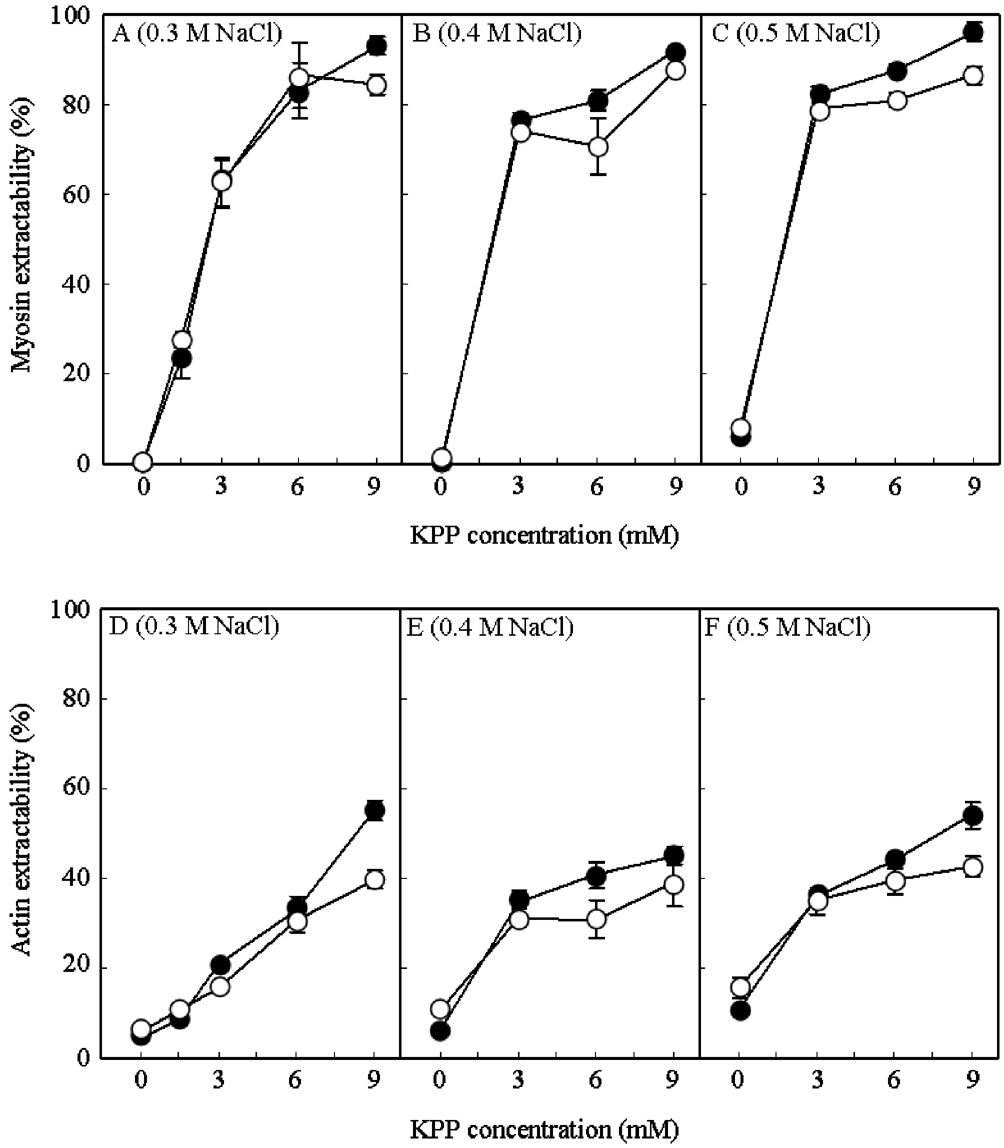


図 10、KPP によるミオシンおよびアクチンの抽出に対する NaCl 濃度、KPP 濃度および抽出時間の影響

ミオシン（A-C）およびアクチン（D-F）の抽出率は、9 倍量の 0、3、6 および 9 mM KPP を含む 0.3（A および D）、0.4（B および E）および 0.5 M（C および F）NaCl 溶液でホモジナイズした豚肉を 4°C で、0（○）および 12 時間（●）インキュベートして測定した。結果は 3 回試行の平均値±標準誤差で表した。他の条件は実験材料および方法で述べられている。

6 mM KPP での抽出率は 83.1%、9 mM KPP では 93.1%にまで達して、ミオシンのほぼ全量が抽出された。KPP 濃度の増加によって、抽出率は増加した。9 mM KPP 添加でのホモジネート中の KPP 濃度は、8.1 mM となる。0.3 M NaCl 中の原料肉に 8 mM KPPを添加するとミオシンのほぼ全量が抽出されることはMoritaら（1983）およびIshiwata ら（1985）によってすでに明らかにされており、本研究の結果はそれと一致した。ちなみにソーセージの製造において一般的に使用されるピロリン酸塩濃度は、8 mM かこれ以下である。0 時間抽出と比較すると、各 KPP 濃度の 12 時間抽出における抽出率は、0 時間抽出のそれとほとんど同じ値を示した。

0.4 M NaCl 溶液を用いて 12 時間抽出した場合（図 10B）、KPP 無添加での抽出率は 0.5%で、0.3 M NaCl 溶液と同様に、ミオシンはほとんど抽出されなかった。3、6 および 9 mM KPP での抽出率は、各々76.5、81.0 および 92.0%であり、3 mM という低い濃度でも高い抽出率を示した。いずれの値も 0.3 M NaCl 溶液を用いた場合と同程度であり、NaCl 濃度の増加は抽出率に影響しなかった。KPP 濃度の増加によって、抽出率は増加した。0 時間抽出と比較すると、各 KPP 濃度の 12 時間抽出における抽出率は、0 時間抽出のそれとほとんど同じ値を示した。

0.5 M NaCl 溶液を用いて 12 時間抽出した場合（図 10C）、KPP 無添加では、抽出率は 6.4%でミオシンはわずかに抽出され、0.4 M NaCl 溶液の場合よりも高かった。Ishiwata ら（1985）は、筋肉中の太いフィラメントの脱重合に対する KCl 濃度（0.1-0.6 M）の影響を調べており、0.5 M KCl で太いフィラメントがわずかに脱重合することを示した。この太いフィラメントの脱重合は、筋原線維において細いフィラメントとオーバーラップしていない H 帯で生じると考えられている。本研究でも、同様の現象が起きたのであろう。3、6 および 9 mM KPP での抽出率は、各々76.5、81.0 および 92.0%であり、3 mM という低い濃度でも高い抽出率を示した。いずれの値も 0.3 M NaCl 溶液を用いた場合と同程度であり、NaCl 濃度の増加は抽出率に影響しなかった。KPP 濃度の増加によって、抽出率は増加した。0 時間抽出と比較すると、各 KPP 濃度の 12 時間抽出における抽出率は、0 時間抽出のそれとほとんど同じ値を示した。0.3 と 0.4 M NaCl 溶液の場合と同様に、0 時間抽出から高い値が得られ、抽出時間延長の効果が発現する余地がほとんどないことが示された。

以上の結果から、KPP がミオシンの抽出を高めることが確認された。NaCl 濃度を0.3 から0.5 Mに上げることは、抽出率を増加させなかった。ミオシンは0.3 M NaCl

で十分に抽出された。KPP 濃度の増加によって抽出率が増加した。この原因の 1 つは、1.5-9 mM の範囲での KPP 濃度の増加によって解離されるアクトミオシンが増加したためであろう。Morita ら（1983）も同様の結果を示している。抽出時間の延長は、抽出率を増加させなかった。このことは筋原線維中のミオシンがアクチンから解離され、続いて筋原線維外に溶出するという現象が短時間で完了していることを示している。Higuchi ら（1985）は、10 mM のピロリン酸塩、0.4-0.5 M KCl の条件下での、筋線維における太いフィラメントが、最初の 5 分間でほとんど脱重合することを示している。

アクチン抽出の結果は、図 10D、E および F に示した。0.3 M NaCl 溶液を用いて 12 時間抽出した場合（図 10D）、KPP 無添加での抽出率は 4.6%で、アクチンはほとんど抽出されないことが示された。1.5、3、6 および 9 mM KPP 添加での抽出率は、各々 8.6、20.7、33.1 および 55.0%であり、KPP 濃度の増加によって、抽出率は増加した。0 時間抽出と比較すると、各 KPP 濃度の 12 時間抽出における抽出率は、0 時間抽出のそれとほぼ同じ値を示した。

0.4 M NaCl 溶液を用いて 12 時間抽出した場合（図 10E）、KPP 無添加での抽出率は 6.2%で、0.3 M NaCl を用いた場合と同程度であった。3、6 および 9 mM KPP 添加での抽出率は、各々34.5、40.8 および 44.9%であり、3 mM KPP の値は 0.3 M NaCl 溶液を用いた場合より高くなった。KPP 濃度の増加によって抽出率は増加した。0 時間抽出と比較すると、各 KPP 濃度の 12 時間抽出における抽出率は、0 時間抽出のそれとほぼ同じ値を示した。

0.5 M NaCl 溶液を用いて 12 時間抽出した場合（図 10F）、KPP 無添加での抽出率は 10.5%で、0.4 M NaCl 溶液の場合よりも高かった。この KPP 無添加条件での塩濃度の増加による抽出率の増加は、ミオシン抽出と対応していた。すなわち、筋原線維において、細いフィラメントと太いフィラメントがオーバーラップした部分でもわずかにアクチンおよびミオシンが抽出されたと考えられる。3、6 および 9 mM KPP 添加での抽出率は、いずれも 0.4 M NaCl の場合とほぼ同じ値を示し、NaCl 濃度の増加は抽出率を増加させなかった。0 時間抽出と比較すると、各 KPP 濃度の 12 時間抽出における抽出率は、0 時間抽出とほぼ同じ値を示した。

以上の結果から、KPP がアクチンの抽出を高めることが確認された。KPP によるアクチンの抽出において、NaCl 濃度を 0.3 から 0.5 M に上げることは、抽出率を増加させなかった。KPP 濃度の増加によって抽出率が増加したことは、新たな知見である。

この原因の 1 つは、ミオシン抽出の場合と同様に、1.5-9 mM の範囲での KPP 濃度の増加によって解離されるアクトミオシンが増加したためであろう。抽出時間の延長は、抽出率を増加させなかった。これは、筋原線維中のアクチンがミオシンから解離され、続いて筋原線維外に溶出するという現象が短時間で完了していることを示している。以上の KPP によるアクチン抽出に対する NaCl 濃度、KPP 濃度および抽出時間の影響は、ミオシン抽出と同じ傾向を示した。

本研究の条件におけるミオシンおよびアクチン抽出は、KPP 濃度に依存していた。ミオシンはほとんどが抽出されたのに対して、アクチンは最大でも 50%程度の抽出であったことは、筋原線維において存在する形態が異なるためであろう。

2. 3. 3. IMP によるミオシンおよびアクチンの抽出

IMP によるミオシン抽出の結果を図 11A、B および C に示した。0.3 M NaCl 溶液を用いて 12 時間抽出した場合(図 11A)、9 mM IMP での抽出率は、2.1%という低い値であった。このときのホモジネート中の IMP 濃度は、8.1 mM となる。したがって、8 mM IMP(と畜後の肉中最大値)を含む原料肉をそのまま 0.3 M NaCl 中に移しても、その IMP による効果は現れないとみられる。18 mM IMP での抽出率も 4.7%という低い値のままであったが、36 mM IMP では、29.7%という高い抽出率が示された。IMP 濃度の増加によって抽出率は増加し、18 から 36 mM IMP への増加で顕著に現れた。0 時間抽出と比較すると、9 あるいは 18 mM IMP の 12 時間抽出における抽出率は、0 時間抽出のそれとほとんど同じ値を示した。36 mM IMP の 12 時間抽出における抽出率は、0 時間抽出のそれより高い値を示した。したがって、0.3 M NaCl、36 mM IMP の条件では、抽出時間の延長は効果的であった。

0.4 M NaCl 溶液を用いて 12 時間抽出した場合(図 11B)、9、18 および 36 mM IMP での抽出率は、各々16.0、58.3 および 66.6%であった。IMP 濃度の増加によって、抽出率は増加した。この効果は 9 から 18 mM IMP への増加で顕著に現れた。いずれの値も 0.3 M NaCl 溶液を用いた場合より著しく高く、NaCl 濃度の 0.3 から 0.4 M への増加は抽出率を上昇させた。0 時間抽出と比較すると、9 mM IMP の 12 時間抽出における抽出率は、0 時間抽出のそれとほとんど同じ値を示した。しかし、18 および 36 mM IMP の 12 時間抽出における抽出率は、0 時間抽出のそれより高い値を示した。したがって、0.4 M NaCl、18 および 36 mM IMP の条件では、抽出時間の延長は効果

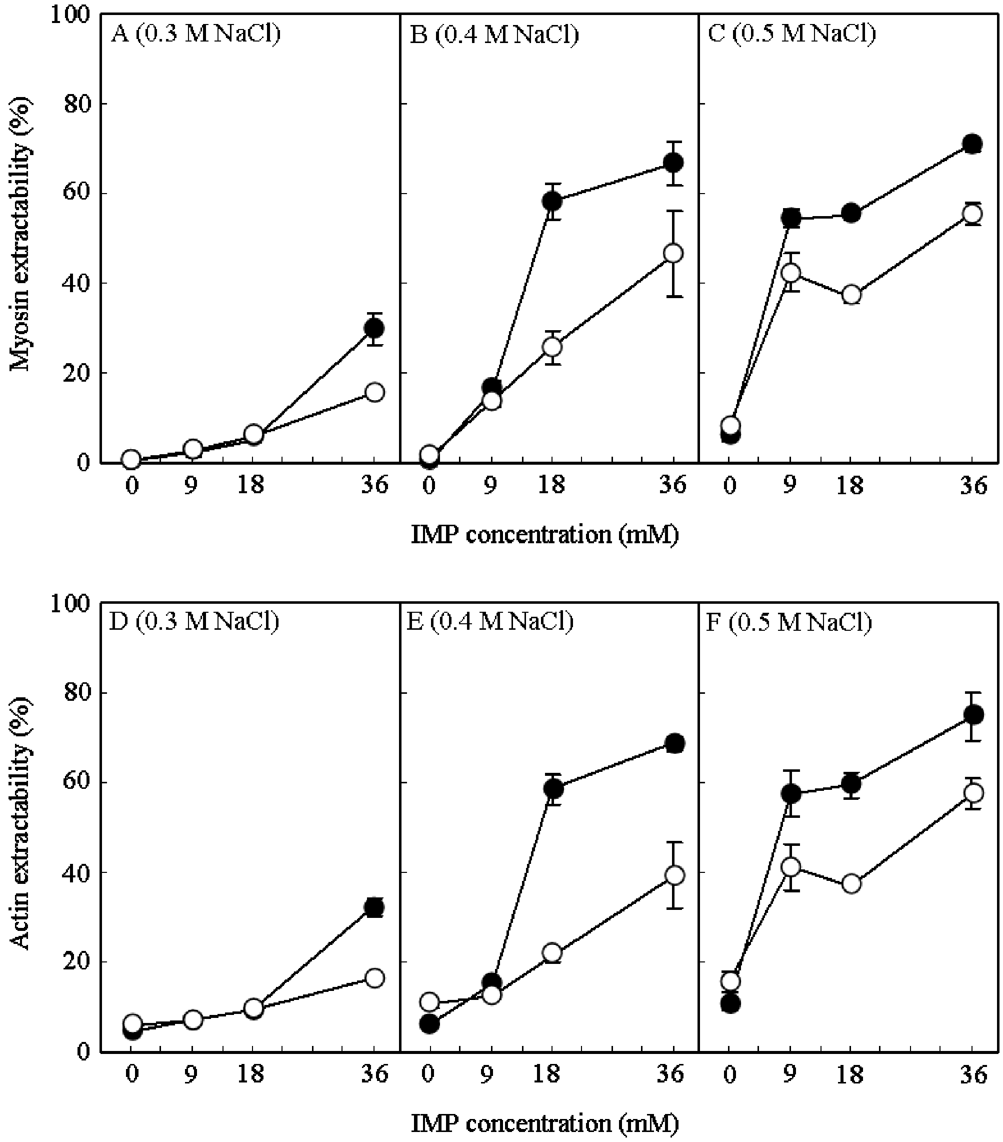


図 11、IMP によるミオシンおよびアクチンの抽出に対する NaCl 濃度、IMP 濃度および抽出時間の影響

ミオシン（A-C）およびアクチン（D-F）の抽出率は、9 倍量の 0、9、18 および 36 mM IMP を含む 0.3（A および D）、0.4（B および E）および 0.5 M（C および F）NaCl 溶液でホモジナイズした豚肉を 4°C で、0（○）および 12 時間（●）インキュベートして測定した。結果は 3 回試行の平均値±標準誤差で表した。他の条件は実験材料および方法で述べられている。

的であった。

0.5 M NaCl 溶液を用いて 12 時間抽出した場合（図 11C）、9、18 および 36 mM IMP での抽出率は、各々54.4、55.1 および 71.1%であった。IMP 濃度の増加によって、抽出率は増加した。この効果は 18 から 36 mM IMP への増加で顕著に現れた。NaCl 濃度の 0.4 から 0.5 M への増加は、9 mM IMP でのみ抽出率を上昇させた。0 時間抽出と比較すると、各 IMP 濃度の 12 時間抽出における抽出率は、0 時間抽出のそれより高い値を示した。したがって、0.5 M NaCl では、全ての IMP 濃度において抽出時間の延長は効果的であった。

以上の結果から、IMP は豚肉からのミオシンの抽出性を高めることが明らかとなった。これは IMP のアクトミオシンの解離作用に起因すると考えられる。NaCl 濃度を 0.3 から 0.5 M に上げることは、抽出率の増加に効果的であった。この傾向は、KPP の場合と異なった。例えば、0.3 M NaCl（IS≒0.3）の条件で、KPP は 90%以上のミオシンを抽出したが、IMP では 30%程度のミオシンしか抽出しなかった。そして、NaCl 濃度を 0.5 M（IS≒0.5）に上げることによって、抽出率は 70%程度に達した。このことから、IMP 抽出の場合、イオン強度の増加による塩溶効果が現れたと考えられる。KPP でのミオシン抽出は、比較的低いイオン強度で発現するが、IMP でのミオシン抽出は、比較的高いイオン強度が必要であったことは、注目に値する結果である。

IMP 濃度の増加によって抽出率が増加したことは、KPP の場合と同様であった。また、抽出時間の延長による抽出率の増加効果が認められた。これは筋原線維中のミオシンが IMP によってアクチンから解離され、続いて筋原線維外に約 70%溶出するという現象に 12 時間必要となることを示している。他方、KPP ではこの現象は比較的短時間で完了するようである。すなわち、IMP によるミオシン抽出には、アクトミオシン解離以外の何らかの律速段階があり、KPP はアクトミオシン解離ばかりでなく、その律速段階にも作用していると考えることができる。

IMP と KPP の間にはミオシン抽出における違いが認められ、その違いは NaCl 濃度と抽出時間の影響であった。この違いはピロリン酸塩が有する特別な能力によってもたらされていると推定したが、この推定については第三章および第四章の結果と合わせて議論することとする。続いて、各種 NaCl 濃度におけるアクチン抽出の結果を述べる。

IMP によるアクチン抽出の結果を図 11D、E および F に示した。0.3 M NaCl 溶液

を用いて 12 時間抽出した場合（図 11D）、9 および 18 mM IMP での抽出率は、各々6.9 および 9.2%であった。36 mM IMP では、32.3%という高い抽出率が示された。IMP 濃度の増加によって抽出率は増加し、18 から 36 mM IMP への増加で顕著に現れた。0 時間抽出と比較すると、9 あるいは 18 mM IMP の 12 時間抽出の抽出率は、0 時間抽出のそれとほとんど同じ値を示した。36 mM IMP の 12 時間抽出における抽出率は、0 時間抽出のそれより高い値を示した。0.3 M NaCl、36 mM IMP の条件では、抽出時間の延長は抽出率の増大に効果的であった。こうした IMP 濃度と抽出時間がアクチン抽出に与える影響は、ミオシン抽出のそれと同じであった。

0.4 M NaCl 溶液を用いて 12 時間抽出した場合（図 11E）、9、18 および 36 mM IMP での抽出率は、各々14.9、58.6 および 68.7%であった。IMP 濃度の増加によって、抽出率は増加した。この効果は 9 から 18 mM IMP への増加で顕著に現れた。いずれの値も 0.3 M NaCl 溶液を用いた場合より著しく高く、NaCl 濃度の 0.3 から 0.4 M への増加は抽出率を上昇させた。0 時間抽出と比較すると、9 mM IMP の 12 時間抽出における抽出率は、0 時間抽出のそれとほとんど同じ値を示した。しかし、18 および 36 mM IMP の 12 時間抽出における抽出率は、0 時間抽出のそれより高い値を示した。0.4 M NaCl、18 および 36 mM IMP の条件では、抽出時間の延長は抽出率の増大に効果的であった。こうした IMP 濃度、NaCl 濃度および抽出時間がアクチン抽出に与える影響は、ミオシン抽出のそれと同じであった。

0.5 M NaCl 溶液を用いて 12 時間抽出した場合（図 11F）、9、18 および 36 mM IMP での抽出率は、各々57.4、59.5 および 74.7%であった。IMP 濃度の増加によって、抽出率は増加した。この効果は 18 から 36 mM IMP への増加で顕著に現れた。NaCl 濃度の 0.4 から 0.5 M への増加は、9 mM IMP でのみ抽出率を上昇させた。0 時間抽出と比較すると、各 IMP 濃度の 12 時間抽出における抽出率は、0 時間抽出のそれより高い値を示した。0.5 M NaCl では、全ての IMP 濃度において抽出時間の延長は、抽出率を上昇させた。こうした IMP 濃度、NaCl 濃度および抽出時間がアクチン抽出に与える影響は、ミオシン抽出のそれと同じであった。

以上の結果から、IMP は豚肉からのアクチンの抽出性を高めることが明らかとなった。これは IMP のアクトミオシンの解離作用に起因すると考えられる。IMP 濃度の増加によって抽出率が増加したことは、KPP の場合と同様であった。NaCl 濃度を 0.3 から 0.5 M に上げることは、抽出率の増加に効果的であった。この原因の 1 つは NaCl

濃度(イオン強度)の増加による塩溶効果と考えられるが、KPPとは異なる傾向を示したことは注目すべきことであった。例えば、KPP 抽出における最大抽出率は、抽出時間に関係なく50%程度であったが、IMP 抽出における最大抽出率は、0 および 12 時間抽出で各々50 および 70%程度で、抽出時間に依存して増加した。このことから、IMP 抽出における抽出時間延長の正の効果は、IMP の性質に由来していると考えられる。IMP と KPP の間にはアクチン抽出における違いが認められ、その違いは、ミオシン抽出と同様に、NaCl 濃度と抽出時間の影響であった。IMP と KPP の間のアクチン抽出における違いの理由については、第三章および第四章の結果と合わせて議論することとする。

2. 3. 4. GMP によるミオシンおよびアクチンの抽出

GMP によるミオシン抽出の結果を図 12A、B および C に示した。0.3 M NaCl 溶液を用いて12時間抽出した場合(図12A)、9、18および36 mM GMPでの抽出率は、各々1.4、0.5 および 2.9%という低い値であった。GMP 濃度の増加は抽出率を増加させなかった。各 GMP 濃度の 12 時間抽出における抽出率は、0 時間抽出のそれより低い値を示した。抽出時間の延長は抽出率を増加させなかった。

