

食肉熟成中の食味性向上に関与する
因子の解明

松石 昌典

①

博士論文

食肉熟成中の食味性向上に関与する
因子の解明

1970年 12月

日本獣医畜産大学
畜産食品工学科
食品化学研究室

松石昌典

指導教官 東京大学教授
加藤博通

目次

	頁
序論	1
1、食肉の熟成による風味の向上とその機構	5
1) 食肉の熟成による風味に関する官能特性の向上	5
2) 食肉の熟成による味の向上の機構	12
3) 食肉の熟成によるテクスチャーの向上の機構	16
4) 食肉の熟成による香りの向上の機構	27
2、食肉熟成中のプロテオリシスとそれに関するプロテアーゼおよびインヒビター	31
1) 食肉熟成中のプロテオリシスへの寄与が明確にされているプロテアーゼ	32
2) 食肉熟成中のプロテオリシスへの寄与が明確にされていないプロテ	

アーゼヒインヒビター	39
i) 高分子量プロライナーゼ	40
ii) カテプシンH	42
iii) カルバスタチン	44
iv) システインプロライナーゼイン ヒビター	45
3、食肉の凍結貯蔵	48
1) 食肉の風味に対する凍結貯蔵の 影響	48
2) わが国における凍結輸入牛肉の 現状	53
4、本研究の目的	55
実験材料と実験方法	61
1、試薬類	61
2、筋肉およびその貯蔵方法	62
1) ウサギ筋肉	62
2) ウシ筋肉	63
3、官能評価	66
1) 牛肉の官能評価	66

2) 加熱調理肉の官能評価	66
4、筋原線維および筋漿タンパク質の調製法	66
5、筋原線維の小片化率の測定法	68
6、筋原線維の Mg-ATPase 活性測定法	68
7、筋肉プロテイナーゼの調製法	69
1) 粗カラプシンの調製法	69
2) カラプシンBの調製法	69
3) カラプシンLの調製法	69
4) カラプシンDの調製法	70
5) カルパインIIの調製法	70
8、プロテイナーゼの活性測定法	71
1) 高分子量プロテイナーゼの活性測定法	71
2) カラプシンHの活性測定法	71
3) カラプシンBの活性測定法	73
4) カラプシンLの活性測定法	73
5) パパインの活性測定法	74
6) トリプシンの活性測定法	74
7) カルパインの活性測定法	74

8) カテプシン D の活性測定法	74
8. シスライソプロテイナーゼインヒ ビターの活性測定法	75
9. タンパク質濃度測定法	76
10. 電気泳動法	77
1) ポリアクリルアミドゲル電気泳動	77
2) SDS-ポリアクリルアミドゲル電気 泳動	77
3) 液体等電点電気泳動	78
11. 分子量測定法	77
1) ゲル濾過法	77
2) 電気泳動法	80
12. CM-papain-Sepharose カラムの調製法	80
13. Kinetic constant (K_m , V_{max} , K_i) および 阻害様式の決定法	81

結果と考察

第 I 章 食肉熟成におけるテクスチャ ーの向上と筋原線維 Mg -ATPase 活性の挙動	82
--	----

1、	牛肉の冷蔵および凍結貯蔵(冷凍)	
	におけるラクスターと筋原線維	
	Mg-ATPase活性の挙動	83
	<結果と考察>	83
2、	食肉のラクスター変動要因の新	
	候補としての2つの筋肉プロテ	
	ナーゼと1つのプロライナーゼイ	
	ンヒビターの精製と性質	93
1)	筋肉高分子量プロテイナーゼ(HMP)	
	の精製と性質	96
	i) 精製	96
	<結果と考察>	98
	ii) 一般的性質	107
	<結果>	107
	a、分子量	108
	b、サブユニット組成	108
	c、等電点	111
	d、至適pH	111
	e、pH安定性	111
	f、熱安定性	111

g、各種薬剤の影響	115
h、 K_m と V_{max}	115
<考察>	118
2) 筋肉カテプシンHの精製と性質	130
i) 精製	131
<結果と考察>	131
ii) 一般的性質	141
<結果>	141
a、分子量	143
b、至適pH	143
c、pH安定性	143
d、熱安定性	143
e、 K_m と V_{max}	147
フ、各種薬剤の影響	147
<考察>	151
iii) 各種アミノ酸ナフチルアミドおよび筋肉タンパク質への作用	154
<結果と考察>	154
a、各種アミノ酸ナフチルアミドへの作用	154

b、筋肉タンパク質への作用	158
3) 筋肉ニステインプロテイナーゼイ ニヒビターの精製と性質	162
i) 精製	163
<結果と考察>	163
ii) 一般的性質	172
<結果>	172
a、分子量	172
b、pH安定性	175
c、熱安定性	175
d、各種酵素に対する作用	175
e、CPI-M のカテプシンL阻害 活性に対するカテプシンH の影響	184
<考察>	184
3、筋原線維の Mg-ATPase 活性に変化を もたらす因子の解明	173
1) Ca^{2+} および各種内在性プロテイナー ゼによる筋原線維 Mg-ATPase 活性の 変化	174

<結果と考察>

174

i) Ca^{2+} は筋原線維 Mg-ATPase 活性変動
を惹起しない

175

ii) 高分子量プロテイナーゼは筋原
線維 Mg-ATPase 活性変動を惹起(な

177

iii) カルパインによる筋原線維 Mg-ATPase 活性の KCl 濃度依存性の増大

177

iv) カラプシン類による筋原線維 Mg-ATPase 活性の KCl 濃度依存性の増大

203

v) カルパインおよびカラプシン類
による筋原線維 Mg-ATPase 活性の
 KCl 濃度依存性増大の機序

216

2) 筋原線維の低 KCl 濃度での Mg-ATPase
活性を増加させる因子の検索

227

<結果と考察>

227

i) 筋肉抽出物による筋原線維
 Mg-ATPase 活性の増加

227

ii) 筋漿より分離した塩基性タンバ
ク質による筋原線維 Mg-ATPase 活性
の増加

241

iii) 筋原線維 Mg -ATPase 活性に対する	
塩基性タンパク質とプロテイナーゼの協働作用	258

第II章 食肉熟成による生鮮香気の発	263
生とその機構	

1. 牛肉の熟成による生鮮香気、熟成	
香の生成	264

<結果と考察>	264
---------	-----

1) 牛肉の熟成による生鮮香気の変化	264
--------------------	-----

2) 豚肉および鶏肉の熟成による生鮮	
香気の変化	271

2. 牛肉の熟成香の生成機構	274
----------------	-----

<結果と考察>	274
---------	-----

1) 熟成香の生成に対する酸素の必要性	274
---------------------	-----

2) 熟成香の生成に対する赤身と脂身	
の必要性	278

3) 熟成香の生成に対する微生物の関与	280
---------------------	-----

4) 熟成香生成系の簡略化の試み	285
------------------	-----

5) 熟成香を呈す本体物質の検索	287
------------------	-----

3. 総合考察

288

第三章 食肉の熟成効果発現に及ぼす

凍結貯蔵（冷凍）の影響

270

1. 冷凍牛肉の解凍後冷蔵によるテク

スチャーと香りの変化とその要因

272

1) 冷凍牛肉の解凍後冷蔵によるテク

スチャーの変化とその要因

272

〈結果と考察〉

272

2) 冷凍牛肉の解凍後冷蔵による香り

の変化とその要因

300

〈結果と考察〉

300

2. 冷凍輸入牛肉における熟成効果の 発現度

305

〈結果と考察〉

305

1) テクスチャーについての熟成効果 の発現度

305

2) 香味についての熟成効果の発現度

311

總括

317

梗概

323

參考文獻

329

謝辭

337

略語の説明

- Arg-MCA ; L-arginine-7-(4-methyl)coumarylamide
AMC ; 7-amino-4-methylcoumarin
BANA ; N-D-benzoyl-DL-arginine-2-naphthylamide
BSA ; bovine serum albumine
CPI ; cysteine proteinase inhibitor
DEAE ; diethylaminoethyl
DFP ; diisopropyl fluorophosphate
DTT ; dithiothreitol
EDTA ; ethylenediamine tetraacetic acid
E-64 ; trans-epoxysuccinyl-L-leucylamido (4-guanidino)butane
GEDTA ; glycoletherdiamine tetraacetic acid
HC ; heavy chain
HMP ; high molecular weight-muscle proteinase
Leu-NA ; L-leucine-2-naphthylamide
MCE ; 2-mercaptoethanol
MF ; myofibril
NA ; 2-naphthylamine
P-cellulose ; Phosphocellulose
Pi ; inorganic phosphate

- PMSF ; phenylmethylsulfonyl fluoride
- SDS ; sodium dodecyl sulfate
- SLLVT-MCA ; succinyl-L-leucyl-L-leucyl-L-valyl-L-tyrosine-
7-(4-methyl)coumarylamide
- TLCK ; d-N-p-tosyl-L-lysine chloromethane
- TPCK ; L-tosylphenylalanylchloromethane
- TTA ; potassium tetrathionate
- Z-Arg-Arg-MCA ; benzyloxycarbonyl-L-arginine-L-arginine-
7-(4-methyl)coumarylamide
- Z-Phe-Arg-MCA ; benzyloxycarbonyl-L-phenylalanyl-L-arginine-
7-(4-methyl)coumarylamide

序論

食品の価値は主に栄養特性と嗜好特性によ
り決定される。生活の質的豊かさが重視さ
れる現代社会においては、食品は栄養特性に
優れたといふことはもちろん、嗜好特性にも優れ
ていふことが要求される。こうした背景から
元来、栄養特性に優れた食肉が、更に嗜好特
性にも優れたといふことが求められるのは当然
であろう。

食肉の嗜好特性は風味に加えて、外観やそれ
と味わう人の社会性によっても決まる。生の牛
肉を見かける場合、多くの人が鮮赤色のものがあ
いしと思うと感じるが、これは外観が重要な
意味を持つ例の典型であろう。また、こうした人
々の判断には、鮮赤色の牛肉が新鮮でおいし
いと有り一種の社会通念が大きく影響してい
るとも言える。

しかし、食肉の嗜好特性で中心となるのは、
やはり口に含んでから感知されるその風味で

ある。良好な風味を持つ食肉を口に含んで咀嚼すると、なめらかな舌ざわりと心地よく噛み切られる軟らかな組織が感じられ、同時にそこから浸出する肉汁のうま味と豊かな香りが口腔全体に広がる。このように食肉の風味は、味、香り、テクスチャーが混然一体となって形成されているのである。

食肉にはと殺直後から良好な風味が備わっているわけではない。と殺直後の食肉は軟らかいが香味に乏しい。すなわち、これをしばらく置くと死後硬直により硬くなる。しかし、これを更に一定期間貯蔵することにより軟らかく、香味も豊かな食肉へと変化あり。この過程が熟成である。この熟成に要する期間は肉種により、それぞれ、一般には2~4日にあつて牛肉は10日間、豚肉は3~5日間、鶏肉は2日間とされている。なかでも日本人に最も好まれる牛肉は死後硬直が著しく硬化し、風味向上の速度が緩慢であるため、良好な風味と獲得するには充分な熟成が必要である。

熟成による風味向上の機構は味、香り、テクスチャーそれぞれについて研究が行われ、徐々に明らかになりつつある。味の向上の機構はほぼ解明され、牛肉での味の向上は豚肉や鶏肉ほどには明確ではないことが示された。しかし、2、牛肉の熟成ではテクスチャーと香りの向上が期待されるものとして残される。

確かに熟成でテクスチャーは軟らかく、多汁性になることは多くの研究結果より明白であるが、その機構はまだ完全には解明されていない。テクスチャー向上の主因である筋原線維構造の変化を反映するものとしてミ線の脆弱化とMg-ATPase活性の変化の2つの主現象が報告されている。前者の惹起因子には Ca^{2+} と内在性プロテイナーゼが提示されているが、後者のそれはこれまでに未知である。したがって、本研究の目的の一つをこの解明にあり、本現象とテクスチャー向上との直接的な関係りを明らかにした。

他方、熟成による香り向上では調理肉で

の加熱香氣の増強が報告されている。しかし、牛肉では血液臭の消失が示されているのと同じ、 K 。しかし、 L 、本研究では牛肉で感知される生鮮香氣（熟成香と命名）が牛肉で生成し、その食味性向上に大きく寄与することと明らかにし、その生成機構の大筋を提示した。

さらに、これらの知見をもとに、国産の牛肉に比べておいしくないと言われる冷凍輸入牛肉の不味さの原因解明に資するため、凍結貯蔵が牛肉の熟成効果の発現に及ぼす影響について調べた。その結果、解凍後の冷蔵による軟らかさの増加と熟成香の生成が進行することが明らかになり、 K 。これらの知見をもとに、現在、流通している冷凍輸入牛肉の風味の改善を試み、 K 。

以下に、本研究の行われた意義を明確にし、得られた結果の考察に資するため、食肉の熟成による風味向上とその機構、並びに凍結貯蔵が風味に及ぼす影響について今まで得られている知見を概説した。

1. 食肉の熟成による風味の向上とその機構

食肉の風味は味、香り、テクスチャーが一体となつて形成されている。熟成中にはこれらの3要素がそれぞれ独立に変化し、その集積として風味が向上するが否かが決定される。したがって、その様相は非常に複雑である。

そこで、本章では、まず熟成による味、香り、テクスチャーそれぞれの向上の現象がどのように認知されているかをまとめて述べ、その後これらの発現機構についてこのまゝの知見について解説したい。

1) 食肉の熟成による風味に関する官能特性の向上

食肉の味は香りと一括してフレーバーとして官能評価されていることが多い。熟成によるフレーバーの向上については後述するように、肯定、否定両方の結果が得られており、報告の対象とする肉種や熟成の条件がそれ

れ異なりために統一的解釈がなされていなか
った。また、フレーバーのうち味と香りのい
ふれが向上可能なか明確ではなく、これも
また結果の不一致の一因となし、という可能性
があった。味に限定して研究はこれまでにほと
んどなされていなかったが、最近、味の向上
は肉種間で差があることが明らかになつた。

柳[1]は牛肉、豚肉、鶏肉の加熱スーポと
嗅覚を遮断した状態で官能評価し、熟成によ
る各肉種の味の向上を調査した。その結果、
豚肉と鶏肉は4日で各々5日間と2日間の貯
蔵で味が有意に向上したのに対し、牛肉では
4日で8日間の貯蔵では味が有意には向上し
なかつた。この結果は肉種間で味の向上の
差を明示したばかりではなく、牛肉の熟成によ
る風味の向上ではテクスチャーと香りの向上
の寄与が大きいことを期待させる。

確かに牛肉ではテクスチャーの向上の一要
素として熟成により軟化可能なことが認められ
ている。

Fieldら[2]は牛肉を2℃で2、7、21日間貯蔵した結果、剪断力価(shear value; 6.75の尺度)が減少し、官能的にも軟らかくなることを報告している。MinksとStringer[3]およびSmithら[4]も熟成により牛肉が軟らかくなることを示している。

熟成による軟化は他の肉種でも認められている。

豚肉については、Gouldら[5]、Bennetら[6]、Harrisonら[7]が0-4℃において6日間の貯蔵による軟化を示している。

鶏肉については、Sayre[8]がと殺後3℃で24時間貯蔵し、その間に剪断力価が減少することを報告している。

このように熟成による食肉の軟化は広く認められているが、その速度は肉種や部位によっても異なることが示されている。Dransfieldら[9]は牛肉、家兔肉、子羊肉、豚肉を1℃で貯蔵したときの剪断力価の経時変化を調べた結果、軟化の速度は豚肉>子羊肉>牛肉、

家兎肉の順であることと明らかにした。鶏肉の軟化速度は豚肉より更に大きいことが報告されている[8]。牛肉と家兎肉は軟化速度が似かち、このため、生鮮試料が手に入れない家兎肉はしばしば牛肉のモデルとして用いられる。また、Fieldら[2]は牛の背最长筋と大腿二頭筋を貯蔵し、前者が後者より速く軟化可能なことを示した。しかし、このように、肉種や部位による軟化速度の差の原因は明らかではない。これを説明するには食肉の軟化の機構の解明を待たねばならない。

熟成によるテクスチャーの向上では軟化の他に多汁性(juiciness)が問題となる。これについては牛肉[3, 4]と豚肉[7]で調べられており、それぞれ有意ではないが熟成により多汁性になる傾向にあることが示されている。

他方、熟成による香りの向上については、先にも述べた通り味と含めたフレーバーとして官能評価されているが、牛肉に限る場合

でも肯定と否定の両方の結果が得られている。
なお、これらの報告のほとんどは加熱肉のフ
レーバーを対象としている。

Caulら〔10〕は牛肉の加熱フレーバーを調
べた。と殺後の時間置いた牛肉は酸、ほく、
金属味と収斂味があるだけで牛肉特有のフレ
ーバーは感じられないが、約8日間熟成させ
た牛肉には甘い香りと血液臭の混じり、牛肉
ステーキ独特の芳香が感じられたとしている。
また、Wilson〔11〕もと殺直後の生肉は乳酸
様あるいは血液様の香りをもち、これを加熱
しても典型的な肉の加熱香氣はないが、熟成
により軟化すればあるほど加熱時の芳香性が
強くなるとしている。同様な加熱フレーバー
の変化はWeir〔12〕によつて報告されてい
る。Smithら〔4〕もと殺後3-5日後の牛肉を
10℃で更に貯蔵した場合、貯蔵5日目より11
日目の方が加熱肉の官能評価のフレーバース
コアが有意に高いことを報告している。

一方、MinksとStringer〔3〕はと殺後3日

後の牛肉を15日間0-4℃に貯蔵しても貯蔵前より加熱肉のフレーバースコア^{PM}高くなりな
いことを示した。また、Fieldら[2]および
Parrishら[13]も加熱肉のフレーバーが同
じと報告している。

これらの相反する報告では、香りだけでなく味も含めて官能評価されている。したが
て、柳[1]の報告をもとに判断すると、フ
レーバーの向上を否定した報告では、香りより
味に重点を置いて官能評価したのかもしれな
い。しかし、牛肉の香りのみを調べた報告で
も、CoppockとMacLeod[14]は熟成により加熱香
気が強くなり、良好になることを示しているの
に
対し、HoodとAllen[15]は熟成による加熱香
気の向上はなかったとし、むしろ雌雄による香
気の差があったことを指摘している。

豚肉については、Harrisonら[7]が豚肉を
2℃で12日間貯蔵した^{PM}、加熱肉のフレーバ
ースコアは変化しなかったことを報告してい
る。またBennetら[6]もと殺後2日目^{PM}の豚

肉を0-4℃で6日目まで貯蔵した¹⁶加熱肉のフレーバーは向上したが、¹⁷としている。

鶏肉についてはTerasakiら¹⁶と殺直後より4℃で8時間置いてから加熱した方がおいしく、¹⁸と報告している。¹⁹ただし、彼らは呈味物質との関連を調べていることから判断してこの場合のおいしさは香りより味²⁰中心にある可能性²¹が高い。

以上のように熟成による香りの向上については肉種によるばかりではなく、牛肉に限らず、²²場合にも異なり、²³結果が得られている。これは熟成による香りの向上が必ずあることを示しているのかもしれない。したがって、用いる牛肉の品種や性、貯蔵の条件を厳密にして調べる必要がある。官能評価も、一般に多く用いられているスコアを用いる方法よりは、同一個体の牛肉の一部を熟成して、他の一部を熟成しない凍結状態にしておき、両者を2点嗜好試験法により比較する方法を用いるべきであろう。また、これまでに知見

でもおかしな方に、牛肉は生鮮香気より加熱香気の方が顕著であるため[17]主に後者が研究されている。しかし、熟成中には加熱香気が増強されるばかりではなく、熟成特有の生鮮香気も生成する可能性もある。したがって、肉を加熱する前の生鮮香気にも注意を払い、と殺直後の乳酸臭や血液臭が熟成によりいかに変化するかを調べるべきであろう。

④食肉の熟成による味の向上の機構

食肉の味はもとに含まれる各種の不揮発性の呈味成分に、決定される。食肉の主要な呈味成分は遊離アミノ酸、ペプチド、ATP代謝物質、乳酸、糖である。熟成による味の向上はこれらの呈味成分の量的変動に、ともなわれると考えられている[18]。これはこれらの成分は熟成中にどのように変動して、その機構はいかなるものであろうか。

遊離アミノ酸とペプチドは死後筋肉にあり

7タンパク質の分解によ、生成する。まず
 エンドペプテリナーゼの作用によりタンパク質
 が分解されペプチドを生じ、更にこれがエ
 キソペプテリナーゼの作用によりアミノ酸へと
 変化する。Suzukiら[19]とKhanら[20]は
 それぞれ家兎肉と鶏肉を貯蔵したときペプ
 テリド態アミノ酸が増加すること明らかにし
 ている。また、Nishimuraら[21]は、4℃で
 の熟成で牛ではと殺後4日目から12日目まで
 の8日間、豚では1日目から6日目までの
 5日間、鶏ではと殺直後から2日目までの
 2日間、筋肉中のペプチド量が20-25%増加
 すると報告している。このような熟成中のペ
 テリドの増加は主に筋肉中のカテプシンB、
 D、H、Lおよびカルパインなどのエンドペ
 テリナーゼの作用によると考えられている[18]。
 熟成による遊離アミノ酸の増加は牛、
 豚、鶏のいずれの肉種でも認められるが、その
 増加の速度は鶏>豚>牛の順であることを明
 らかにしている[18]。柳[1]はこの遊

離アミノ酸の生成は主にアミノペプチダーゼHとCの作用によることと明らかにし、特に旨味を有するグルタミン酸の遊離は基質特異性から判断してアミノペプチダーゼHに、より引き起こされることを示した。また、肉種による熟成中の遊離アミノ酸の増加速度の差が主にアミノペプチダーゼHの活性量の差で説明できることを示した。

ATPは死後筋肉では種々のATPaseにより、分解されADPを生じる。ADPは更に複数の酵素によりAMP、IMP、イノシン、ヒポキサンチンへと順次分解されていくことが知られている[22]。これらの代謝物のうち味に寄与するのはイノシン酸を持つIMPである。牛肉ではと殺後12時間でIMP含量は最高になりその後徐々に減少する[23]。また、豚肉と鶏肉でもそれぞれと殺後4時間と8時間で最高になりその後、くりと減少すること明らかにし、述べている[16]。