0.4 M NaCl 溶液を用いて 12 時間抽出した場合(図 12B)、9 mM GMP 添加での抽出率は、34.8%というかなり高い値が示された。18 および 36 mM GMP での抽出率は、各々7.8 および 9.3%という低い値が示された。GMP 濃度増加の負の効果は、9 から 18 mM への増加で顕著に現れた。いずれの値も 0.3 M NaCl 溶液を用いた場合より高く、NaCl 濃度の 0.3 から 0.4 M への増加は抽出率を増加させた。0 時間抽出と比較すると、9 mM GMP の 12 時間抽出における抽出率は、0 時間抽出のそれより高い値を示したが、18 および 36 mM GMP の 12 時間抽出における抽出率は、0 時間抽出より低い値を示した。つまり、抽出時間の延長は、0.4 M NaCl、9 mM GMP の条件では正の効果を示したが、18 および 36 mM GMP の条件では負の効果を示した。また、0時間抽出におけるGMP濃度の増加は抽出率を上昇させ、12時間抽出とは異なる結果が得られた。したがって、12 時間抽出における抽出率の低下は、抽出時間の延長と GMP 濃度の増加によってもたらされていると考えられる。

0.5 M NaCl 溶液を用いて 12 時間抽出した場合(図 12C)、9、18 および 36 mM GMP 添加での抽出率は、各々55.5、34.3 および 53.9%であった。GMP 濃度増加の負

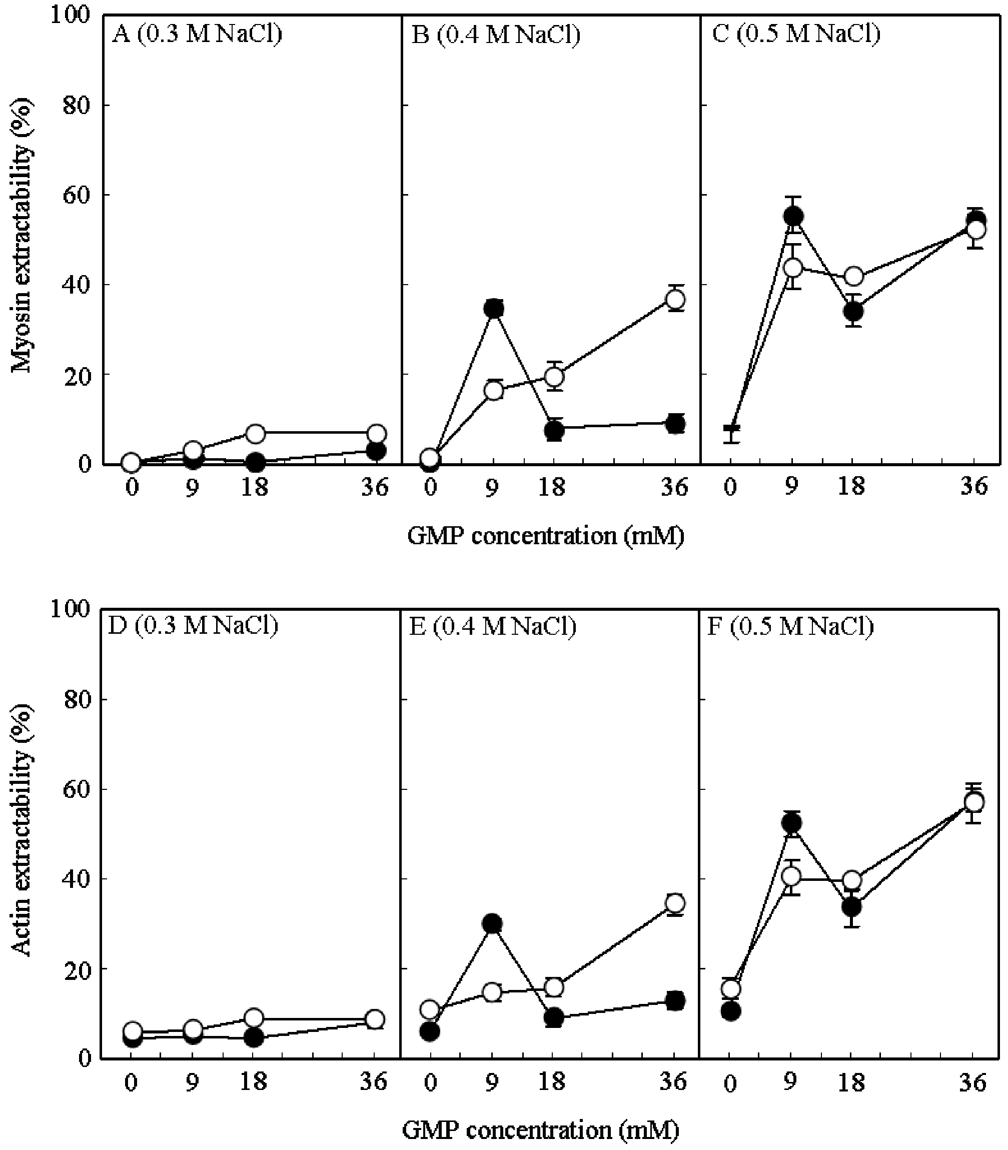


図 12、GMP によるミオシンおよびアクチンの抽出に対する NaCl 濃度、GMP 濃度および抽出時間の影響

ミオシン（A-C）およびアクチン（D-F）の抽出率は、9 倍量の 0、3、6 および 9 mM GMP を含む 0.3（A および D）、0.4（B および E）および 0.5 M（C および F）NaCl 溶液でホモジナイズした豚肉を 4°C で、0（○）および 12 時間（●）インキュベートして測定した。結果は 3 回試行の平均値±標準誤差で表した。他の条件は実験材料および方法で述べられている。

の効果は、9 から 18 mM への増加で現れたが、18 から 36 mM への増加で正の効果が現れた。いずれの値も 0.4 M NaCl 溶液を用いた場合より高く、NaCl 濃度の 0.4 から 0.5 M への増加は抽出率を上昇させた。0 時間抽出と比較すると、9 mM GMP の 12 時間抽出における抽出率は、0 時間抽出のそれより高い値を示した。しかし、18 mM GMP の 12 時間抽出における抽出率は、0 時間抽出のそれより低い値を示し、36 mM GMP の 12 時間抽出における抽出率は、0 時間抽出のそれとほぼ同値を示した。

以上の結果から、GMP は豚肉からのミオシンの抽出性を高めることが明らかとなった。これは GMP のアクトミオシンの解離作用に起因すると考えられる。NaCl 濃度を 0.3 から 0.5 M に上げることは、抽出率の増加に効果的であった。この傾向は、IMP と同様であり、KPP とは異なった。GMP 濃度の増加および抽出時間の延長による負の効果は、IMP や KPP では認められない注目すべき現象であった。この負の効果は 0.4 から 0.5 M への NaCl 濃度の増加によって緩和された。0 時間抽出では、GMP 濃度の増加によって抽出率が増加したことは、IMP や KPP と同様であった。したがって、NaCl 濃度の影響は IMP と同様であるが、抽出時間と PrMP 濃度の影響は、IMP との間に違いが認められた。

GMP によるアクチン抽出の結果を図 12D、E および F に示した。0.3 M NaCl 溶液を用いて 12 時間抽出した場合（図 12D）、9、18 および 36 mM GMP での抽出率は、各々4.7、4.6 および 8.2%という低い値であった。つまり、GMP 濃度の増加は抽出率に影響を与えなかった。各 GMP 濃度の 12 時間抽出における抽出率は、0 時間抽出のそれより低い値を示した。つまり、抽出時間の延長は抽出率を減少させた。こうしたアクチン抽出の様相は、ミオシン抽出と同じであった。

0.4 M NaCl 溶液を用いて 12 時間抽出した場合（図 12E）、9 mM GMP 添加での抽出率は、29.6%というかなり高い値が示された。18 および 36 mM GMP での抽出率は、各々8.7 および 12.9%という低い値が示された。GMP 濃度増加の負の効果は、9 から 18 mM への増加で顕著に現れた。いずれの値も 0.3 M NaCl 溶液を用いた場合より高く、NaCl 濃度の 0.3 から 0.4 M への増加は、抽出率の増加に効果的であった。0 時間抽出と比較すると、9 mM GMP の 12 時間抽出における抽出率は、0 時間抽出のそれより高い値を示したが、18 および 36 mM GMP の 12 時間抽出における抽出率は、0 時間抽出より低い値を示した。抽出時間の延長は、0.4 M NaCl、9 mM GMP の条件で抽出率の増加を示したが、18 および 36 mM GMP の条件では抽出率の低下を

示した。また、0 時間抽出における GMP 濃度の増加は抽出率を上昇させ、12 時間抽出とは異なる結果が得られた。したがって、12 時間抽出における抽出率の低下は、抽出時間の延長と GMP 濃度の増加によってもたらされていると考えられる。こうしたアクチン抽出の様相は、ミオシン抽出と同じであった。

0.5 M NaCl 溶液を用いて 12 時間抽出した場合（図 12F）、9、18 および 36 mM GMP 添加での抽出率は、各々52.2、33.5 および 57.5%であった。GMP 濃度増加の負の効果は、9 から 18 mM への増加で現れたが、18 から 36 mM への増加で正の効果が現れた。いずれの値も 0.4 M NaCl 溶液を用いた場合より高く、NaCl 濃度の 0.4 から 0.5 M への増加は抽出率を増加させた。0 時間抽出と比較すると、9 mM GMP の 12 時間抽出における抽出率は、0 時間抽出のそれより高い値を示した。しかし、18 mM GMP の 12 時間抽出における抽出率は、0 時間抽出のそれより低い値を示し、36 mM GMP の 12 時間抽出における抽出率は、0 時間抽出のそれとほぼ同値を示した。こうしたアクチン抽出の様相は、ミオシン抽出と同じであった。

以上の結果から、GMP は豚肉からのアクチンの抽出性を高めることが明らかとなった。これは GMP のアクトミオシンの解離作用に起因すると考えられる。NaCl 濃度を 0.3 から 0.5 M に上げることは、抽出率の増加に効果的であった。この傾向は、IMP と同様であり、KPP とは異なった。GMP 濃度の増加および抽出時間の延長による負の効果は、IMP や KPP では認められない注目すべき現象であった。この負の効果は 0.4 から 0.5 M への NaCl 濃度の増加によって緩和された。0 時間抽出では、GMP 濃度の増加によって抽出率が増加したことは、IMP や KPP と同様であった。したがって、NaCl 濃度の影響は IMP と同様であるが、抽出時間と PrMP 濃度の影響は、IMP との間に違いが認められた。こうしたアクチン抽出の様相が、ミオシン抽出と同じであったことは、IMP と同様であった。

今回、GMP はミオシンとアクチンの抽出率を高める作用を有していることが明らかになったが、その反面、GMP 濃度の増加と抽出時間の延長は、抽出率を低下させる場合があったことも明らかになった。この抽出率の低下の原因について議論したい。

第一に、この現象は 0 時間抽出で GMP 濃度を上げても生じないが、12 時間抽出で GMP 濃度を上げたときに生じた。このことから、12 時間抽出でミオシンおよびアクチンが抽出されないという現象ではなく、抽出された両タンパク質が 0 から 12 時間

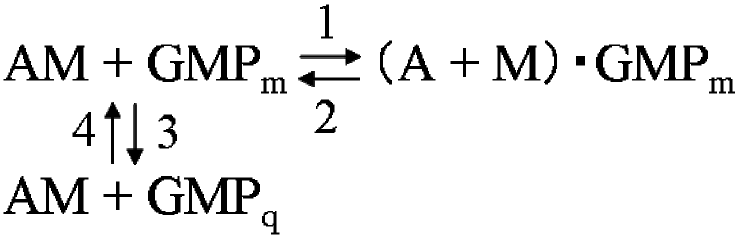
の時間経過で何らかの変化を起こしたという現象であろう。そしてこの変化に GMP 濃度の増加が関与していると考えられる。

第二に、抽出率測定に用いた試料は、各抽出時間のホモジネートを遠心分離した上清であるから、上清に溶解したタンパク質は抽出されたと判断している。したがって、0 時間では上清に溶解されていたタンパク質が、12 時間後には上清に溶解されなくなり、遠心分離によって沈殿した現象であると考えられる。

第三に、0-36 mM GMP を含む 0.4 M NaCl における SDS-PAGE 像（図 9）について、抽出時間延長の負の効果が現れた 18 mM GMP における 0 と 12 時間抽出のバンド（図 9 g と h）を比較すると、抽出時間の延長によってバンドの濃さが減少するのは、ミオシン重鎖とアクチンのみであり、その他のバンドは、抽出時間の延長によって変化しなかった。36 mM GMP（図 9 i と j）でも同様の結果が得られた。すなわち、ミオシンとアクチンに特異的に生じる現象であると考えられる。

第四に、筋原線維タンパク質の抽出のために調製した GMP を含む NaCl 溶液を 4°C に置いていたところ、この溶液がゲル化する現象を認めた。この現象は、GMP が環状の四量体（G-カルテット）を形成することによって生じたゲルであると考えられる（Davis、2004）。この G-カルテットは、GMP 分子におけるグアニンが、他分子のグアニンと水素結合することによって形成され、G-カルテットの中心にカチオンを抱えるような形をとることによって安定化する。

したがって、GMP 存在下で、上清に溶解していたミオシンとアクチンが、時間の経過とともに溶解されなくなる現象は、GMP が G-カルテットを形成する性質によって生じたのかもしれない。GMP 抽出におけるアクトミオシンと GMP の間の平衡関係および GMP の単量体と四量体（G-カルテット）の間の平衡関係をスキーム 1 に示した。このスキームにおける反応 1 および 2 は、単量体の GMP がアクトミオシンを解離する平衡関係を示しており、反応 3 および 4 は、単量体の GMP と G-カルテットの間の平衡関係を示している。12 時間抽出の間に G-カルテットが形成された場合（反応 3 が進行した場合）、溶液中の GMP_m は減少することから、アクトミオシンの解離の平衡関係は反応 2 へとシフトするだろう。すなわち、アクトミオシンから GMP が解離し、最終的には GMP によって解離していたアクチンとミオシンはアクトミオシンを形成すると考えられる。したがって、GMP 抽出における抽出時間延長の負の効果は、GMP の四量体の形成に起因し、GMP によって解離していたミオシンとアクチンがアクトミオシンを形



スキーム 1、GMP 抽出におけるアクトミオシンと GMP の間の平衡関係および GMP の単量体と 4 量体（G-カルテット）の間の平衡関係

AM；アクトミオシン、GMP_m；単量体の GMP、A；アクチン、M；ミオシン、

（A+M）・GMP_m；GMP と結合して解離したアクトミオシン、

GMP_q；4 量体の GMP（G-カルテット）

成することと推定した。そして、0.4 から 0.5 M への NaCl 濃度の増加によって、この負の効果が抑制されたのは、塩溶効果によって 4 量体の形成が抑制された、あるいは再度形成されたアクトミオシンがそのイオン強度（IS≒0.5）によって溶解されたことなどが考えられるだろう。

第三章　PrMP と KPP の併用による筋原線維タンパク質の抽出

3. 1. 目的

前章の結果から、IMP と GMP は筋原線維タンパク質の抽出性を高めることが明らかになった。そしてこの現象は IMP と GMP が有するアクトミオシンの解離作用に起因すると推定した。他方、IMP、GMP あるいはピロリン酸塩による筋原線維タンパク質の抽出様式は異なり、筋原線維タンパク質の抽出性に対する NaCl 濃度や抽出時間の影響に違いが認められた。このことから、IMP、GMP およびピロリン酸塩は、アクトミオシンの解離作用については共通しているが、筋原線維タンパク質の抽出性については、異なる性質を有していると考えられる。本章では、食肉からの筋原線維タンパク質の抽出性が異なる IMP あるいは GMP とピロリン酸塩を併用して、筋原線維タンパク質の抽出を試み、筋原線維タンパク質の抽出に対する各種併用効果を検討した。この併用効果の検討は、なるべく少ない KPP で優れた物性のソーセージを製造する可能性を追求するための基礎実験としての意味も有している。

3. 2. 実験材料および方法

3. 2. 1. 試薬

IMP および GMP は東京化成工業製、KPP は和光純薬工業製を用いた。その他の試薬はすべて特級品を用いた。

3. 2. 2. 試料

市販の豚肉のモモ肉（半膜様筋、内転筋および薄筋）を用いた。脂肪組織および結合組織を取り除き、ミンチとした。

3. 2. 3. 筋原線維タンパク質の抽出

ミンチ（3 g）と 9 倍量の抽出液（27 mL）を 12,000 rpm で 30 秒間ホモジナイズした（Excel Auto、日本精機）。抽出液は 0、9、18 および 36 mM IMP あるいは GMP と 1.5 あるいは 3 mM KPP を含む 0.3 M NaCl の混合溶液である。ミンチ肉の塩濃度を 0.2 M と仮定すると（Offer and Knight、1988）、0.3 M NaCl 溶液を加えたホモジネート中の全 KCl と NaCl を合わせた濃度は、各々0.29 M である。ホモジネート中の IMP、GMP

および KPP の濃度は、抽出液中の濃度の 0.9 倍である。ホモジナイズ直後のホモジネートの一部を採取して、1 つは pH 測定、もう 1 つは遠心分離（12,000×*g*、20 分間）した。遠心分離の操作は、ホモジナイズ後、30 分以内に終えた。この操作を 0 時間抽出とした。残りのホモジネートは 4°C で 12 時間静置した後、同様に遠心分離した。この操作を 12 時間抽出とした。これらの遠心分離処理によって得られた上清に溶解しているタンパク質を抽出されたタンパク質と定義した。上清とホモジネートは、2 倍量の NT-buffer で希釈して、SDS-PAGE に供した。ウェルに供した 10 µL の試料には、74 µg のミンチ肉に由来するタンパク質が含まれる。

3. 2. 4. ホモジネートの pH 測定

試料は 0 時間抽出で得られたホモジネートを採取した。測定にはガラス電極を装着した pH メータ（F-52、堀場製作所社製）を用いた。測定温度は 4°C とした。

3. 2. 5. SDS-PAGE

SDS-PAGE は 10%のゲルを使って Laemmli（1970）の方法に従って行った。定量性および再現性を向上させるため、以下の ATTO 社製の既成品を用いた。ゲルは e-PAGEL E-T 10L、泳動相は AE-1410 EzRun、染色液は AE-1340 EzStain Aqua である。

3. 2 .6. デンシトグラフによるミオシンおよびアクチンの定量

デンシトグラフ（AE-6933FXCF、ATTO 社製）およびソフトを使って泳動ゲルにおけるバンドの濃さについてのプロファイルを得て、各バンドに対応するピーク面積を測定した。抽出率は以下の式によって計算した。

$$\text{Extractability (\%)} = D_s / D_h \times 100$$

D_sおよびD_hは、それぞれ上清およびホモジネートに検出されたミオシン重鎖あるいはアクチンのピーク面積を表している。

3. 2. 7. 統計処理

ミオシンおよびアクチンの抽出率は、3 回試行の平均値±標準誤差として表した。pH 測定の結果は、3 回試行の平均値を表した。

3. 3. 結果と考察

3. 3. 1. KPP と PrMP の混合抽出液によって調製したホモジネートの pH およびイオン強度

表 3 には、1.5-3 mM KPP と 9-36 mM IMP を含む 0.3 M NaCl 溶液によって調製したホモジネートの pH を示した。

1.5 mM KPP と各種濃度の IMP を添加したホモジネートの pH は、9 mM で 6.8、18 mM で 7.0、36 mM で 7.1 であった。9 から 36 mM への IMP 濃度の増加によって pH は上昇したが、6.8-7.1 の範囲での変化であった。

3 mM KPP と各種濃度の IMP を添加したホモジネートの pH は、9 mM で 7.0、18 mM で 7.2、36 mM で 7.3 であった。9 から 36 mM への IMP 濃度の増加によって pH は上昇したが、7.0-7.3 の範囲での変化であった。また、各種 IMP 濃度における KPP 濃度増加によって、pH は 0.2 ユニット増加した。

表 4 には、1.5-3 mM KPP と 9-36 mM GMP を含む 0.3 M NaCl 溶液によって調製したホモジネートの pH を示した。

1.5 mM KPP と各種濃度の GMP を添加したホモジネートの pH は、9 mM で 6.8、18 mM で 7.0、36 mM で 7.3 であった。9 から 36 mM への GMP 濃度の増加によって pH は上昇したが、6.8-7.3 の範囲での変化であった。

3 mM KPP と各種濃度の GMP を添加したホモジネートの pH は、9 mM で 7.1、18 mM で 7.3、36 mM で 7.4 であった。9 から 36 mM への GMP 濃度の増加によって pH は上昇したが、7.1-7.4 の範囲での変化であった。また、各種 GMP 濃度における KPP 濃度増加によって、pH はわずかに増加したが最大で 0.3 ユニットの増加であった。以上の結果から、KPP と IMP あるいは KPP と GMP を添加したホモジネートにおける pH 変化の範囲は、同程度であった。したがって、次項以降に示す筋原線維タンパク質の抽出性は、KPP、IMP および GMP に関わらず、同程度の pH で観察された現象であると言える。

表 5 には、1.5-3 mM KPP と 9-36 mM IMP を含む 0.3 M NaCl 溶液によって調製したホモジネートのイオン強度（IS）を示した。この IS は、表 3 に示した各種ホモジネー

表 3　KPP と IMP の混合抽出液から調製した 0 時間抽出ホモジネートの pH

		IMP concentration		
		9 mM	18 mM	36 mM
KPP concentration	1.5 mM	6.8	7.0	7.1
	3 mM	7.0	7.2	7.3

表4　KPPとGMPの混合抽出液から調製した0時間抽出ホモジネートのpH

		GMP concentration		
		9 mM	18 mM	36 mM
KPP concentration	1.5 mM	6.8	7.0	7.3
	3　mM	7.1	7.3	7.4

表 5 KPP と IMP の混合抽出液から調製した 0 時間抽出ホモジネートのイオン強度の理論値

		IMP concentration		
		9 mM	18 mM	36 mM
KPP concentration	1.5 mM	0.32	0.34	0.39
	3 mM	0.33	0.35	0.40

トの pH と KPP および IMP の pKa を用いて算出した理論値（化学便覧、2004）であり、解離したイオンがタンパク質などと全く相互作用しなかった場合を示している。

1.5 mM KPP と各種濃度の IMP を添加したホモジネートの IS は、9 mM で 0.32、18 mM で 0.34、36 mM で 0.39 であった。9 から 36 mM への IMP 濃度の増加によって IS は上昇したが、0.32-0.39 の範囲での変化であった。

3 mM KPP と各種濃度の IMP を添加したホモジネートの IS は、9 mM で 0.33、18 mM で 0.35、36 mM で 0.40 であった。9 から 36 mM への IMP 濃度の増加によって IS は上昇したが、0.33-0.40 の範囲での変化であった。また、各種 IMP 濃度における KPP 濃度増加によって、IS はわずかに増加した。

表 6 には、1.5-3 mM KPP と 9-36 mM GMP を含む 0.3 M NaCl 溶液によって調製したホモジネートの IS を示した。この IS は、先と同様に表 4 に示した各種ホモジネートの pH と KPP および GMP の pKa を用いて算出した理論値（化学便覧、2004）である。

1.5 mM KPP と各種濃度の GMP を添加したホモジネートの IS は、9 mM で 0.32、18 mM で 0.34、36 mM で 0.38 であった。9 から 36 mM への GMP 濃度の増加によって IS は上昇したが、0.32-0.38 の範囲での変化であった。

3 mM KPP と各種濃度の IMP を添加したホモジネートの IS は、9 mM で 0.33、18 mM で 0.35、36 mM で 0.40 であった。9 から 36 mM への GMP 濃度の増加によって IS は上昇したが、0.33-0.40 の範囲での変化であった。また、各種 GMP 濃度における KPP 濃度増加によって、IS はわずかに増加した。以上の結果から、KPP と IMP あるいは KPP と GMP を添加したホモジネートにおける IS の変化の範囲は、同程度であった。したがって、次項以降に示す筋原線維タンパク質の抽出は、KPP、IMP および GMP に関わらず、同程度の IS で行われている。したがって、次項以降に示す筋原線維タンパク質の抽出性は、KPP、IMP および GMP に関わらず、同程度の IS で観察された現象であると言える。

3. 3. 2. KPP と IMP の混合抽出液によるミオシンおよびアクチンの抽出

図 13 には 1.5-3 mM KPP と 0-36 mM IMP を含む 0.3 M NaCl 溶液を用いて抽出されたミオシンの抽出率を示した。

1.5 mM KPP で 0 時間抽出した場合（図 13A）、1.5 mM KPP 単独での抽出率は

表 6　KPP と GMP の混合抽出液から調製した 0 時間抽出ホモジネートのイオン強度の理論値

		GMP concentration		
		9 mM	18 mM	36 mM
KPP concentration	1.5 mM	0.32	0.34	0.38
	3　mM	0.33	0.35	0.40

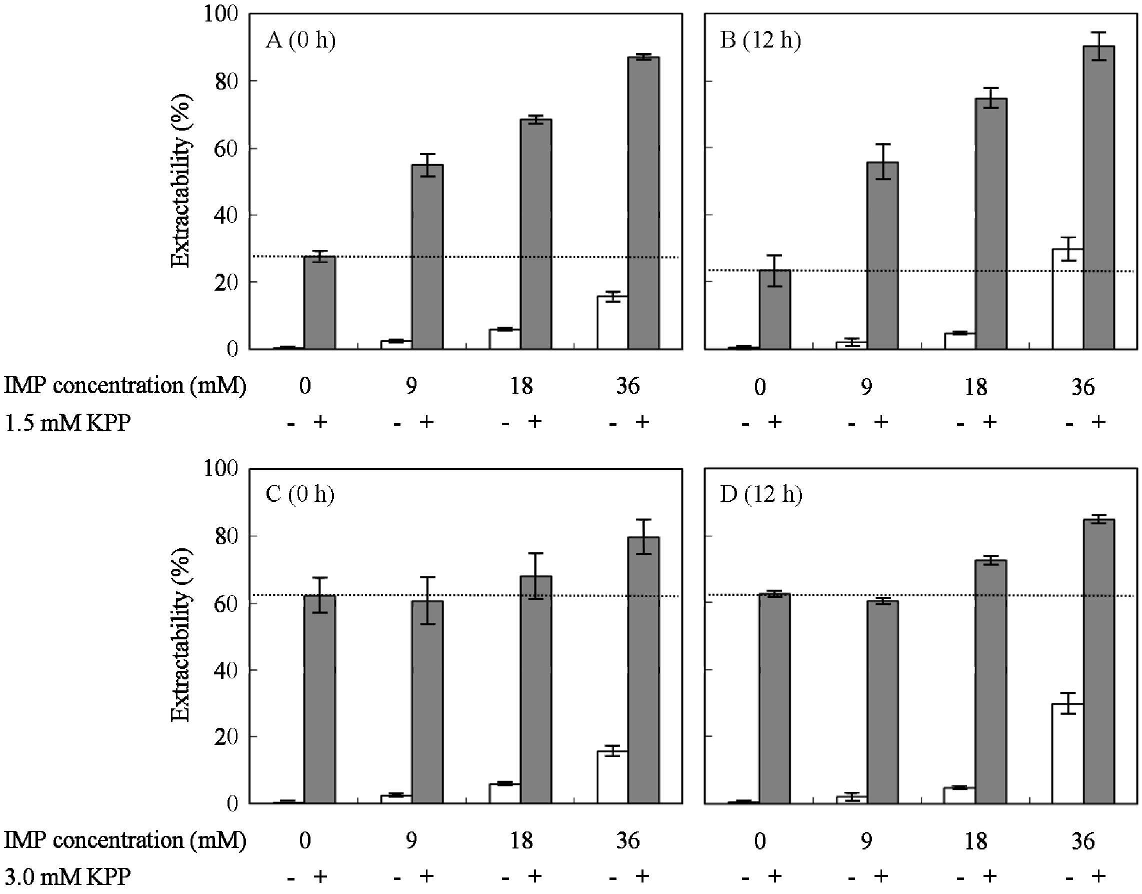


図 13、KPP と IMP を併用した抽出液によるミオシンの抽出に対する IMP 濃度、KPP 濃度および抽出時間の影響

ミオシンの抽出率は、0-36 mM IMP 単独の抽出液（A、B、C および D の－）、1.5 mM KPP と 9-36 mM IMP を併用した抽出液（A および B の＋）、あるいは 3.0 mM KPP と 9-36 mM IMP を併用した抽出液（C および D の＋）を豚肉に 9 倍量加えてホモジナイズした後、0 時間（A および C）と 12 時間（B および D）に測定した。各種抽出液は 0.3 M NaCl を含む。点線は 1.5 または 3.0 mM KPP 単独の抽出液で得られた抽出率を示している。結果は 3 回試行の平均値±標準誤差で表した。他の条件は実験材料および方法で述べられている。

27.5%であった。9、18 および 36 mM IMP 単独での抽出率は、各々2.5、5.9 および 15.7%であった。他方、1.5 mM KPP と 9、18 および 36 mM IMP の併用で得られた抽出率は、各々54.9、68.5 および 87.0%であった。IMP 濃度の増加によって、抽出率は増加した。これらの抽出率は、1.5 mM KPP 単独での抽出率と 9、18 および 36 mM IMP 単独での抽出率の和(30.0、33.4 および 43.2%)と比べると、それぞれ 1.8、2.1 および 2.0 倍であった。

12 時間抽出した場合(図 13B)、1.5 mM KPP 単独での抽出率は 23.4%であった。9、18 および 36 mM IMP 単独での抽出率は、各々2.1、4.7 および 29.7%であった。他方、1.5 mM KPP と 9、18 および 36 mM IMP の併用で得られた抽出率は、各々55.6、74.6 および 90.3%であった。抽出時間の延長によって、抽出率はほとんど変化しなかった。これらの抽出率は、1.5 mM KPP 単独と各種濃度の IMP 単独の抽出率の和の約 2 倍であった。

これらの結果から、1.5 mM KPP あるいは 9-36 mM IMP によるミオシンの抽出作用は、両物質を併用することによって相乗的に高められることが明らかになった。IMP 濃度の増加によって、ミオシンの抽出は高められた。しかし、抽出時間の延長によっては、ミオシンの抽出率はそれ以上高まらなかった。

3 mM KPP で 0 時間抽出した場合(図 13C)、3 mM KPP 単独での抽出率は、62.5%であり、KPP 濃度の増加により抽出率が上昇した。これは既に第二章で示した結果と同じである。他方、3 mM KPP と 9、18 および 36 mM IMP の併用で得られた抽出率は、各々60.6、68.0 および 79.8%であった。IMP 濃度の増加によって、抽出率は増加した。これらの値は、3 mM KPP 単独での抽出率と 9、18 および 36 mM IMP 単独での抽出率の和(65.0、68.4 および 78.2%)と比べると、ほぼ同じ値であった。また、上述した 1.5 mM KPP と IMP を併用して 0 時間抽出した場合の値と比べても(図 13A)、ほぼ同じ値である。これは、IMP と併用した場合には、1.5 から 3 mM への KPP 濃度の増加によって、抽出率は変化しなかったことを示している。

12 時間抽出した場合(図 13D)、3 mM KPP と 9、18 および 36 mM IMP の併用で得られた抽出率は、各々60.4、72.7 および 84.9%であり、抽出時間の延長によって抽出率はほとんど変化しなかった。IMP 濃度の増加によって、抽出率は増加した。これらの値は、3 mM KPP 単独での抽出率と 9、18 および 36 mM IMP 単独での抽出率の和と比べると、ほぼ同じ値であった。また、上述した 1.5 mM KPP と IMP を併用して 12

時間抽出した場合の値と比べても（図 13B）、ほぼ同じ値である。これは、IMP と併用した場合には、1.5 から 3 mM への KPP 濃度の増加によって、抽出率は変化しなかったことを示している。

これらの結果から、3 mM KPP あるいは 9-36 mM IMP によるミオシンの抽出作用は、両物質を併用することによって相加的に高められることが明らかになった。IMP と併用した場合には、KPP 濃度の増加によってミオシンの抽出は、影響されなかった。一方、併用の場合には IMP 濃度の増加によってミオシンの抽出は高められた。しかし、抽出時間の延長によってはミオシンの抽出率は、それ以上高まらなかった。

前章では、IMP 存在下でミオシンがアクチンから解離して筋原線維外に溶出するという現象に 12 時間程度の時間を要したこと、これに対し KPP 存在下での同現象は、比較的短時間で完了することを示した。これらの結果から、KPP はミオシンの抽出を短時間で完了させる能力を有していることが推定された。この推定は、本章で示したように KPP と IMP の併用によってミオシンの抽出が短時間で高められ、抽出時間の延長によってはそれ以上高められなかったことによって支持される。また、このことは IMP によるミオシン抽出の律速段階が、KPP によって除かれたことを示すと考えられる。ミオシンの抽出に関して、KPP と IMP は同じ作用を有しているが、KPP は IMP よりも短時間でその作用を完了させることができると考えられる。そして、IMP と KPP を併用した場合には、IMP による抽出の律速段階を KPP が補完的に除去するために、ミオシンの抽出が著しく高められたのであろう。

図 14 には 1.5-3 mM KPP と 0-36 mM IMP を含む 0.3 M NaCl 溶液を用いて抽出されたアクチンの抽出率を示した。

1.5 mM KPP で 0 時間抽出した場合（図 14A）、1.5 mM KPP 単独での抽出率は 10.6%であった。9、18 および 36 mM IMP 単独での抽出率は、各々6.9、9.3 および 16.5%であった。他方、1.5 mM KPP と 9、18 および 36 mM IMP の併用で得られた抽出率は、各々13.2、19.2 および 39.8%であった。IMP 濃度の増加、特に 18 から 36 mM への増加によって、抽出率は増加した。これらの値は、1.5 mM KPP 単独での抽出率と 9、18 および 36 mM IMP 単独での抽出率の和（17.5、19.9 および 27.1%）と比べると、それぞれ 0.8、1.0 および 1.5 倍であった。

12 時間抽出した場合（図 14B）、1.5 mM KPP 単独での抽出率は、8.6%であった。9、18 および 36 mM IMP 単独での抽出率は、各々6.9、9.2 および 32.3%であった。他

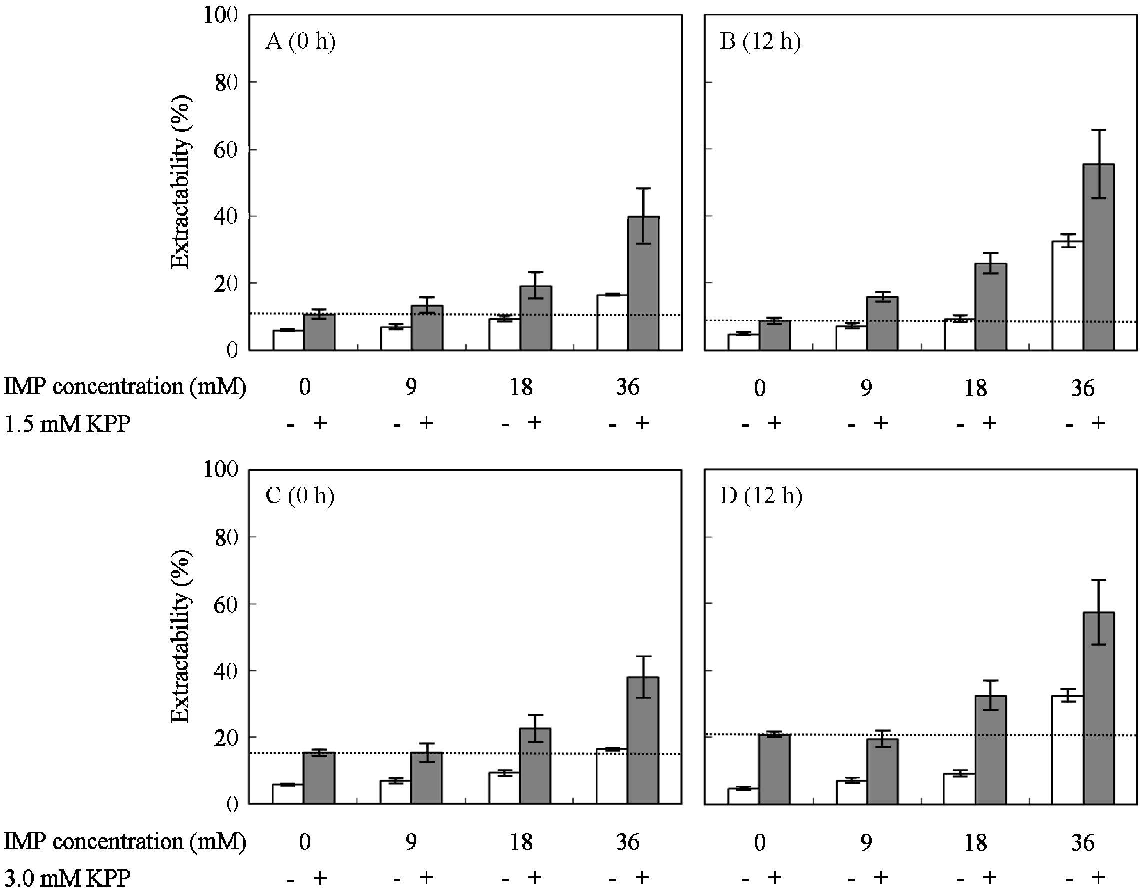


図 14、KPP と IMP の併用によるアクチンの抽出に対する IMP 濃度、KPP 濃度および抽出時間の影響

アクチンの抽出率は、0-36 mM IMP 単独の抽出液（A、B、C および D の－）、1.5 mM KPP と 9-36 mM IMP を併用した抽出液（A および B の＋）、あるいは 3.0 mM KPP と 9-36 mM IMP を併用した抽出液（C および D の＋）を豚肉に 9 倍量加えてホモジナイズした後、0 時間（A および C）と 12 時間（B および D）に測定した。各種抽出液は 0.3 M NaCl を含む。点線は 1.5 または 3.0 mM KPP 単独の抽出液で得られた抽出率を示している。結果は 3 回試行の平均値±標準誤差で表した。他の条件は実験材料および方法で述べられている。

方、1.5 mM KPP と 9、18 および 36 mM IMP の併用で得られた抽出率は、各々15.8、25.8 および 55.3%であった。抽出時間の延長によって抽出率が増加し、これは 36 mM IMP で顕著であった。これらの抽出率は、1.5 mM KPP 単独と 9、18 および 36 mM IMP 単独の抽出率の和（15.5、17.8 および 40.9%）と比べると、それぞれ 1.0、1.4 および 1.4 倍であった。

これらの結果から、1.5 mM KPP あるいは 9-36 mM IMP によるアクチンの抽出作用は、両物質を併用することによって高められることが明らかになった。これは IMP 濃度に依存し、IMP 濃度の増加によってアクチンの抽出は高められた。抽出時間の延長によってアクチンの抽出はさらに高められた。この抽出時間延長の正の効果は、ミオシンの抽出と異なった。

3 mM KPP で 0 時間抽出した場合（図 14C）、3 mM KPP 単独での抽出率は、15.4%であった。3 mM KPP と 9、18 および 36 mM IMP の併用で得られた抽出率は、各々15.4、22.5 および 37.9%であった。IMP 濃度の増加、特に 18 から 36 mM への増加によって、抽出率は増加した。これらの値は、3 mM KPP 単独での抽出率と 9、18 および 36 mM IMP 単独での抽出率の和（22.3、24.7 および 31.9）と比べると、それぞれ 0.7、0.9 および 1.2 倍であった。また、上述の 1.5 mM KPP と IMP を併用して 0 時間抽出した場合と比べると（図 14A）、ほぼ同じ値である。これは、IMP と併用した場合には、1.5 から 3 mM への KPP 濃度の増加によって、抽出率は増加しなかったことを示している。

12 時間抽出した場合（図 14D）、3 mM KPP と 9、18 および 36 mM IMP の併用で得られた抽出率は、各々19.5、32.3 および 57.3%であり、抽出時間の延長によって、抽出率が増加し、これは 36 mM IMP で顕著であった。IMP 濃度の増加によって、抽出率は増加した。これらの値は、3 mM KPP 単独での抽出率と 9、18 および 36 mM IMP 単独での抽出率の和（27.6、29.9 および 53.0%）と比べると、それぞれ 0.7、1.1 および 1.1 倍であった。また、上述の 1.5 mM KPP と IMP を併用して 12 時間抽出した場合と比べると（図 14B）、ほぼ同じ値である。これは、1.5 から 3 mM への KPP 濃度の増加によって、抽出率は増加しなかったことを示している。

これらの結果から、3 mM KPP あるいは 9-36 mM IMP によるアクチンの抽出作用は、両物質を併用することによって高められることが明らかになった。これは IMP 濃度に依存し、IMP 濃度の増加によってアクチンの抽出は高められた。IMP と併用し

た場合には、KPP 濃度の増加によってアクチンの抽出は影響されなかった。他方、抽出時間の延長によってアクチンの抽出はさらに高められた。この抽出時間の正の効果は、ミオシンの抽出と異なった。

前章では、IMP によるミオシンとアクチンの抽出率は、いずれも抽出時間の延長によって増大した。しかしながら、KPP と IMP の併用によるアクチンとミオシンの抽出率については、前者が抽出時間の延長により増大したのに対し、後者は増大しなかった。したがって、IMP によるアクチン抽出には、ミオシン抽出の場合と異なり、1.5-3.0 mM KPP では除去しきれない律速段階があることが示唆される。

3. 3. 3. KPP と GMP の混合抽出液によるミオシンおよびアクチンの抽出

図 15 には 1.5-3 mM KPP と 0-36 mM GMP を含む 0.3 M NaCl 溶液を用いて抽出されたミオシンの抽出率を示した。

0 時間抽出した場合（図 15A）、9、18 および 36 mM GMP 単独での抽出率は、各々3.0、7.2 および 6.9%であった。他方、1.5 mM KPP と 9、18 および 36 mM GMP の併用で得られた抽出率は、各々62.7、74.0 および 77.1%であった。GMP 濃度の増加によって、抽出率は増加した。これらの抽出率は、1.5 mM KPP 単独での抽出率と 9、18 および 36 mM GMP 単独での抽出率の和（30.5、34.7 および 34.4%）と比べると、それぞれ 2.1、2.1 および 2.2 倍であった。

12 時間抽出した場合（図 15B）、9、18 および 36 mM GMP 単独での抽出率は、各々1.4、0.5 および 2.9%であった。他方、1.5 mM KPP と 9、18 および 36 mM GMP の併用で得られた抽出率は、各々52.6、42.5 および 61.5%であった。抽出時間の延長によって、抽出率は減少し、これは 18 mM GMP で顕著であった。GMP 濃度の 9 から 18 mM への増加によっても、抽出率は減少した。これらの抽出率は、1.5 mM KPP 単独と 9、18 および 36 mM GMP 単独での抽出率の和（24.8、23.9 および 26.3%）と比べると、それぞれ 2.1、1.8 および 2.3 倍であった。

これらの結果から、1.5 mM KPP あるいは 9-36 mM GMP によるミオシンの抽出作用は、両物質を併用することによって相乗的に高められることが明らかになった。ミオシンの抽出は、GMP 濃度の増加によって、0 時間抽出では高められ、12 時間抽出の 9 から 18 mM GMP の増加では低下した。抽出時間の延長によってミオシンの抽出は低下した。

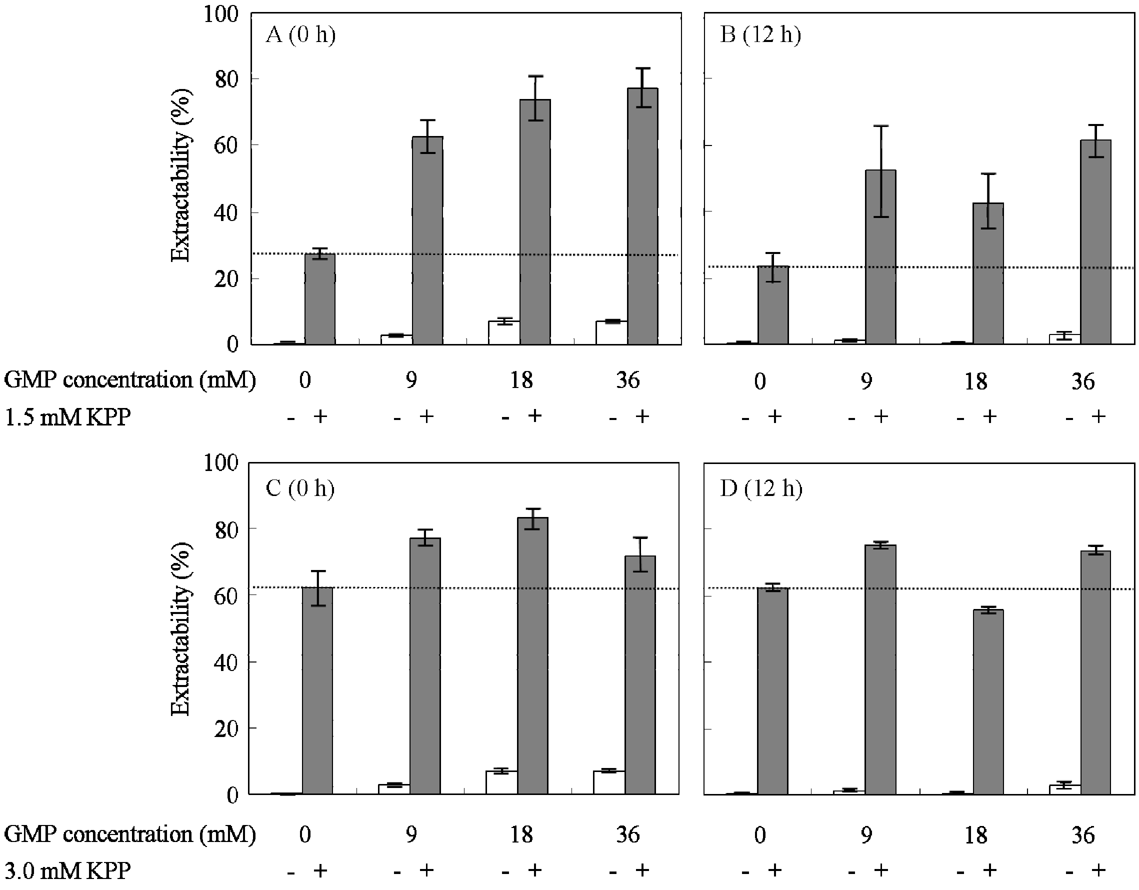


図 15、KPP と GMP の併用によるミオシンの抽出に対する GMP 濃度、KPP 濃度および抽出時間の影響

ミオシンの抽出率は、0-36 mM GMP 単独の抽出液（A、B、C および D の－）、1.5 mM KPP と 9-36 mM GMP を併用した抽出液（A および B の＋）、あるいは 3.0 mM KPP と 9-36 mM GMP を併用した抽出液（C および D の＋）を豚肉に 9 倍量加えてホモジナイズした後、0 時間（A および C）と 12 時間（B および D）に測定した。各種抽出液は 0.3 M NaCl を含む。点線は 1.5 または 3.0 mM KPP 単独の抽出液で得られた抽出率を示している。結果は 3 回試行の平均値±標準誤差で表した。他の条件は実験材料および方法で述べられている。