乳酸は酸味を持ち、死後筋肉のpH低下の原因

因物質である。酸素供給が停止した死後筋肉ではグリコーゲンが解糖系酵素により、ピルビン酸に分解され、これが更に乳酸となり、蓄積する。牛肉の乳酸量は、と殺直後には 1.18 mg/g 筋肉であるが、その後増加し、48時間後には 7.42 mg/g 筋肉に一定になると報告されている[24]。牛肉とと殺後4日目から12日目まで、豚肉とと殺後1日目から6日目まで、鶏肉とと殺当日から2日目までそれぞれ貯蔵した結果では、いずれも乳酸量は多少減少するもののほぼ一定であることが示されている[21]。

糖のうち死後筋肉で増加するのは主にグリコーゲンから生成するフルコースーラーン酸であるが、この増加はと殺後24時間以内に停止し、その後は一定量を保つとされている[18]。なおこれは弱い甘味を呈する。他方、強い甘味を持つグルコースの量は熟成中に変化しないとされている[18]。

Nishimuraら[21]は以上の呈味成分のうち

熟成期間中持続的に増加する遊離アミノ酸とペプチドが、熟成による味の向上に寄与すると推定している。また、加藤ら[25]は合成スープを用いた実験から、熟成による味の向上は主にグルタミン酸量の増加による支配されることを示した。他方、IMPは熟成中に漸減することから、それ自身のうま味による熟成中の味の向上への寄与は小さいが、その充分な存在量から考えて、グルタミン酸とのお互いの相乗効果を通して熟成に左右されない肉の味の形成には貢献するとされている[21]。

以上のように、味の向上に対する遊離アミノ酸の重要性とその生成機構はほぼ解明されているが、味の向上に寄与するとされるペプチドの種類や構造、およびその生成源となるタンパク質の種類は今後の課題とに残されている。

3) 食肉熟成によるテクスチャーの向上の機構
食肉はと殺直後は軟らかく、保水性に富み、しばらくすると死後硬直により硬くなり、

保水性も低下する。

死後硬直の発生は次のように理解されている。と殺直後の肉では酸素の供給は停止しているが、クレアチンリン酸や解糖系によりATPが再生される。そのため、種々の膜にある各種のポンプによりATPが消費され続けるにもかかわらずATP濃度は高く維持されている。また、 Ca^{2+} はATPを利用するポンプにより筋小胞体中に取り込まれて、その筋漿中の濃度は低く維持されている。このとき筋原線維は生筋という弛緩状態にある。しかし、解糖作用の進行に伴い乳酸が蓄積してpHが低下し、pH 5.5付近になると解糖系酵素の機能が低下してATPの再生が停止し、続いてATP濃度が低下する。ATP濃度とpHの低下によ、筋小胞体の機能が低下して Ca^{2+} が漏出し、筋漿中の濃度が上昇する。この Ca^{2+} が筋原線維のトロポニンに結合すると、トロポニン-トロポミオシン系による抑制がはなれてアクチンとミオシンが結合する。こうなるとミオシンのATPaseが

活性化され、残されたATPを分解してそのエネルギーにより細いフィラメントと太いフィラメント間で滑り込みが起こり、生筋と同様に収縮する。しかし、一旦収縮した後には生筋とは異なり筋小胞体による Ca^{2+} の回収とATPの再生がないためアクチンとミオシンは結合したままになる。これが死後硬直である。

この硬直によ、て生きた食肉の硬直はRigor toughnessと呼ばれ、と殺直後の硬直であるBackground toughnessと区別される[26]。

熟成によるテクスチャーの向上は主に前者の硬直の消失と保水性の回復である。後者の硬直は主に結合組織が原因であり、熟成ではあまり変化しない。

熟成によるRigor toughnessの消失がなれう軟化ならびに保水性の回復は主に筋原線維構造の変化によ、ても知られておられ、これと反映可能と考えられていくつかの現象が知られていく。

これらの i) プロテインアーゼの筋原線維タンパク質への作用。

ii) 筋原線維Z線への脆弱化。

iii) コネクトンの変化。

iv) アクチンミオシン中のミオシンとアクチンの結合の弱化。

v) 筋原線維 Mg -ATPase 活性の変化。

これらの詳細について以下に記す。

Hayashi [27] は、 $2^{\circ}C$ で貯蔵した鶏肉より筋原線維を調製して SDS-ゲル電気泳動で分析した結果、貯蔵により 3 石タルトン成分が出現することと報告した。Olson [28] も牛肉を $2^{\circ}C$ および $25^{\circ}C$ で 3 日間貯蔵し、筋原線維タンパク質のトロポニン T の消失と 3 石タルトン成分の生成を認めている。この現象はプロテインアーゼが筋原線維タンパク質に作用したことを明確に示している。これと並行してカルパイン [28]、カタラスチン B [29]、D [30]、L [31] が *in vitro* にあつて筋原線維に同様の变化と引き起こすことが知られて

いる。この現象が直接軟化に結びつくかどうかは明らかにされていない。しかし、3-デオキシフルトン成分が軟らかい肉には認められ、硬い肉には認められないこと [32] やトロポニンTの減少が熟成による軟化と同時平行に起こること [33] が報告されており、この現象と軟化との相関は高いと考えられる。

筋肉に存在したままの状態の筋原線維を電子顕微鏡により観察すると、熟成によりZ線構造は緻密さを失い、無定形化していく [34]。また、筋肉から分離調製した筋原線維を位相差顕微鏡で観察すると、と殺直後には10個以上の筋節からなる長い筋原線維が多く見られるのに対し、熟成させると数個の筋節からなる短い筋原線維が多く見られるようになる [35, 36]。このように筋原線維の小片化は熟成によりZ線の構造が脆弱化し、筋原線維を調製する際のホモジナイズなどの物理的な力によりZ線部分で断裂しやすくなることを示している。

この現象を引き起こす因子としては Ca^{2+} と各種プロテイナーゼが知られている。

Hattori と Takahashi [37, 38] は Ca^{2+} が γ 線構造を脆弱化させることを報告している。筋原線維と Ca^{2+} 存在下あるいは非存在下で一定期間インキュベートした後、そのうち小片化の程度が異なる。後述するように Ca^{2+} で活性化されるカルパインが γ 線を脆弱化させることが知られているが、その特異的インヒビターであるカルバスタチンに於て、この変化は抑制されないため、彼らは、これは Ca^{2+} の非酵素的作用の結果であると考えている。小片化は Ca^{2+} 濃度と pH に依存し、 10^{-4}M Ca^{2+} が最大となり、pH 6.5 が最小となる。 Ca^{2+} は γ 線を構成する無定形物質と溶解させて、構造を崩壊させると推測されている [39]。

カルパインは Ca^{2+} で活性化されるシスチインプロテイナーゼで、筋漿に存在する。これには活性化に要する Ca^{2+} 濃度が異なる I、II が存在するが、ともに筋原線維の γ 線を崩壊させ

ること^が知られていゝ [40, 41]。その作用は pH7-8 で最も顕著である^が、熟成の極限 pH である 5.5 付近でもかなり発現すること^が示されていゝ [42]。

カテコシン類はリソソームに存在する酸性プロテイナーゼである。熟成中にはリソソーム膜が壊れ、^{ため}に筋原線維に作用すること^が可能である [26]。カテコシン類のうちカテコシニン L [43] ^が最も顕著に熟成の極限 pH である 5.5 付近で、ミ線と崩壊させること^が知られていゝ。それ、カテコシン B [29]、D [43] もより弱い^が同様の作用を持つこと^が報告されていゝ。

コネクチンは Maruyama ら [44] によ、ミ線見られ^る巨大タンパク質で、細いフィラメントの三次元網目構造を形成し、筋肉に弾性を与えていゝ [45]。死後筋肉は熟成によ、ミ弾性を失う^が、これはコネクチンの構造の弱化に^よると考えられていゝ。熟成に^より、ミコネクチンの網目構造が小片化しや^るくなり、

筋肉からのコネクチンの抽出量が増加すること
 が報告されている[46]。また、筋原線維
 とSDS-ゲル電気泳動で観察した結果、熟成に
 よりコネクチンバンドが消失することを示
 されている[47]。高橋[48]は熟成による
 弾性の低下に伴って、筋原線維を0.1N NaOHで
 洗淨した残渣として得られるコネクチン量が
 減少することを示し、これはコネクチンの耐
 アルカリ性の消失が原因であると述べている。
 また、その機序はCa²⁺による不溶性のα-コネク
 テン(分子量280万)から可溶性のβ-コネク
 テン(分子量210万)への変換であると推定
 されている[49]。一方、コネクチンはカルパ
 イン[50]やカタロシンD[51]により、2分
 解されることが報告されており、熟成中のコ
 ネクチンの変化は内在性プロテアーゼによ
 り引き起こされると考えられる。

死後硬直中の肉では細いフィラメントと太
 いフィラメントの間の滑り込みにより、2つ
 のフィラメントの重なり程度が大きくなり、

こから、筋節の長さは弛緩状態より短くなり、
 といふ。しかし、肉と骨に付いた状態と熟成
 させると2つのフィラメントの重なり の程度
 が小さくなり、筋節の長さが弛緩状態に戻り
 [35]。また、Fujimakiら[52]は、熟成に
 よりアクチンとミオシンの結合とミオシンへの
 解離が低濃度のATPで起こるようになること
 とを報告している。これらの現象は硬直複合
 体を形成しているアクチンとミオシンの間の
 結合が熟成により弱化することを示すと考え
 られている。 Ca^{2+} を作用させたときに筋原線維
 から遊離するパラトロポミオシンは、in vitro
 においてアクチン-ミオシン間の結合を弱化
 させることが示されている[53-55]。また、
 熟成中においてもパラトロポミオシンはA帯
 とI帯の接合部から細いフィラメントに移行
 して他のような作用を表現できると推定され
 ている[56]。他方、生筋ではトロポニント
 ロポミオシン系によりアクチン-ミオシン間
 の結合が調節されていることから考えて、先

に記した熱成によるトロポニンTの分解がア
クチン-ミオシン間の結合の弱化に関与する
可能性があらう。

筋原線維のMg-ATPase活性が熱成により特徴
的に変化すること知られている。

Yangら[57]は家兎肉を4℃で8日間貯蔵
し、筋原線維のMg-ATPase活性を0-0.2MKCl存在
下で測定した。その結果、貯蔵に従い低KCl
濃度で存在する活性の極大値が増加し、活性
のKCl濃度依存性が増大した。このときアク
トミオシン自身の潜在活性は変化しないことか
ら、これは筋原線維構造内部に組み込まれた
アクトミオシンの自由度の増加が原因であると
推定されている。アクチン-ミオシン間の
結合の弱化もこのアクトミオシンの自由度の
増加と関係して測定されている可能性があらう。
Qualiら[58]も牛肉と家兎肉を6℃で8-10日
間貯蔵しその間に0.15-0.35MKCl存在下でのATPase
活性のKCl濃度依存性が増大することと報告し
ている。また、この変化が熱成による肉の圧

縮に対する抵抗性の減少と同時進行であること
と指摘されている[59]。

このようなATPase活性の変化の機序はほとんどわかっていないが、それを引き起こす因子の検索は試みられている。Yangら[60]は筋原線維をトリフリン処理することにより熟成のときと類似した変化が起これることを示し、内在性プロテアーゼがその因子であることを示唆した。Dualiら[58, 61]は精製したカルパインをpH 7.0において筋原線維に作用させた結果、0.15-0.17 M KClでのMy-ATPase活性が若干増加し、0.17-0.30 M KClでの活性が減少して0.15-0.30 M KClでの活性のKCl濃度依存性が増大することを示した。彼らはまた、カトリオン類をpH 5.7で作用させた場合にはKCl濃度依存性の増大はみられず、調べた全KCl濃度域で活性の低下が起きることを報告した[61, 62]。SuzukiとGoll[63]はpH 7で粗精製のカルパインを作用させた結果、0-0.07 M KClにおけるATPase活性が上昇すること示した。これらの報告から判断

可なり ATPase 活性を変化させる因子はカルパインが有力であるが、熟成の極限 pH とある pH 5.5 付近にあることも同じ作用を有するかどうかは不明である。また、Suzuki と Goll [63] の報告のよう粗精製のカルパインが使用されている場合もあるため他の因子の関与の可能性も排除できない。他方、カタボシン類については 0.01 M 程度にある ATPase 活性に対する影響が調べられておらず、また、酵素濃度や作用時間についての検討がなされていない。したがって、これらの知見だけではカルパインが ATPase 活性を変化させる因子である可能性を完全には否定できない。したがって、他の因子が存在する可能性や作用条件などについて詳細な検討が必要である。

4) 食肉の熟成による香りの向上の機構

食肉は一般に加熱して食用に供されるため、この香りと云えば加熱香気を示すことが多い。

れたが、この香りについての研究も生鮮香氣より加熱香氣に力点が置かれている。

食肉の加熱香氣成分としてはこれまでに遊離脂肪酸、アルコール、アルデヒド、ケトン、ピラジン、フロン、ラクトンなど1000種近い様々な化合物が同定されている[64, 65]。その中には1-methylthio-ethanethiol [66], 2-methyl-3-(methylthio)furan [67], 2-methyl-3-furanthiol [68] などの含硫化合物のようにならば、単独で肉様香氣を持つとされる物質もある。しかし、これらの存在量と閾値から判断して、必ずしもそれらだけで特徴的な食肉の加熱香氣を説明できず、現状では多種多様な化合物の関与が考えられている。これらの加熱香氣成分は水溶性の低分子化合物であり、アミノ酸、ペプチド、糖、及び脂溶性の脂肪酸やリン脂質から生成すると考えられている[64, 65, 69]。これらが加熱中に脱水、縮合、酸化、分解などの様々な反応を起こして加熱香氣成分に変化すると考えられるが、中でも糖とアミノ酸

に於てアミノ-カルボニル反応が重要であることが指摘されてゐる[64]。

地方、食肉の生鮮香氣成分としては、硫化水素、メチルメルカプトン、エチルメルカプトン、アセトアルデヒド、アセトン、2-ブタノン、メタノール、エタノールが認められてゐる[70]。また、揮発性塩基性化合物の99.9%がアンモニアであるとされてゐる[71]。と殺直後の生肉に認められる乳酸様の香り[11]は硬直に至るまでに急増する乳酸[24]に由来することは容易に推測できるが、血液臭や獣臭と上記の成分との関連については明らかにされてゐない。

以上のような香氣成分は食肉の熟成によつてどのように変化するのであろうか。この点について調べた報告は意外に少ない。CoppockとMacLeod[14]は熟成による加熱香氣成分の変化を報告してゐる。彼らは牛肉を真空包装して26-33℃で4週間貯蔵し、1gの牛肉を湯煮して揮発成分を捕集し、官能評価と成

分分析を行, K. その結果、熟成により加熱
 香氣は強くかつ良好になり、これに伴, γ -
 ルカン、ベンゼン、フーレン、ピロール、ピリ
 ジン、ピラジンやこれらの誘導体の成分の量
 が増加したとしている。一方、牛肉の揮発性
 成分であるアンモニアは、牛肉をと殺後1日
 目から5日目まで30℃に保ちて貯蔵したとき
 の含量が125 ppmから211 ppmまで増加するこ
 とが報告されている[72]。SinkとSmithは、
 牛肉をと殺後14日目まで30℃に貯蔵したとき
 の脂溶性のカルボニル化合物が6.5 $\mu\text{M/g}$ 脂肪か
 ら17.94 $\mu\text{M/g}$ 脂肪まで増加あることを報告して
 いる[73]。このFうな化合物は加熱香氣の
 前駆物質となるばかりでなく、そのものが生
 鮮香氣に影響すると思われるが、これらの
 具体的な香氣特性については示されていない。

2. 食肉熟成中のプロテオリシスとそれに関与するプロテアーゼ及びインヒビター

食肉熟成中に進行するプロテオリシスは熟成による食肉の風味向上に密接に関わり、こゝる。プロテオリシスはエンドペプチダーゼの作用によりタンパク質から比較的大きなペプチドを生じるプロテイノリシスとそれらのペプチドからエキソペプチダーゼの作用によりオリゴペプチドや遊離アミノ酸を生じるペプチドリシスに分けられる。熟成中のトリプトファン¹の減少と3万ダルトン成分の生成は主としてプロテイノリシスの結果であり、同様に何らかのタンパク質の損傷がミトコンドリアの脆弱化やMg-ATPase活性の変化の一因となし、こゝろと考えられる。一方、ペプチドリシスにより生ずるオリゴペプチドや遊離アミノ酸は熟成による味の向上に寄与するばかりでなく、加熱香氣成分の前駆体として熟成による加熱香氣の増強に寄与すると考えられる。

このようなプロテオリシスに関与する主な

プロテアーゼについて先にも述べたが、こゝではこれらの性質と熟成における役割についてこれらについて得られた知見を解説するのとともに、肉の存在が知られながらも熟成における意義がまだ明らかでないというプロテアーゼおよびインヒビターについての情報も整理した。

1) 食肉熟成中のプロテオリシスへの寄与が明確にされているプロテアーゼ

Okitani [24, 75] は、筋肉ホモジネートの自己分解活性を pH 2-8 において測定し、比較的大きなプロテンドに相当する TCA 可溶性の銅-ホルン試薬陽性物質の増加は pH 3, 4.5, 7 の 3 つのピークがあることを示した。また、pH 4.5 のピークはモノヨード酢酸の添加により減少し、pH 7 のピークは Ca^{2+} の添加で増加することを示した。彼ら [29, 76, 77] は至適 pH、各種薬剤への対応などから、pH 3 のピークは

カタロシンロク、 $\text{pH} 4.5$ のピークはカタロシン
B とし、 $\text{pH} 7$ のピークはカルパインにふ
とし、これらが食肉のプロテオリシスに関与
する主要なエンドペプチダーゼであると推定
した。

これらのエンドペプチダーゼは、死後筋で
のプロテオリシスへの関与という面ばかりで
なく、生筋でのタンパク質代謝という面から
も注目され非常によく研究されている。

カタロシンロはカルボキシルプロテイナー
ゼで各種の臓器に存在することが報告されて
いる。そのうち筋肉としては、ニワトリ[78]、
ウット[79]、ウサギ[80]の骨格筋から精
製あるいは部分精製されている。ハモグロビ
ン、ミオシン重鎖、アクチン、トロポニンの
T と I、トロポミオシン、 α -アクチニンを分
解し、その至適 pH は 3-4 である[81]。その
活性は放線菌が生産するペロスタチンに特
異的に阻害される[82]。先にも述べたよ
うに、筋原線維に作用させるとともに、3万

ダルトン成分が生成し[30]、Z線の密度の減少が認められZ線小片化には至らなかった[43]。

カタロシンBは、シス테인プロテアーゼで、これも各種臓器に存在すること報告されている。そのうち筋肉としては、ラット[77]、ウサギ[83]、サル[84]の骨格筋から精製されている。BANA[85]、Z-Phe-Arg-MCA[86]、Z-Arg-Arg-MCA[87]などの合成基質およびミオシン重鎖、アクチン、トロポニンT[29, 77, 84]を分解し、その至適pHは5-6である。先にも述べたように、筋原線維に作用させるとよくはる万ダルトン成分が生成し、カタロシンLよりは弱いながらもZ線と崩壊して小片化を引き起こした[29]。

カタロシンLはカタロシンBと同じくシス테인プロテアーゼであり、ラット肝臓[88, 89]、ウサギ肝臓[90]、ウシ脾臓[91]から精製されているが、筋肉からの精製についてはOkitaniら[92]の報告のみである。合

成基質の γ -Phe-Arg-MCA [87] 並びにミオシン重鎖、アクチン、トロポニンの T と I、 α -アクチニン [93] を分解し、その至適 pH は 4-6 である [90, 93]。先に述べたように、筋原線維に作用させるときには、Z 線と M 線の消失が起こり、小片化を引き起こす [43]。

カルパインは、その活性発現に Ca^{2+} を要するシステインプロテイナーゼである。これには μM オーダーの Ca^{2+} で活性化されるカルパイン I と mM オーダーの Ca^{2+} で活性化されるカルパイン II があり、ともに各種の組織中に普遍的に存在すること明らかにし、という [94]。

カルパイン I はフタ骨格筋 [41]、ウサギ骨格筋 [95]、ニワトリ骨格筋 [96] から精製され、という。活性の至適 pH は 7-8 で、筋原線維に作用させるときにはトロポニン T、 α -アクチニン、C-タンパク質を分解し、3万ダルトン成分を生成する [58]。また、Z 線を消失させる [41]。

カルパイン II は、フタ筋肉 [97]、ニワト

リ筋肉[96,98]、ウサギ筋肉[99,100]から精製されている。活性の至適pHは7-8でトロポニンのTとI、トロポミオシン、ミタンパク質、ミオシン重鎖を分解する[99]。また、筋原線維に作用させるとときには、Z線も消失させ、小片化を引き起こすことが知られている[40,42]。

他方、筋肉にキマーゼと呼ばれるエンドペプチダーゼが存在することが知られている。本酵素はウット筋肉から精製され[101,102]、分子量2.2-2.4万で至適pHが9-10のセリンプロテイナーゼであり、キモスタチン、アンチポイン、大豆トリプシンインヒビターで阻害され、筋原線維タンパク質をよく分解する[103]。しかし、本酵素は筋細胞そのものに存在するのではなく、筋肉組織に共存する肥満細胞(mast cell)に存在することが示されている[104]。また、ニワトリ、モルモット、ヤギ、ウシ、ウサギの筋肉にはその活性が検出されず、各種動物の筋肉組織に普遍的に存在する

のことはいいことが明らかにされている [105]。
本酵素は筋肉組織での存在が限定されている
ことと、その最適 pH が熟成の pH からかはな
れていることから、熟成中のプロテオリシス
への関与は否定されている。