3 mM KPP で 0 時間抽出した場合（図 15C）、3 mM KPP と 9、18 および 36 mM GMP の併用で得られた抽出率は、各々77.2、83.5 および 71.9%であった。GMP 濃度の 9 から 18 mM への増加によって抽出率はわずかに増加し、18 から 36 mM への増加によって抽出率は減少した。これらの値は、3 mM KPP 単独での抽出率と 9、18 および 36 mM GMP 単独での抽出率の和（65.2、69.4 および 79.1%）と比べると、1.2、1.2 および 0.9 倍であった。

12 時間抽出した場合（図 15D）、3 mM KPP と 9、18 および 36 mM GMP の併用で得られた抽出率は、各々75.1、55.7 および 73.7%であった。18 mM GMP では、抽出時間の延長によって抽出率は減少した。GMP 濃度の 9 から 18 mM への増加によっても、抽出率は減少した。これらの値は、3 mM KPP 単独での抽出率と 9、18 および 36 mM GMP 単独での抽出率の和（63.9、63.0 および 65.4%）と比べると、1.2、0.9 および 1.1 倍であった。3.0 mM KPP と 18 mM GMP の併用で得られた抽出率は、3.0 mM KPP 単独の抽出率よりも低かった。

これらの結果から、3 mM KPP あるいは 9-36 mM GMP によるミオシンの抽出作用は、両物質を併用することによって相加的に高められることが明らかになった。しかしながら、例外として 18 mM GMP の 12 時間抽出では、ミオシンの抽出作用は低下した。GMP 濃度の増加によってミオシンの抽出は、0 時間抽出では 18 から 36 mM への増加で、12 時間抽出では 9 から 18 mM への増加で低下した。抽出時間の延長によってミオシンの抽出は、18 mM GMP でのみ低下した。

図 16 には 1.5-3 mM KPP と 0-36 mM GMP を含む 0.3 M NaCl 溶液を用いて抽出されたアクチンの抽出率を示した。

0 時間抽出した場合（図 16A）、9、18 および 36 mM GMP 単独での抽出率は、各々6.1、8.8 および 8.8%であった。他方、1.5 mM KPP と 9、18 および 36 mM GMP の併用で得られた抽出率は、各々14.5、25.4 および 34.1%であった。GMP 濃度の増加によって、抽出率は増加した。これらの値は、1.5 mM KPP 単独での抽出率と 9、18 および 36 mM GMP 単独での抽出率の和（16.7、19.4 および 19.4%）と比べると、それぞれ 0.9、1.3 および 1.8 倍であった。

これらの結果から、0 時間抽出での 1.5 mM KPP あるいは 9-36 mM GMP によるアクチンの抽出作用は、両物質を併用することによって高められることが明らかになった。これは GMP 濃度に依存し、GMP 濃度の増加によってアクチンの抽出は高めら

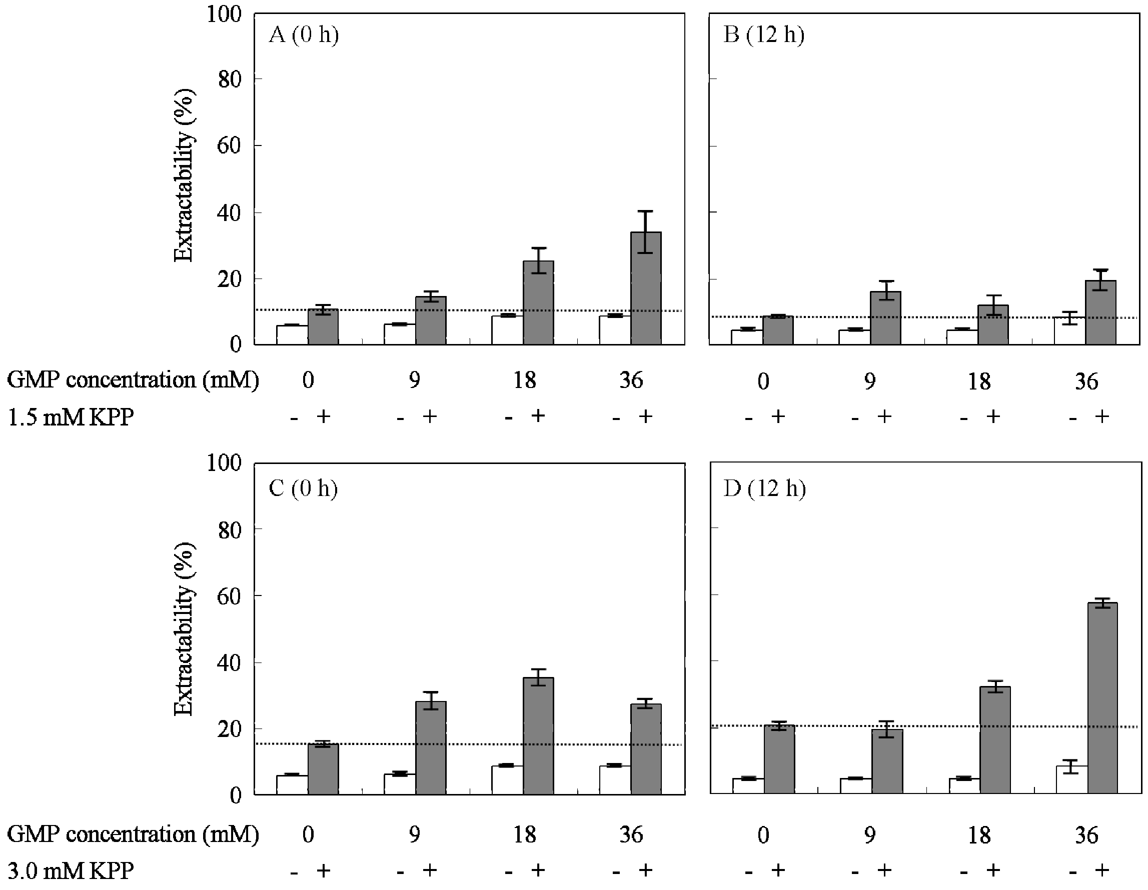


図 16、KPP と GMP の併用によるアクチンの抽出に対する GMP 濃度、KPP 濃度および抽出時間の影響

アクチンの抽出率は、0-36 mM GMP 単独の抽出液（A、B、C および D の－）、1.5 mM KPP と 9-36 mM GMP を併用した抽出液（A および B の＋）、あるいは 3.0 mM KPP と 9-36 mM GMP を併用した抽出液（C および D の＋）を豚肉に 9 倍量加えてホモジナイズした後、0 時間（A および C）と 12 時間（B および D）に測定した。各種抽出液は 0.3 M NaCl を含む。点線は 1.5 または 3.0 mM KPP 単独の抽出液で得られた抽出率を示している。結果は 3 回試行の平均値±標準誤差で表した。他の条件は実験材料および方法で述べられている。

れた。

12 時間抽出した場合(図 16B)、9、18 および 36 mM GMP 単独での抽出率は、各々4.7、4.6 および 8.2%であった。他方、1.5 mM KPP と 9、18 および 36 mM GMP の併用で得られた抽出率は、各々16.1、12.0 および 19.6%であった。GMP 濃度の増加による抽出率の大きな変化はなかった。抽出時間の延長によって、抽出率は減少し、これは 18 および 36 mM GMP で顕著であった。これらの抽出率は、1.5 mM KPP 単独と 9、18 および 36 mM GMP 単独の抽出率の和(13.3、13.2 および 16.8%)と比べると、それぞれ 1.2、0.9 および 1.2 倍であった。

これらの結果から、12 時間抽出での 1.5 mM KPP あるいは 9-36 mM GMP によるアクチンの抽出作用は、両物質を併用することによって高められることが明らかになった。これは GMP 濃度の増加に影響されなかった。抽出時間の延長によってアクチンの抽出は、18 および 36 mM GMP で低下した。これらの GMP 濃度の効果と抽出時間の延長による負の効果は、ミオシン抽出と同様であった。

3 mM KPP で 0 時間抽出した場合(図 16C)、3 mM KPP と 9、18 および 36 mM GMP の併用で得られた抽出率は、各々28.2、35.1 および 27.4%であった。GMP 濃度の 9 から 18 mM への増加によって抽出率はわずかに増加し、18 から 36 mM への増加によって減少した。これらの値は、3 mM KPP 単独での抽出率と 9、18 および 36 mM GMP 単独での抽出率の和(21.5、24.2 および 24.2%)と比べると、1.3、1.5 および 1.1 倍であった。

これらの結果から、0 時間抽出での 3 mM KPP あるいは 9-36 mM GMP によるアクチンの抽出作用は、両物質を併用することによって高められることが明らかになった。この条件では、18 mM GMP が、アクチンの抽出に最も効果的であった。GMP 濃度の 18 から 36 mM への増加によって、アクチンの抽出は低下した。これらの GMP および KPP 濃度の効果は、ミオシン抽出と同様であった。

12 時間抽出した場合(図 16D)、3 mM KPP と 9、18 および 36 mM GMP の併用で得られた抽出率は、各々19.5、32.3 および 57.3%であった。抽出時間の延長によって抽出率は、9 mM GMP では減少したが、18 mM GMP では変化せず、36 mM GMP では増加した。GMP 濃度の増加によって、抽出率は増加した。これらの値は、3 mM KPP 単独での抽出率と 9、18 および 36 mM GMP 単独での抽出率の和(25.4、25.3 および 28.9%)と比べると、0.8、1.3 および 2.0 倍であった。

これらの結果から、12 時間抽出での 3 mM KPP あるいは 9-36 mM GMP によるアクチンの抽出作用は、両物質を併用することによって高められることが明らかになった。GMP 濃度の増加によってアクチンの抽出は高められた。抽出時間の延長によってアクチンの抽出は、9 mM GMP では低下し、18 mM GMP では変化せず、36 mM GMP では高められた。

KPP と GMP の併用におけるミオシンの抽出は、KPP と IMP の併用時と同様に、抽出時間の延長によって増加しなかったことから、KPP によって短時間で完了したと考えられる。前章では、GMP 存在下でミオシンの抽出率が、抽出時間の延長に伴って低下することが示され、これは抽出されたミオシンおよびアクチンが、G-カルテットの形成に伴ってアクトミオシンを形成することに起因するものと推定した。本章の KPP と GMP の併用によって得られたミオシンの抽出率も、抽出時間の延長に伴って低下することが示された。したがって、KPP と GMP の併用時におけるミオシン抽出率の低下も G-カルテットの形成に起因するものと考えられる。

KPP と GMP の併用におけるアクチンの抽出は、抽出時間の延長によって多くの場合低下し、ミオシンの抽出と同じ挙動を示した。このアクチン抽出の低下も、上記同様 G-カルテット形成に伴うアクトミオシンの形成が原因であると考えられる。
しかし、3.0 mM KPP と 36 mM GMP の併用の場合のみは、アクチンの抽出率は抽出時間の延長によって高まった。これは G-カルテット形成では説明できない部分であり、アクチンとミオシンの GMP による抽出メカニズムが異なっていることを示唆しているであろう。

以上の一連の KPP と PrMP の併用による結果からは、アクチンとミオシンが筋原線維から抽出されるメカニズムは、異なることが推定された。アクチンとミオシンの抽出のメカニズムの違いは、タンパク質の構造や性質の違い、あるいは筋原線維での存在状態の違い(アクチンは細いフィラメント、ミオシンは太いフィラメントとして存在する)などが影響しているのであろう。この詳細な考察は、第四章の結果を受けて行うこととする。

第四章　生理的イオン強度におけるIMPおよびKPPによる筋原線維タンパク質の抽出様式

4. 1. 目的

第二章および第三章の結果から、IMP や GMP は 0.3-0.5 M NaCl 存在下で、アクトミオシンの解離作用によってアクチンおよびミオシンの抽出を高めることが示された。しかしながら、IMP や GMP と同様にアクトミオシンの解離作用によってアクチンおよびミオシンの抽出性を高める KPP とは抽出様式が異なることも示された。IMP はアクチンおよびミオシン抽出の律速段階を時間をかけて除去するのに対し、KPP は短時間で除去する能力を有していると推定した。しかし、0.3-0.5 M NaCl 存在下の条件は、アクトミオシンそのものが溶解してしまうため、IMP と KPP の抽出様式の違いの詳細を調べるには限界がある。そこで本章では、アクトミオシン自身は沈殿するが、アクチンとミオシンに解離すれば溶解する生理的イオン強度（1. 3. 1. 参照）において、アクトミオシンに対するIMPおよびKPPの作用を比較した。その上で、アクトミオシンが構造中に組み込まれている筋原線維からの IMP と KPP によるタンパク質の抽出作用を調べ、それらの抽出様式の違いを明らかにした。

4. 2. 実験材料および方法

4. 2. 1. 試薬

IMP は東京化成工業製、KPP は和光純薬工業製を用いた。その他の試薬はすべて特級品を用いた。

4. 2. 2. 試料

市販の豚肉の胸最長筋を用いた。脂肪組織および結合組織を取り除き、ミンチとした。

4. 2. 3. アクトミオシンの調製

アクトミオシンの調製は、定法に従った（Szent-Györgyi、1951）。ブタのミンチ肉に 6 倍量の Weber-Edsall 溶液を加えて撹拌した後、4°C で 24 時間静置した。このホモジネートを遠心分離（10,160 × *g*、10 分間、4°C）して得られた上清に 2 倍量の冷蒸留水

を加えて撹拌し、遠心分離（5,720 × *g*、7 分間、4°C）した。この沈殿に等量の 1 M KCl を加えて撹拌し、遠心分離（10,160 × *g*、10 分間、4°C）した。これらの操作を 2 回繰り返し、最終的に得られた上清をアクトミオシン（in 0.6 M KCl）とした。

4. 2. 4. 筋原線維の調製

筋原線維の調製は、Yang ら（1970）の方法に従った。豚のミンチ肉（5 g）に 8 倍量（40 mL）の調製溶液（0.16 M KCl/1 mM EDTA/4 mM NaN_3/40 mM Tris-HCl buffer、pH 7.2）を加えてホモジナイズした後、さらに同量の調製溶液を加えた。このホモジネートを遠心分離（3,000 × *g*、7 分間、4°C）して、上清を除いた。残渣を 70 mL の 0.16 M KCl で懸濁して、遠心分離（3,000 × *g*、7 分間、4°C）した。この操作を 1 回繰り返し、再び得られた残渣を 70 mL の 0.16 M KCl で懸濁した。これをナイロンネットに通して、最終的に得られた懸濁液を筋原線維とした。

4. 2. 5. IMP および KPP とアクトミオシンのインキュベーション

0.4 mL のアクトミオシン溶液（5 mg/mL）に各種試薬を加えて、0.4-1.0 mg/mL のアクトミオシン、0.06-0.2 M KCl、20 mM Tris-HCl 緩衝液（pH 7.2）、2 mM NaN_3 および 8 mM IMP または KPP を含む、あるいは IMP または KPP を含まない混合溶液（全量 2.0 mL）とした。この混合溶液を 0°C で最大 4 時間インキュベーションした後、12,000 × *g* で 10 分間遠心分離した。この上清を SDS-PAGE に供した。ウェルに供した試料には、13.4 μg のアクトミオシンに由来するタンパク質が含まれる。

4. 2. 6. IMP および KPP と筋原線維のインキュベーション

1.0 mL の筋原線維溶液（5 mg/mL）に各種試薬を加えて、4.17 mg/mL の筋原線維、0.2 M KCl、20 mM Tris-HCl 緩衝液（pH 7.2）、6 mM NaN_3 および 8 mM IMP または 1.0-8.0 mM KPP を含む、あるいは IMP または KPP を含まない混合溶液（全量 2.0 mL）とした。この混合溶液を 0°C で一定時間インキュベーションした後、12,000 × *g* で 10 分間遠心分離した。この上清を SDS-PAGE に供した。ウェルに供した試料には、18.6 μg の筋原線維に由来するタンパク質が含まれる。

4. 2. 7. SDS-PAGE

SDS-PAGE は 10%のゲルを使って Laemmli（1970）の方法に従って行った。タンパク質をクマシー・ブリリアント・ブルーR250 で染色した。分子量マーカーとしてトリプシンインヒビター (Mr=20,100)、カルボニックアンヒドラーゼ (29,000)、オボアルブミン (44,287)、ウシ血清アルブミン (66,409)、ホスホリラーゼ b (97,200)を用いた。分子量マーカー、精製した筋原線維および IMP を含む 0.4 M NaCl 溶液で抽出されたタンパク質の比較には、以下の ATTO 社製の既成品を用いた。ゲルは e-PAGEL E-T 10L、泳動相は AE-1410 EzRun、染色液は AE-1340 EzStain Aqua である。分子量マーカーは、Fermentas 社製の 10,000-200,000 のタンパク質を含むものを使用した。

4. 2. 8. タンパク質濃度の測定

ウシ血清アルブミンを検量線としたビウレット法によって測定した。

4. 3. 結果と考察

4. 3. 1. IMP がアクトミオシンの解離に要する時間

IMP がアクトミオシンをアクチンとミオシンに解離するのに要する時間を調べるために、アクトミオシンと IMP を 0.2 M KCl の生理的なイオン強度で 4 時間までインキュベートした。この結果の SDS-PAGE 像を図 17 示した。

インキュベーション 0 分間において、アクチンとミオシン重鎖の濃いバンドが認められ（図 17、レーン c）、10 分間以降も同様にバンドが認められた。したがって、IMP によるアクトミオシンの解離は、10 分以内にほとんど完了した。

他方、ピロリン酸塩がアクトミオシンを解離するのに要する時間に関して、Yasui ら（1964）は、アクトミオシンにピロリン酸塩を添加した直後に、その粘度が低下することを示した。第二章では、アクチンおよびミオシンの抽出が 30 分以内（0 時間抽出）に完了することを示した。これらの結果から、本項で示した IMP がアクトミオシンをアクチンおよびミオシンへと解離するのに要する時間は、ピロリン酸塩とほぼ同等であると考えられる。

第二章では、ホモジネートにおける IMP によるアクチンおよびミオシンの抽出は、抽出時間の延長によって高められることを示した。つまり、IMP が筋原線維中の細いフィラメントと太いフィラメントの結合を解離して、これらのタンパク質が筋原線維外に溶出するのに 12 時間程度の時間を要すると考えられる。IMP がアクトミオシンを解離

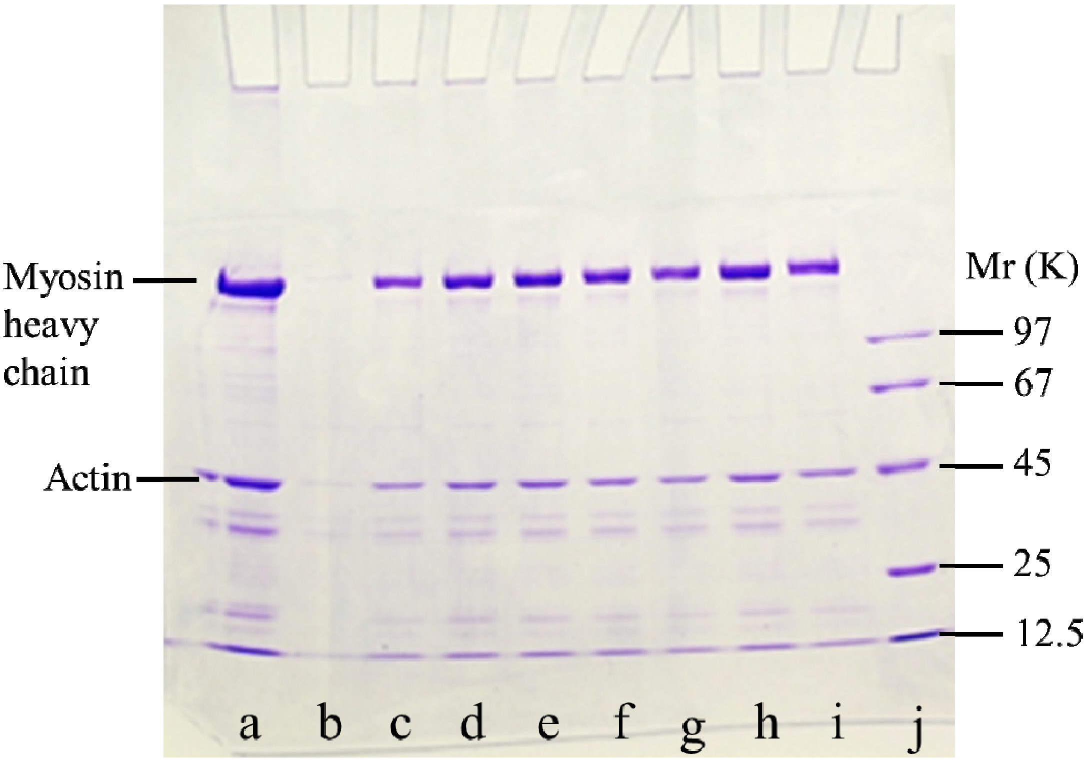


図 17、0.2 M KCl で IMP と 0-4 時間インキュベートした豚肉アクトミオシンの電気泳動像

0.2 M KCl 溶液（pH 7.2）で、アクトミオシンを 8 mM IMP と 0°C で最大 4 時間インキュベートした後、遠心分離した。得られた上清を SDS-PAGE に供した。a、ホールアクトミオシン；b-i、アクトミオシンの上清；b、IMP 無添加；c、0 分間；d、10 分間；e、20 分間；f、30 分間；g、1 時間；h、2 時間；i、4 時間；j、分子量マーカー

するのに要する時間は 10 分以内であるから、IMP による筋原線維からのアクチンおよびミオシンの抽出に時間を要することの原因は、IMP よるアクトミオシンの解離作用そのものにあるのではないと考えられる。

4. 3. 2. IMP および KPP によるアクトミオシン解離作用に及ぼす KCl 濃度の影響

IMP によるアクトミオシンのアクチンおよびミオシンへの解離作用に及ぼす KCl 濃度の影響を 0.2 M より低い KCl 濃度において調べた。この結果の SDS-PAGE 像を図 18 示した。0.12-0.18 M KCl では、アクトミオシンの解離は認められず（図 18、レーン b-h）、0.19 および 0.20 M ではアクトミオシンの解離が認められた（図 18、レーン i-j）。別の実験において、アクトミオシン（1 mg/mL）と 8 mM IMP を 0.16 および 0.18 M KCl、0°C で 120 時間インキュベーションしても、アクトミオシンの解離は起きなかった（電気泳動像は示していない）。これらの結果から、IMP によるアクトミオシンの解離は、0.19 M 以上の KCl 濃度で起こることが明らかとなった。

KPP のアクトミオシンの解離に及ぼす KCl 濃度の影響を調べた（図 19）。その結果、0.06 M KCl でアクトミオシンの解離が認められ（図 19、レーン b）、0.16 M KCl では十分なアクトミオシンの解離が認められた（図 19、レーン e）。

これらの結果から、IMP によるアクトミオシンの解離は、KPP の場合よりも高い KCl 濃度で起こることが明らかとなった。したがって、アクトミオシンを解離させるのに KPP よりも高い塩濃度が必要な IMP は、アクトミオシンに対する親和性が KPP よりも低いことが示唆された。IMP および KPP のアクトミオシン解離作用が KCl 濃度によって変化したことは両物質とアクトミオシンとの結合が非共有結合によることを示している。また、ピロリン酸塩はミオシン頭部に結合し（Morita、1967）、第 1 章で IMP もミオシン頭部に結合するものと推定した。したがって、IMP のミオシン頭部との親和性が、KPP のそれより弱いものと考えられるであろう。このことは、IMP と KPP の間の抽出様式の違いの原因の 1 つであるかもしれない。