一方、エキソペプテリダーゼについては、
Okitani ら [74] が、筋肉ホモジネート中に pH
7 付近で遊離アミノ酸およびオリゴペプチド
を増加させる活性を認め、以来、その活性に
関与する酵素の同定が行われてきた。彼らは、ウ
サギ筋肉の中性抽出物を DEAE-cellulose カラム
で分画し、各画分に各種ペプチドを作用させ
た結果、先のホモジネート中での活性には、
Otsuka ら [106] が精製したアミノペプテリ
ダーゼ、アミノトリペプチダーゼ、ジペプチ
ダーゼなども関与していることを示した [107]。
また、エキソペプテリダーゼのうちカルボキシ
ペプチダーゼ群の関与は小さいことを示した。
他方、ウサギ筋肉からはハイドロラーゼ H が

単離された〔108〕。この酵素はアミノペプチダーゼ活性とエンドペプチダーゼ活性とあわせ持つ、いわゆるアミノエンドペプチダーゼである。しかし、その後それは熟成においてエンドペプチダーゼとしてよりはアミノペプチダーゼとして著しい作用を示すことが明らかになった〔109、110〕。最近、柳〔1〕は、ウシ、フタ、ニワトリの筋肉よりハイドロラーゼHと類似の酵素を精製し、アミノペプチダーゼHと命名した。また、筋肉タンパク質のカテプシン類あるいはカルパインを作用させて得たペプチド画分にアミノペプチダーゼとあるいはHを作用させた結果、Hを作用させた場合の方が遊離するアミノ酸の量が多く、その組成が熟成中に増加するアミノ酸組成と類似していることを示した。彼女はこの結果から、熟成中のペプチドリシスについて、主酵素をアミノペプチダーゼH、副酵素をアミノペプチダーゼCとする機構を提示した。

2) 食肉熟成中のプロテオリシスへの寄与が明確にされてはいないプロテアーゼとインヒビター

以上のようによ主要なプロテアーゼは精製され、その食肉熟成中のプロテオリシスへの寄与が明らかにされている。また、これらの酵素系に付いてプロテオリシスのかなりの部分は説明できると考えられる。しかし、筋肉中にはその存在が知られていないがまだ精製されていないかあるいはその熟成中のプロテオリシスへの寄与が検討されていないプロテアーゼが残されている。また、内在性のインヒビターがプロテオリシスへの影響を与えているかについても明らかにされていない。これらのプロテアーゼとインヒビターについてその意義を調査することは、これまでに得られた熟成中のプロテオリシスについての情報を補強することになるばかりでなく、筋原線維構造変化を反映する Mg -ATPase 活性変化の因子を探索する助けになると考えられる。さらに、

生筋ビタミンB₆質代謝の機序解明に役立つことは、言うまでもない。したがって、以下にどのようなプロテアーゼとして残されている高分子量プロテイナーゼとカテコシンH、ならびに、内在性インヒビターとしてカルバスタチンとシステインプロテイナーゼインヒビターに関するこれまでの知見を整理した。

ii) 高分子量プロテイナーゼ

高分子量プロテイナーゼはプロテアソーム、マクロパイン、マルチキャタリティックプロテイナーゼ、インゲンシンなどと呼ばれている[111]。本酵素はラット肝臓[112, 113]、ヒト胎盤[114]、ヒト赤血球[115]、ラット筋肉[116]、ブタ筋肉[117]、ウサギ筋肉[118]から精製される他、真核生物の細胞に普遍的に存在することが示されている[111]。分子量は600,000-1,000,000と巨大であり、分子量20,000-30,000のヘテロサブユニット、数10個から形成されている。カベイン、グロビンなどの

タンパク質がトリペプチドあるいはそれより長いペプチド基質を分解する。本酵素は塩基性、中性、酸性のアミノ酸のカルボキシル基側のペプチド結合とそれぞれ分解する活性と併せ持つ多機能性を有しているが、それぞれの活性の阻害剤への対応が異なり、このため、これらの切断点の触媒活性部位は分子内で互いに独立していると推定されている[11, 119]。最適pHは各活性により異なるが、ほぼpH 7-9の間に存在する[119]。またSDSやリノール酸のような脂肪酸で活性化される[119, 120]。最近、網状赤血球分解物 (reticulocyte lysate) 中のATP依存性タンパク質分解活性が本酵素の特異的抗体による処理で抑制されること[121]やトリセリン存在下で近連に精製した本酵素がATP依存性の活性を示すこと[118]が報告された。

したがって、本酵素が従来から見い出されてきた細胞内のエネルギー依存性タンパク質分解系[12, 123]の中心酵素である可能性が高

まゝといふ。

以上のやうに本酵素についての研究はめざましく進展し、細胞内タンパク質分解で非常に重要な位置を占めることが明らかになりつつあるが、その本来の基質についてはまだ調べられていない。特に筋肉タンパク質への作用様式は不明である。また、死後筋である食肉の熟成との関わりも全く調べられていない。

II) カテプシンH

カテプシンHは、先に述べたカテプシンB、D、Lと同様にリソソーム由来のプロテアーゼである。本酵素は最初、Kirschkeら[124]がラット肝臓のリソソームより単離し、命名した。分子量28,000で、カテプシンBやLと同様のシステインプロテアーゼである。しかし、本酵素はBANAやアザカゼインを分解するエンドペプチダーゼ活性を有するばかりでなく、Leu-NAを分解するアミノペプチダーゼ活

性とも有する アミノエンドペプチダーゼである点でカタボシンB、Lとは著しく異なり、という。同種の酵素はほかへ、ラット皮膚[125]、ウサギ肺[126]、ヒト肝臓[127]、ウサギ肝臓[128]、ラット脾臓[129]から精製されている。筋肉については、Roisenら[130]が筋芽細胞中へ、ラット肝臓のカタボシンHに対する蛍光抗体を用いてその存在を示したほか、Okitaniら[83]がカタボシンBの精製途中でそれによると考えられる活性ピークを認めている。しかし、精製した性質を明らかにした例はない。本酵素は、アミノエンドペプチダーゼであることをため、プロテオリシスばかりではなくペプチドリシスにも関与する可能性を待っており、その役割を検討する必要がある。

iii) カルパスタチン

カルパスタチンはカルパインⅠ、Ⅱに対する特異的なインヒビターである。ウサギ骨格筋[131]、ニワトリ骨格筋[132]、ヒト赤血球[133]、ラット肝臓[134]、ウサギ肝臓[135]などから精製され、動物の組織中に広く存在することが示されている[136]。その分子量はウサギ骨格筋のものが50,000、ニワトリ骨格筋のものは68,000であるのに対して、ヒト赤血球のものは280,000、ウサギ肝臓のものは240,000と報告されるなど、著しい多様性を有することが明らかになっている[137]。最近、cDNAの1次構造解析により、分子内に約140アミノ酸残基からなる繰り返しドメインを持ち[138,139]、それぞれのドメインがカルパイン阻害能を持つことが明らかにされた[140]。カルパスタチンは熱に安定なタンパク質で[131,132,135]、カルパインに対して特異的に作用し、他のシステインプロテアーゼであるパパインやカロメウインを阻害し

ない [131, 132]。このことはパパインやプロメ
うインと阻害するシスタチンとの共通配列と
カルパスタチンが有しないことから裏付け
られた [139]。

Ⅳ システインプロテイナーゼインヒビター
システインプロテイナーゼインヒビターは
カルパイン以外のシステインプロテイナーゼ、
例えばカテプシン B、H、L、パパインなど
を阻害するタンパク性インヒビターであり、
各組織中に広く存在することが明らかにな
っている [141]。1次構造の解析が進んだ結果、
これらのインヒビターの一群をシスタチン
スーパーファミリーと呼び、その中で構造上の
特徴により次の3群に分類することが提唱さ
れている [142]。

a. ステフィンファミリー：分子量が 10,000 -
14,000 で分子量内にジスルフィド結合を有しない
一本鎖ポリペプチドである。例えば、多形核
顆粒球のステフィン [143]、マット皮膚のシ

スタチン α [144]、ラット肝臓のシスタチン β [145]、ヒト肝臓のシスタチン B [146] がこの群に分類されている。

b. シスタチンファミリー：分子量 M^u 10,000-14,000で分子内に2つのジスルフィド結合を持つ一本鎖ポリペプチドである。例えばニワトリ卵白のシスタチン [147, 148]、ヒト脳脊髄液のシスタチン C [149]、ヒト尿液のシスタチン S [150] がこの群に分類されている。

c. キニノーゲンファミリー：分子量 M^u 50,000-58,000で分子内に9つのジスルフィド結合を持つ一本鎖ポリペプチドである。例えば、ヒト血清の α_2 -チオールプロテインセビンヒビターと α_2 -チオールプロテインセビンヒビター [151]、ウシ、ラットおよびヒトの血清の低分子量キニノーゲンと高分子量キニノーゲン [152, 153] がこの群に分類される。

筋肉のシステインプロテインセビンヒビターについてはラット骨格筋 [154] とウサギ骨格筋 [155] でその存在が報告されている M^u 、

精製されたのはウシ骨格筋の分子量14,000のインヒビター [156] のみであり、その構造やシスタチンのどのファミリーに分類されるかなどは明らかにならないう。い。

また、熟成中にシステインプロテイナーゼが作用するとともにこのインヒビターがどのような影響^{影響}を与えるかは明確にならないう。これら^{これら}の知見では筋肉ホモジネート中では、カタボシンリヤルはこのインヒビターの存在下でも活性を^{発現}していると考えられている [75] が、それがどのような機構によるのかは説明されていらない。

3. 食肉の凍結貯蔵

1) 食肉の風味に対する凍結貯蔵の影響

食肉を凍結すると長期間貯蔵できることは古くから知られている。これは、凍結により食肉を変質させる化学的、微生物的、酵素的諸種の反応が抑制されるためと考えられる。

こうした利点を生かして、凍結貯蔵は、運搬に長時間を要する国外からの食肉の輸入に用いられるばかりでなく、国内での食肉の需給調節にも用いられている。

しかし、反面、食肉を凍結することにより様々な好ましくない変化が起きることも知られている。それは、凍結前の食肉が硬直前と硬直後の場合とで異なる。

硬直後の食肉を凍結して解凍した場合には保水性の低下とそれによるドリップ（流出液汁）の生成が問題となる。これらは凍結速度とそれによる氷結晶形成過程とに密接に関連している。通常の流通過程に用いられるよう

な緩慢凍結では、筋細胞間の水から凍り始め、細胞間液に溶けている様々な物質は氷結晶中に入り込められ、凍結していない部分に濃縮される。これにより、凍結していない細胞内との浸透圧差が生じて、細胞内の水は細胞間へ移動し、細胞間の氷結晶が更に成長する。こうして生じた大きな氷結晶が細胞を物理的に破壊し、更に筋線維を損傷させる。また、氷結晶の形成に伴い、非凍結部の溶液の塩の濃縮とpH変化および水和水の離脱により、筋肉タンパク質が変性する。したがって、この肉を解凍したときには細胞内の水が流出しやすく、しかも、タンパク質にある水の保持力が低下しているために生成可能なドリフト量が多くなる[157, 158]。

これに対し、急速凍結では細胞内、外での氷結晶の生成に時間差が少なく、ゆえに浸透圧差が小さくならずに双方に小さい氷結晶が生じる。このとき筋肉タンパク質の変性はある程度起こるにしても細胞の損傷は少ない。

レズル、²⁾ この肉を解凍してもドリッポの生成量は少ない [157, 158]。牛肉では、凍結するとき -1°C から -7°C の間の温度帯 (最大氷結晶生成帯という) を通過するに要する時間が短いほど解凍するときのドリッポ量が少ないと報告されている [159]。

保水性の低下により肉は官能的には多湿性が乏しい、口ずわりの悪いものになると考えられる。しかし、このような凍結によるテクスチャーの劣化を官能的に示した報告は見当たらない。これはおそらく、対照と比べた非凍結肉 (同一個体の肉) では熟成効果が顕現するにため、凍結肉との比較が難しく、凍結のせいによる影響と調べることができないからであろう。また、多量のドリッポの生成は呈味物質や香氣前駆物質の流失と招き、香味も劣化すると考えられる [157]。他方、長期間の凍結貯蔵中に脂質の酸化が起これ、不快臭が生じるとされている [160]。しかし、これは凍結による悪影響というより酸敗と凍結が

抑制しきれないためと理解すべきであろう。

一方、硬直前の食肉を凍結して解凍した場合には解凍硬直が起こる。 -18°C 以下で凍結している間には食肉中の一連の酵素反応は停止し、硬直前の状態そのままに ATP 濃度は高く維持されている。しかし、これと室温において急速解凍すると ATP の分解は凍結しない場合よりも加速され激しく硬直する [161, 162, 163]。これは凍結による細胞膜や筋小胞体膜の損傷による筋漿の Ca^{2+} 濃度の急激な上昇が原因であろう。この状態の肉は硬く、保水性も低く好ましくない。これを防止するためには、と殺後しばらく冷蔵してから凍結するかあるいは解凍前に -3°C に数日間放置してから解凍可ななど、解凍前に ATP を消費させておく方法が勧められている [157]。

他方、硬直後早期に凍結された肉は、解凍硬直こそ起きないものの、熟成効果が十分に発揮されていない可能性がある。これを解凍後に熟成させた場合について Cohen [164] が報

をしている。彼はイスラエルに輸入された凍結牛肉を $-5 \sim -6^{\circ}\text{C}$ で7-12日間貯蔵した結果、官能的に軟らかくなる傾向があることを認めている。しかし、筋原線維の小片化は必ずしも進行しないことを示している。また長期の解凍後貯蔵による不快感の発生を認めている。

以上の他に、凍結は軟化を促進するという報告もある。WingerとHennessy [165] はと殺後 15°C に26-28時間置いた牛肉を2つに分け、一方を -7°C で凍結して解凍後 15°C で48時間貯蔵し、他方を 15°C で48時間貯蔵後に -7°C で凍結して解凍し、両者のshear値を比較した結果、前者の方が軟らかいとしている。また、

LockerとDaines [166] はと殺後 15°C に24時間置いて硬直させた牛肉に -25°C での凍結と 15°C での解凍を3回繰り返した結果、shear値が初期の79%に低下したことを報告している。この原因としては、膜の損傷による細胞内Ca²⁺濃度の上昇やカテコラミン類のリソソームからの漏出などが考えられるが、明確な説明はなされ

ていない。また、これらの報告では軟らかさ以外のテクスチャー要素である多汁性などについて全く考慮していない。

2) 海外国における凍結輸入牛肉の現状

近年、国内での需要の増加に伴い、国内産より低価格である国外産の牛肉の輸入が増加している。この輸入牛肉はその貯蔵形態により、冷凍牛肉（フローズンビーフ）、冷蔵牛肉（チルドビーフ）、冷蔵して輸入し日本で冷凍した牛肉（エージドビーフ）に分けられる。しかし、量的には冷凍牛肉が圧倒的に多いのが現状である[167]。この冷凍輸入牛肉は低価格ではあるものの、国産の牛肉に比べて不味であるというアンケート調査結果がある[168]。その原因は一般には、肥育和牛にみられる肉質の高度な軟らかさと脂肪交雑（霜降り）が輸入牛肉には乏しいことにあると考えられている。しかし、原因の全てがこれ

らにあるのではなく、一部は冷凍輸入牛肉について非凍結牛肉と認められる熟成による肉質の軟化と香味向上が充分に発現していないことにある可能性が残されている。実際、オーストラリア産の牛肉の一部はと殺後2日目まで冷凍されて輸入されていることが報告されている[169]。しかし、このような熟成不足が一因である可能性について調べた報告は見当たらない。したがって、その可能性を調査するとともに、もしそうである場合には解凍後の熟成により、冷凍牛肉の風味の改善を図ることが可能かどうかについて検討する必要がある。

4. 本研究の目的

以上、述べたように、食肉の品質にと、重要な風味は熟成にあり、向上する。しかし、高品質の食肉を得るためにはその向上の機構の解明が是非とも必要である。

これまで熟成による呈味性向上の機構はほぼ解明され、牛肉での味の向上は豚肉や鶏肉ほどには明確でないことが示されている。

したが、牛肉の熟成ではテクスチャーと香りの向上が期待される。しかし、これらの機構は完全に解明されていない。これを明らかにすることは高品質の牛肉を得るために必要であり、また、現実には流通している冷凍輸入牛肉が国産牛肉よりも不味である原因の解明に役立つと考えられる。

このような考えをもとに以下のことを本研究の目的とした。

牛肉を冷蔵したときと凍結したときのテクスチャーが向上することを検証し、そのときの筋原線維の構造変化を把握する。

2) これまでに食肉熟成での意義が明確にエト
ていない筋肉高分子量プロテイン、筋肉
カタラーゼ、筋肉システインプロテアー
ゼインヒビターをそれぞれ精製し、性質を調
べ、これらのテクスチャー変動への関与を明
らかにする。

3) 筋原線維の構造変化を反映すると思われる
Mg-ATPase活性の変化が2)で調査したものと
含め、既知のテクスチャー変動要因の候補に
よ、引き起こされるかどうかを調べる。そ
れで説明できない場合には新しい因子を検索
する。

4) 牛肉の熟成による香りの向上を調査する。
特に生鮮香気の発生に注目し、その生成機構
を明らかにする。

5) a) 4)で明らかにした熟成効果が冷凍牛肉
を解凍後に冷蔵した場合にどの程度発現する
かを調べ、解凍後熟成による風味向上の可能
性を探る。

b) a) 4)で明らかにした熟成効果が実際に流

通していう冷凍輸入牛肉でどの程度発現しているかを調べ、その不味さの原因を明らかにする。また、これの風味を改善することが可能かどうかを検討する。

得られた結果を本章に分けて記した。

第1章ではまず牛肉の一部を冷蔵し、他方を冷凍して肉質を比較した。その結果、前者が後者より軟らかく、多汁であることが確認された。このとき冷蔵した方では筋原線維のZ線が脆弱化し、 Mg -ATPase活性のKCl濃度依存性が増大し、かつ低KCl濃度で存在する極大値も増大した。冷凍した方ではこのような変化は見られなかった。

次に食肉テクスター変動要因の新候補として筋肉高水分量プロテイン-β、筋肉カタアシニンH、筋肉シスチニンプロテイン-βインヒビターを精製し、性質を調べた。前二者については筋肉タンパク質の分解様式並びに筋原線維の Mg -ATPase活性への影響⁸度から、それらのテクスター変動への寄与は小さいと

推定された。後者についてはカテフシン B、H、L を非拮抗的に阻害することが明らかになった。また、B、H、L に対する親和性の差があること ($H, L > B$) や L に対する阻害が H の共存により抑制されることが示された。これらのことなどから、カテフシンがインヒビターより過剰に存在し、かつインヒビターに対してカテフシン同士で競合することが肉中のカテフシンの活性発現を可能にする一因であると推察された。

更に、筋原線維の Mg -ATPase 活性の変化を引き起こす因子を検索した。その結果、活性の KCl 濃度依存性の増大は主にカルパイン、カテフシン D、L による引き起こされ、活性の低 KCl 濃度での極大値の増加は筋肉中の塩基性タンパク質により引き起こされると推定された。

第 II 章では、牛肉の熟成による生鮮香気の変化を調べた。

牛肉の熟成により甘い香気な生鮮香気が生

成し、加熱後の肉の嗜好性を高めることに寄与していることを認め、これを熟成者と命名した。熟成者の生成には酸素が必要で、脂身と赤身の共存部で強く生成すること、また、微生物の作用で生成する可能性が高いことが明らかにされた。

第Ⅲ章では、牛肉の熟成効果発現に及ぼす冷凍の影響を調べた。冷凍牛肉を解凍して冷蔵するとテクスチャーは軟らかくなるが、口どわりの粗さが残った。これに対応して筋原線維のミ線が脆弱化した。Mg-ATPase活性の変化は小さかった。Mg-ATPase活性に変化しにくくした凍結による何らかのタンパク質の損傷が口どわりの粗さとして感知されると推察された。

また、このとき熟成者が生成したが、同時に汗臭を伴うこともあることが示された。しかし、この汗臭はドリップと肉との接触を避けることにより抑制できることが明らかになった。

さらに、実際の冷凍輸入牛肉を調べた結果、テクスチャーは良好であったが、熟成香が決定的に不足していた。これは真空包装による酸素の遮断が一因であると推察された。しかし、この冷凍輸入牛肉にも解凍後の熟成により熟成香を賦与できる可能性が示された。

実験材料および方法

1. 試薬類

DEAE-cellulose (DE-52) は Whatman 社から、DEAE-Sephadex A-50、Sephadex G-75、Sephadex G-100、Sephacryl S-300、CNBr-activated Sepharose 4B および blue dextran は Pharmacia 社から得た。P-cellulose および Hydroxyapatite は 生化学工業株式会社から、Centriflo CF25 は Amicon 社から購入した。BANA、Leu-NA、ペヨーロマイシン、TLCK、大豆トリプシンインヒビター、パパイン、トリプシンは Sigma 社から購入した。分子量測定用の標準タンパク質であるフェリチン、アルドラーゼ、ウシ血清アルブミン、オボアルブミン、 α -キモトリプシノーゲンおよびチトクローム c は Boehringer Mannheim 社から、チログロブリンは Sigma 社から購入した。タンパク質濃度測定用の標準タンパク質であるウシ血清アルブミンは Miles 社から購入した。カゼインおよびヘモグロビンは Merck 社から、TPCK は Aldrich 社から購入した。PMSF、DFP および

ATPは和光純薬工業株式会社から購入した。
 Z-Phe-Arg-MCA, Z-Arg-Arg-MCA, Arg-MCA, SLLVT-MCA, AMC, アニチパイン, ロイペプチン, パースタチン, キモスタチン, E-64 およびペスタチンはペプチド研究所から購入した。Arg-NA, Lys-NA, Met-NA, Ala-NA, Ser-NA, Val-NA, Glu-NA, Pro-NA, Gly-NAはBachem社から購入した。Bio-Lyte 3/10 AmpholyteはBio-Rad社から購入した。

2. 筋肉およびその貯蔵方法

1) ウサギ筋肉

家兎を殺後すぐに充分放血し、その背最長筋(M. longissimus dorsi)を取り出し、これを用いた。

0℃での貯蔵は筋肉をポリエチレン製の袋に入れて、砕氷と混合した水中に保持することにより行なった。

2) ウシ筋肉

国産の牛肉については、Table 1 に示す月齢のホルスタイン種の去勢肥育牛4頭および同種の泌乳量の低下した老雌牛8頭をと殺し、その半丸枝肉を0-4℃に2日間懸吊（最大硬直期を経過させた後、ロイン部（胸最長筋：リブローズとサーロイン）を採取し、これを用いた。