4. 3. 3. IMP および KPP による筋原線維からの筋原線維タンパク質の抽出様式

4.3.1. で示したように、生理的イオン強度で、IMP がアクトミオシンをアクチンとミオシンに解離するのに要した時間は、10 分以内であり、ピロリン酸塩とほぼ同等であった。一方、第二章では、IMP がアクチンとミオシン（すなわち、細いフィラメントと太い

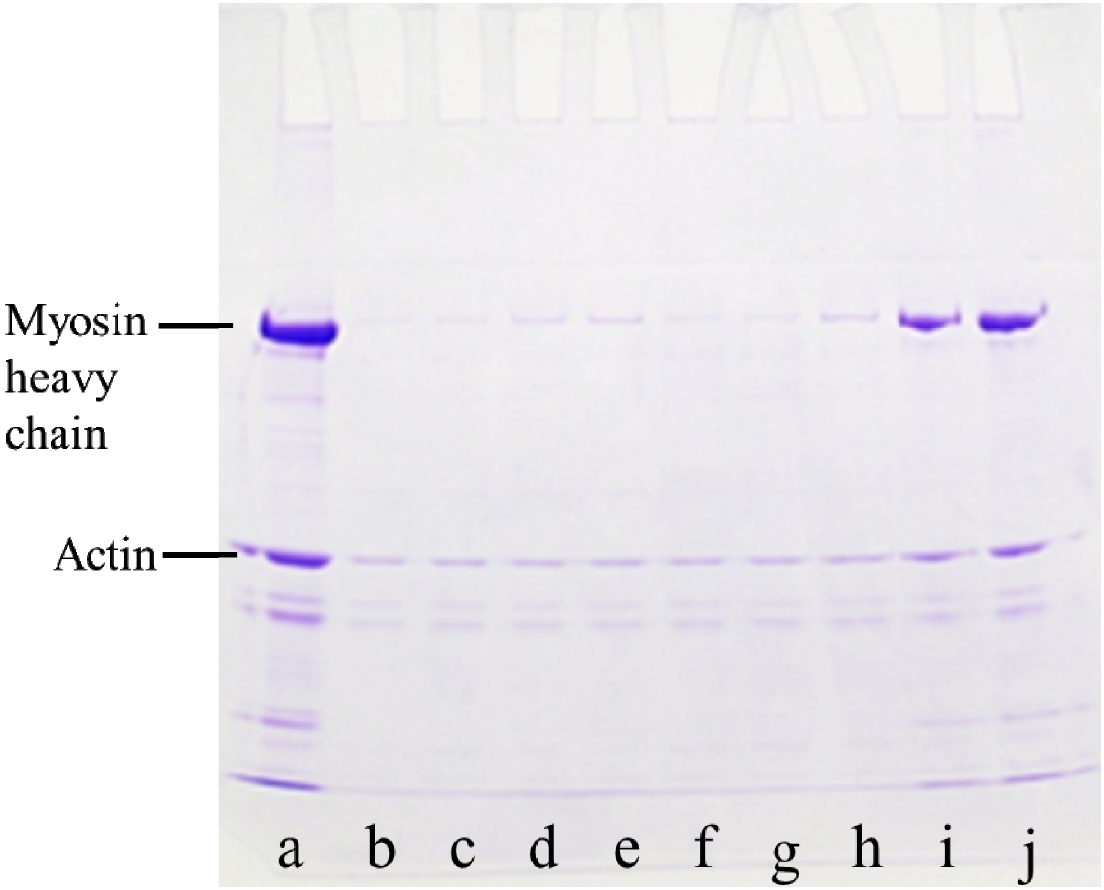


図 18、各種 KCl 濃度で IMP とインキュベートした豚肉アクトミオシンの電気泳動像

各種濃度の KCl 溶液（pH 7.2）で、アクトミオシンを 8 mM IMP と 0°C で 4 時間インキュベートした後、遠心分離した。得られた上清を SDS-PAGE に供した。a、ホールアクトミオシン； b-i、アクトミオシンの上清； b、0.12 M KCl； c、0.13 M KCl； d、0.14 M KCl； e、0.15 M KCl； f、0.16 M KCl； g、0.17 M KCl； h、0.18 M KCl； i、0.19 M KCl； j、0.20 M KCl

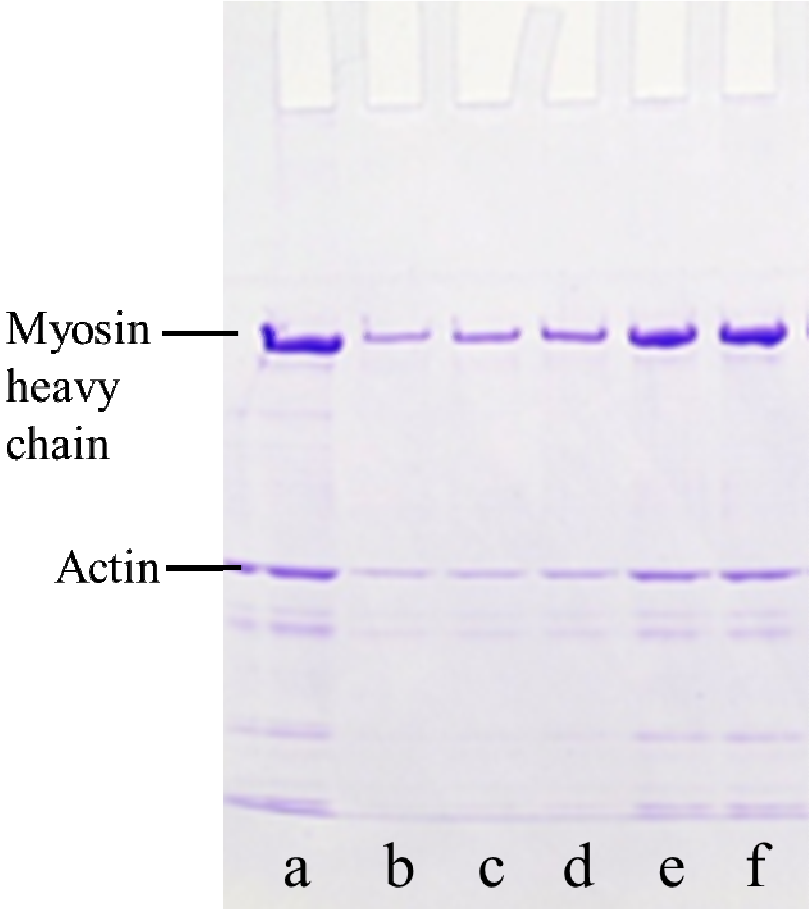


図 19、各種 KCl 濃度で KPP とインキュベートした豚肉アクトミオシンの電気泳動像

各種濃度の KCl 溶液（pH 7.2）で、アクトミオシンを 8 mM KPP と 0°C で 30 分間インキュベートした後、遠心分離した。得られた上清を SDS-PAGE に供した。a、ホールアクトミオシン；b-f、アクトミオシンの上清；b、0.06 M KCl；c、0.08 M KCl；d、0.10 M KCl；e、0.16 M KCl；f、0.20 M KCl

フィラメント)を筋原線維外に溶出させるのには、12 時間程度を要したのに対し、KPP はそうした溶出を速やかに引き起こした。こうした IMP と KPP の筋原線維からのアクチンおよびミオシンの抽出様式の違いは、アクチンとミオシンを筋原線維構造に拘束している部分に対する両者の作用の違いであることが予想される。

そこで本項では、4. 3. 1. と同じ条件、すなわち 0.2 M KCl という生理的イオン強度で、IMP と KPP が筋原線維からアクチンとミオシンを溶出させられるかどうかを調べた。さらに、アクチンおよびミオシンを筋原線維構造に拘束している部分についても他の報告の情報を加えて考察した。

精製した筋原線維と IMP を 0.2 M KCl で 16 時間インキュベートし、遠心分離で得られた上清の SDS-PAGE 像を図 20 に示した。IMP 存在下の上清にはアクチンおよびミオシンがわずかにしか検出されなかった(図 20、レーン c)。この結果は、IMP によりアクチン-ミオシン間結合が切れても筋原線維から抽出されないことを示している。このことは、例えば筋原線維を ATP と EGTA を含む溶液(いわゆる Relaxing solution)で処理した場合に、アクチンおよびミオシンが筋原線維から抽出されないこと(Higuchi ら、1992)によっても支持される。

精製した筋原線維と KPP を 0.2 M KCl で 30 分間インキュベートし、遠心分離で得られた上清の SDS-PAGE 像を図 21 に示した。この場合、上清には多量のアクチンおよびミオシンが検出され(図 21、レーン c)、IMP での結果と異なった。アクチンおよびミオシンは、それぞれ単独ではイオン強度 0.2 で溶解することから、溶解性のみから見れば、合理的な結果であると言える。しかし、生理的イオン強度下では KPP ばかりでなく IMP もアクトミオシンをアクチンとミオシンに解離させることから、この KPP によるアクチンおよびミオシンの抽出は、KPP のアクトミオシン解離作用のみでは説明することができない。

以上の結果に示された IMP と KPP の間の抽出様式の違いの説明は次のように考察した。IMP による抽出では、筋原線維において太いフィラメントから解離した細いフィラメントおよび、細いフィラメントから解離された太いフィラメントは、何らかの原因によって抽出されぬよう筋原線維に拘束されていると考えられる。この“拘束”が第二章で示した高イオン強度下での抽出における時間依存性と、本章で示した生理的イオン強度下での抽出の抑制をもたらしていると考えられるであろう。他方、KPP による抽出では、KPP の作用によってアクチン-ミオシン間の結合が切られるばかりでなく、

図 20、0.2 M KCl で IMP とインキュベートした豚肉筋原線維の電気泳動像

0.2 M KCl 溶液（pH 7.2）で、筋原線維を 0 または 8 mM IMP と 0°C で 16 時間インキュベートした後、遠心分離した。得られた上清を SDS-PAGE に供した。a、ホール筋原線維； b、筋原線維と 0 mM IMP の上清； c、筋原線維と 8 mM IMP の上清

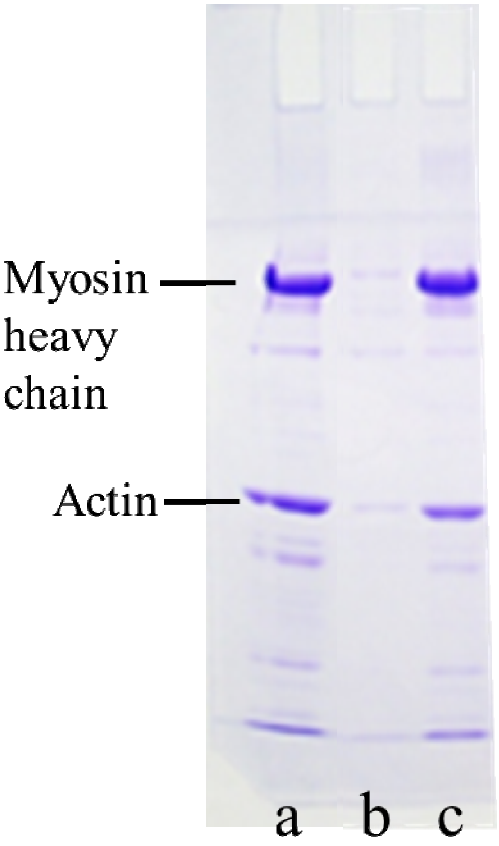


図 21、0.2 M KCl で KPP とインキュベートした豚肉筋原線維の電気泳動像

0.2 M KCl 溶液（pH 7.2）で、筋原線維を 0 または 8 mM KPP と 0°C で 30 分間インキュベートした後、遠心分離した。得られた上清を SDS-PAGE に供した。a、ホール筋原線維； b、0 mM KPP と筋原線維の上清； c、8 mM KPP と筋原線維の上清

この“拘束”も短時間で解除されると考えられる。

この“拘束”は筋原線維の高度な構造体において、タンパク質同士が非共有結合によって相互作用し、重合体（筋原線維）を形成することに起因すると推察される。筋原線維において細いフィラメントのアクチンがミオシン以外のタンパク質と、あるいは太いフィラメントのミオシンがアクチン以外のタンパク質と相互作用していることは明らかである。したがって、アクチンあるいはミオシンとその他のタンパク質間の相互作用が、IMP 抽出における“拘束”であると推定した。また、ピロリン酸塩はアクチンあるいはミオシンとその他のタンパク質間の相互作用、すなわち“拘束”を解除する能力を有していると考えられる。

ミオシンと相互作用する主要なタンパク質の 1 つは、コネクチンである。Funatsu ら（1990）は、イオン強度 0.2 の条件で筋原線維の細いフィラメントを選択的に除いて、Z 線-コネクチン-太いフィラメントが結合していることを観察した。イオン強度 0.2 では単離されたミオシンは溶解することから、Z 線-コネクチン-太いフィラメント間の結合によって、ミオシン抽出が抑制されていることが推定される。筋原線維においてコネクチンは、1 つの太いフィラメント（M 線から片側）に対して 4-6 分子が結合していると考えられている（丸山、1994）。さらに、Maruyama ら（1989）は、60 mM KCl/5 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) (IS≒0.07)の条件で、ミオシンフィラメントとβコネクチンをそれぞれ遠心分離すると上清に現れるが、両タンパク質を混合して遠心分離すると重合体の形成によって沈殿に現れることを示している。この結果は、推定を支持するものと考えられる。

次にアクチンと相互作用する主要なタンパク質の 1 つは、αアクチニンである。αアクチニンは Z 線の主成分であり(Takahashi and Hattori、1989)、αアクチニンは Z 線において細いフィラメントと結合している（Goll ら、1972）。αアクチニンは水溶性である。筋原線維から強イオン強度（IS≒0.6）の溶液でミオシンを除くと、複数の細いフィラメントと Z 線が結合した残渣（I-Z-I brush）が得られる（深沢、1975）。I-Z-I brush はイオン強度 0.6 で溶解しない。他方、この I-Z-I brush をトリプシン処理して Z 線を崩壊させると（αアクチニンは分解されない（丸山、1976））、Z 線から切り離された細いフィラメントは 0.1 M KCl に溶解する（Hama ら、1964）。したがって、Z 線と細いフィラメント間の結合によって、アクチン抽出が抑制されていることが推定される。

また、Kimura ら（1983）によって確立されたβコネクチンの調製法では、αアクチニ

ンを除去した後に pH 6.6 の 0.1 M リン酸緩衝液（IS≒0.22）によってβコネクチンを抽出しているが、pH 7.0 の 0.1 M リン酸緩衝液（IS≒0.26）にするとβコネクチンとともにミオシンが抽出されることを示している。この結果は、αアクチニンの除去がミオシンの抽出にも有効であることを示唆している。すなわち、Z 線-コネクチン-太いフィラメント間の結合において、αアクチニンが関わる Z 線-コネクチン間の結合がミオシン抽出を抑制していることが推定される。

以上の推定を踏まえて、IMP を含む 0.4 M NaCl 溶液から得られた SDS-PAGE 像について、アクチンおよびミオシン以外のタンパク質の変化に注目した。分子量マーカー、精製した筋原線維および抽出されたタンパク質の SDS-PAGE 像を図 22 に示した。18 mM IMP の 0 および 12 時間抽出では（図 22、レーン i および j）、抽出時間の延長によってアクチンおよびミオシンの抽出率が増加した。そこでは、αアクチニンのバンド、分子量 200,000 以上のコネクチンが含まれると考えられるバンドおよび M-タンパク質のバンドが、抽出時間の延長によって濃くなることが確認された。M-タンパク質は筋原線維において太いフィラメントを束ねるタンパク質である。これらのタンパク質の抽出率が抽出時間の延長によってアクチンやミオシンのそれと共に増加したことは、これらのタンパク質によるアクチンおよびミオシン抽出の抑制の解除と同時に、これらのタンパク質が抽出されやすくなったことを意味するだろう。また、C-タンパク質、トロポニン T やトロポミオシンなどは、抽出時間の延長によって変化しなかったことから、抽出の抑制には関与していないものと考えられるだろう。

4.3.4. IMP および KPP の併用による筋原線維からの筋原線維タンパク質の抽出様式

これまでの結果から、KPP はアクチンおよびミオシンの抽出を抑制する“拘束”を IMP より短時間で解除する作用を有していることが示唆された。本項ではこの IMP と KPP を併用したときの作用について調べた。

精製した筋原線維と 0 あるいは 8 mM IMP と 0-2.0 mM KPP を 0.2 M KCl 下で併用し、21 時間インキュベートした。これを遠心分離して得られた上清の SDS-PAGE 像を図 23 に示した。IMP 無添加で 1.0 mM KPP を添加した場合、その上清には少量のアクチンおよびミオシンが検出された（図 23、レーン c）。8 mM IMP と 1.0 mM KPP を併用した場合、多量のアクチンおよびミオシンが検出された（図 23、レーン g）。この

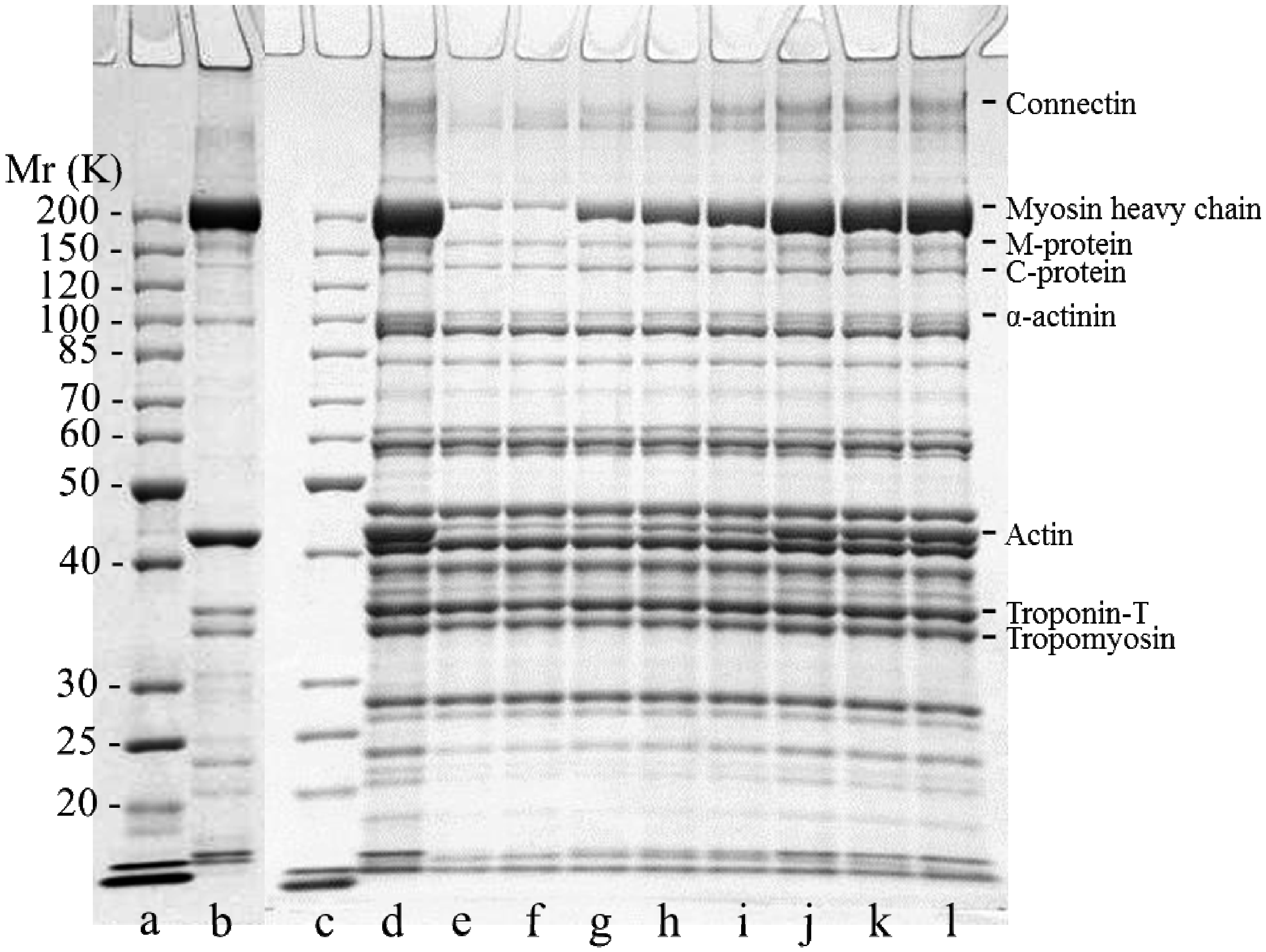


図 22、分子量マーカー、精製した筋原線維および各種濃度の IMP を含む 0.4 M NaCl 溶液で抽出されたタンパク質の SDS 電気泳動パターン

a、分子量マーカー; b、精製した筋原線維; c、分子量マーカー; d、IMP を含まない 0.4 M NaCl 溶液で 0 時間抽出して得られるホールのホモジネート; e-l、は各種濃度の IMP を含む 0.4 M NaCl 溶液から得られた上清; e、g、i および k、0、9、18 および 36 mM IMP で 0 時間抽出; f、h、j および l、0、9、18 および 36 mM IMP で 12 時間抽出。M-タンパク質、C-タンパク質および α-アクチニンの分子量は Takahashi ら (1981)、トロポニン T およびトロポミオシンの分子量は Matsuishi and Okitani (2000) を引用した。

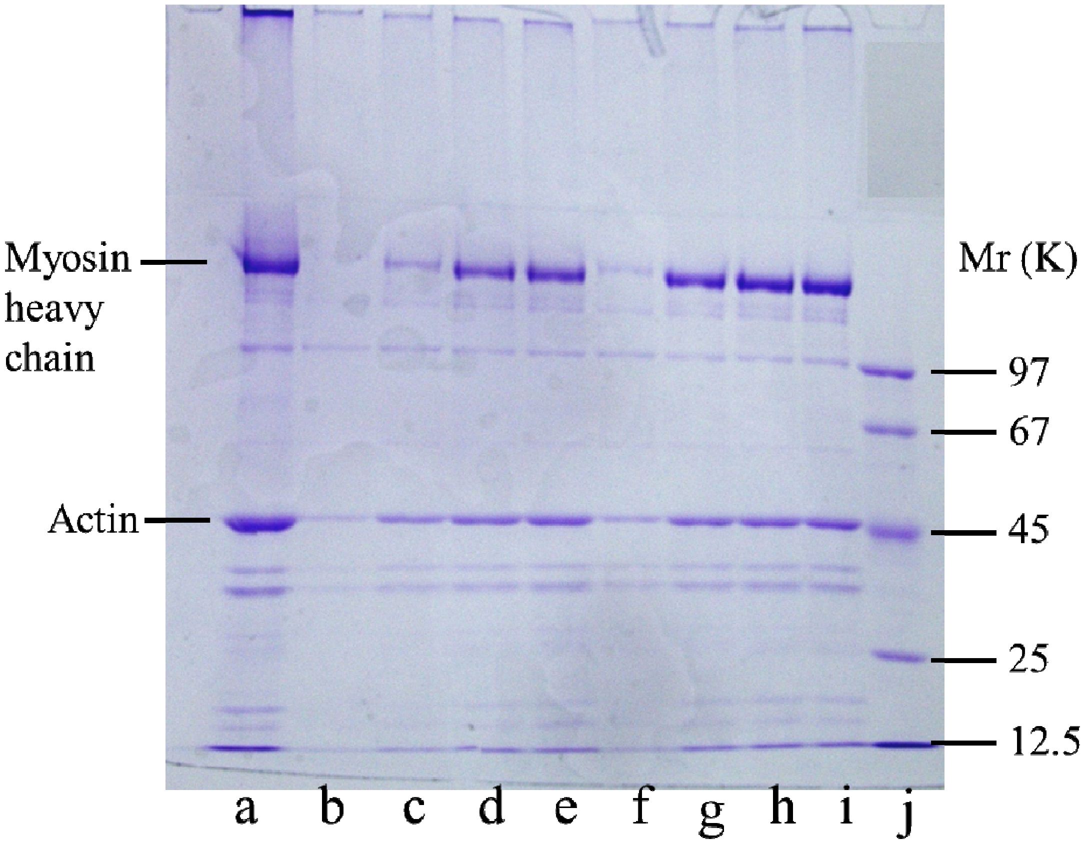


図 23、0.2 M KCl で IMP と各種濃度の KPP をインキュベートした豚肉筋原線維の電気泳動像

0.2 M KCl 溶液（pH 7.2）で、筋原線維を 0 または 8 mM IMP と 0-3.0 mM KPP と 0°C で 21 時間インキュベートした後、遠心分離した。得られた上清を SDS-PAGE に供した。a、ホール筋原線維；b-e、0 mM IMP と KPP の筋原線維の上清；b、0 mM KPP；c、1.0 mM KPP；d、1.5 mM KPP；e、3.0 mM KPP；f-i、8 mM IMP と KPP と筋原線維の上清；f、0 mM KPP；g、1.0 mM KPP；h、1.5 mM KPP；i、3.0 mM KPP；j、分子量マーカー