Table 1. Sex and age of the cattles used for the present work

Cattle number	Sex	Age(months)
#1	castrated	21
#2	castrated	21
#3	castrated	unknown
#4	castrated	unknown
#5	female	55
#6	female	56
#7	female	101
#8	female	152
#9	female	29
#10	female	57
#11	female	60
#12	female	76

貯蔵の方法によつて試料を次のように3グループに分けた。i)最大硬直期後(と殺2日後)一度も凍結しないでさらに0℃に数週間貯蔵したもの(冷蔵肉と略す)、ii)最大硬直期後、ただちに-20℃に凍結貯蔵してから解凍させた直後のもの(冷凍肉と略す)、およびiii)最大硬直期後、ただちに-20℃に凍結貯蔵してから解凍後0℃に数週間貯蔵したもの(解凍冷蔵肉と略す)である。ある個体のロイン部の一定部位(皮下脂肪を含む)を縦に等分割し、それぞれが700g前後の肉塊とした。その一方をある方法で貯蔵した場合、他方は異なる方法で貯蔵し、貯蔵後の両試料間で官能特性と筋原線維と線維の脆弱度について比較調査した。筋原線維のMg-ATPase活性は、ロイン部の一定部位(皮下脂肪を含まず)を80g前後の肉塊に切り分け、それらを3つのグループに分けて前述の3つの方法で貯蔵した試料について測定した。熟成香の生成機構を調べる実験では、ロイン部の一定部位(特に記

(たときを除き皮下脂肪を含む)を100-200gの肉塊に切り分け、それらをランダムに2つから4つのグループに分けてそれぞれ結果に記した条件で0℃に貯蔵した。

牛肉の0℃での貯蔵は、試料をプラスチック製の袋あるいはガラスの容器に入れて、碎氷と混合した水中に保持することによって行なつた。-20℃での凍結と貯蔵は冷凍庫に入れることで行なつた。凍結速度は測定しなかつた。凍結肉を解冻するには最短でも、大きな肉塊(700g)前後では0℃で3日あるいは4℃で2日を要し、小さな肉塊(80g前後)では4℃で1日を要した。したがって、本実験ではそれぞれの肉塊を0℃あるいは4℃に最小必要日数だけ放置して解冻した。

外国産の牛肉の履歴はそれぞれ結果のところに記した。

3. 官能評価

1) 生肉

各種条件(結果に記した)下で貯蔵した牛肉の生鮮香気を未訓練パネリストが鼻で嗅いで判定した。

2) 加熱調理肉

脂肪組織を除いた牛肉を、断面約4×4 cm、厚さ約1 cmの大きさの小片にし、これを200℃のホットプレート上にのせて片面を1分間、裏をかえして30秒間加熱後、未訓練パネリストによる2点嗜好試験に供した。評価項目は軟らかさと香味である。香味は香りと味を区別しないで評価した。なお、このように加熱した肉の状態は、肉の調理法というよりあるいはミディアムレアに相当した。

4. 筋原線維および筋漿タンパク質の調製法

筋原線維はYangら[57]の方法に準じて調製した。基本的には以下の通りである。

ウシ筋肉の筋原線維は、試料の脂肪組織を除いたのちに挽肉にし、その5gに40 mM Tris-

HCl buffer (pH 7.2) / 0.16 M KCl / 1 mM EDTA / 4 mM NaN_3 を加えてワーリングブレンダー (特) テラオカ製) で 1 分間 (目盛り 1 で 15 秒後、目盛り 3 で 45 秒間) ホモジナイズしたあと、遠心分離法によって 60 ml の 0.16 M KCl / 5 mM で 2 回洗浄して得た。

ウサギ筋肉の筋原線維は、試料を挽肉にし、その 5g に 40 mM Tris-HCl buffer (pH 7.2) / 0.16 M KCl / 4 mM NaN_3 を加えてオートホモジナイザー (特) 日本精機製作所製) で 10,000 rpm で 1 分間ホモジナイズしたあと、上記と同様の遠心分離法により洗浄して得た。

Mg-ATPase 活性を変化させる因子の解明に用いた筋原線維は、と殺後 0°C に一夜保持して最大硬直期を経過したウサギ筋肉から調製した。

筋原線維の調製過程で、1 回目の遠心で得られる上清と筋漿タンパク質として使用した。

5. 筋原線維の小片化率の測定法

Hattori と Takahashi [38] の方法に準じて測定した。筋原線維の 2mg/ml 濃度の溶液をそのまゝ位相差顕微鏡で 400 倍で観察し、写真をとった。その写真中の全筋原線維数に占める $1-4$ 個の筋節からなる筋原線維数のパーセントを求め、これを小片化率とした。1個体について1つの筋原線維調製液をつくり、それについて3枚の写真をとる、3枚の写真から得た値の平均値を求めた。

6. 筋原線維の Mg-ATPase 活性測定法

Yang ら [57] の方法に準じて測定した。筋原線維 (0.25 mg/ml) を 2.0 ml の $2\text{ mM MgCl}_2 / 20\text{ mM Tris-HCl (pH 8.0)} / 2\text{ mM NaN}_3 / \text{KCl}$ (濃度は各図中に示した) 中で、 1 mM ATP に 25°C で5分間作用させたのち、 0.5 ml の 20% トリクロロ酢酸を加えて反応を停止させた。これを $1,000\times g$ で10分間遠心分離し、得られた上清中のリンを Allen [170] にしたがって定量した。

7、筋肉プロテイナーゼの調製法

1) 粗カテプシンの調製法

ウサギ筋肉に3倍量の40 mM Tris-HCl (pH 7.2)/4 mM NaN_3 を加えてホモジナイズした。これの7,000 $\times g$ の遠心分離で得られる上清に1 N HClを加えてpHを3.7にし、30分間搅拌したのち、再度7000 $\times g$ で遠心分離した。得られた上清の硫酸25-65%飽和で沈澱するタンパク質を、少量の10 mM sodium acetate buffer (pH 5.0)/0.05 M NaCl/1 mM NaN_3 に溶解し、さらに同溶液で2日間透析した。透析後に10,000 $\times g$ の遠心分離して得られた上清を粗カテプシン調製物とした。

2) カテプシンBの調製法

ウサギ筋肉より Okitani ら [83] の方法により精製した。

3) カテプシンLの調製法

ウサギ筋肉より Okitani ら [171] の方法により精製した。

4) カテプシン D の調製法

1) の粗カテプシン調製物に 0.1mM になるように TIA を加えたのち、 10mM sodium acetate buffer ($\text{pH}5.0$) / 0.05M NaCl / 0.1mM TIA / 1mM NaN_3 で平衡化した Sephadex G-75 カラム ($40 \times 54.4\text{cm}$) にかき、同溶液で溶出した。分流量 $40,000$ 付近の尿素変性アモグロビン分解活性のピークを集めてカテプシン D とした (Fig. 42)。

5) カルパイン II の調製法

ウサギ筋肉に 2 倍量 40mM Tris-HCl buffer ($\text{pH}7.2$) / 4mM NaN_3 を加えてホモジナイズし、これを $7,000 \times g$ で遠心分離して残渣を除き、粗抽出物を得た。これの $25-65\%$ 飽和画分を取り、 10mM Tris-HCl buffer ($\text{pH}7.2$) / 0.1M NaCl / 1mM NaN_3 で平衡化した DEAE-cellulose カラムにかけた。同溶液で非吸着物を洗淨後、NaCl 濃度 0.1M から 0.4M への傾斜法により酵素を溶出させた。このとき NaCl 濃度 0.25M 付近に溶出するカベイン分解活性のピークをカルパイン II とした。

8. プロテイナーゼの活性測定法

1) 高分子量プロテイナーゼの活性測定法

高分子量プロテイナーゼの活性は Ishiura ら [117] の方法の変法を用いて、SLLVT-MCA を基質として測定した。特に記したときを除いて次のような条件を用いた。酵素を 0.4 ml の 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) 中で、0.05 mM の基質に 37°C で 1 時間作用させたのち、0.6 ml の 1% SDS - 20 mM Tris-HCl buffer (pH 9.0) を加えて反応を停止した。遊離した AMC の蛍光を励起波長 370 nm、蛍光波長 460 nm で測定した。1 分間に 1 μ mol の基質を分解する酵素活性を 1 単位とした。

2) カテプシン H の活性測定法

カテプシン H の活性は BANA、Leu-NA などのアミノ酸ナフチルアミドおよび Arg-MCA を基質として測定した。

BANA およびアミノ酸ナフチルアミドの分解活性は Matsutani ら [112] の方法によって測定した。特に記したときを除いて次のような条件を用いた。酵素を 0.4 ml の 0.4 mM EDTA / 3 mM

DTT / 50 mM potassium phosphate buffer (pH 6.2) 中で 0.5 mM の基質に 37℃ で 1 時間作用させたのち、0.4 ml の 0.23 N HCl を含む エタノールを加えて反応を停止した。さらに 0.4 ml の 0.06 % p-ジメチルアミノシニナムアルデヒドを含む エタノールを加え、生成したシッフ塩基色素の 540 nm の吸光度を測定し、遊離した 2-ナフチルアミンを定量した。

Arg-MCA の分解活性は Barrett と Kirschke [87] の方法に準じて測定した。特に記したときを除いて次のような条件を用いた。酵素を 0.4 ml の 1.2 mM EDTA / 3 mM DTT / 50 mM potassium phosphate buffer (pH 6.2) 中で 5 μ M の基質に 30℃ で 20 分間作用させたのち、1 ml の 100 mM sodium monochloroacetate / 100 mM sodium acetate buffer (pH 4.3) を加えて反応を停止した。遊離した AMC の蛍光を励起波長 370 nm、蛍光波長 460 nm で測定した。

1 分間に 1 μ mol の各基質を分解する酵素活性を 1 単位とした。

3) カテプシン B の活性測定法

カテプシン B の活性は BANA、Z-Phe-Arg-MCA および Z-Arg-Arg-MCA を基質として測定した。

BANA 分解活性は特に記したときを除き、2) のカテプシン H の場合と同じ方法で測定した。

Z-Phe-Arg-MCA および Z-Arg-Arg-MCA 分解活性は、特に記したときを除き、2) のカテプシン H の Arg-MCA 分解活性と同じ方法で測定した。

1 分間に $1\mu\text{mol}$ の各基質を分解する酵素活性を 1 単位とした。

4) カテプシン L の活性測定法

カテプシン L の活性は Z-Phe-Arg-MCA を基質とし、特に記したときを除き、2) のカテプシン H の Arg-MCA 分解活性と同じ方法で測定した。

1 分間に $1\mu\text{mol}$ の基質を分解する酵素活性を 1 単位とした。

5) パパインの活性測定法

パパインの活性は Z-Phe-Arg-MCA を基質とし、

特に記したときを除き、2)のカテプシンHのArg-MCA分解活性と同じ方法で測定した。

6) トリプシンの活性測定法

トリプシン (ウシ膵臓; $7.5 \mu\text{g}/\text{ml}$) を 0.4 ml の 0.1 M Tris-HCl buffer ($\text{pH} 7.2$) / 10 mM NaN_3 中で 0.5 mM の BANA に 37°C で 15 分間作用させて、遊離した 2-ナフチルアミンを 2) のカテプシンH の BANA 分解活性の場合と同じ方法で測定した。

7) カルパインの活性測定

カルパインを 2 ml の 0.1 M Tris-HCl buffer ($\text{pH} 7.2$) / 0.1 M KCl / 5 mM CaCl_2 / 10 mM MCE / 1 mM NaN_3 中で $5 \text{ mg}/\text{ml}$ の カゼイン に 30°C で 30 分間作用させた。 0.5 ml の 20% トリクロロ酢酸を加えて反応を停止したのち、No. 5A の濾紙で濾過し、濾液の 280 nm での吸光度を測定した。

8) カテプシンDの活性測定

カテプシンDの活性は Okitani ら [80] の方

法で測定した。酵素を 1ml の 0.1 M sodium acetate-HCl buffer (pH 4.0) 中で 0.5% 尿素変性ヘビグロビンに 37°C で 1 時間反応させたのち、1ml の 6% トリクロロ酢酸を加えて反応を停止させた。反応液を No. 5A の濾紙で濾過し、濾液中のトリクロロ酢酸可溶性ペプチド量を、Lowry 法 [193] の方法によりウシ血清アルブミンを標準物として求めた。

8. シスライノプロテイナーゼインヒビターの活性測定法

シスライノプロテイナーゼインヒビターの存在下と非存在下で、カタプシン B、カタプシン H、カタプシン L、カタプシン D、カルパイン、トリプシン、パパインの各活性を、前に記した方法で測定し、それらの活性の減少量をインヒビター活性とした。なお、インヒビター活性の 1 単位は、カタプシン B (Okitani 法 [83] の方法で *P*-cellulose カラムクロマトグラフィーの段階まで精製したもの) の BANA 分

解活性1単位を阻害する量と定義した。

9. タンパク質濃度測定法

高分子量プロテインアーゼおよびカタプシン類のカラムクロマトグラフィーにおいては、280nmにおける吸光度により測定した。このとき $A_{1\text{cm}}^{1\text{mg/ml}}$ を1.0と考えた。

シス테인プロテインアーゼインヒビターのカラムクロマトグラフィーにおいては、230nmにおける吸光度およびウシ血清アルブミンを標準物として用いた色素結合法[174]により測定した。精製したインヒビターはそのタンパク質濃度が極めて低いため、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行ない銀染色して得られたバンドの濃さを、同時に泳動したチトクロームc (泳動したタンパク量は33, 13.2, 11.55, 9.9, 8.25, 6.6, 4.95, 3.3, 1.32 ng) のバンドと目視により比較して決定した。

その他のタンパク質濃度は、ウシ血清アルブミンを標準物として用いたビウレット法[

175] により測定した。

10. 電気泳動法

1) ポリアクリルアミドゲル電気泳動

ポリアクリルアミドゲル電気泳動は、Davis の方法 [176] により pH 9.4 で行った。高分子量アロテイナーゼをスラブゲル (75%) 上で 2 つのレーンで泳動した。泳動後、ゲルを 2 つのレーンに切り分け、一方を銀染色した。他方は泳動方向に垂直に約 2mm の間隔で細切り、それぞれの小片を 1 μ l の 10mM Tris-HCl buffer (pH 7.2) / 0.1M NaCl / 1mM NaN₃ 中に浸漬し、4°C で一夜振とうして酵素を抽出した。この活性を測定することにより酵素の泳動された位置を決定した。

2) SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動は、Laemmli [177] の方法により、10、12.5、15% ゲルを用いて行った。ゲルの染色は銀染色法

とクマジー・アリリアントブルー染色法の2つの方法で行なった。

3) 液体等電点電気泳動

液体等電点電気泳動は Bio-Rad 社の調製用液体等電点電気泳動装置 (RotoforTM Cell) を用いて行なった。試料に 2% になるように 3/10 Bio-Lyte Ampholyte を加え、0-5°C に冷却したフォーカシングチャンバーに入れた。チャンバーを回転させながら 12 W の定電力で 4 時間泳動し、泳動終了後、形成された pH 勾配に浴して 20 の画分に分け、それぞれ pH 測定、酵素活性測定およびタンパク質濃度測定に供した。

II. 分子量測定法

1) ゲル濾過法

高分子量アロテイナーゼの分子量は、10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.2) / 0.1 M NaCl / 1 mM NaN_3 で平衡化した Sephacryl S-300 カラム ($2.7 \times 89 \text{ cm}$) を用いて測定した。

カタプシンHの分子量は、10 mM sodium acetate buffer (pH 5.0) / 0.05 M NaCl / 0.1 mM TTA / 1 mM NaN_3 で平衡化した Sephadex G-100 カラム ($2.0 \times 81.2 \text{ cm}$) を用いて測定した。

シスライナーアロテイナーゼインヒビターの分子量は、10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.2) / 0.1 M NaCl / 1 mM NaN_3 で平衡化した Sephadex G-75 カラム ($2.2 \times 80.3 \text{ cm}$) を用いて測定した。

標準タンパク質としてチログロブリン ($M_r = 669,000$)、フェリチン ($450,000$)、アルドラーゼ ($158,000$)、ウシ血清アルブミン ($68,000$)、オボアルブミン ($45,000$)、 α -キモトリポンノーゲン ($25,000$)、チトクローム c ($12,500$) を用いた。

2) 電気泳動法

高分子量プロテイナーゼのサブユニット、カタパシンH、システインプロテイナーゼインヒビターおよび筋原線維のMy-ATPase 活性と変化させる塩基性タンパク質の分子量は、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により測定した。標準タンパク質としてホアクチニン ($M_r = 95,000$)、ウシ血清アルブミン (68,000)、オボアルブミン (45,000)、ホキモトリプシン-ゲン (25,000)、チトクロームc (12,500) を用いた。

12. CM-papain Sepharose カラムの調製法

CM-papain Sepharose カラムは Anastasi ら [178] の方法に準じて調製した。パパイン (2.8 mg/ml) を 5 ml の 112 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0) / 2 mM DTT / 1 mM EDTA 中において 25°C で 10 分間活性化した。これに 100 mM になるようにモノヨード酸を加えてさらに 25°C で 10 分間保温したのち、0.1 M NaHCO_3 (pH 8.3) / 0.5 M NaCl に対

して透析した。得られた S-カルボキシメチル化パバインを Pharmacia 社のマニニアルにしたが、 CNBr -activated Sepharose 4B (乾燥重量 4g) と反応させて固定化した。

13. Kinetic constant (K_m , V_{max} , K_i) および阻害様式の決定法

K_m , V_{max} および阻害様式は Lineweaver-Burk プロット [191] により求めた。また、 K_i は、種々のインヒビター濃度について得られた Lineweaver-Burk プロットの傾きを、インヒビター濃度に対してプロットすること (Lineweaver-Burk の二次プロット) [192] により求めた。

結果と考察

第I章 食肉熟成におけるナクステップの向上と筋原線維 Mg -ATPase活性の挙動
牛肉は冷蔵すると筋原線維のZ線が脆弱化していく。このことは熟成による肉質の軟化の主要因となつてゐる。そして、Z線の脆弱化は、むしろ可因子についてこれまでに多くの人々の研究の対象とされてゐる。その結果得られた現在までの知見は、すこし序論で述べた。

他方、Yangら[57]は、家兔筋肉を冷蔵すると、筋原線維の Mg -ATPase活性が著しく変化することを見出さしめて、筋肉軟化現象との関連を示唆した。そこで、本章において、 Mg -ATPase活性の変化と熟成によるナクステップの変化との関連を調査し、さらに、変化をもたらす可因子を解明して、 Mg -ATPase活性に関する情報から熟成による肉の食味性の変化を知る上でのいかなる意義を有するかを明らかにした。

うとしK。

1. 牛肉の冷蔵および凍結貯蔵（冷凍）にお けるテクスターと筋原線維のMg-ATPase 活性の挙動

本節では、牛肉を冷蔵しKとまのテフスチ
パーの官能評価、筋原線維の脆弱度、および
Mg-ATPase活性などの程度変化可否のAを検証
し、さらに、これらの変化が、牛肉を冷凍し
Kとまにどのよう影響されるかを明らかに
して、Mg-ATPase活性の変化とテクスターと
の関連について考察しK。

<結果と考察>

ホルスタイン種の去勢肥育牛2頭のロイン
部（胸最長筋）を、と殺後0-4℃に2日間放置
して最大硬直期を経過させたのち、その一定
部位を縦に等分割し、それぞれが700g前後の
肉塊としK。その一方を0℃に18日間貯蔵し、
他方は-20℃に凍結貯蔵したのち0℃に3日間置
15日間

いて解凍した。このようにして得られた前者を冷蔵肉と呼び、後者を冷凍肉と呼ぶ。両者を加熱したのち、軟らかさについて2点嗜好試験法による官能評価を行なう。未訓練の大学生11人のパネリストによる99回の試験の結果、Table 2に示すように、冷蔵肉が有意に軟らかいことが示された。また、熟成肉には多汁でありとのコメントがあった。

食肉の軟らかさを調べる手段としては、官能評価する方法と剪断力価を測定する方法の2つがある。このうち、官能評価とは、個体の果なすいくつかの試料を熟成させ、一定日数経たせるところで評価者の経験値にもとづいて軟らかさの程度を絶対値である点数で示す方法が多くの場合とされている。そして、この方法では、熟成により牛肉が軟化することがFieldら[2]、MinksとStringer[3]、Smithら[4]が示すに明らかにしている。しかし、この方法では対照がないために、熟練したパネリストを用意する必要がある。さらに、個体

Table 2. Tenderness of beef loins after storage.

Numbers of samples judged to be preferable		
0°C-stored beef ^a	Frozen beef ^b	Difference
77	22	***

Significant differences were indicated with *** ($P < 0.001$)
Cattles #1 and 2 were used.

a: stored at 0°C for 18 days after 2 days postmortem.

b: stored at -20°C for 15 days after 2 days postmortem
and then thawed at 0°C for 3 days.

間と硬直によらないかたさ (background toughness) が果ばすために、硬直によるかたさ (rigor toughness) が熟成により減少すること、可なり、軟化することとを把握するためには、多数の個体を用いて統計処理をすることが必要である。そこで、本研究では、より簡便な方法を求め、少数の個体の試料の各々を2分し、一方を冷蔵、他方を冷凍し、一定日数後、両者を未訓練パネルの2点嗜好試験法で判定する方法を試みたのである。得られた結果は、凍結により、軟化反応が停止するため、このようにした冷凍肉は冷蔵による軟化現象を調べる場合の対照として使用できることも強く示唆している。

つぎに、上記と同様の方法を採用して、冷蔵肉と冷凍肉の筋原線維の脆弱度の変化を調べた。脆弱度は、筋原線維の小片化率で測定し、Table 3に示した。冷蔵肉では、14日間の貯蔵により、小片化は約38%から79%へと増加しており、筋原線維のミ線が脆弱化したとい

Table 3. Changes in fragmentation rate of myofibrils during the storage of beef loins after 2 days postmortem.