結果から、生理的なイオン強度条件において、IMP あるいは KPP のアクチンおよびミオシン抽出作用は、IMP と KPP の併用によって高められることが示された。先の第三章の 0.3 M NaCl 条件下での IMP と KPP の併用効果と同様であった。

前項までの結果および本項での IMP と KPP の併用の結果から、IMP および KPP それぞれによるアクチンおよびミオシンの抽出様式を考察する。筋原線維において、IMP は短時間でアクチンとミオシン間、すなわち細いフィラメントと太いフィラメント間の結合を解除するが、細いフィラメントは Z 線と、太いフィラメントはコネクチン-Z 線と結合（非共有結合）したままである。これらの結合は、抽出時間の延長および抽出液の NaCl 濃度（イオン強度）や IMP 濃度を増加させることによって解除され、アクチンとミオシンは筋原線維から抽出されると考えられる。IMP は細いフィラメント-Z 線間および太いフィラメント-コネクチン-Z 線間の相互作用を解除する能力を有するが、その能力は弱いと考えられる。NaCl も弱いが同じ能力を有していると考えられる。他方、KPP は短時間で細いフィラメントと太いフィラメント間の結合を解除するのと同時に、細いフィラメント-Z 線間および太いフィラメント-コネクチンの結合を解除するため、アクチンとミオシンが筋原線維から短時間で抽出されると考えられる。IMP と KPP を併用した場合、高濃度の IMP は短時間で細いフィラメントと太いフィラメント間の結合を、低濃度の KPP は短時間で細いフィラメント-Z 線間および太いフィラメント-コネクチン-Z 線間の結合を解除するため、アクチンとミオシンが筋原線維から短時間で抽出されると考えられる。

第五章　IMP を添加した加熱ゲルの保水性、物性および官能特性～KPP との比較～

5. 1. 目的

前章において、IMP や GMP が豚肉からのアクチンおよびミオシンの抽出を高めることが明らかになった。したがって、IMP や GMP がソーセージの品質を向上させると推定した。本章では、汎用性が高い食品添加物である IMP を選択し、これを添加した加熱ゲルを作製し、加熱ゲルの保水性や物性に対する IMP の効果を検討した。さらに、官能試験において、IMP を添加した加熱ゲルの性質を評価した。

5. 2. 実験材料および方法

5. 2. 1. 試薬

IMP は東京化成工業製、KPP は和光純薬工業製を用いた。その他の試薬はすべて特級品を用いた。

5. 2. 2. 試料

市販の豚肉のモモ肉（半膜様筋、内転筋および薄筋）を用いた。脂肪組織および結合組織を取り除き、ミンチとした。

5. 2. 3. 保水性測定のための加熱ゲルの作製

ミンチ（3 g）と 9 倍量の抽出液（27 mL）を 12,000 rpm で 30 秒間ホモジナイズした（Excel Auto、日本精機）。抽出液は 0、 9、18 および 36 mM IMP あるいは 9 mM KPP を含む 0.3、0.4 および 0.5 M NaCl、または 1.5 mM KPP を含む 0.3 M NaCl の溶液である。ミンチ肉の塩濃度を 0.2 M と仮定すると（Offer and Knight、1988）、0.3、0.4 および 0.5 M NaCl 溶液を加えたホモジネート中の全 KCl と NaCl を合わせた濃度は、各々0.29、0.38 および 0.47 M である。ホモジネート中の IMP と KPP の濃度は、抽出液中の濃度の 0.9 倍である。この KPP 濃度は今日のソーセージ製造に適用されている濃度である。ここで得られたホモジネートは、第 2 章および第 3 章で筋原線維タンパク質の抽出性を調べたホモジネートと濃度が同じである。ホモジネートの一部は得られた直後に 2.0 mL 容の平底チューブ（内径 9 mm）に詰めた。ここまでの操作は 4°C

で行った。得られたチューブを 63°C で 35 分間加熱した。このとき、ホモジネートの中心温度は、23 分後に 60°C、35 分後に 62.3°C に到達した。このようにして得られたゲルを 0 h-gel と呼ぶ。残りのホモジネートは 4°C で 12 時間静置した後、同様に加熱した。このようにして得られたゲルを 12 h-gel と呼ぶ。0 h-gel と 12 h-gel を使って保水性を測定した。

5. 2. 4. 加熱ゲルの保水性測定

2 mL チューブ中の加熱ゲルを 1,000 × *g* で 30 秒間遠心分離して、ゲルから遊離する水の重量を測定した。保水性（WHC）は以下の式を用いて算出した。

$$\mathrm{WHC}\ (\%) = \{1-(W_w/W_g)\}\times 100$$

W_w は遠心分離によって加熱ゲルから遊離した水の重量、そして W_g は加熱ゲルの重量を示している。

5. 2. 5. 物性測定および官能試験のための加熱ゲルの作製

物性測定および官能試験のための加熱ゲルは、ソーセージに近づけるため、添加する水の量を保水性測定の加熱ゲルより減らした。ミンチ肉（30 g）と 0.5 倍量の IMP あるいは KPP を含む NaCl 溶液（15 mL）を 12,000 rpm で 30 秒間ホモジナイズした（Excel Auto、日本精機社製）。ミンチ肉の塩濃度を 0.2 M と仮定すると（Offer and Knight、1988）、得られたホモジネートの塩（NaCl および KCl）濃度は 0.3 M である。ホモジネート中の IMP 濃度は、9、18 および 36 mM で、KPP 濃度は 9 mM である。この KPP 濃度は今日のソーセージ製造で適用されている濃度である。物性の測定に関しては、ホモジナイズ直後のホモジネート（1.5 g）を 2.0 mL 容の平底チューブ（内径 9 mm）に詰め、脱気のために 100 × *g* で 10 秒間遠心分離した。ここまでの操作は 4°C で行った。得られたチューブを 63°C で 35 分間加熱した。このとき、ホモジネートの中心温度は、26 分後に 60°C、35 分後に 63.8°C に到達した。このゲルは測定に使用するまで氷中に置いた。官能試験に関しては、ホモジナイズ直後のホモジネート（40 g）を 50 mL チューブに詰め、脱気のために 100 × *g* で 10 秒間遠心分離した。ここまでの操作は 4°C で行った。得られたチューブを 65°C で 40 分間加熱した。このとき、ホモジ

ネートの中心温度は、6 分後に 65°C に到達し、この温度を 34 分間維持した。このゲルは試験に使用するまで氷中に置いた。

5. 2. 6. 加熱ゲルの物性測定

加熱ゲルの物性測定は、テンシプレッサー（TTP-50BX、タケトモ電機社製）を使って 2 バイト法により行った。加熱ゲル（直径 9 mm、厚さ 20 mm）に対して直径 5 mm の中空プランジャーを速さ 6 mm/秒で挿入した。クリアランスは 14.0 mm とした。図 24 は、テンシプレッサーによって得られるプロファイル（H1、A1、A2、P1 および P2）である。H はプランジャーの圧縮力（N）、P はプランジャーの移動距離（mm）、A は圧縮によるプロファイルと横軸で囲まれた面積（mm^2）である。得られたプロファイルから、硬さ（H1）、凝集性（A1/A2）、ガム性（H1×A1/A2）および弾力性（P2/P1×100）をテンシプレッサーのソフトウェアを使って測定した。

5. 2. 7. 官能試験

官能試験は、9 mM KPP あるいは 36 mM IMP を含む加熱ゲル（それぞれ KPP-gel と IMP-gel とする）と KPP と IMP を含まない加熱ゲル（control-gel とする）の 3 種類について、訓練されたパネリストにより 2 回実施した。パネリストは、一般社団法人食肉科学技術研究所に所属する女性 1 名および男性 6 名で、30 代が 2 名、40 代が 3 名、60 代が 2 名である。加熱ゲルの直径は 28 mm、厚さは 3 mm とし、試験の 1 時間前に室温（25°C）に置いた。テクスチャーに関する項目は、硬さ、弾力性、結着性およびジューシーさである。風味に関する項目は、うま味、塩味、収斂味、匂いおよび総合評価である。評価は、KPP-gel を 0 点として-3 点から+3 点の 7 点で表した。

5. 2. 8. 統計処理

保水性と物性は、3 回試行の平均値±標準誤差として表した。官能試験では、KPP-gel と他の加熱ゲルの間の点数を student’s t-test によって分析した。

5. 3. 結果と考察

5. 3. 1. 豚肉加熱ゲルの保水性に対する IMP の効果

0.3-0.5 M NaCl と 9-36 mM IMP あるいは 9 mM KPP からなる抽出液で作製した

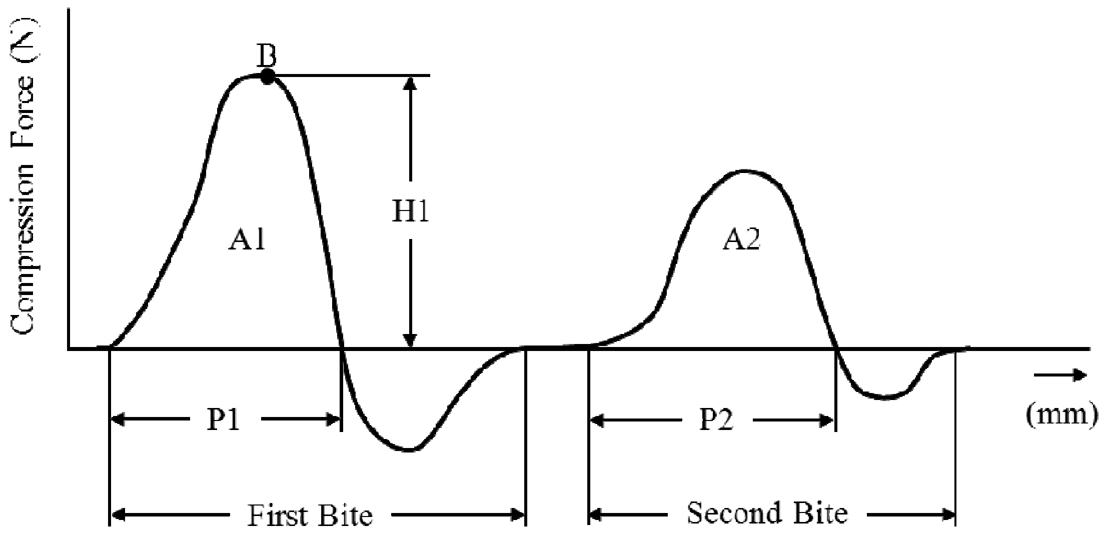


図 24、テンシプレッサーを使った 2 バイト法によって得られる加熱ゲルのプロファイル

テンシプレッサーTTP-50BX を用いて 2 バイト法により加熱ゲルの物性を測定した。 H、プランジャーの圧縮力; P,、プランジャーの移動距離; B、破断点

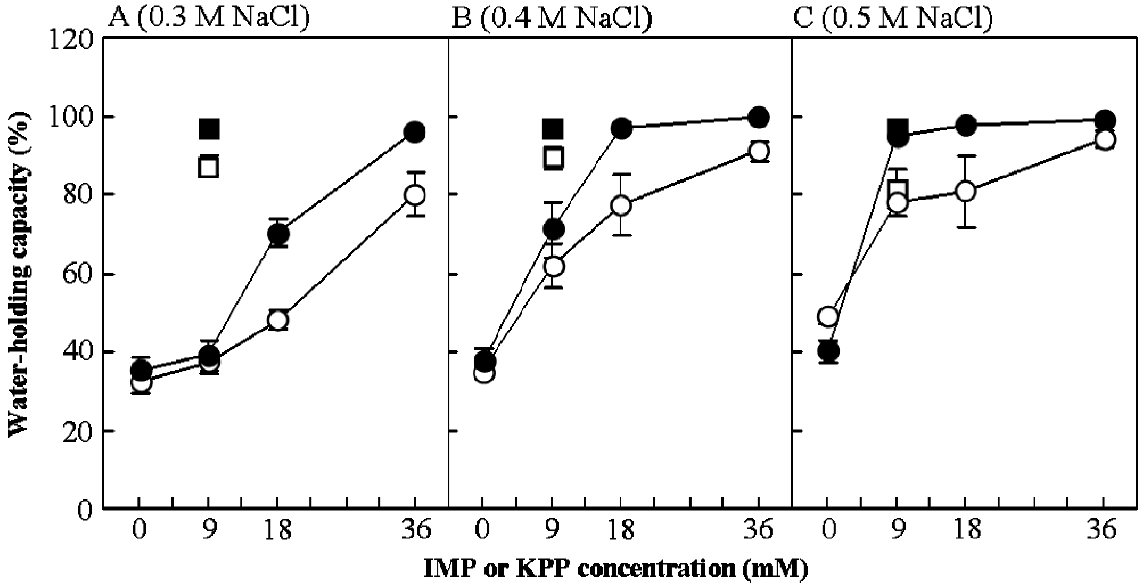


図 25、加熱ゲルの保水性に対する IMP の影響

ミンチ肉とその 9 倍量の 0-36 mM IMP を含む 0.3 M（A）、0.4 M（B）および 0.5 M（C）NaCl 溶液を混合して調製したホモジネートを 0 時間（○）または 12 時間（●）インキュベートした。9 mM KPP を含む各種濃度の NaCl 溶液で調製したホモジネートも 0 時間（□）または 12 時間（■）インキュベートした。各種ホモジネートを加熱して、得られた加熱ゲルの保水性を測定した。結果は、3 回試行した平均値±標準誤差で表した。

0 h-gel と 12 h-gel の保水性を図 25A、B および C に示した。KPP は IMP の効果と比較するために用いた。

0.3 M NaCl の抽出液を用いて作製した 0 h-gel では（図 25A）、IMP と KPP 無添加の保水性は、32%であった。NaCl 溶液に 9 および 18 mM IMP を加えると、保水性はそれぞれ 37 および 48%で、わずかに増加した。36 mM IMP を加えると、保水性は 80%というかなり高い値となった。12 h-gel では（図 25A）、IMP と KPP 無添加で保水性は 35%であった。9、18 および 36 mM IMP 添加での保水性は、それぞれ 39、70 および 96%に増加した。これらの値は各 IMP 濃度 0 h-gel の値より高く、IMP を添加した加熱ゲルの保水性は、抽出時間に依存して増加することがわかった。他方、NaCl 溶液に 9 mM KPP を加えると（図 25A）、0 h-と 12 h-gel の保水性はそれぞれ 87 と 97%に増加した。したがって、IMP は加熱ゲルの保水性を高め、36 mM IMP を添加した 0 h-と 12 h-gel の増強効果は、9 mM KPP の同効果と同等であった。

0.4 M NaCl の抽出液を用いて作製した 0 h-gel では（図 25B）、IMP と KPP 無添加の保水性は、35%であった。抽出液に 9、18 および 36 mM IMP を加えると、61、77 および 91%のかなり高い保水性となった。これらの値は、各 IMP 濃度の 0.3 M NaCl の抽出液で得られた値より高かった。したがって、0.3 から 0.4 M への NaCl 濃度の増加は、IMP 添加加熱ゲルの保水性を高めることがわかった。12 h-gel では（図 25B）、IMP と KPP 無添加で保水性は 37%であった。9、18 および 36 mM IMP 添加での保水性は、それぞれ 71、97 および 100%に増加した。これらの値は各 IMP 濃度の 0 h-gel の値より高く、IMP を添加した加熱ゲルの保水性は、抽出時間に依存して増加することがわかった。他方、NaCl 溶液に 9 mM KPP を加えると（図 25B）、0 h-と 12 h-gel の保水性はそれぞれ 89 と 96%に増加した。これらの値は、18 および 36 mM IMP 添加で得られた値と同等の値であった。

0.5 M NaCl の抽出液を用いて作製した 0 h-gel では（図 25C）、IMP と KPP 無添加の保水性は、48%であった。抽出液に 9、18 および 36 mM IMP を加えると、78、81 および 94%に増加した。各 IMP 濃度の 0.4 M NaCl の抽出液で得られた値とほとんど同値であった。12 h-gel では（図 25C）、IMP と KPP 無添加で保水性は 40%であった。9、18 および 36 mM IMP 添加での保水性は、それぞれ 95、98 および 99%に増加した。これらの値は各 IMP 濃度の 0 h-gel の値より高く、IMP を添加した加熱ゲルの保水性は、抽出時間に依存して増加することがわかった。他方、NaCl 溶液に 9 mM KPP を

加えると（図 25C）、0 h-と 12 h-gel の保水性はそれぞれ 82 と 98%に増加した。これらの値は、9、18 および 36 mM IMP 添加で得られた値と同等の値であった。

以上のすべての結果から、IMP は、豚肉加熱ゲルの保水性を高めることが明らかとなった。そしてこの効果は、3 つの要因によって高められた：（1）IMP 濃度の増加、（2）NaCl 濃度の増加、（3）抽出時間の増加である。

前章では、IMP がアクチンやミオシンの抽出性を増強する作用が、アクトミオシンのアクチンとミオシンへの解離に起因することを示した。したがって、このアクトミオシンの解離が、保水性の増強のきっかけであろう。各条件で豚肉から抽出されたミオシンは、加熱によって 3 次元の網目構造を形成し、この網目に水が保持されたと考えられる。同様に、KPP がもたらす保水性の増強もアクトミオシンの解離によって生じるアクチンおよびミオシンの抽出性の増加が原因であろう。

しかし、0.3 M NaCl の抽出液の実験系について、前章で示したアクチンおよびミオシンの抽出性と加熱ゲルの保水性の関係性を見ると、IMP と KPP の間に注目すべき違いがあることがわかった。まず、12 h-gel の保水性は、36 mM IMP で 96%、9 mM KPP で 97%であり、同等の効果が得られた。他方、このときのアクチンおよびミオシンの抽出性は、36 mM IMP でそれぞれ 32、30%、9 mM KPP でそれぞれ 55、93%であった。

次に、1.5 mM KPP を含む 0.3 M NaCl 溶液による 0 h-gel の保水性と、このときのアクチンおよびミオシンの抽出率の結果を表 7 に示した。保水性は 49%、アクチンおよびミオシンの抽出性はそれぞれ 11 および 28%であった。この結果と 36 mM IMP の結果を比較すると、1.5 mM KPP の保水性は、36 mM IMP より低いが、筋原線維タンパク質、特にミオシンの抽出性は同等であった。以上の結果から、IMP 添加ゲルは、低い抽出性であっても、高い保水性を示したが、他方 KPP 添加ゲルの保水性は、抽出性に強く依存し、低い抽出性では低い保水性を示した。このことは、IMP 添加ゲルと KPP 添加ゲルでは、保水性の発現メカニズムが異なることを示唆している。つまり、IMP 添加ゲルの高い保水性の原因を、ミオシンを主体とする 3 次元の網目構造のみに求めることはできないだろう。

Offer and Knight（1983）や Offer ら（1988）は、筋原線維が保水性を発現することを示した。IMP 添加ゲルによる保水性の発現メカニズムは、筋原線維の存在に起因していると考えられる。IMP 存在下で筋原線維が保水性を発現するメカニズムの考察

表 7　1.5 mM KPP を含む 0.3 M NaCl 溶液による 0 h-gel の保水性とアクチンおよびミオシンの抽出率

		0 h-gel
Water-holding capacity		49%
Extractability	Actin	10.6%
	Myosin	27.5%

は以下のようである。第一に、筋原線維中のアクトミオシンが、IMPによって解離されると、その筋原線維は弛緩する。この弛緩によって筋原線維中の細いフィラメントあるいは太いフィラメントは、水と接する面積が増加する。その結果、タンパク質表面の結合水および準結合水の増加がもたらされることが考えられる。第二に、この弛緩したサルコメア／筋原線維中の水が持つ性質、特にNaCl濃度（＞0.2 M）やpHなどは、さらに筋原線維を緩ませる。NaClに由来する塩化物イオンは、正に荷電したアミノ酸側鎖に結合する（Offer and Knight、1983；Belton、1987）。その結果、タンパク質の等電点の低下と負に荷電したタンパク質間の反発力の増大がもたらされ、筋原線維の体積は増加すると考えられる。これは一般的に"筋原線維の膨潤"と呼ばれる現象である。最終的な筋原線維の体積の増加によって、そこに保持される水の量は増加するかもしれない。第三に、筋原線維の水の保持には、浸透圧が作用していると考えられている（Offerら、1988）。この浸透圧は、サルコメアに細いフィラメントや太いフィラメントが抽出されずに残っていることに起因する。ミオシンが抽出された筋原線維における浸透圧は乏しく、ほとんど保水性を発現しない。以上のことから、0.3 M NaCl条件下におけるIMP添加ゲルの保水性は、IMPによってアクトミオシンが解離されて弛緩した状態のインタクトな筋原線維によって発現していると推定した。

他方、KPP添加ゲルの保水性の発現は、筋原線維タンパク質が多量に抽出された場合には、ミオシンを主体とする3次元の網目構造に起因すると考えられる。1.5 mM KPPの場合、筋原線維中のアクトミオシンは、ほとんど解離されておらず、かつ筋原線維タンパク質の抽出性が乏しいことから、筋原線維に由来する保水性および3次元の網目構造に由来する保水性がどちらも低かったと考えられる。

5. 3. 2. 豚肉加熱ゲルの物性に対するIMPの効果

0.3 M NaClと9-36 mM IMPあるいは9 mM KPPを含む加熱ゲルの物性を図26に示した。KPPはIMPの効果と比較するために用いた。硬さは食品の形態を変化させるのに必要な力、凝集性は食品の形態を構成する内部結合に必要とされる力、ガム性は硬さと凝集性と関係しており、飲み込める状態にまで噛み砕くのに必要とされる力、弾力性は外力による変形が、力を除いたときに戻る性質（割合）である。

各種加熱ゲルの硬さについては（図26A）、IMPとKPP無添加で4.2 Nであった。9、18および36 mM IMPを添加すると、硬さはそれぞれ5.4、6.3および7.9 Nに増加