Storage condition	Cattle number	Storage time (days)			
		0	14	44	58
		%	%	%	%
0°C (0°C-stored beef)	#5	36.8	79.2		
	#6	38.9	80.1		
	Average	37.9	79.2		
-20°C ^a (Frozen beef)	#5	— ^b	— ^b	36.6	32.3
	#6	— ^b	— ^b	41.6	38.2
	Average	— ^b	— ^b	39.1	35.3

a: thawed for preparation in 4°C-air for 2 days after the storage.

b: not determined.

ることから明らかである。この現象は、鶏肉を用いた Takahashi ら [35] や、肉用種の牛肉を用いた Olson ら [36] の報告と一致している。一方、冷凍肉では、58 日間の凍結貯蔵中に、筋原線維の小片化はほとんど変化しなかつた。本結果は、筋原線維の Z 線を脆弱化させる因子の作用が凍結によつて完全に停止させられたことを示している。Z 線の脆弱化は食肉の軟化と直接結びついていることから、Table 2 で用いた冷凍肉でも軟化は全く進行していないと判断される。したがって、Table 2 で、冷凍肉を冷蔵肉の軟らかさを官能評価するときの対照として用いたことの妥当性が、さらに強められたことになる。

以上のように、凍結によつて牛肉の軟化反応は著しく抑制されることが明らかになったわけであるが、このとき筋原線維の Mg-ATPase 活性挙動を知ることは、きわめて興味深い。調査の結果は以下のようである。冷蔵肉の筋原線維の Mg-ATPase 活性は、Fig. 1 のように貯

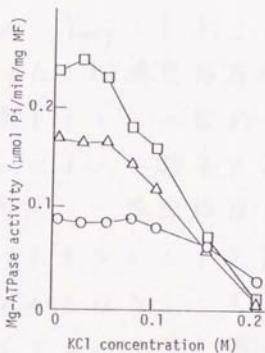


Fig. 1. Changes in Mg-ATPase activities of myofibrils at various KCl concentrations during storage of beef loins at 0°C.

The loins of the cattle #4 were stored at 0°C for 0 (O), 7 (Δ) and 14 (□) days after 2 days postmortem. Mg-ATPase activities were measured by the assay of myofibrils (MF, 0.25 mg/ml) with 1 mM ATP in 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) containing 2 mM $MgCl_2$ and varying concentrations of KCl indicated on the abscissa at 25°C for 5 min.

蔵に従い、2. 低KCl濃度に存在する極大値が増大し、KCl濃度依存性も増大した。これと同様の变化は、家兔肉を4℃に貯蔵したときに認められることが、Yangら[57]によって報告されている。また、KCl濃度依存性の増大は、牛肉を6℃に貯蔵したときに認められることが、Qualiら[58]によって報告されている。

これらの変化は、筋原線維を構成しMg-ATPase活性を担うミオシンとアクチンの分子内変化に起因するのではなく、これらのタンパク鎖とその他のタンパク鎖を構築している筋原線維の構造変化に起因するものであると推定している[57]。しかし、この構造変化の内容や変化をもたらす因子はまだ不明である。一方、冷凍肉ではFig.2のよう、 -20°C で14日間の凍結貯蔵中にはMg-ATPase活性の変化はほとんど起こらなかった。このことは、牛肉の凍結貯蔵中には、筋原線維に上述のような構造変化をもたらす因子がほとんど作用しないことを示している。

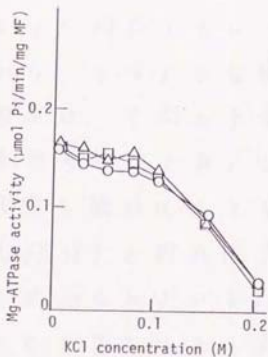


Fig. 2. Changes in Mg-ATPase activities of myofibrils (MF) at various KCl concentration during of beef loins at -20°C .

The loins of the cattle #3 were stored at -20°C for 1 (O), 7 (Δ) and 14 (\square) days after 2 days postmortem and then thawed in 4°C -air for 1 day. The activities were measured as in Fig.1.

以上の結果は、官能評価で認められたテクスチャーの向上とミ線、脆弱化はもとより、 Mg-ATPase 活性の変化に反映される筋原線維構造の変化ともよく対応していることを示している。すなわち、このような筋原線維構造を変化させる因子が、牛肉のテクスチャー向上にもたらす原因の一つであることも強く示唆している。ミ線を脆弱化させる因子としては、 Ca^{2+} [37, 38] と内在性プロテナーゼ [29, 40, 41, 43] が知られている。一方、 Mg-ATPase 活性を変化させる因子はまだ不明であることから、これを解明することは、牛肉のテクスチャー向上の機構の全容を知るうえに大きく貢献することになると考えられる。したがって、以後の研究では、その因子の解明を目的とした。

2. 食肉のテクスチャー変動要因の新候補としての2つの筋肉プロテイナーゼと1つのプロテイナーゼインヒビターの精製と性質

前節において、牛肉の熟成中のテクスチャー変動と筋原線維の Mg -ATPase 活性の変化がよく対応していることが明らかになり、そのような Mg -ATPase 活性の変化を引き起こす因子が、熟成中のテクスチャー変動をもたらす因子の1つであることが強く示唆された。しかし、これほどその因子は不明のままであるため、本論文の主目的の1つをその解明におくことになった。

テクスチャー変動と直接に関係したもう1つの現象である筋原線維のZ線の脆弱化については、これほどに多くの研究がなされ、その惹起因子としては、すでに Ca^{2+} とプロテイナーゼのカルパイン、カタプシンB、D、L が挙げられている。そして、これらのプロテイナーゼはすべて精製されその性質も詳しく調べら

れている。しかし、これらが筋原線維の My-ATPase 活性の変化をもたらす因子でもあるのか否かは必ずしも明確になっていない。これについては次節で調査することにした。

他方、筋肉の生分解機構の研究から、上記のプロテイナーゼのほか、さらに高分子量プロテイナーゼとカラプシンHが筋肉内在性のものとして注目されはじめてきた。しかし、これらについての情報は、その精製や筋肉タンパク質への作用という点で先の4つのプロテイナーゼに比べて明らかに不足している。そこで、本節では、これらの筋原線維 My-ATPase 活性への作用を調べる前段として、その完全精製と性質の解明を行い、筋肉熱成におけるそれらの意義を追求した。なお、先の4つのプロテイナーゼはすべてウサギ骨格筋から精製されている。したがって、それらのプロテイナーゼとともに筋原線維の My-ATPase 活性に対する作用を調べるときの斉一性を保つために、高分子量プロテイナーゼとカラプシンHもウ

サギ骨格筋から精製した。

さて、筋肉には上記のような各種プロテインナーゼのいくつかに対し特異的に働くインヒビターが存在することが知られている。それらが筋肉プロテインナーゼにいかなる影響を与えるかは、熱成中のプロテインナーゼの作用を解明するうえで考慮すべき重要な因子の一つである。こうしたインヒビターにはカルパインとシステインプロテインナーゼインヒビターがあり、前者については詳しく調べられてきたが、後者については筋肉から精製された例が少なく、著しく情報が不足している。そこで、本節では、システインプロテインナーゼを精製し、その性質を明らかにして、テクスチャー変動因子としてのプロテインナーゼの作用への関わりについて考察した。なお、システインプロテインナーゼインヒビターも、その作用対象となるプロテインナーゼとの斉一性を保つためにウリギ骨格筋から精製した。

1) 筋肉高分子量プロテイナーゼ (HMP) の精製と性質

高分子量プロテイナーゼは真核生物の細胞に普遍的に存在することが知られており[11]、その巨大な分子量(600,000~1,000,000)が特徴的な酵素である。筋肉の酵素はラット[116]、ブタ[117]、ウサギ[118]で精製されている。しかし、それらの筋肉タンパク質への作用も調べた報告はなく、したがって、そのタンパク質分解作用を通して食肉熟成中のテクスチャー変動にどの程度寄与する可能性があるのかはまだ調べられていない。そこで、本項ではウサギ骨格筋より本酵素を精製し、その性質を調べ、先のウサギでの報告[118]と比較すると同時に新たな知見を追加した。さらに今まで調べられていない筋肉タンパク質への作用様式を明らかにした。

i) 精製

本研究の初期にはウサギ骨格筋から高分子

量プロテイナーゼは精製されていなか、ため、ブタ骨格筋で報告された部分精製法[117]を部分的に採用し、ウサギ筋肉からの本酵素の完全精製を目指した。その後、ウサギ骨格筋から本研究とは異なる方法により高分子量プロテイナーゼが精製された[118](下欄参照)。そこでここでは、本研究で確立された方法によっても、先に報告された方法[118]と同程度の純度の精製酵素が得られることを示し、さらに、本法と先の方法との相違と長短を比較考察した。

ウサギ骨格筋の高分子量プロテイナーゼの精製法は1989年2月に Driscoll と Goldberg により Proc. Natl. Acad. Sci. USA 誌上に発表されたものである[118]が、本研究の精製法は1988年12月までに独自に確立され、1989年4月の日本農芸化学会大会にて口頭発表されたものである。

〈結果と考察〉

筋肉高タンパク量70mg/100mgの割合で次のように
 1で精製した。ウサギ骨格筋のひき肉に2倍
 量の40mM Tris-HCl buffer (pH 7.2)/4mM NaNO₃を加えて
 ホモジナイズし、これを7000×gで遠心して
 残渣を除き、粗抽出物を得た。この硫酸25-
 65%飽和画分を取り、10mM Tris-HCl buffer (pH
 7.2)/0.1M NaCl/1mM NaNO₃で平衡化したDEAE cellulose
 カラムにかけた。同溶液で非吸着物を洗浄後、
 NaCl濃度0.1Mから0.4Mへの傾斜法により酵素
 を溶出させた。Fig. 3に示すようにNaCl濃度0.2
 M付近に活性ピークが溶出した。この活性画
 分を集めてメンブレンフィルターでろ過し、
 Centriflo CF-25で濃縮し、10mM Tris-HCl (pH 7.2)/
 0.1M NaCl/1mM NaNO₃で平衡化したSephacryl S-300
 カラムにかけた。同溶液で酵素を溶出させた
 結果、Fig. 4に示すようにフラクション38付近
 に1つの活性ピークが現われた。この活性画
 分を集めて5mM potassium phosphate buffer (pH 7.0)
 に透析したのを同bufferで平衡化したHydroxyapatite

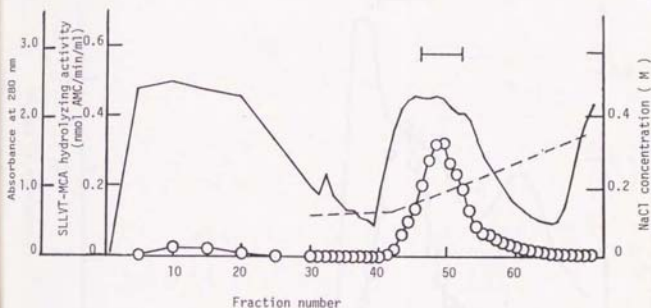


Fig. 3. DEAE-cellulose column chromatography of the high molecular weight-muscle proteinase (HMP).

The protein solution obtained between 25 and 65 % ammonium sulfate saturation (3769 mg of protein) was applied to a column (2x16 cm) equilibrated with 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.2)/0.1 M NaCl/1 mM Na₂S₂O₃. Elution was carried out with a linear gradient of 0.1-0.4 M NaCl in the same buffer.

Fractions of 10 ml were collected.

Absorbance at 280 nm, —; SLLVT-MCA hydrolyzing activity, O; NaCl concentration, - - -.

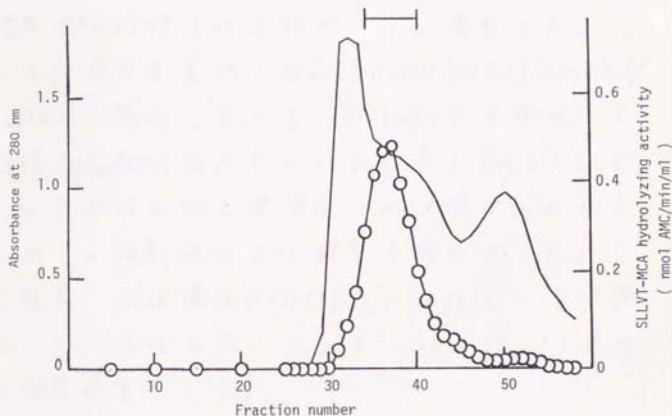


Fig. 4. Sephacryl S-300 column chromatography of HMP.

The active fractions (318 mg of protein) from the DEAE-cellulose column, indicated with the bar (—) in Fig. 3, were pooled and concentrated. The concentrated solution (318 mg of protein) was applied to a column (2.7x89cm) equilibrated with 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.2)/0.1 M NaCl/1 mM NaN_3 and eluted with the same solution. Fractions of 5 ml were collected. Absorbance at 280 nm, —; SLLVT-MCA hydrolyzing activity, O.

カラムにかけた。同bufferで非吸着物を洗淨後、リン酸濃度 5mM から 300mM への傾斜法により酵素を溶出させた。Fig. 5 に示すようにリン酸濃度 180mM 付近に活性ピークが溶出した。この活性画分を集めて 10mM Tris-HCl ($\text{pH } 7.2$) / 0.1M NaCl / 1mM NaN_3 に透析したのを、同bufferで平衡化した DEAE-Sephadex A-50 カラムにかけた (Fig. 6)。同bufferで非吸着物を洗淨後、NaCl 濃度 0.1M から 0.4M への傾斜法により酵素を溶出させた。その結果、NaCl 濃度 0.27M 付近に活性ピークが溶出した。活性の高いフラクション 55-61 を集めて精製酵素とした。

全精製過程のまとめを Table 4 に示した。酵素は粗抽出物から約 92 倍に精製され、活性の回収率は 1.9% とある。特に Hydroxyapatite カラムは活性をあまり低下させずに不純タンパク質を分離することができ有効である。精製酵素の純度を検定するために $\text{pH } 9.4$ のポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。スラブゲルを用い 1 つのレーンに切り出して銀染色を

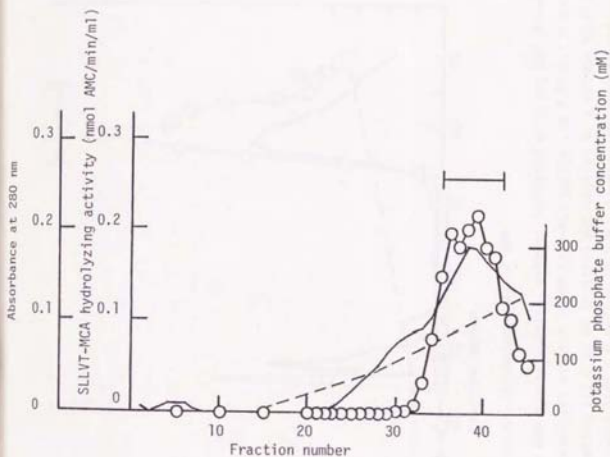


Fig. 5. Hydroxyapatite column chromatography of HMP.

The active fractions from the Sephacryl S-300 column, indicated with the bar (—) in Fig. 4, were pooled and dialyzed against 5 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0).

The dialyzed solution (15 mg of protein) was applied to a column equilibrated with 5 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0).

Elution was carried out with a linear gradient of 5-300 mM phosphate buffer (pH 7.0). Fractions of 10 ml were collected.

Absorbance at 280 nm, —; SLLVT-MCA hydrolyzing activity, O; potassium phosphate concentration, - - -.

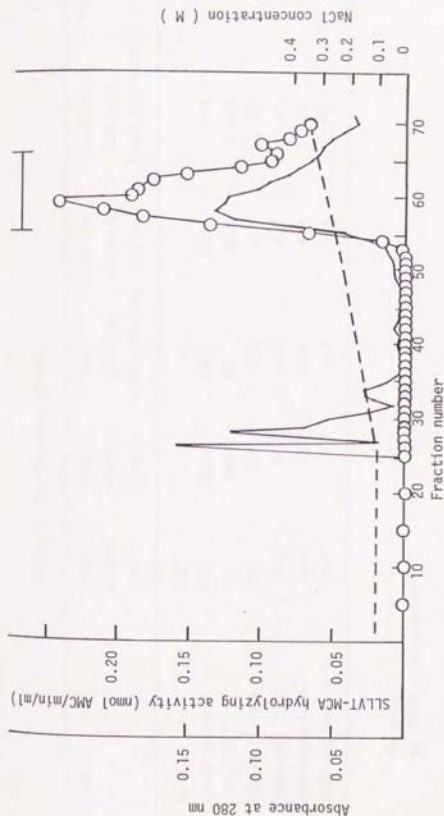


Fig. 6. DEAE-Sephadex A-50 column chromatography of HMP.

The active fractions from the Hydroxyapatite column, indicated with the bar (—) in Fig. 5, were pooled and dialyzed against 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.2)/0.1 M NaCl/1 mM NaH_2PO_4 . The dialyzed solution (12.8 mg of protein) was applied to a column equilibrated with 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.2)/0.1 M NaCl/1 mM NaH_2PO_4 . Elution was carried out with a linear gradient of 0.1–0.4 M NaCl in the same buffer. Fraction of 5 ml were collected. Absorbance at 280 nm, —; SLVT-MCA hydrolyzing activity, O; NaCl concentration, - - -.

Table 4. Purification of HMP.

Step	Total volume (ml')	Total protein (mg)	Total activity (nmol AMC/min)	Yield of activity (%)	Specific activity (nmol AMC/min/mg)	Purity (-fold)
Muscle	260 ^a					
Crude extract	482	18436	326	100	0.018	1
(NH ₄) ₂ SO ₄ ^b	99	9943	217	66.6	0.022	1.2
DEAE-cellulose	77	131	18.0	5.5	0.137	7.6
Sephacryl S-300	33.2	42.3	13.2	4.0	0.312	17.3
Hydroxyapatite	76.4	12.8	14.4	4.4	1.13	62.8
DEAE-Sephadex A-50	33.0	3.7	6.1	1.9	1.65	91.7

a; grams

b; 25-65 % saturation

を行い、残りのレーンは細切りにして各々の
 SLLVT-MCA 分解活性を測定した。その結果、
 Fig. 7 に示すように単一のバンドが観察され、
 しかも、そのバンドの位置に活性が検出され、
 精製酵素が電気泳動的に単一であることが示
 された。

Ishiura ら [117] らはマタ骨格筋の高分子量
 プロテイナービの精製において Hydroxyapatite カ
 うムフロマトグラフィーの段階で 50 mM リン酸
 濃度と 150 mM リン酸濃度でそれぞれ溶出する
 ingensin A と B の二つの酵素を見い出していま
 るが、本研究で得られた酵素はその溶出するリ
 ン酸濃度から考えて ingensin B に相当するもの
 であろう。本結果で ingensin A に相当する酵素
 が認められないのはマタとウサギの種差、あ
 るいは Ishiura ら [117] が行ったアセトン分画
 を本研究では行わなかったことが原因である
 かもしれない。いずれにしても、Ishiura らは
 両酵素を完全に精製していないため、本質
 的に両酵素は別種のもののなか、あるいは後

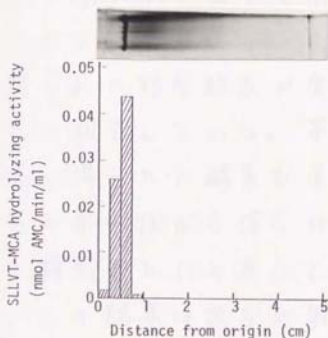


Fig. 7. Polyacrylamide gel electrophoresis of HMP.

The enzyme (9 μ g) was applied to a 7.5% gel at pH 9.4.

Graph demonstrates SLLVT-MCA hydrolyzing activity of the sections from the unstained part of the slab gel.

Details are described under "Materials and Methods."

述すように本酵素を構成する多種かつ多数のサブユニットの組成に一部差異が生じたものであるかは不明である。

Driscoll と Goldberg [118] も高分子量をロナイターゼもウサギ筋肉粗抽出物から約130倍に精製し、得られた精製酵素が電気泳動的に単一であると報告している。本研究で確立された精製法で得られた酵素もその精製度と電気泳動上の単一性から彼らが精製した酵素と同程度に精製されたと考えてよいであろう。そして、この結果は彼らが用いた Mono Q、Superose 6、DEAE-Affi-Gel Blue の各カラムクロマトグラフィーに代わ、本研究で用いた硫酸分画と Sephacryl S-300、Hydroxyapatite、DEAE-Sephadex A-50 の各カラムクロマトグラフィーが本酵素の精製手段として有効であったことを示している。

ii) 一般的性質

<結果>

精製酵素の一般的性質を調べた。以下のデータのうち、等電点、至適pH、pH安定性、熱安定性、各種薬剤 (Mg -ATPは除く) の影響、活性の K_m と V_{max} はこれよりウサギ骨格筋の酵素では調べられていないものである。

a. 分子量

Sephacryl S-300カラムを用いたゲル濾過法により、得られた本酵素の分子量は Fig. 8 に示すように 600,000-800,000 である。分子量の値の幅があるのは用いた検量線が直線ではなから、ためである。

b. サブユニット組成

本酵素を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけた結果、Fig. 9 に示すように分子量 20,000-29,000 の 8 本のバンドが検出された。これにより本酵素はヘテロサブユニット構造を持つことが示された。

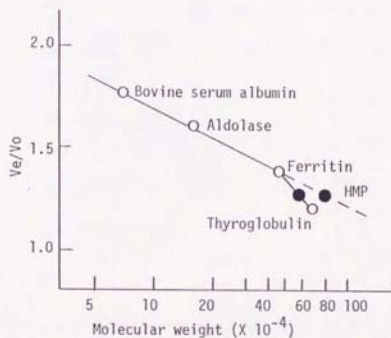
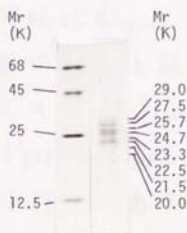


Fig. 8. Determination of molecular weight of HMP.

The purified enzyme and protein standards were applied to the Sephacryl S-300 column (2.7X89cm) and eluted with 10mM Tris-HCl buffer(pH 7.2)/0.1M NaCl/1mM NaN_3 . Details are described under "Materials and Methods."