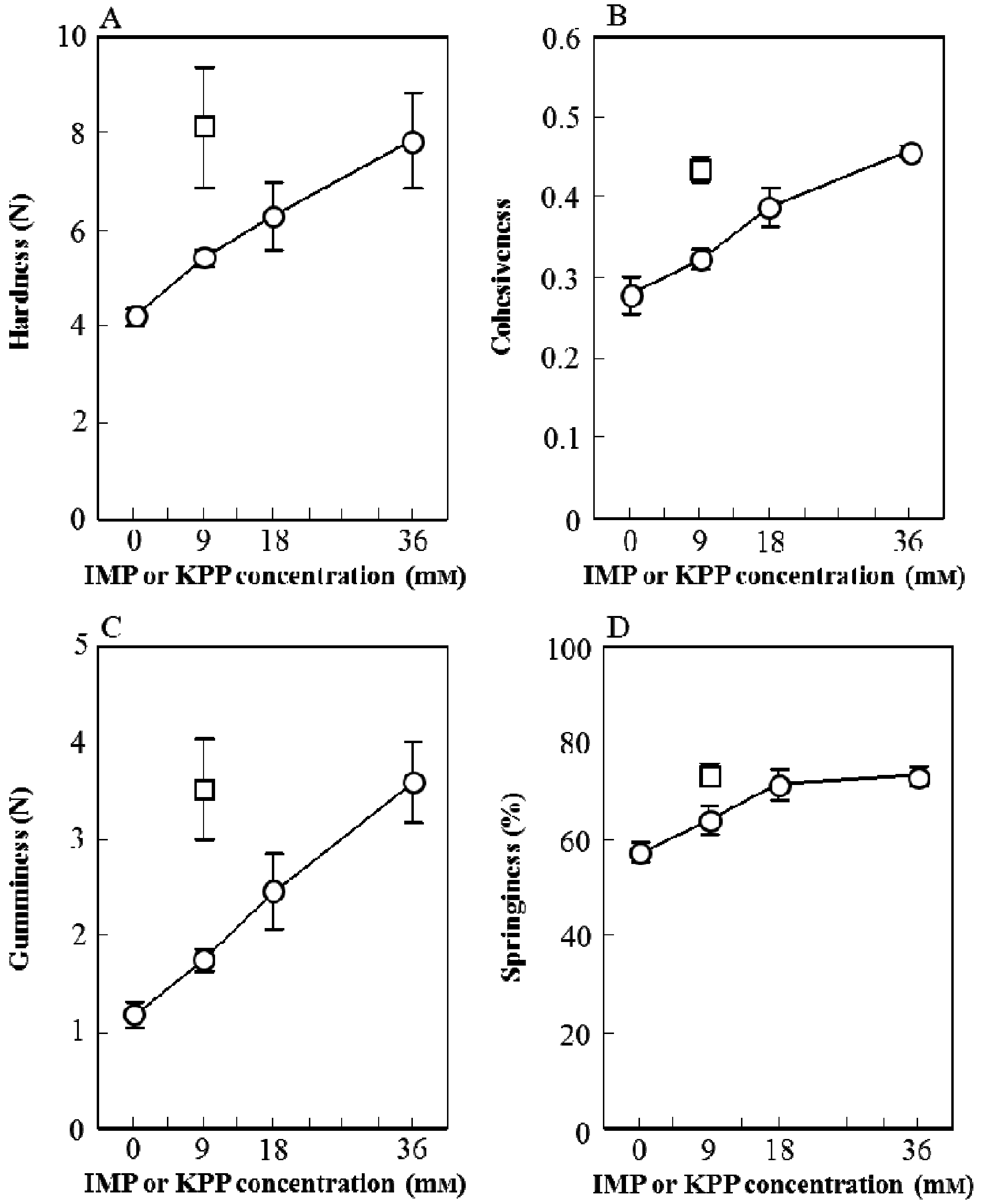


図 26、加熱ゲルの物性に対する IMP の影響

ミンチ肉とその 0.5 倍量の 0-36 mM IMP（○）または 9 mM KPP（□）を含む NaCl 溶液を混合して調製したホモジネートを加熱した。得られた加熱ゲルの硬さ（A）、凝集性（B）、ガム性（C）および弾力性（D）を測定した。加熱ゲルの塩（KCl + NaCl）濃度は、0.3 M である。結果は、3 回試行した平均値±標準誤差で表した。

した。他方、9 mM KPP を添加すると、硬さは 8.1 N であった。各種加熱ゲルの凝集性については（図 26B）、IMP と KPP 無添加で 0.28 であった。9、18 および 36 mM IMP を添加すると、凝集性はそれぞれ 0.32、0.39 および 0.46 に増加した。他方、9 mM KPP を添加すると、凝集性は 0.43 に増加した。

各種加熱ゲルのガム性については（図 26C）、IMP と KPP 無添加で 1.2 N であった。9、18 および 36 mM IMP を添加すると、ガム性はそれぞれ 1.7、2.5 および 3.6 N に増加した。他方、9 mM KPP を添加すると、ガム性は 3.5 N に増加した。

各種加熱ゲルの弾力性については（図 26D）、IMP と KPP 無添加で 57%であった。9、18 および 36 mM IMP を添加すると、弾力性はそれぞれ 64、71 および 73%に増加した。他方、9 mM KPP を添加すると、弾力性はそれぞれ 74%に増加した。

以上のすべての結果から、36 mM IMP は、豚肉加熱ゲルの硬さ、凝集性、ゴム性および弾力性を高めることが明らかとなった。さらにこれらの物性値は 9 mM KPP 添加ゲルに匹敵するものであった。この原因は、IMP がアクチンとミオシンの抽出性を高めたことであろう。

36 mM IMP 添加と 9 mM KPP 添加の加熱ゲルの各物性値が同等であったことは興味深い結果である。前章で示したように、36 mM IMP を含む 0.3 M NaCl 溶液によるアクチンとミオシンの抽出性は、9 mM KPP を含む 0.3 M NaCl 溶液のそれよりかなり低かった。ゲル強度と筋原線維タンパク質の抽出性の間には正の相関がある（Samejima ら、1985）。しかしながら、今回の結果は、IMP 添加ゲルが KPP 添加ゲルよりも低い程度のアクチンとミオシンの抽出で十分な物性を発現できることを示唆した。

36 mM IMP と 9 mM KPP の間の抽出性の違いは、IMP 添加と KPP 添加のホモジネートにおいて組成の違いをもたらすだろう。IMP による低い抽出性は、ホモジネートに高次構造を維持した筋原線維が存在する可能性を示している。前項で述べたように、この筋原線維は IMP によって弛緩状態にある。IMP 添加のホモジネートは、少量の抽出されたアクチンおよびミオシンとインタクトな筋原線維によって構成されるであろう。したがって、このゲルの物性値は、加熱前のホモジネートにおけるタンパク質の抽出量と筋原線維構造の完全性に起因すると推定した。Barbut（1988）は、ソーセージの硬さや凝集性に対するチョッピング時間の影響を調べた。短時間チョッピングしたソーセージ（塩濃度 1.5-2.5%、リン酸塩無添加）の硬さおよび凝集性は、長時間チョ

ッピングしたものより高い値となることを示した。チョッピングは筋原線維の構造を物理的に破壊する。つまり、この結果は筋原線維構造の破壊の程度が低いほど、物性が高くなることを示しており、IMP 添加ゲルにおける推定を支持する結果である。他方、KPP による高い抽出性は、筋原線維の高次構造が崩壊している可能性を示している。KPP 添加のホモジネートは、多量の抽出されたアクチンおよびミオシンで構成され、このゲルの物性値はタンパク質の抽出量に起因すると推定した。この場合、Samajima ら（1985）が示したゲル強度と抽出性の間の正の相関と一致する。

5. 3. 3. IMP 添加豚肉加熱ゲルの官能特性

加熱ゲルのテクスチャーに関する官能試験の結果を図 27 に示した。IMP-gel の硬さは、KPP-gel と比べて、わずかに低い評点を示し、弾力性、結着性およびジューシーさは同等の評点を示した。他方、control-gel は、KPP-gel と比べて、ジューシーさを除いた全ての項目で低い評点を示した。この結果は、前項で得られた加熱ゲルの保水性および物性の結果と一致した。IMP-gel の硬さの評価が、KPP-gel より低いことは、その低い抽出性に起因しているのかもしれない。あるいは、前項で推定した IMP-gel と KPP-gel の組成の違いが、官能試験では検出された可能性もあるだろう。

加熱ゲルの風味に関する官能試験の結果を図 28 に示した。IMP-gel のうま味および総合評価は、KPP-gel と比べて、高い評点を示し、塩味、収斂味および匂いは、同等の評点を示した。他方、control-gel は、KPP-gel と比べて、うま味、塩味および収斂味で同等の評点を示したが、匂いおよび総合評価では低い評点を示した。IMP-gel のうま味の評価については、IMP はうま味を呈する物質であるから、妥当な結果が得られた。control-gel の匂いの低い評価は、それが有している脂質酸化臭が原因であったが、IMP-gel では、この酸化臭が感じられなかったことは興味深い結果である。ピロリン酸塩のような無機の重合リン酸塩は、酸化臭の発生を抑制する（Matlock ら、1984a、b；Sofos、1986）。この作用は、重合リン酸塩が酸化を触媒する金属イオンをキレートすることに起因する。IMP は 2 価のカチオンをキレートすることが示されている（Brown and Bugg、1980）。今回の結果から IMP も同様の能力を示すことが明らかになった。

以上のすべての結果から、IMP は加熱ゲルの官能特性を向上させること、IMP 添加加熱ゲルの官能特性は、KPP 添加ゲルと同等かそれ以上であることが明らかに

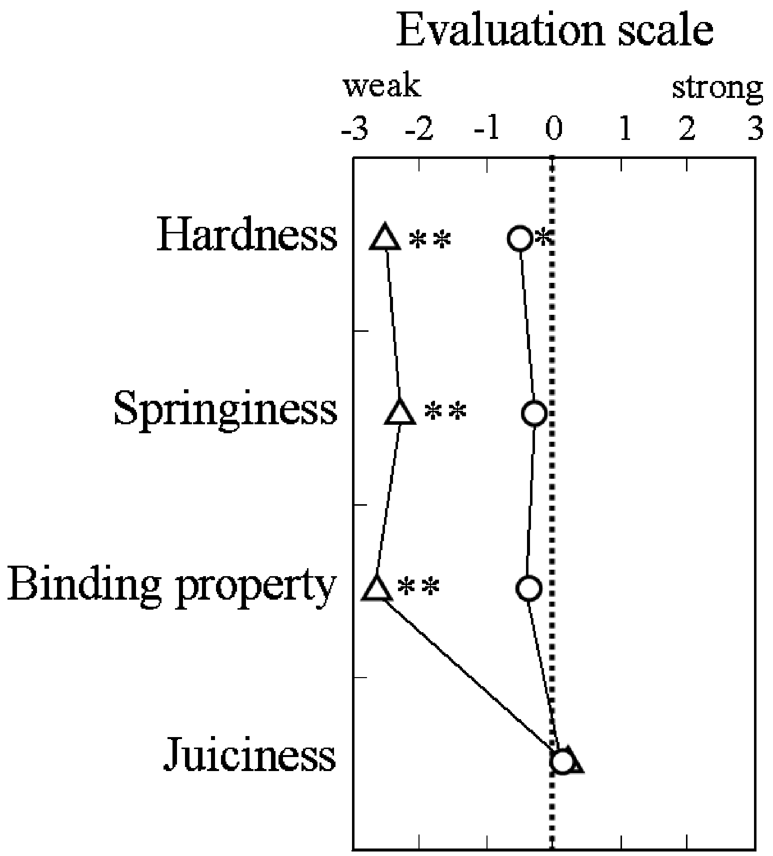


図 27、加熱ゲルのテクスチャーの官能評価

加熱ゲルの官能評価は 9 mM KPP（KPP-gel、点線）、36 mM IMP（IMP-gel、○）そして KPP および IMP 無添加（control-gel、△）の 3 種類のゲルを使って行った。差は 7 点(-3 から+3)で評価し、KPP-gel の評価をゼロとした。*$p < 0.05$ (*versus* KPP-gels); **$p < 0.01$ (*versus* KPP-gels)

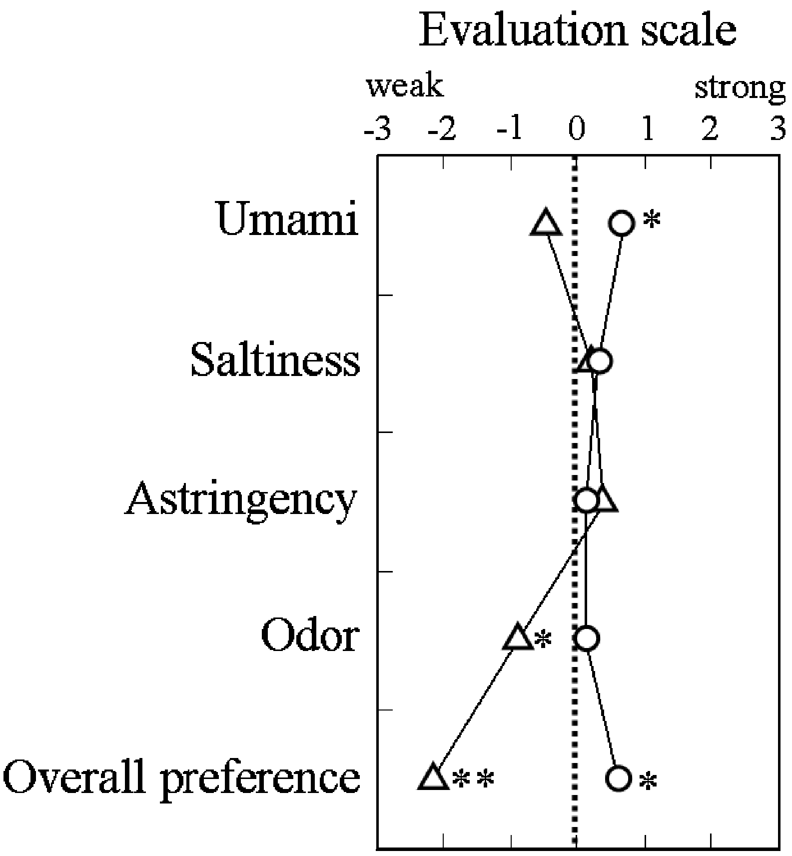


図 28、加熱ゲルの風味の官能評価

加熱ゲルの官能評価は 9 mM KPP（KPP-gel、点線）、36 mM IMP（IMP-gel、○）そして KPP および IMP 無添加（control-gel、△）の 3 種類のゲルを使って行った。差は 7 点(-3 から+3)で評価し、KPP-gel の評価をゼロとした。*$p < 0.05$ (*versus* KPP-gels); **$p < 0.01$ (*versus* KPP-gels)

なった。

総括

第一章で示したように、NMP によるアクトミオシンの解離作用には、プリン骨格が必須であることが明らかになった。これは、アクチン-ミオシン間結合に関わる構造を推定するにあたって重要な情報を提供することになり、タンパク質構造化学的な意義が大きい。

第二章～第五章で示された知見は、PrMP による加熱ゲル（モデルソーセージ）の保水性および物性の向上効果を明らかにしたものであり、食肉製品の製造に大いに貢献するものであろう。PrMP は食品添加物として使用頻度の高い物質の 1 つであり、食品衛生的な問題点はほぼ無く、入手することも容易である。また、食肉にも数 μmol/g 含まれる物質である。この PrMP に新たな機能が見出されたことは、製造者および消費者にとって大きなメリットがあると言える。

PrMP 添加加熱ゲル（0.3 M NaCl 下モデルソーセージ）の品質向上は、PrMP による筋原線維タンパク質の抽出増強作用によってもたらされた。この抽出増強作用は、PrMP が有するアクトミオシンの解離作用（アクチン-ミオシン間結合の解離作用）に起因するものである。PrMP が筋原線維の細いフィラメントと太いフィラメント間の結合を解離することによって、アクチンおよびミオシンが抽出されやすくなったと考えられる。

ソーセージの保水性および物性の発現機構を示した過去の報告の多くは、塩漬工程でミオシンが抽出されたことを前提とし、精製されたミオシンを用いて、その加熱ゲルが保水性や物性を発現することを示している。これに対し、本研究は塩漬工程で豚肉から抽出された筋原線維タンパク質およびその抽出率とモデルソーセージの保水性や物性を直接結びつけた数少ない研究として価値があると考えられる。本研究の結果は、ミオシンの抽出率の増加に伴いその加熱ゲルの保水性および物性が向上することを示した。この結果は、精製ミオシンによって示されたソーセージの保水性および物性の発現機構を強く支持するものであった。さらに、ミオシンと同時に抽出されるアクチンに注目すると、ある条件下では、F-アクチンがミオシン加熱ゲルを補強することが示されている。しかし、ソーセージの品質に対するアクチンの役割はまだ明らかではない。これを明らかにするために、本研究で示した PrMP によるアクチンの抽出率の増加という知見は貢献するであろう。

IMP を添加した加熱ゲル（モデルソーセージ）の保水性については、筋原線維タンパク質の抽出性が比較的低くとも保水性が発現することを示した。この現象は、

IMP によって筋原線維の細いフィラメントと太いフィラメントの結合が解離され、両フィラメントの間に水が保たれることで保水性が発現したものと考えられた。これは、Offer and Trinick（1983）および Offer ら（1988）が筋原線維の膨潤現象から推定した筋原線維による保水性発現機構を支持する結果であろう。また、保水性は、抽出された筋原線維タンパク質、特にミオシンの加熱によって形成される 3 次元の網目構造によっても発現する。したがって、IMP 添加モデルソーセージの保水性は、少なくとも 2 つの機構によって発現していると考えられる。他方、IMP 無添加の通常のソーセージにおいても、カッティング工程後に得られる肉のりは、筋原線維や抽出されたタンパク質によって構成されている。本研究の結果は、この保水性の発現にも筋原線維が寄与することを示唆している。このように本研究の結果は、ソーセージの保水性発現機構の詳細を明らかにすることに寄与するであろう。

PrMP による筋原線維タンパク質抽出の増強作用は、繰り返しになるが、PrMP のアクトミオシン解離作用によってもたらされる。本研究では、この PrMP による抽出増強作用の機構を明らかにすべく、同じくアクトミオシン解離作用を有するピロリン酸塩の抽出増強作用との比較を行った。その結果、PrMP とピロリン酸塩の抽出増強作用に違いがあること、さらにこの違いはアクトミオシン解離作用に起因しないことを明らかにした。PrMP による筋原線維タンパク質の抽出において、PrMP は細いフィラメントと太いフィラメントの間の結合を解離するが、PrMP 自身の抽出作用は弱く、NaCl の抽出作用も影響するものと考えられた。他方、ピロリン酸塩は細いフィラメントと太いフィラメントの間の結合を解離することに加えて、強い抽出作用も有していると考えられた。PrMP とピロリン酸塩の抽出作用の強さの違いは、アクチンとミオシンの間の結合が解離した後にも細いフィラメントと太いフィラメントを拘束しているものを、前者は容易には解除できないのに対して、後者が容易に解除できることにあると考えられた。そして、その拘束とは、Z 線-コネクチン-太いフィラメント間の結合と Z 線-細いフィラメント間の結合であると推定した。これらの知見は、筋原線維の微細構造に対する PrMP とピロリン酸塩の効果を明らかにしたものであり、その意義は大きい。

筋原線維タンパク質の抽出に関しての PrMP、ピロリン酸塩および NaCl 等の添加物が有する特徴を明らかにすることにより、塩漬工程は効率化され、高品質な食肉製品の製造につながると考えられる。本研究で示した PrMP とピロリン酸塩の併用による筋原線維タンパク質の抽出性の相乗的な増加は、少ないピロリン酸塩で高品質

のソーセージを製造することにつながり、塩漬工程の効率化の一例となるものであろう。

論文の要約

ヌクレオシド-5'-一リン酸が豚肉からの筋原線維タンパク質の抽出とその加熱ゲル形成に及ぼす影響

中村　幸信

序

ソーセージの国内生産重量および1世帯当たりの購入数量は、他の食肉製品に比べ多い。したがって、生産者や消費者は、高品質のソーセージを製造することに関心が高い。高品質なソーセージは、適度な保水性および結着性を有している。それらの発現には、主原料となる食肉に存在する筋原線維タンパク質（Mf-p）、特にミオシンが必須である。Mf-p は、製造の塩漬工程で食肉から抽出され、続く加熱工程で 3 次元の網目構造を形成し、最終的にソーセージの保水性および結着性を発現させる。日本のソーセージ製造の主流である低塩濃度下（1.5%）における塩漬工程では、Mf-p を抽出するためにピロリン酸塩を使用している。このピロリン酸塩の役割は、食肉において死後硬直時に形成されたアクチン-ミオシンの硬直結合体（アクトミオシン）をアクチンとミオシンに解離させ、これらタンパク質の抽出を容易にすることである。

他方、アデノシン-5'-一リン酸（AMP）やイノシン-5'-一リン酸（IMP）がアクトミオシンをアクチンとミオシンに解離させることが明らかにされている。これは上述のピロリン酸塩の作用と同様である。しかしながら、AMP や IMP によるアクトミオシン解離機構は明らかになっていなかった。そこで、本研究では塩基部分の異なるヌクレオシド-5'-一リン酸（NMP）を用いてアクトミオシン解離機構を調べ、この解離作用がグアノシン-5'-一リン酸（GMP）を含めたプリンヌクレオシド-5'-一リン酸（PrMP）によって生じることを明らかにした。

次に、PrMP の中から、ソーセージ製造においてうま味を付与する食品添加物として使用されている IMP と GMP を選択し、これらの Mf-p の抽出作用について検討した結果、IMP と GMP が Mf-p の抽出を高めることを明らかにした。

さらに、IMP を Mf-p の抽出を高めるために添加した加熱ゲルを作製した。その結果、IMP が加熱ゲルの保水性、物性および官能特性を高めることを明らかにした。

I、NMP によるアクトミオシンの解離作用

精製アクトミオシンと GMP、シチジン-5'-一リン酸（CMP）、デオシキチミジン-5'-一リン酸（dTMP）およびウリジン-5'-一リン酸（UMP）を 0.2 M KCl 下、pH 7.2、0°C で 16 時間インキュベートした。各種 NMP の濃度は 8 mM とした。この結果、GMP は AMP や IMP と同様にアクトミオシンをアクチンとミオシンに解離させたが、CMP、dTMP および UMP はアクトミオシンを解離させなかった。したがって、プリン骨格を有する AMP、IMP および GMP はアクトミオシンを解離できるが、ピリミジン骨格を有する CMP、dTMP および UMP はアクトミオシンを解離できないことが明らかとなった。PrMP は、ピリミジンヌクレオシド-5'-一リン酸（PyMP）よりもアクトミオシンに対して強く結合することができるためにアクトミオシンの解離作用を示したと推定した。

II、PrMP による Mf-p の抽出～ピロリン酸塩との比較～

食肉に 9-36 mM IMP あるいは GMP を含む 0.3-0.5 M NaCl 溶液を 9 倍量加えて、Mf-p を抽出した。この抽出に対する NaCl 濃度、IMP あるいは GMP 濃度および抽出時間の影響を調べた。そして、1.5-9 mM のピロリン酸四カリウム（KPP）の作用と比較した。その結果、IMP および GMP が、Mf-p の抽出を高めることが明らかになった。これは IMP および GMP が有するアクトミオシンの解離作用に起因するものと考えられた。IMP による Mf-p 抽出の増加は、NaCl 濃度と IMP 濃度の増加および抽出時間の延長によってさらに高められた。GMP による Mf-p 抽出の増加は、NaCl 濃度と GMP 濃度の増加によってさらに高められたが、抽出時間の延長による抽出率の低下が生じた。他方、KPP によっても Mf-p の抽出は増加したが、NaCl 濃度の増加や抽出時間の延長によって高められなかった。IMP、GMP および KPP はいずれもアクトミオシンの解離作用を有しているが、これらの Mf-p の抽出性については異なることが明らかになった。KPP は比較的低い NaCl 濃度および短時間で Mf-p を抽出することが可能であった。GMP 抽出における抽出時間の延長による抽出率の低下は、アクトミオシンを解離させていた GMP が 4 量体の G-カルテットを形成することで、食肉から抽出され解離状態にあったアクチンおよびミオシンが再びアクトミオシンを形成することに起因するものと推定した。