(a) (b)

Fig. 9. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of IMP.

The purified enzyme and standard protein mixture were applied to a 12.5% gel.

The gel was stained with silver using a Kanto Chemical silver-staining Kit.

(a) standard protein mixture with (top to bottom):

bovine serum albumin, ovalbumin, α -chymotrypsinogen, cytochrome c.

(b) 0.21 μ g of the purified enzyme.

c. 等電点

本酵素を等電点 pI $pH 3-10$ の両性担体と共に液体等電点電気泳動にかけた。泳動後に形成された pH 勾配にも、20の画分に分画し、それぞれ画分の pH と SLLVT-MCA 分解活性を測定した。その結果、Fig. 10 に示すように活性のピークは $pH 5.5$ の画分に検出され、本酵素の等電点は 5.5 付近であることが明らかになった。

d. 至適 pH

本酵素の SLLVT-MCA 分解活性の至適 pH は Fig. 11 に示すように $pH 8$ である。

e. pH 安定性

本酵素の pH 安定性を知るに、基質非存在下で、3.5-10 の間の各種 pH に $37^{\circ}C$ で 1 時間放置後、残存する活性を測定した。Fig. 12 に示すように本酵素は $pH 5-10$ で安定である。

f. 熱安定性

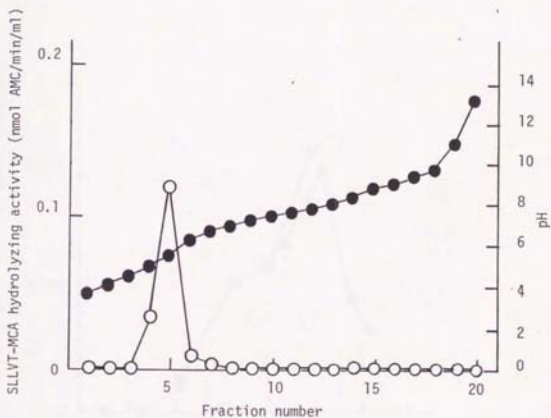


Fig. 10. Isoelectric focusing of HMP on a Rotofor cell.

The enzyme (specific activity, 0.059 nmol AMC/min/ml; 40 ml) was applied to a Rotofor cell with 2% Bio-Lyte3/10 Ampholyte and focusing with 12 watts of power for 4 h. After focusing, twenty fractions were obtained. Separated fractions were analyzed for their SLLVT-MCA hydrolyzing activity (○) and their pH (●).

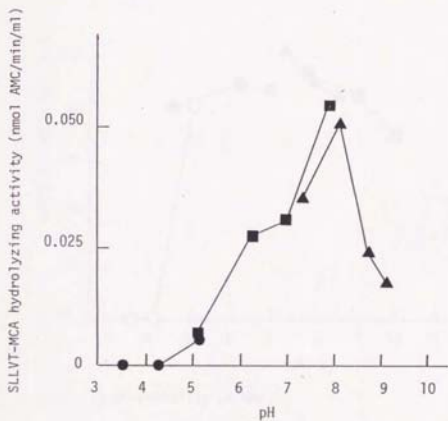


Fig. 11. Effect of pH on the activity of HMP.

The enzyme (0.78 μ g) was incubated with 0.05 mM SLLVT-MCA in 50 mM buffer at various pH values and 37°C for 60 min.

- , sodium acetate-HCl buffer; ■, Tris-acetate buffer;
▲, Tris-HCl buffer.

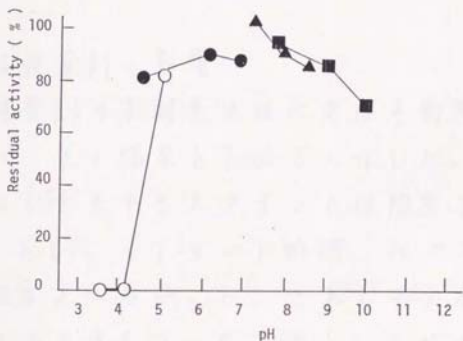


Fig. 12 pH-stability of HMP.

The enzyme (42 μ g) in 0.425 ml of 59 mM buffer solution of various pH was kept at 37°C for 1 h.

The residual activity was measured with 0.05 mM SLLVT-MCA at pH 8.0, and expressed as a percentage of the value for the enzyme kept at pH 7.2 and 0°C for 1 h.

○, sodium acetate-HCl buffer; ●, Tris-acetate buffer; ▲, Tris-HCl buffer; ■, glycine-NaOH buffer.

本酵素の熱安定性を知るため基質非存在下、 $\text{pH} 7.2$ と $0-100^\circ\text{C}$ の各種温度に 10 分間放置後、残存する活性を測定した。Fig. 13 に示すように、本酵素は 60°C 以下の温度では安定であつたが、 70°C 以上の温度では完全に失活した。

g. 各種薬剤の影響

各種薬剤の本酵素活性に及ぼす影響について調べ、その結果を Table 5 に示した。本酵素活性は DFP とキモスタチンとは阻害されたが、EDTA、E-64、モノヨード酢酸、ペプスタチンとは阻害されなかつた。これにより本酵素はセリンプロテアーゼであることが示された。他方、 CaCl_2 や Mg-ATP とは活性化されないが、 0.01% の SDS により約 8 倍に活性化された。なお、ここには示していないが、SDS による活性化の至適濃度は精製した酵素のロットにより $0.01-0.02\%$ の範囲で変動した。

h. K_m と V_{max}

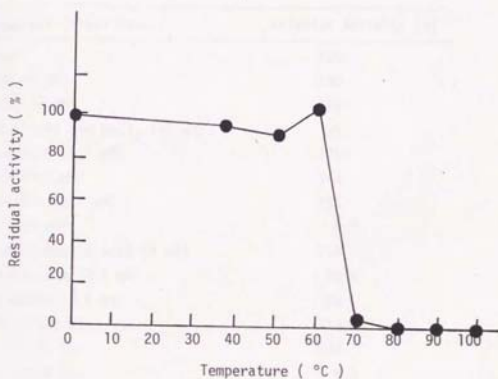


Fig. 13. Heat-stability of HMP

The enzyme (105 $\mu\text{g/ml}$) in 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.2)/ 0.1 M NaCl/1 mM NaN_3 was kept at various temperature for 10 min. The residual activity was measured with 0.05 mM SLLVT-MCA hydrolyzing activity at pH 8.0, and expressed as a percentage of the original activity.

Other conditions are described under "Materials and Methods".

Table 5. Effect of various compounds on the activity of HMP.

The enzyme (10.5 $\mu\text{g/ml}$) was assayed with 0.05 mM SLLVT-MCA in the presence of various compounds at pH 8.0.

Other conditions are described under "Materials and Methods".

Compounds (final conc.)	Relative activity (%)
None	100
EDTA (1 mM)	130
CaCl_2 (1 mM)	115
ATP (1 mM) and MgCl_2 (10 mM)	99
Leupeptin (0.1 mM)	101
E-64 (0.1 mM)	145
Bestatin (0.1 mM)	135
DFP (25 mM)	6.4
Monoiodoacetic acid (5 mM)	114
Chymostatin (0.1 mM)	50.4
Pepstatin (0.1 mM)	129
SDS (0.005 %)	113
(0.01 %)	834
(0.02 %)	8.5
(0.04 %)	0.2

本酵素の SLLVT-MCA 分解活性の K_m と V_{max} は Lineweaver-Burk plot により求め、Table 6 に示した。SDS 非存在下では K_m が 0.26 mM 、 V_{max} は $150 \text{ nmol AMC/min/mg}$ であった。これに対し 0.015% SDS 存在下では K_m が 0.41 mM 、 V_{max} は $48.2 \text{ nmol AMC/min/mg}$ であった。SDS による変化は V_{max} の方が顕著であった。

<考察>

本酵素に認められた巨大な分子量とサブユニット構造はこれまでに報告されている骨格筋の高分子量プロテイナーゼ [116, 117, 118] と共通な性質であった。分子量はスチ $1,000,000$ [117]、ラット $650,000$ [116]、ウサギ $650,000$ [118] と報告されている。また、サブユニットについては、ラットでは分子量 $25,000-32,000$ の 8 種のヘテロサブユニット [116]、ウサギでは分子量 $23,000-34,000$ の 8 ないし 10 種のヘテロサブユニット [118] から成ると報告されている。

Table 6. K_m and V_{max} values of HMP in the presence or absence of SDS.

The enzyme (43 $\mu\text{g/ml}$) was assayed with various amounts of SLLVT-MCA in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0).

Other conditions are described under "Materials and Methods".

SDS concentration (%)	K_m (mM)	V_{max} (nmol AMC/min/mg)
0	0.26	1.50
0.015	0.41	48.2

本酵素の等電点は約5.5であることが判明した。筋肉の酵素の等電点については、ラット2.51-5.2と報告されている[116]。したがって、ウサギ骨格筋の酵素も類似した等電点を持つと言えよう。

本酵素の至適pH、8という値は、マウス骨格筋の酵素がSLVT-MCAに対して示したpH8-10[117]、ラット骨格筋の酵素がSuc-Ala-Ala-Phe-MCAに対して示したpH7-8[116]とほぼ同様である。本酵素の熱安定性とpH安定性を同じく筋肉に存在するカタロシンB[83]、L[91]やカルパイン[100]と比較した場合、熱に対してはカタロシンB、Lより高温で安定でカルパインと同程度に安定である。pHに対しては、カタロシンB、Lよりも高いpHでも安定である。カルパインのpH安定性は報告されておらず、本酵素との比較はできない。

本酵素はMg-ATPで活性化されるが、Table 5)、DriscollとGoldberg[118]はウサギ筋肉からグリセロール存在下で迅速に精製した

プロテアソーム (高分子量プロテイナーゼ)
 は Mg -ATP により、210 倍程度に活性化されるこ
 とを報告している。彼らは、酵素はカリセロ
 ール存在下では Mg -ATP で活性化される余地を
 残した準安定化状態に保たれるが、グリセロ
 ール非存在下では不可逆的に活性化された状
 態に変化し、むしろ Mg -ATP で活性化される余地
 がなくなるとしている。本研究で得られた酵
 素はカリセロール非存在下で精製したために
 彼らの言う不可逆的に活性化された状態にあ
 るのかも知れない。彼らは、筋肉から精製され、
 Mg -ATP で活性化される酵素を、肝臓や [112, 113]
] や赤血球 [117] から精製され、 Mg -ATP で活性
 化されない酵素と比較してその分子量やサブ
 ユニット組成にあまり差がないことから、 Mg -
 ATP により活性化されるか否かはその高次構
 造の差によると推測している。もし、Driscoll
 と Gordberg¹⁶ が指摘したように、本研究で得た酵
 素は Mg -ATP で活性化される性質を精製過程で
 失くし、たまたまのことであり、たとえ、本酵

素の死後筋肉、可なり ATP の存在しない熟成中の筋肉との筋肉タンパク質への作用を調べる上には大きな欠点にはならないように考えられる。

本酵素に認められ、 SDS による活性化は高分子量のロティナーゼに広く認められている性質である [119, 120, 130] が、その分子機構や生理的意義については明らかにされていない。しかし、 SDS による活性化の K_m と V_{max} の変化 (Table 6) を見る限り、 SDS は酵素の基質との親和性を高めるといふより、触媒部位の反応効率を高めるような何らかの構造変化を引き起こしていると推察される。その構造変化の詳細については不明であるが、生体内ではこれと類似した活性化のための構造変化が ATP のエネルギーによっても引き起こされると言う考えも提示されており [179] さらに検討が必要であろう。

III 筋肉タンパク質への作用

<結果と考察>

本酵素の筋肉タンパク質分解様式を知るために、37℃で20時間筋肉タンパク質に作用させてその変化をSDS-ゲル電気泳動で調べた。作用時のpHとしては、合成基質に対する最適pHの8.0と食肉熟成中の極限pHである5.5を選んだ。また、本実験を行うにあたり、本酵素が実際の筋肉で均一に分散していることと想定したときの濃度をそのSLLVT-MCA分解活性により概算した。筋肉の全SLLVT-MCA分解活性がほぼ100%粗抽出物に回収されたと仮定した場合、求める値は約1.0nmol AMC/min/mlと概算された。本酵素の筋肉中での作用を推定するため本実験で採用する酵素濃度はこの値に近いものを設定した。

筋原線維タンパク質に作用させた場合とFig. 14に示した。SDS非存在下ではpH8.0と5.5のいずれにおいてもタンパク質は分解されないが、

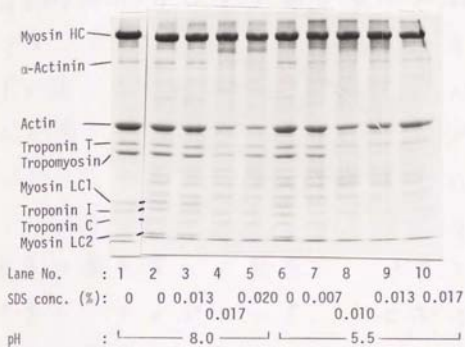


Fig. 14. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of myofibril treated with HMP.

Myofibril (2mg/ml) was incubated with HMP (specific activity, 0.704nmolAMC/min/ml) at the pH and SDS concentration indicated below each lane and 37°C for 20 h in 50 mM Tris-acetate buffer/5mM NaH_2PO_4 .

Lane 1 was without added HMP and SDS.

The incubated myofibril (13μg) was applied to a 10% polyacrylamide gel.

SDS が存在すると顕著に分解された。pH 8.0 では 0.017% SDS 存在下で最も変化が顕著で、アクチン、トロポニン T、トロポミオシンのバンドが薄くなり、 α -アクチニンのバンドはほとんど消失した。また、ミオシン重鎖(HC)のバンドの下にその分解産物のものと考えられる新バンドが出現した。一方、pH 5.5 では 0.01% SDS 存在下で最も変化が顕著で、 α -アクチニン、アクチン、トロポニン T、トロポミオシンのバンドが薄くなった。しかし、pH 8.0 に比べて α -アクチニンとアクチンのバンドの減少程度ならびにミオシンの分解産物と考えられるバンドの生成程度は小さく、トロポミオシンのバンドの減少程度は大きかった。本酵素は SDS で活性化された場合には筋原線維の主要なタンパク質をことごとく分解し、しかも中間産物はミオシン重鎖から以外にはほとんど認められなかった。これは、本酵素に存在するとされている [111, 119] 基質特異性が果なる複数の触媒部位が協働的に働き、非限定的に働く

り効率よく各タンパク質を分解し、電気泳動
工と確認されない小さいペプチドまで変換し
ていたことを示すのであろう。pHによつて分
解に对する SDS 至適濃度が異なり、これらの
SDS による酵素の活性化のための構造変化が
pHによつても影響を受けることを示唆してい
る。また、pHによつて各タンパク質の分解の
程度がそれぞれ異なるのは、分解を受けやす
い構造をとる pH が各タンパク質によつて異な
ることを示すばかりでなく、本酵素の複数の
触媒部位の作動性がそれぞれ pH によりかなり
影響を受けることを示すのであろう。

他方、筋漿タンパク質に作用させた場合を
Fig. 15 に示した。筋漿タンパク質は、SDS 存在
下と非存在下のいずれにおいても本酵素によ
り分解されなかった。先に示したように SDS
存在下で筋原線維タンパク質も顕著に分解し
た本酵素が何故筋漿タンパク質を分解しない
のであろうか。その一つの原因として筋漿タ
ンパク質中に内在性インヒビターが存在する

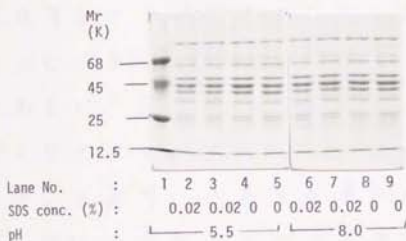


Fig. 15. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of sarcoplasmic proteins treated with HMP.

Sarcoplasmic protein (1.2mg/ml) was incubated with HMP (specific activity, 0.47nmolAMC/min/ml) at the pH and SDS concentration indicated below each lane and 37°C for 20h in 50mM Tris-acetate buffer/5mM Na₃.

Lane 1 was the standard protein mixture with bovine serum albumin, ovalbumin, α -chymotrypsinogen, cytochrome c.

Lanes 3, 5, 7 and 9 were without added HMP.

The incubated sarcoplasmic protein (8 μ g) was applied to a 10% polyacrylamide gel.

ことが考えられる。ヒト赤血球とは高分子量
 のロティナーゼとカルパインを同時に阻害可
 る分子量24万のタンパク質性インヒビターが
 存在すること報告されている[180]。この
 インヒビターはカルパスタチンである可能性
 があるが、別に報告されたヒト赤血球のカル
 パスタチンの分子量は28万[133]とそれとは
 異なっており、これらの異同は明らかにされ
 ていない。もしカルパスタチンであるならば
 筋漿中に当然存在する[131]がカルパスタチ
 ンとない場合には筋漿中に同様なインヒビタ
 ーが存在するかどうかはこれと調べられて
 いない。本研究ではこれ以上追究しなかった
 が、本酵素の内在性インヒビターが筋肉中にも
 存在している可能性が示されたことになり、
 その検索は興味深い課題として残された。

以上のように本酵素はSDS存在下では筋原線
 維タンパク質を分解するが、SDS非存在下では
 分解しないことが明らかにされた。生体内に
 おいてはATPがSDSと同様に構造変化を引

起こして本酵素を活性化させると想定されている。ATPが食肉熱成中にはほとんど存在しないこと、また、それに代る活性化物質が食肉中に見い出されていない現状では、本酵素がタンパク質分解作用を通して熱成中のテクスチャー変動に寄与する可能性は小さいと判断される。しかし、筋原線維のMy-ATPase活性の変化に対しては、本結果のみでは寄与しないとは言いきれない。これについては次節において調べることにする。

他方、SDSによる活性化と同様のことが生体内においてATPあるいはその他の因子で引き起こされるならば、本酵素は効率よく筋肉タンパク質を分解するため、その生分解での役割は大きいと考えられる。筋肉タンパク質の生分解機構の解明にはまだ多くの知見が必要とされている。したがって、ここで得られた結果もそのような知見の一つに加えられることになろう。

2) 筋肉カタフェシンHの精製と性質

カタフェシンHは、カタフェシンB、Lと同じリソゾーム由来のシステインプロテイナーゼである。しかし、それはカタフェシンB、Lとは異なり、エンドペプチダーゼ活性のみならず、アミノペプチダーゼ活性をも有する、アミノエンドペプチダーゼである。筋肉のカタフェシンHは、これまで、螢光抗体法により筋芽細胞中にその存在が示された他、それによると考えられる活性ピークが筋肉カタフェシンBの精製途中にみいって認められている[83]。しかし、精製してその性質を明らかにした例はない。したがって、食肉熟成中のカタフェシンHが、そのアミノペプチダーゼ活性によるアミノ酸遊離を通じて香味向上にどの程度寄与するか、また、そのエンドペプチダーゼ活性による筋肉タンパク質分解を通じてテクスチャー変動にどの程度寄与するかは明らかにされていない。そこで、本項ではまず、筋肉カタフェシンHの精製法を確立し、一般的性質

を明らかにした。さらに、そのアミノペプチダーゼとしての合成基質分解における基質特異性とエンドペプチダーゼとしての筋肉タンパク質分解様式を調べ、食肉熱成中のテクスター変動と香味向上への寄与度を考察した。

1) 精製

Okitani ら [83] は、筋肉カテプシン B の精製過程の P-cellulose カラムクロマトグラフィーにおいて、カテプシン B による BANA 分解活性ピークより低塩濃度で溶出し、BANA 分解活性と Leu-NA 分解活性の両方を有するピークを認め、これをカテプシン H に帰属されると推定した。したがって、本研究では、そのカテプシン B の精製法に準り、この筋肉よりカテプシン H 画分を分離し、さらに純化した。

< 結果と考察 >

家兔背最長筋のひき肉 500g に 2 倍量の 3% NaCl/15mM HCl を加えて 1 分間ホモジナイズし、

これに 1NHCl を加えて pH を 3.7 に合わせた。これを 2 時間攪拌したのち、7000×g で遠心分離して残渣を除き、粗抽出物を得た。この硫酸 25-65% 飽和画分をとり 10mM sodium acetate buffer (pH 5.0) / 0.05M NaCl / 1mM NaN₃ で 2 日間透析した。透析後の画分から不溶物を遠心分離 (9000×g, 20min) により除いて得た酵素溶液 (540mg のタンパク質、34mL) にタンパク質の 10 重量% の blue dextran を加え、かつ TTA を 0.1mM の濃度にするように加えた。これを 10mM sodium acetate buffer (pH 5.0) / 0.05M NaCl / 0.1mM TTA / 1mM NaN₃ で平衡化し、K Sephadex G-75 カラムにかけ同溶液で溶出した。Fig. 16 に示すように、フラクション 40 付近に BANA 分解活性と Leu-NA 分解活性のピークが重なり、認められた。このカテプシン B と H^{pro} が含まれると考えられる画分を集めて次のステップにかけた。このピークより前に溶出した大きな Leu-NA 分解活性のピークは、主に、カテプシン H より分子量が大きいアミノペプチダーゼ C とハイドロラーゼ H によるものと考え

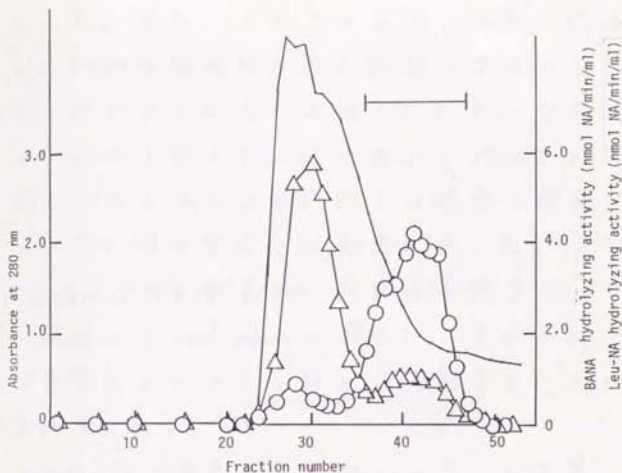


Fig. 16. Sephadex G-75 column chromatography of cathepsin H. The protein solution obtained between 25 and 65% ammonium sulfate saturation (540 mg protein, 34 ml, 54 mg blue dextran and 0.1 mM TTA) was applied to a column (4.0 x 54.4 cm) equilibrated with 10 mM sodium acetate buffer (pH 5.0)/0.05 M NaCl/0.1 mM TTA/1 mM NaN_3 and eluted with the same solution. Fractions of 10 mM were collected. Absorbance at 280 nm, —; BANA hydrolyzing activity, O; Leu-NA hydrolyzing activity, Δ .

えられ、 K_m 、これとほぼ同じ位置に認められた BANA 分解活性の K_m はハイドロージェンにあるものと推定された。なお、このクロマトカラムにおいて添加された TTA は、カタロシン B [83] の場合と同様にカタロシン H の安定化に効果があった。また、blue dextran は分子量 60,000 前後の不純タンパク質と結合して void volume に溶出し、その不純タンパク質をカタロシン H から分離することに効果があった。

Sephadex G-75 溶出画分 (111 mg のタンパク質、152 ml) の、DTT と 3mM に加えたもの、10 mM sodium acetate buffer (pH 5.0) / 0.05M NaCl / 1mM NaN₃ で平衡化した P-cellulose カラムにかいた。同溶液でカラムから非吸着性の不純タンパク質を洗い出したもの、NaCl 濃度 0.05M から 0.55M への傾斜法により酵素を溶出させた (Fig. 17)。Leu-NAl 分解活性 K_m は NaCl 濃度 0.14M 付近に、BANA 分解活性 K_m は 0.14M 付近と 0.23M 付近に、Z-Phe-Arg-MCA 分解活性 K_m は 0.23M

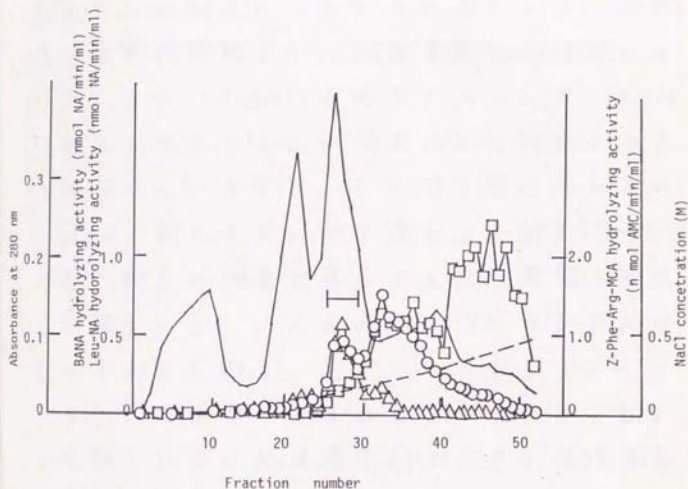


Fig. 17. P-cellulose column chromatography of cathepsin H.

The active fractions (111 mg protein, 157 ml) from the Sephadex G-75 column, indicated by the bar in Fig. 16, were pooled and applied with 3 mM DTT to a column (2 X 14.5 cm) equilibrated with 10 mM sodium acetate buffer (pH 5.0)/0.05M NaCl/1mM NaNO_3 . Elution was carried out with a 0.05-0.55 M NaCl gradient in the same solution. Fractions of 20 ml were collected. Absorbance at 280 nm, —; BANA hydrolyzing activity, \circ ; Leu-NA hydrolyzing activity, Δ ; Z-Phe-Arg-MCA hydrolyzing activity, \square ; NaCl concentration, ---.

付近と0.4M付近に、それぞれ溶出した。各酵素の基質特異性より、NaCl濃度0.14M付近にカタロシンH、0.23M付近にカタロシンB、0.4M付近にカタロシンLが溶出したと判断された。このクロマトグラフィーを行う際に添加されたDTTは、前のステップでTTAにより酵素-S-SO₃⁻の形で酵素のSH基に導入された陰荷電を除去し、酵素のカラムへの吸着を促進するためのものである[83]。このクロマトグラフィーにより、カタロシンHはカタロシンB、Lより分離された。NaCl濃度0.14M付近の活性画分を集めて次のステップにかけた。

P-celluloseカラムクロマトグラフィーで得られた活性画分に、水を加えてNaCl濃度が0.03Mになるように希釈し、さらに、Tris-HCl buffer (pH 7.2)とTTAをそれぞれ10mMと0.1mMになるように加え、酵素がカラムに吸着する条件に調整した。この操作を透析やメンブレンフィルターを用いる方法で行うことも試みたが、いずれの場合も酵素の失活が著しく、そのためこ

こゝは採用しなかつた。このようにして pH と NaCl 濃度を調整した活性画分 (36 mg のタンパク質 550mD) を、10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.2) / 0.03 M NaCl / 0.1 mM TTA / 1 mM NaN₃ と平衡化した DEAE-Sephadex A-5D カラムにかけた。同溶液で非吸着性の不純タンパク質を洗い出したのち、NaCl 濃度 0.03 M (pH 7.2) から 0.3 M (pH 6.0) への傾斜法で酵素を溶出させた。Fig. 18 に示すように、NaCl 濃度 0.17 M 付近に BANA, Leu-NA 両分解活性ピークが重なり、溶出した。このプロマトグラムでは、分子量約 10,000 と 28,000 の不純タンパク質がカラムに吸着せず、効果的に除かれた。

DEAE-Sephadex A-5D カラムのプロマトグラムで得られた活性画分を透析チューブに入れ、66% sucrose / 10 mM sodium acetate buffer (pH 5.0) / 0.05 M NaCl / 0.1 mM TTA / 1 mM NaN₃ 中に浸し、濃縮した。この濃縮方法では 90% 以上の活性が回収できたが、他のメンブレンフィルターを用いる方法で、小さいサイズのイオン交換カラムに吸

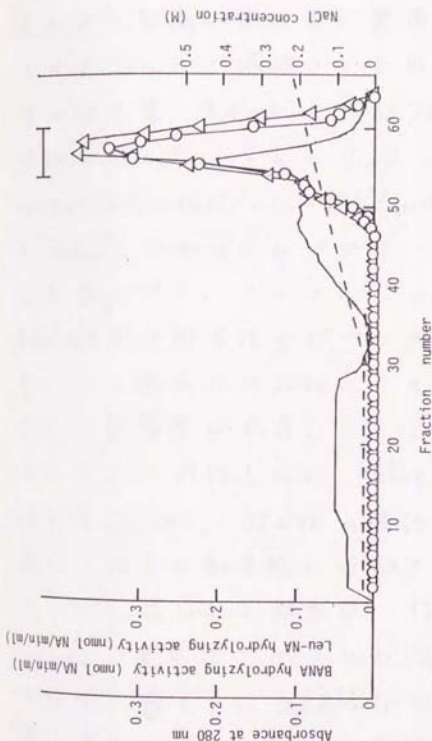


Fig. 18. DEAE-Sephadex A-50 column chromatography of cathepsin H.

The active fractions from the P-cellulose column, indicated by the bar in Fig. 17, were pooled and diluted with Tris-HCl buffer (pH 7.2) and TTA. The enzyme solution (36 mg protein, 550 ml, 10 mM Tris-HCl (pH 7.2), 0.03 M NaCl, 0.1mM TTA) was applied to a column (1.5 X 10.5 cm) equilibrated with 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.2)/0.03M NaCl/0.1mM TTA/1mM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. Elution was carried out with a linear gradient from the above solution to 10 mM sodium acetate buffer (pH6.0) /0.3 M NaCl/0.1 mM TTA/1 mM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. Absorbance at 280 nm, —; BANA hydrolyzing activity, O; Leu-NA hydrolyzing activity, Δ ; NaCl concentration, ---.

着させ、これから一挙に溶出する濃縮方法では、
 そのような高い回収率が実現できなかった。
 このようにして濃縮された酵素溶液 (6.4mgの
 タンパク質, 9.0ml) に 25.7mg の blue dextran を
 添加したのを、それを 10 mM sodium acetate buffer
 (pH 5.0) / 0.05 M NaCl / 0.1 mM TTA / 1 mM NaN₃ で平衡化し
 た Sephadex G-100 カラムにかけ、同溶液で溶出した
 (Fig. 19)。フラクション 33 付近に BANA、
 Leu-NA 両分解活性のピークが重なり、て出現し
 た。この画分には 280nm での吸収はほとんど
 なく、精製度が上昇したことを示唆した。フ
 ラクション 19 付近には、blue dextran とともに
 分子量 68,000、45,000 の不純タンパク質が溶
 出し、酵素と効果的に分離された。しかし、
 こうして得られた酵素は、TTA の存在下にお
 いても不安定で、0°C で 10 日間貯蔵すると活性
 がほぼ半減した。Sephadex G-100 カラムにかけた
 前の酵素ではこのような不安定さは見られな
 かったことから、このクロマトグラフィーで
 除去された分子量 68,000 と 45,000 のタンパク質が

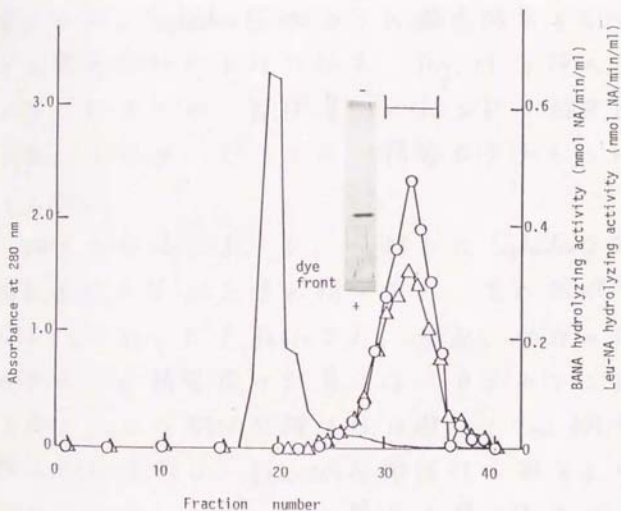


Fig. 19. Sephadex G-100 column chromatography of cathepsin H.

The active fractions from the DEAE-Sephadex A-50 column, indicated by the bar in Fig. 18, were collected into a visking tube and concentrated by immersing in 10 mM sodium acetate buffer (pH 5.0)/0.05 M NaCl/66% sucrose/0.1 mM TTA/1 mM NaN_3 . The concentrated solution (6.4 mg protein, 9.0 ml) was applied with 25.7 mg blue dextran to a column (2.0 X 81.2 cm) equilibrated with 10 mM sodium acetate buffer (pH 5.0)/0.05 M NaCl/0.1 mM TTA/1 mM NaN_3 and then eluted with the same solution. Fractions of 5 ml were collected.

Absorbance at 280 nm, — ; BANA hydrolyzing activity, O ;

Leu-NA hydrolyzing activity, Δ .

Inset: SDS-polyacrylamide gel electrophoretic pattern of the purified cathepsin H.

本酵素を安定化させる役目を持, といったと推察された。Sephadex G-100 カラム 溶出酵素を SDS-ゲル電気泳動にかけた結果、Fig. 19 の挿入図に示したように、ほぼ単一のバンドが観察された。したがって、これを精製カタロシンHとした。

以上の方法によ, 2, 本酵素は Sephadex G-25 溶出画分より 18.7 倍に精製され、その回収率は 11.5% であ, た (Table 7)。なお、活性の回収率および精製度の計算では、カタロシンBも有している BANA 分解活性は避けて Leu-NA 分解活性を採用し、Leu-NA 分解活性と有する中性アミノペプチダーゼの算入を避けるために、Sephadex G-25 溶出画分を基準にした。

このようにして得られた精製カタロシンHを以下に示す各種の性質の調査に供した。

ii) 一般的性質

< 結果 >

Table 7. Purification of cathepsin H.

Step	Total volume (ml)	Total protein (mg)	Total activity (nmol NA/min)	Yield of activity (%)	Specific activity (nmol NA/min/mg)	Purity (-fold)
Muscle	500 ^a					
Crude extract	1000					
(NH ₄) ₂ SO ₄ 25-65%	33.2	426				
Sephadex G-75	110	133	63.3	100	0.47	1
P-cellulose	75	39.1	29.4	46.4	0.75	1.6
DEAE-Sephadex A-50	72.2	6.42	17.7	28.0	2.76	5.9
Sephadex G-100	30	0.83	7.3	11.5	8.80	18.7

^a : grams

a. 分子量

Fig. 20 に示したように、本酵素の分子量は Sephadex G-100 カラムを用いたゲル濾過法により 28,000、SDS-ゲル電気泳動法により 30,000 であると推定され、両結果より本酵素は単一のポリペプチドより成ると結論され、

b. 至適 pH

本酵素の至適 pH は、Fig. 21 に示すように、BANA 分解活性については pH 6.6、Leu-NA 分解活性については pH 7.0 である。

c. pH 安定性

基質非存在下で、本酵素を 3.0-8.0 の間の各種 pH の 37°C で 30 時間放置した後、残存する活性を測定した。Fig. 22 に示すように、BANA、Leu-NA 両分解活性のいずれも pH 4.0-5.0 で安定である。

d. 熱安定性

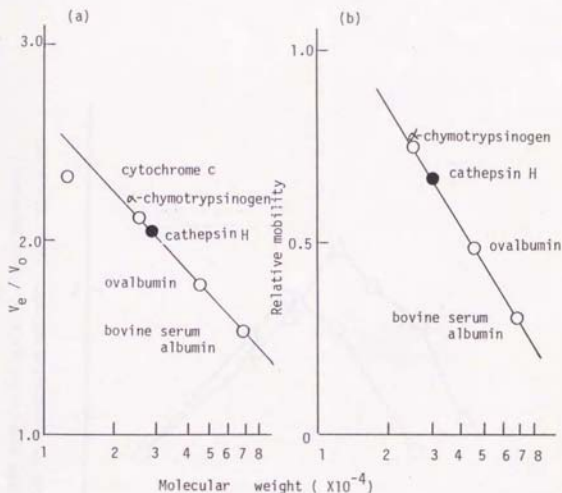


Fig. 20. Determination of the molecular weight of cathepsin H by gel filtration (a) and SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (b). The protein standards used were bovine serum albumin ($M_r=68,000$), ovalbumin ($M_r=45,000$), α -chymotrypsinogen ($M_r=25,000$) and cytochrome c ($M_r=12,500$).

(a) The purified enzyme and protein standards were applied to a Sephadex G-100 column (2.0 X 81.2) and eluted with 10 mM sodium acetate buffer (pH 5.0)/0.05 M NaCl/0.1 mM TTA/1mM NaN_3 .

(b) The purified enzyme and protein standards were applied to a 10% polyacrylamide gel.

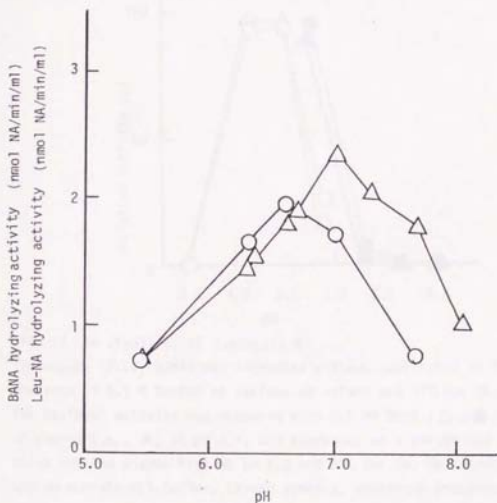


Fig. 21. Effect of pH on the activities of cathepsin H towards BANA and Leu-NA.

The enzyme ($0.7 \mu\text{g/ml}$) was incubated with 0.5 mM BANA (\circ) or Leu-NA (Δ) in 50 mM potassium phosphate buffer of various pH values. Other conditions are described under "Materials and Methods".

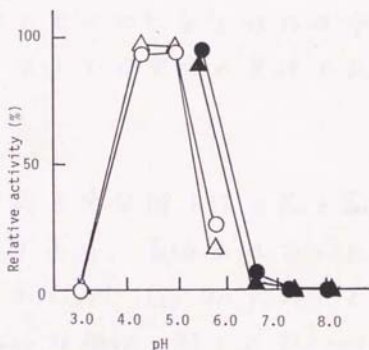


Fig. 22. pH stability of cathepsin H.

The enzyme ($2.24 \mu\text{g/ml}$) was incubated without substrates in the presence of 0.1 M buffer at various pH values and 37°C for 3h.

The residual activity was measured with 0.5 mM BANA (\circ , \bullet) or Leu-NA (Δ , \blacktriangle) at pH 6.7, and expressed as a percentage of the value for the enzyme kept at pH 5.0 and 0°C for 3h. Open symbols, sodium acetate-HCl buffer; closed symbols, potassium phosphate buffer.

基質非存在下、本酵素を pH 5.0 で 0-70°C の各種温度に 10 分間放置した後、残存する活性を測定した。Fig. 23 に示すように、BANA、Leu-NA の分解活性はともに 50°C までほぼ安定であり、60°C、60°C 以上では完全に失活した。

e. K_m と V_{max}

本酵素の合成基質分解活性の K_m と V_{max} は Lineweaver-Burk plot により求め、Table 8 に示した。 K_m は BANA に対して 0.367 mM 、Leu-NA に対して 0.203 mM であり、 V_{max} は BANA に対して $942 \text{ nmol NA/min/mg}$ 、Leu-NA に対して $675 \text{ nmol NA/min/mg}$ であり、 K_i 。

f. 各種薬剤の影響

各種薬剤の本酵素活性に対する影響を調べた結果を Table 9 に示した。本酵素が BANA、Leu-NA の分解活性はいずれもモノヨード酢酸、ロイペプチン、アンチパインに、かなりの程度阻害された。また TLCK および TPCK に、ともに両活性はかなりの程度阻害されたが、BANA 分解

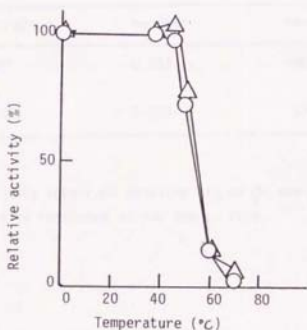


Fig. 23. Heat stability of cathepsin H.

The enzyme ($1.1 \mu\text{g/ml}$) in 4 mM sodium acetate buffer (pH 5.0)/ 0.02 M NaCl/ 0.04 mM TTA was stood at various temperatures for 10 min. The residual activity was measured with 0.5 mM BANA (○) or Leu-NA (Δ) at pH 6.2, and expressed as a percentage of the original activity. Other conditions are described under "Materials and Methods".

Table 8. K_m and V_{max} values of cathepsin H.

The enzyme (0.7 $\mu\text{g/ml}$) was assayed with various amounts of BANA or Leu-NA in 50 mM potassium phosphate buffer (pH 6.2). Other conditions are described under "Materials and Methods".

substrate	K_m (mM)	V_{max} (nmol NA/min/mg)
BANA*	0.367	942
Leu-NA	0.203	675

* As this substrate contains Arg of D_2 - and L_2 - forms, the value is corrected as for the L_2 - form.

Table 9. Effect of various compounds on the activities of cathepsin H.

The enzyme (0.7 μ g/ml) was assayed with 0.5 mM BANA or Leu-NA in the presence of various compounds at pH 6.2. Other conditions are described under " Materials and Methods ".

Compounds (final conc.)	Relative activity (%) towards	
	BANA	Leu-NA
None	100	100
Monoiodoacetic acid (1 mM)	0.8	0
Leupeptin (0.1 mM)	4.8	22.4
Antipain (0.1 mM)	1.3	2.4
Pepstatin (0.1 mM)	105	87.3
Bestatin (0.1 mM)	99.2	99.8
Puromycin (0.1 mM)	79.7	92.2
PMSF (1 mM)	83.6	84.9
TLCK (0.1 mM)	13.1	46.6
TPCK (0.1 mM)	44.0	66.8
Trypsin inhibitor (0.25 mg/ml)	87.8	102

活性の方 p^H Leu-NA 分解活性より阻害される程度は下まが、 K_m 。しかし、ペプスタチン、ピロロマイシン、PMSF、大豆トリプシンインヒビターは両活性をほとんど阻害しなかった。

〈考察〉

カタロシン H の分子量はラット肝臓 [14]、ヒト肝臓 [17] で 28,000、ウサギ肺 [12b] で 26,000-27,000 と報告されており、本研究で得られたウサギ骨格筋のカタロシン H の分子量 (28,000-30,000) はこれらと同程度であつた。しかし、同じ筋肉のアミノエンドペプタダーゼであるハイドロラーゼ H の分子量 340,000 [108] とは明らかに異なつてゐる。

本酵素の至適 pH は BAWA. Leu-NA のいずれの分解活性についてもハイドロラーゼ H のそれ (pH 7.5-8.0) [108] よりも低かつた。これは、本酵素が生体内において酸性環境にあるリソソームに局在するのに対し、ハイドロラーゼ H p^H 中性環境にある細胞質に局在するという

両者の置かれる状況に適、といると考えられる。

本酵素の BANA と Leu-NA に対する分解活性の至適 pH に於けるのは、基質結合部位または、触媒部位がそれぞれの基質に対して最適の構造をとる pH が異、といることを示すのであろう。このようなエンドペプチダーゼ活性とアミノペプチダーゼ活性の至適 pH のずれは、ラット皮膚 [125]、ウサギ肺 [126] のカテプシン H でも報告されている。

本酵素の pH 安定性と熱安定性は筋肉カテプシン B [83] のそれ (37℃ 23 時間放置したとき pH 4.5-5.5 と安定。pH 6.2 で 10 分間加熱したとき 40℃ まで安定。) と同程度であり、た。

本酵素の K_m とウサギ肺 [126] の酵素と比較すると、BANA に対する K_m はウサギ肺のそれ (1.2 mM) より小さく、Leu-NA に対する K_m はウサギ肺のそれ (0.06 mM) より大きい。このような相違は本酵素の組織特異性に起因するものと推察される。

本酵素はモノヨード酢酸で阻害されること
 からシステインプロテイナーゼであると推定
 される。ロイペロチンにも、この阻害される
 が、その阻害の程度はカテフシンB [83] 以
 下であるとやや小さい。0.1mMのロイペロチンに
 よりカテフシンB (BANAで測定) は100% 阻害
 されるのに対し、本酵素はBANAでの測定で約
 95%、Leu-NAでの測定で約80% 阻害されるに
 過ぎず、低くである。このようなロイペロチ
 ンによる阻害されることは、ウサギ肺 [126]
]、ラット肝臓 [124]、ヒト肝臓 [127] のカ
 テフシンH のみならず、ウサギ骨格筋のハイ
 ドロラーゼH [108] についても報告されてお
 り、アミノエンドペプチダーゼに共通なもの
 かもしれない。また、本酵素のアミノペプチ
 ダーゼ活性は、アミノペプチダーゼBやロイ
 シンアミノペプチダーゼの阻害剤であるバス
 タチンやアミノペプチダーゼC の阻害剤であ
 るピューロマイシンで阻害されるが、た。こ
 れも他の組織のカテフシンH [124, 127] やハ

イドロウーゼH [108] と共通の性質をあり、アミノエンドペプチダーゼのアミノペプチダーゼ活性を表現する部位の構造が上述のアミノペプチダーゼ類のものとは異なることを示している。したがって、今後カタマシンH とイドロウーゼH の活性部位の一次構造を明らかにし、他のアミノペプチダーゼ類のそれと比較することは、アミノペプチダーゼの活性表現機構を解明する上でも興味ある課題であらう。

iii) 各種アミノ酸ナフチルアミドおよび筋肉タンパク質への作用

< 結果と考察 >

a. 各種アミノ酸ナフチルアミドへの作用

本酵素のアミノペプチダーゼとしての基質特異性を明らかにするために各種アミノ酸ナフチルアミドに作用させたその分解程度を調べた。その結果、Table 10 に示すように、分解

Table 10. Hydrolysis of various amino acid-2-naphthylamides by cathepsin H.