III、PrMP と KPP の併用による Mf-p の抽出

食肉に 9-36 mM IMP あるいは GMP と 1.5-3.0 mM KPP を併用した 0.3 M NaCl 溶液を 9 倍量加えて、Mf-p を抽出した。この抽出に対する PrMP と KPP の併用効果を調べた。この結果、PrMP と 1.5 mM KPP の併用が、Mf-p の抽出を著しく高めることが明らかになった。特にミオシン抽出に関しては、相乗効果が示された。PrMP と 1.5 mM KPP の併用による Mf-p の抽出の著しい増加は、PrMP と KPP による Mf-p の抽出様式が異なっており、PrMP による抽出の律速段階を KPP が除去する補完作用によってもたらされたと推定した。IMP と KPP を併用した場合、抽出時間の延長によってアクチン抽出は増加したが、ミオシン抽出は増加しなかった。この結果は、両タンパク質の筋原線維における存在状態の違い、すなわちアクチンは細いフィラメント、ミオシンは太いフィラメントとして存在することに起因するものと推定した。

IV、生理的イオン強度下での IMP および KPP による Mf-p の抽出様式

精製アクトミオシンと 8 mM IMP を 0.06-0.2 M KCl、pH 7.2、0°C で最大 4 時間までインキュベートして、アクトミオシンの解離に要する時間と KCl 濃度の影響を調べた。この結果、IMP によるアクトミオシンの解離は 10 分以内に完了することおよび KCl 濃度が 0.19 M 以上で起こることを明らかにした。他方、KPP によるアクトミオシンの解離は、KCl 濃度が 0.06 M 以上で起こった。IMP がアクトミオシンの解離に要する時間が、KPP とほぼ同等であることから、高イオン強度下での筋原線維からのアクチンとミオシンの抽出に IMP が KPP より時間を要する原因は、アクトミオシン解離作用そのものにはないと考えられた。IMP によるアクトミオシンの解離に要する KCl 濃度が KPP のそれより高いことは、IMP のアクトミオシンに対する親和性が KPP のそれより低いことを示唆し、両者の抽出様式の違いの原因の 1 つと考えられた。

精製した筋原線維と 8 mM IMP または KPP を 0.2 M KCl、pH 7.2、0°C でインキュベートした。 その結果、IMP により Mf-p は抽出されなかったが、KPP により抽出された。さらに、IMP（8 mM）と KPP（1 mM）を併用した場合、Mf-p は抽出された。これらの結果から、次のことを推定した。生理的イオン強度下での抽出において、IMP は細いフィラメントと太いフィラメント間の結合を解離させるが、細いフィラメント-Z 線間の結合および太いフィラメント-コネクチン-Z 線間の結合を解除しないために、アクチンおよびミオシンは筋原線維内に拘束され抽出されなかったと推定した。他方、KPP は細

いフィラメントと太いフィラメント間の結合を解離させるばかりでなく、細いフィラメントとZ 線間および太いフィラメントとコネクチン-Z 線間の結合を解除する能力を有していると推定した。このような IMP と KPP の性質の違いが、高イオン強度下で認められた両者の抽出様式の違いの原因であると考えられた。この推定は、高イオン強度下での IMP によるアクチンおよびミオシン抽出の増加に伴って、αアクチニンおよびコネクチンの抽出も増加したことにより支持された。

V、IMP を添加した加熱ゲルの保水性、物性および官能特性～KPP との比較～

IMP を添加した加熱ゲルを作製した。保水性測定のゲルは、食肉に 9-36 mM IMP を含む 0.3-0.5 M NaCl 溶液を 9 倍量加えて、0 および 12 時間抽出して得られたホモジネートを加熱して得られた。物性測定および官能試験のゲルは、食肉に 0.5 倍量の IMP を含む NaCl 溶液を加えて得られたホモジネートを加熱して得られた。この加熱ゲルの塩濃度（NaCl および KCl）は 0.3 M、IMP 濃度は 9-36 mM とした。この結果、IMP の添加が、加熱ゲルの保水性、物性および官能特性を高めることが明らかになった。IMP 添加ゲルが有するこれらの性質は、KPP 添加加熱ゲルに匹敵した。この原因は、IMP による Mf-p 抽出の増加によるものと推定した。さらに、IMP によって生じる細いフィラメントと太いフィラメントの間の結合が解離された筋原線維も、保水性および物性を高めるものと推定した。

総括

以上の本研究での知見は、PrMP による加熱ゲル（モデルソーセージ）の保水性および物性の向上効果を示したものであり、良質な食肉製品の製造に大いに貢献するものであろう。PrMP とピロリン酸塩の Mf-p 抽出に対する相乗効果は、少ないピロリン酸塩で高品質のソーセージを製造することにつながり、その産業的意義は大きい。また、NMP によるアクトミオシンの解離作用にプリン骨格が必要であることや、PrMP と KPP の筋原線維からアクチンおよびミオシンを抽出する様式が異なることなどの知見はアクトミオシンおよび筋原線維構造の詳細を明らかにすることに貢献するであろう。

Summary of doctor thesis

Effects of nucleoside-5'-monophosphate on the extraction of myofibrillar proteins from porcine meat and the formation of heat-induced gels from those proteins

Yukinobu Nakamura

Introduction

Japanese manufactures and consumers for meat products share a common interest in production of high-quality sausages since domestic production weight of sausages and quantity of purchase per household of sausages are higher than those of the other meat products. The high-quality sausages bear an adequate level of the water-holding capacity and binding property. An expression of the water-holding capacity and binding property is essential for myofibrillar proteins (Mf-ps) in meat being a major ingredient. During the process for sausages, Mf-ps are extracted from meat in curing process and then a three-dimensional network of Mf-ps is formed in heating process. The formation of the network produce the good water-holding capacity and binding property. Curing process at low salt concentration (1.5%) prevailing in Japanese sausage production has used pyrophosphates to extract Mf-ps. The pyrophosphates dissociate a rigor complex (actomyosin) which is formed by an association between actin and myosin in rigor mortis. Dissociated actomyosin is extracted easily from myofibrils.

Actomyosin was found to be dissociated to actin and myosin by nucleoside-5'-monophoshaptes (NMPs) (*e.g.,* adenosine-5'-monophoshapte (AMP) or inosine-5'-monophoshapte (IMP)). This effect of NMPs is similar to that of pyrophosphates described above. However, this dissociation mechanism of actomyosin by NMPs was unrevealed. In this study, the mechanism was examined by the use of NMPs containing different bases. It was found that actomyosin was dissociated by purine-nucleoside-5'-monophosphates (PrMPs) such as guanosine-5'-monophospahte (GMP) containing purine as bases.

An extraction of Mf-ps by PrMPs was examined. PrMPs such as IMP and GMP is

used as food additives of umami in the production of sausages. It was found that the extraction of Mf-ps was enhanced by IMP and GMP.

Heat-induced gels were prepared by an addition of IMP in order to enhance the extraction of Mf-ps. It was found that the water-holding capacity, physical and sensory properties of heat-induced gels was enhanced by IMP.

I, Effect on dissociation of actomyosin by NMPs

Actomyosin was incubated with GMP, CMP, dTMP or UMP in the presence of 0.2 M KCl at pH 7.2 and 0°C for 16 hours. The various NMPs' concentrations were 8 mM. Actomyosin was dissociated by GMP similarly to AMP and IMP, but not by CMP, dTMP and UMP. Thus, it was found that actomyosin was dissociated by the PrMPs containing purine as bases, but not by the pyrimidine-nucleoside-5'-monophosphates (PyMPs) containing pyrimidine as bases. It is assumed that the dissociation of actomyosin of PrMPs was brought about by those tighter binding to actomyosin than PyMPs because of differences in the structure of both bases.

II, Extraction of Mf-ps by PrMPs: a comparison with pyrophosphates

In order to extract Mf-ps, minced meat was mixed with 9 volumes of 0.3-0.5 M NaCl solutions containing 9-36 mM IMP or GMP. Effects of NaCl, IMP or GMP concentrations and extraction time on the extraction were examined and compared with effects of 1.5-9 mM tetrapotassium pyrophosphate (KPP). The extraction of Mf-ps was found to be enhanced by IMP and GMP. This effect was attributable to the dissociation of actomyosin by IMP and GMP. In the case of IMP, the amounts of the Mf-ps were increased by the rise of NaCl and IMP concentrations and the elongation of the extraction time. In the case of GMP, the amounts of the extracted proteins increased by the rise of NaCl and GMP concentrations. But the amounts were lowered by the elongation of the extraction time. In the case of KPP, there was the same increase of the amounts of the extracted proteins, but this increment was not raised by the elevation of NaCl concentration and the elongation of the extraction time. Thus, it was found that IMP, GMP and KPP, which have a common ability to dissociate actomyosin, differ in

an ability of the extraction of Mf-ps. KPP was able to extract Mf-ps at relatively lower NaCl concentrations and for a shorter time than PrMPs. The decrease of the extractability by GMP may be attributed to the re-association of dissociated actin and myosin free from meat induced by the formation of a G-quartet which is a tetramer of GMP.

III, Extraction of Mf-ps by a combination of PrMPs and KPP

In order to examine a combinational effect between PrMPs and KPP on the extraction of Mf-ps, minced meat was mixed with 9 volumes of 0.3-0.5 M NaCl solutions containing 9-36 mM IMP or GMP and 1.5-3 mM KPP. The extraction of Mf-ps was markedly enhanced by the combination of PrMPs and 1.5 mM KPP. The synergy effect was indicated in particular in the extraction of myosin. It was assumed that this marked increase was induced by a complementary effect between PrMPs and KPP. It means that KPP may remove a rate-limiting step in the extraction by PrMPs because of the difference between PrMP and KPP in a mode of extraction. The elongation of the extraction time enhanced the extraction of actin but not that of myosin. This result was attributed to be the difference in an existence form of both proteins in myofibrils. Thus, actin and myosin exist as thin and thick filaments in myofibrils, respectively.

IV, Mode of extraction of Mf-ps by IMP and KPP at the physiological ionic strength

In order to examine time and KCl concentration required for the dissociation of actomyosin by IMP, purified actomyosin was incubated with 8 mM IMP at 0.06-0.2 M KCl, pH 7.2 and 0°C up to 4 hours. It was found that the dissociation of actomyosin by IMP finished within 10 minutes and occurred in the KCl concentration above 0.19 M. On the other hand, the dissociation of actomyosin by KPP occurred in the KCl concentration of above 0.06 M. Since time required for the dissociation of actomyosin was similar between IMP and KPP, the dissociation of actomyosin itself was unlikely to be responsible for the time-consuming extraction of actin and myosin from myofibrils by IMP at the high ionic strength. The KCl concentration required for the dissociation

of actomyosin of IMP was higher than that of KPP, suggesting that an affinity of IMP on actomyosin is lower than that of KPP. Thus, this may be a possible cause of the difference in the extraction mode between IMP and KPP.

Purified myofibrils were incubated with 8 mM IMP or KPP at 0.2 M KCl, pH 7.2 and 0°C. Mf-ps were not extracted by IMP but were by KPP and by the combination of 8 mM IMP and 1 mM KPP. These results lead the following assumption. At the physiological ionic strength, IMP dissociates a binding between thin and thick filaments but does not dissociate those between thin filaments and Z-lines or between thick filaments and connectin-Z-lines. Thus, IMP may be unable to extract actin and myosin restrained within myofibrils. KPP may have an ability to dissociate not only the bindings between thin and thick filaments but also between thin filaments and Z-lines or between thick filaments and connectin-Z-lines. This assumption was supported by the enhancement of the extraction of α-actinin and connectin accompanying that of actin and myosin at the high ionic strength.

V, Water-holding capacity, physical and sensory properties of IMP-added heat-induced gels, a comparison with KPP

Heat-induced gels containing IMP were prepared. For the determination of water-holding capacity, minced meat was mixed with 9 volumes of 0.3-0.5 M NaCl solutions containing 9-36 mM IMP or 9 mM KPP. The heat-induced gels were obtained by the incubation of the homogenate for 0 or 12 h and the subsequent heating of that. For the determination of physical and sensory properties, minced meat was mixed with 0.5 volumes of NaCl solutions containing IMP. The homogenate was heated to obtain heat-induced gels which contained the salt (NaCl and KCl) concentration of 0.3 M and the IMP concentration of 9-36 mM or the KPP concentration of 9 mM KPP. It was found that the addition of IMP enhanced the water-holding capacity, physical and sensory properties of heat-induced gels. These features of IMP-added gels were comparable to those of KPP-added gels. This improvement of the features appears to be a result of the increase in the extraction of Mf-ps. Furthermore, it was assumed that water-holding capacity and physical properties of heat-induced gels were also enhanced

by myofibrils where IMP dissociated the binding between thin and thick filaments.

Conclusions

The findings in this study indicate that PrMPs brought about the improvement of the water-holding capacity, physical and sensory properties of heat-induced gels (model sausages), markedly contributing to the manufacture of good meat products.

The synergistic effects of PrMPs and pyrophosphates on the extraction of Mf-ps would enable the production of high-quality sausages using a little amount of pyrophosphates, leading to large industrial merits. The findings that PrMPs are necessary for the dissociation of actomyosin and modes of the extraction of actin and myosin by PrMPs and KPP are different appear to contribute to the clarification of the structures of actomyosin and myofibrils.

参考文献

Bendall JR, *J. Sci. Food Agric.,* **5**, 468-475 (1954)

Barbut S, *J. Food Sci.*, **53**, 1300-1304 (1988)

Belton PS, *J. Sci. Food Agric.*, **41**, 267-275 (1987)

Brahms J and Brezner J, *Arch. Biochem. Biophys*., **95**, 219-228 (1961)

Briskey EJ and Fukazawa T, *Advances in Food Research*, **19**, 279-349 (1971)

Brown EA and Bugg CE, *Acta Cryst.*, **B36**, 2597-2604 (1980)

Clark KA, McElhinnu AS, Beckerle MC and Gregorio CC, "*Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*" Vol. 18, eds. Schekman R, Goldstein L, Mcknight SL and Rossant J, Annual Reviews, Palo Alto, California, pp. 637-706 (2002)

Davis JT, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **43**, 668-698 (2004)

深沢利行, "生化学実験講座 15 筋肉," 江橋 節郎, 丸山工作編, 東京化学同人（1975）

Fukazawa T, Hashimoto Y and Yasui T, *J. Food Sci.* **26**, 541-549 (1961a)

Fukazawa T, Hashimoto Y and Yasui T, *J. Food Sci.* **26**, 550-555 (1961b)

Funatsu T, Higuchi H and Ishiwata S, *J. Cell Biol.*, **110**, 53-62 (1990)

Geeves MA and Holmes KC, "*Advances in Protein Chemistry*" Vol. 71, eds. Squire JM and Parry DAD, Elsevier Academic Press, San Diego, California, pp. 161-193 (2005)

Goll DE, Suzuki A, Temple J, Holmes GR, *J. Mol. Biol.,* **67**, 469-472 (1972)

Gordon A and Barbut S, *Crit. Rev. Food Sci. Nurt.*, **32**, 299-332 (1992)

Greene LE, *Biochemistry*, **20**, 2120-2126 (1981)

Haga T, Maruyama K and Noda H, *Biochim. Biophys. Acta*, **94**, 226-237 (1965)

Haga T, Yamamoto M, Maruyama K and Noda H, *Biochim. Biophys. Acta*, **127**, 128-139 (1966)

Hama H, Maruyama K, Noda H, *Biochim, Biophys, Acta,* **102**, 249-260 (1965)

服部昭仁, "肉の科学," 沖谷明紘編, 朝倉書店（1996）

Hermansson AM, Harbitz O and Langton M, *J. Sci. Food Agric.*, **37**, 69-84 (1986)

Higuchi H and Ishiwata S, *Biophys. J.*, **47**, 267-275 (1985)

Higuchi H, Suzuki T, Kimura S, Yoshioka T, Maruyama K, Umazume Y, *J. Muscle Res.*

Cell Motil., **13**, 285-294 (1992)
一般社団法人食品需給研究センター，食品産業動態調査 (2013)
http://www.fmric.or.jp/stat/stat.html#bukka
一般社団法人食肉科学技術研究所，品質管理担当者講習会テキスト（2012）
Ishioroshi M, Samejima K and Yasui T, *J. Food Sci.*, **44**, 1280-1284 (1979)
Ishioroshi M, Samejima K and Yasui T, *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 2809-2816 (1983)
Ishiwata S, *J. Biochem.*, **89**, 1647-1650 (1981)
Ishiwata S, Muramatsu K and Higuchi H, *Biophys. J.*, **47**, 257-266 (1985)
Ito Y, Tatsumi R, Wakamatsu J, Nishimura T and Hattori A, *Anim. Sci. J.*, **74**, 417-425 (2003)
Kimura S, Maruyama K, *J. Biochem.,* **94**, 2083-2085 (1983)
Laemmli UK, *Nature,* **227**, 680-685 (1970)
丸山工作, “生化学実験講座　筋肉,” 江橋節郎，丸山工作編，東京化学同人 (1975)
丸山工作, “筋収縮の制御,” 岩波書店 (1976)
丸山工作，生物物理, **34**, 143-148（1994）
Maruyama K and Tonomura Y, *J.Res. Inst.Catalysis, Hokkaido Univ.*, **5**, 55-70 (1957)
Maruyama T, Nakauchi Y, Kimura S, Maruyama K, *J. Biochem.,* **105**, 323-326 (1989)
Matlock RG, Terrell RN, Savell JW, Rhee KS and Dutson TR, *J. Food Sci.*, **49**, 1363-1366, 1371 (1984a)
Matlock RG, Terrell RN, Savell JW, Rhee KS and Dutson TR, *J. Food Sci.*, **49**, 1372-1375 (1984b)
Matsuishi M, Okitani A, *Meat Sci.,* **56**, 369-377 (2000)
Morita F, *J. Biol. Chem.*, **242**, 4501-4506 (1967)
Morita F, *Biochim. Biophys. Acta*, **343**, 674-681 (1974)
Morita J, Kume H, Nagahashi T, and Yasui T, *J. Fac. Agric. Hokkaido Univ.*, **61**, 364-370 (1983)
日本ハム・ソーセージ工業協同組合，年次食肉加工品生産数量 (2013)
http://hamukumi.lin.gr.jp/data/nenji_seisan.htm
日本化学会, “化学便覧改訂 5 版,” 丸善（2004）
Offer G and Knight P, “Developments in Meat Science” Vol. 4, ed. Lawrie R, Elsevier

Science Publishers, Barking, Essex, pp. 63-171 (1988)
Offer G, Knight P, Jeacocke R, Almond R, Cousins T, Elsey J, Parsons N, Sharp A, Starr R and Purslow P, *Food Microstruct.*, **8**, 151-170 (1989)
Offer G and Trinick J, *Meat Sci.*, **8**, 245-281 (1983)
Okitani A and Fujimaki M, *Agric. Biol. Chem.*, **32**, 178-184 (1968)
Okitani A, Ichinose N, Koza M, Yamanaka K, Migita K and Matsuishi M, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **72**, 2005-2011 (2008)
Okitani A, Takagi O and Fujimaki M, *Agric. Biol. Chem.*, **31**, 939-946 (1967)
Paterson BC, Parrishi FC and Stromer MH, *J. Food Sci.*, **53**, 1258-1265 (1988)
Parsons N and Knight P, *J. Sci. Food Agric.*, **51**, 71-90 (1990)
Rome E, *J. Mol. Biol.*, **37**, 331-344 (1968)
Samejima K, Egelandsdal B and Fretheim K, *J. Food Sci.*, **50**, 1540-1543, 1555 (1985)
Shen QW and Swartz DR, *Meat Sci.*, **84**, 364-370 (2010)
Szent-Györgyi A, "*Stud. Inst. Med. Chem. Univ. Szeged.*" Vol. 3, ed. Szent-Györgyi A, S. Karger Basel, New York, pp. 86-92 (1943a)
Szent-Györgyi A, "*Stud. Inst. Med. Chem. Univ. Szeged.*" Vol. 3, ed. Szent-Györgyi A, S. Karger Basel, New York, pp. 76-85 (1943b)
Szent-Györgyi A, "*Chemistry of Muscular Contraction*," Academic Press, New York, pp. 146-152 (1951)
Takahashi K, Fukazawa T and Yasui T, *J. Food Sci.*, **32**, 409-413 (1967)
Takahashi K, Hattori A, *J. Biochem.,* **105**, 529-536 (1989)
Takahashi K, Nakamura F, Inoue A, *J. Biochem.,* **89**, 321-324 (1981)
Terasaki M, Kajikawa M, Fujita E and Ishii K, *Agric. Biol. Chem.*, **29**, 208-215 (1965)
Trinick J and Cooper J, *J. Mol. Biol.*, **141**, 315-321 (1980)
Westra HG, Berden JA, Pasman WJ, Pool I and van Doorn JE, *Arch. Physiol. Biochem.*, **109**, 316-322 (2001)
Westra HG, de Haan A, van Doorn JE and de Haan EJ, *Biochem. J.*, **239**, 751-755 (1986)
Xiong YL, Lou X, Harmon RJ, Wang C and Moody WG, *J. Sci. Food Agric.*, **80**, 1176-1182 (2000)

Yamamoto K, *J. Biochem.*, **108**, 896-898 (1990)

山本克博, 化学と生物, **46**, 748-750（2008）

Yang R, Okitani A, Fujimaki M, *Agric. Biol. Chem.*, **34**, 1765-1772 (1970)

Yasui T, Fukazawa T, Takahashi K, Sakanishi M and Hashimoto Y, *J. Agric. Food Chem.*, **12**, 399-404 (1964a)

Yasui T, Ishioroshi M and Samejima K, *J. Food Biochem.*, **4**, 61-78 (1980)

Yasui T, Ishioroshi M and Samejima K, *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 1049-1059 (1982)

Yasui T, Ishioroshi M, Nakano H and Samejima K, *J. Food Sci.*, **44**, 1201-1204, 1211 (1979)

Yasui T, Sakanishi M and Hashimoto Y, *J. Agric. Food Chem.*, **12**, 392-399 (1964b)

安井勉, 鮫島邦彦, *New Food Industry*, **27**, 139-170 (1985)

Yoshino H, Morita F and Yagi K, *J. Biochem.*, **71**, 351-353 (1972a)

Yoshino H, Morita F and Yagi K, *J. Biochem.*, **72**, 1227-1235 (1972b)

Ziegler GR and Acton JC, *Food Tech.*, **38**, 77-80, 82 (1984)

謝辞

本研究を遂行し本論文をまとめるにあたり、御指導御鞭撻および御高配を賜りました日本獣医生命科学大学教授、松石昌典博士並びに同大学名誉教授、沖谷明紘博士に深く感謝申し上げます。本研究を円滑に遂行する上で、多数の御配慮いただきました同大学助教、右田光史郎博士に厚く御礼申し上げます。

本研究の審査におきましては、日本獣医生命科学大学教授、阿久澤良造博士、中山勉博士、西村敏英博士並びに田中実博士にご教示を賜りました。この場を借りて深謝申し上げます。

また、本研究を遂行する機会を与えてくださり、御支援御助言を賜りました一般社団法人食肉科学技術研究所、前理事長、新村裕博士並びに同研究所、理事長、北海道大学名誉教授、服部昭仁博士に心より御礼申し上げます。本研究に御協力いただきました日本獣医生命科学大学食品化学教室の皆様並びに一般社団法人食肉科学技術研究所所員の皆様に感謝の意を表します。

最後に、私の仕事を理解し、暖かく見守り支えてくれた妻千津子、長女三桜並びに長男史武に感謝を申し上げ謝辞といたします。