The enzyme(0.7 $\mu\text{g/ml}$) was assayed with 0.5 mM amino acid-2-naphthylamide in 50 mM potassium phosphate buffer(pH 6.2) containing 3 mM DTT and 0.4 mM EDTA. The rate of hydrolysis of L-Leu-2-naphthylamide was arbitrarily taken to be 100.

Substrate	Rate of hydrolysis (relative)
2-naphthylamide of	
L-Arg	163
L-Lys	151
L-Met	141
L-Ala	125
L-Ser	108
L-Leu	100
L-Val	42
L-Glu	26
L-Pro	9
L-Gly	1

の程度は $\text{Arg-} > \text{Lys-} > \text{Met-} > \text{Ala-} > \text{Ser-} > \text{Leu-} > \text{Val-} > \text{Glu-} > \text{Pro-} > \text{Gly-}$ ナフチルアミドの順である。K。

これをラット肝臓[124]のカテアシンHと比較してみると、Arg-、Met-ナフチルアミドを分解しやすい、Glu-ナフチルアミドを分解しにくいという全体の傾向は似かよっている。しかし、本酵素は、Lys-ナフチルアミドの分解活性が比較的高いという点がラット肝臓のカテアシンHと異なり、この相違は種あるいは組織の特異性を反映しているであろう。

他方、筋肉の主要なアミノペプチダーゼであるアミノペプチダーゼC[167]、H[7]およびハイドロウーゼH[110]と比較すると、Arg-、Lys-ナフチルアミドの分解活性がLeu-ナフチルアミド分解活性より高い点はアミノペプチダーゼCと似ている。また、Leu-ナフチルアミド分解活性を基準にした相対的Glu-ナフチルアミド分解活性は、アミノペプチダーゼCより大きく、アミノペプチダーゼHとハイドロウーゼHより小さいが、K。

この様な相違はあるものの、本結果から判断して本酵素もアミノペプチダーゼC、HおよびハイドロラーゼHと同様にオリゴペプチドに対して比較的広い基質特異性を有することと予想される。この広い基質特異性と活性の至適pHが中程度にあることから、カタロシンHも食肉熟成中のペプチドリシスに寄与する酵素の一つであると推察される。しかし、精製過程の Sephadex G-75 によるクロマトグラフィー (Fig. 16) で測定された Leu-NA 分解活性量が肉中の各酵素の活性の量比を反映しているとは仮定した場合、カタロシンHの活性量はアミノペプチダーゼCとHの活性の合計量の1/2以下と算定される。したがって、合成基質分解活性で推定する限り、カタロシンHの食肉熟成中のペプチドリシスに対する寄与度はアミノペプチダーゼC、HおよびハイドロラーゼHより相対的に小さいと考えられる。しかし、合成基質活性がアミノペプチダーゼCより小さいアミノペプチダーゼHが、筋肉

タンパク質とカテプシン類やカルパインと分解して得られ、 α -ペプチド混合物に対して、 α -ミロチンダーゼCより高い活性を示すという例もあり[1]、カテプシンHも天然基質に対しては高い活性を示す可能性が有る。しかし、 α -カテプシンHの食肉熟成中のペプチドリシスに対する寄与度は、その天然基質に対する作用を調べることから結論されるべきであらう。

6. 筋肉タンパク質への作用

本酵素の筋肉タンパク質分解様式と知られるために、37℃で20時間、筋原線維タンパク質に作用させたその変化をSDS-ゲル電気泳動で調べた。本実験を行うにあたり、本酵素が筋肉中で均一に分散していると想定したときの濃度をそのBANA分解活性より概算した。筋肉の全BANA分解活性の約50%が本酵素へ、残りがカテプシンBに帰属すると仮定した場合、求めた値は約 $0.7 \text{ nmol NA/min/ml}$ と概算された。

した。そこで、本実験で採用する酵素濃度はこ
 の値に近いものとした。Fig. 24に示したよう
 に、筋原線維タンパク質の分解は低pHほど著
 しく、pH4.0ではアクチン、トロポミオシン、
 トロポニンIのバンドが減少し、それぞれの
 バンドの直下に分解産物と考えられる新バン
 ドが生じた。このpHではミオシン重鎖のバン
 ドも減少したが、pH4.0のコントロール（レー
 ン1）でもpH5.0のコントロール（レーン5）
 に比べるとミオシン重鎖のバンドが減少して
 いることから、ミオシン重鎖はカテプシンH
 により分解されるばかりでなく、一部は酸変
 性により凝集しゲル中に浮動されなくな、
 けものと推察された。他方、食肉熟成時のpHで
 あるpH5.6-5.7ではトロポニンIのみがわずかに
 分解されただけである。本酵素の筋原線
 維タンパク質分解の至適pH、4.0は合成基質分
 解活性の至適pH、6.6-7.0よりも低い値であ
 るが、このようなのはカテプシンLやBにあ
 いても認められている。カテプシンLでは、

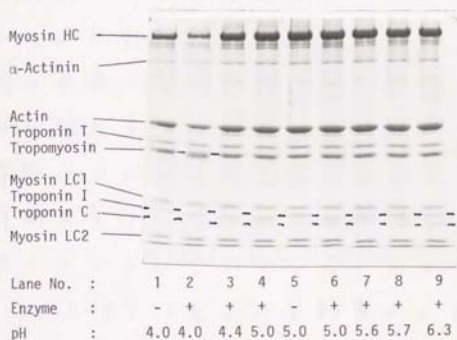


Fig. 24. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of myofibrils treated with cathepsin II at various pH values.

Myofibril (2 mg/ml) was incubated with (+) or (-) cathepsin II (specific activity against BANA, 0.81 nmol NA/min/ml) at 37°C and the pH indicated below each lane for 20 h in 50 mM sodium acetate-HCl buffer (lanes 1-4) or 50 mM Tris-acetate buffer (lanes 5-9), containing 3 mM DTT, 1 mM EDTA, 0.1 mM pepstatin and 1.7 mM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$. The incubated myofibril (11 µg) was applied to a 10% polyacrylamide gel.

筋原線維タンパク質分解の至適 pH は 4.0 [31]
 であるのに対し、合成基質 α -Phe-Arg-MCA 分解の
 至適 pH は 6.2 である (未発表データ)。また、
 カテプシン B [29] では、筋原線維タンパク
 質分解の至適 pH は 5.0 であるのに対し、合成基
 質 BANA 分解の至適 pH は 6.5 である。これらは、
 筋原線維タンパク質の方が低 pH で変性して酵
 素の作用を受けやすくなることの原因であら
 う。カテプシン B [29] や L [31] に比較可
 ると、pH 5.5-5.7 付近での本酵素による筋原線
 維タンパク質の分解度は明らかに小さい。こ
 の pH 域でカテプシン B や L を作用させた場合
 にはミオシン重鎖やアクチンにも変化が認め
 られるからである。したがって、本酵素が筋
 原線維タンパク質に対する分解作用を介して
 の食肉熟成中のテクスチャー変動への寄与度
 は、カテプシン B、L よりも小さいと推定さ
 れる。ただし、筋原線維の Mg-ATPase 活性の変化
 に対する寄与度は本結果からは明らかではな
 い。これについては次節で調べることにする。

3) 筋肉システインプロテイナーゼインヒビター の精製と性質

システインプロテイナーゼインヒビター (CPI) はカルパイン以外のシステインプロテイナーゼ、例えばカタールシン B、H、L などをも阻害するタンパク性インヒビターであり、各組織中に広く存在することが明らかにされている [141]。序論で述べたように、それらの多くは精製され、一次構造解析がなされ、結果、その一群をシスタチンスーパーファミリーと呼び、さらにその中でステフィンファミリー、シスタチンファミリー、キニノーゲンファミリーの3つに分類することが提唱されている [142]。

筋肉の CPI についても、ウット骨格筋 [154] とウサギ骨格筋 [155] でその存在が報告されたが、精製されたのはウシ骨格筋のインヒビター [156] のみで、まだその一次構造がシスタチンのいずれのファミリーに属するかが不明らなままでいる。また、食肉熟成中の

システインプロテイナーゼの作用に対してどのような影響を与えるかは明らかにされていない。特に、このインヒビターが存在する全筋ホモジネート中でカタロシンBが活性を発現している[75]理由については説明されていない。そこで、本項ではウサギ骨格筋よりCPIを精製しその性質を調べた。さらにCPI存在下においてカタロシンBが働き得る理由について考察した。

1) 精製

<結果と考察>

筋肉からのCPIの抽出は、Matsumotoら[155]のウサギ骨格筋での方法に従って行い、家兎背最長筋のひき肉約1kgに3倍量の40mM Tris-HCl buffer (pH 7.2)/4mM NaNO₃を加えてホモジナイズし、そのホモジネートを7000×gで20分間遠心した。得られた上清に最終濃度3%になるようにNaClを加え、さらに1N HClを加え

を pH 3.7 に合わせ、30 分間攪拌した。このとき CPI は沈殿し、上清に残る カリブシン類と効率はよく分離される [155]。生じた沈殿を遠心分離で集め、2 倍量の 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.2) を加えて懸濁し、1 N NaOH で pH を 7.2 に合わせ、このうち 4 時間攪拌した。攪拌後、 $2000 \times g$ で 15 分間遠心して不溶物を除き、粗抽出物を得た。

粗抽出物 550 mL に濃度 55% (v/v) になるように -20°C に冷却してアセトンを加え、生じた沈殿を $2000 \times g$ で 20 分間遠心分離で除いた。得られた上清にさらにアセトンを加えて濃度 77% (v/v) とし、生じた沈殿を遠心分離で集め、少量の 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.2) / 0.1 M NaCl / 1 mM NaN_3 に懸濁したのを、同溶液で 1 日間透析した。このアセトン分画では、アセトン 55-77% 画分が比活性が高いため、これを用いてさらに精製を進めた。

アセトン 55-77% 画分 (57.7 mg のタンパク質) を 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.2) / 0.1 M NaCl / 1 mM

NaN_3 で平衡化して Sephadex G-75 カラム (4 × 75 cm) にかけ、同溶液で溶出した (Fig. 25)。インヒビター活性のピークは2つ認められ、それぞれ溶出位置より先に溶出したものの分子量は約 20,000 - 30,000 に相当し、後に溶出したもののそれは約 10,000 に相当すると推定された。ここで、先に溶出したピークに含まれるインヒビターを CPI-D、後に溶出したピークに含まれるインヒビターを CPI-M とした。CPI-D と M はそれぞれ Matsumoto ら [155] がラザリ骨格筋で報告した分子量 25,000 と 9,500 の CPI に相当すると推定された。Matsumoto ら [155] が報告した分子量 52,000 の CPI および Bige ら [156] がラザリ骨格筋で報告した Sephadex G-75 カラムクロマトグラフ上のボイドボリューム付近に溶出する CPI は本結果では見いだされなかった。これらの CPI はおそらくアセトン分画において除いた 0-55% 画分に含まれている可能性が高いが、それ以上は追究しなかった。

Sephadex G-75 カラムから溶出した CPI-M と

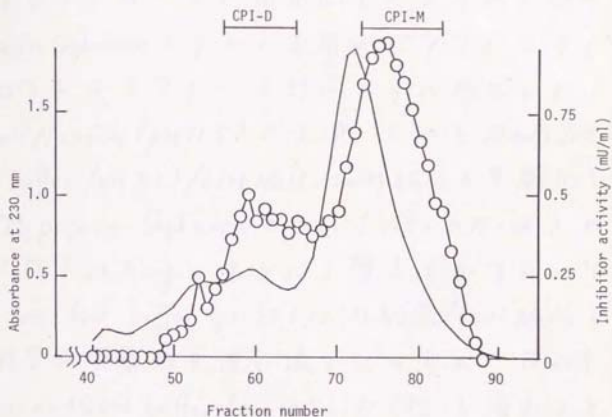


Fig. 25. Sephadex G-75 column chromatography of CPIs.

The inhibitor fraction precipitated between 55 and 77% (v/v) acetone (57.7 mg protein) was applied to a column (4x70 cm) equilibrated with 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.2)/0.1 M NaCl/1 mM NaN_3 , and eluted with the same solution. Fractions of 10 ml were collected.

Absorbance at 230 nm, —; inhibitor activity against cathepsin B (O).

D に対して S-カルボキシステル化したパパイン
 をセファロースに固定化したカラム (CM-
 papain-Sepharose カラム) を用いてアフィニティ
 クロマトグラフィーを行いさらに純化した。
 50mM Na_3PO_4 (pH 11.5) で洗浄したので 10mM Tris-
 HCl buffer (pH 7.2) / 0.1M NaCl / 1mM NaN_3 で平衡化し
 て CM-papain-Sepharose カラム (1.3 x 0.75 cm) に
 CPI-M (22.8 mg のタンパク質) をかけた。10
 mM Tris-HCl buffer (pH 7.2) / 0.5M NaCl / 1mM NaN_3 で
 非特異的吸着物を洗い流したので、10mM
 glycine-NaOH buffer (pH 10.5) で CPI を溶出させ
 た (Fig. 26)。非吸着画分には大きなタンパク
 質のピークが認められ、インヒビター活性
 はほとんど検出されなかった。これに対し、
 溶出画分にはほとんどタンパク質は認められ
 ないが、高いインヒビター活性が検出され、
 精製度が顕著に増加したことが示唆された。
 CPI-D (61 mg のタンパク質) も同様の条件で
 CM-papain-Sepharose にかけることにより精製
 された (Fig. 27)。この CM-papain-Sepharose カラ

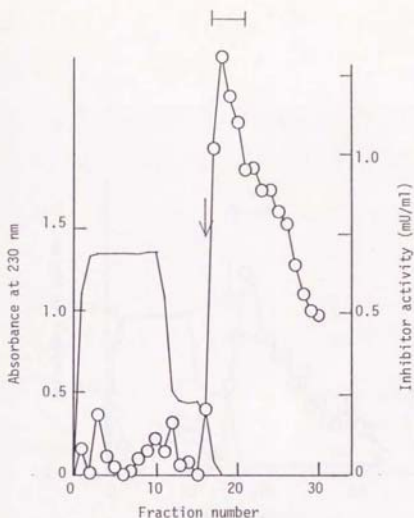


Fig. 26. CM-papain-Sepharose column chromatography of CPI-M.

The active fractions of CPI-M (22.8 mg protein) from the Sephadex G-75 column, indicated by the bar in Fig. 25, were pooled and applied to a column (1.3x0.75 cm) washed with 50 mM Na_3PO_4 (pH 11.5) and then equilibrated with 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.2)/0.1 M NaCl/1 mM NaN_3 . After washing the column with 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.2)/0.5 M NaCl/1 mM NaN_3 , CPI-M was eluted with 10 mM glycine-NaOH buffer (pH 10.5) (indicated by the arrow). Fractions of 10 ml (fraction No. 1-15) or 2 ml (fraction No. 16-30) were collected. Absorbance at 230 nm, —; inhibitor activity against cathepsin B (○).

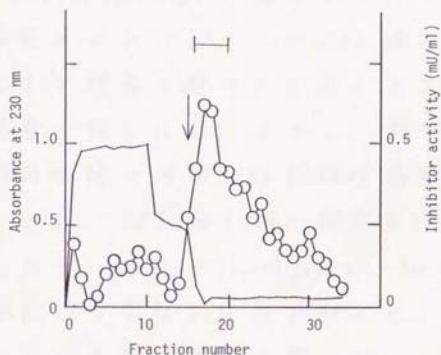


Fig. 27. CM-papain-Sepharose column chromatography of CPI-D.

The active fractions of CPI-D (6.1 mg protein) from the Sephadex G-75 column, indicated by the bar in Fig. 25, were pooled and applied to a column (1.3x0.75 cm) washed with 50 mM Na_3PO_4 (pH 11.5) and then equilibrated with 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.2)/0.1 M NaN_3 . After washing the column with 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.2)/0.5 M NaCl/1 mM NaN_3 , CPI-D was eluted with 10 mM glycine-NaOH buffer (pH 10.5) (indicated by the arrow). Fractions of 10 ml (fraction No. 1-14) or 2 ml (fraction No. 15-30) were collected. Absorbance at 230 nm, —; inhibitor activity against cathepsin B (○).

ムは、調製後 1 回目の使用では、CPI を吸着させる前に溶出 buffer (pH 10.5) より高い pH を有する 50 mM Na_3PO_4 (pH 11.5) で洗浄しておくことにより、固定化したパパイーンが CPI 溶出時と一緒に漏出する現象を避けることができ、良好な精製結果が得られる。しかし、再生処理をした 2 回目以降の使用では同様な前処理を施しておくことも、CPI 溶出時に固定化パパイーンが漏出したり、CPI が 10 mM glycine-NaOH (pH 10.5) では溶出しなくなる現象が起きた。このため、カラムは 1 回の使用に限る。

以上のようにより精製された CPI-M と D はともに後述するよう (Fig. 29) 還元条件下 (2-メルカプトエタノール存在下) の SDS-ゲル電気泳動で単一のバンドを示したため、これらそれぞれを精製 CPI-M と D とした。以上の精製のまとめは Table II に示した。粗抽出物から CPI-M は約 460 倍、CPI-D は約 910 倍に精製され、活性の回収率はそれぞれ 1.1% と 0.15% であり、K。

Table 11. Purification of CPIs

Step	Total volume (ml)	Total protein ^a (mg)	Total activity (mU)	Yield of activity (%)	Specific activity (mU/mg)	Purity (-fold)
Muscle	1105 ^b					
Crude extract	550	2420	2921	100	1.21	1
Acetone-precipitate ^c	28	106	367	12.6	3.45	2.9
Sephadex G-75						
CPI-M	160	101	213	7.3	2.11	1.7
CPI-D	120	13.7	55.7	1.9	4.08	3.4
CM-papain-Sepharose						
CPI-M	14	0.055 ^d	30.7	1.1	558	461
CPI-D	4	0.004 ^d	4.4	0.15	1110	909

a; protein was determined with Coomassie brilliant blue G-250.

b; grams

c; 55-77% acetone

d; the values were estimated from the density of protein bands stained with silver on a 15% polyacrylamide slab gel.

ii) 一般的性質

< 結果 >

a. 分子量

Sephadex G-75 カラム ($2.2 \times 80.3 \text{ cm}$) を用いてゲル濾過法により、非還元条件下では CPI-M と D の分子量はそれぞれ 13,000 と 23,000 と推定された (Fig. 28)。また、CPI-D に 3mM の DTT を添加してタンパク質の SH 基を還元してから同様に分子量を求めた結果、その値は CPI-M と同じ 13,000 と推定された (Fig. 28)。

他方、CPI-M と D を SDS-ゲル電気泳動にかける結果を Fig. 29 に示した。還元条件下 (2-X ルカフトエタロール存在下) では CPI-M と D はともに分子量 13,000 の 1 本のバンドを示した。これに対し非還元条件下 (2-X ルカフトエタロール非存在下) では CPI-M には分子量 15,000 の 1 本のバンドが検出され、CPI-D には分子量 21,000, 20,000, 15,000, 13,000 の 4 本のバンドが検出された。

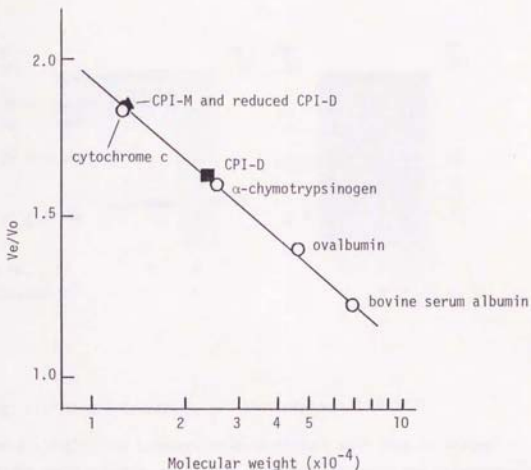


Fig. 28. Determination of the molecular weight of CPIs by gel filtration.

The purified CPIs and protein standards were applied to a Sephadex G-75 column (2.2x80.3 cm) and eluted with 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.2)/0.1 M NaCl/1 mM NaN_3 . The reduced CPI-D had been incubated with 3 mM DTT for 10 min at room temperature before chromatography. The protein standards used were bovine serum albumin ($M_r=68,000$), ovalbumin ($M_r=45,000$), α -chymotrypsinogen ($M_r=25,000$) and cytochrome c ($M_r=12,500$).

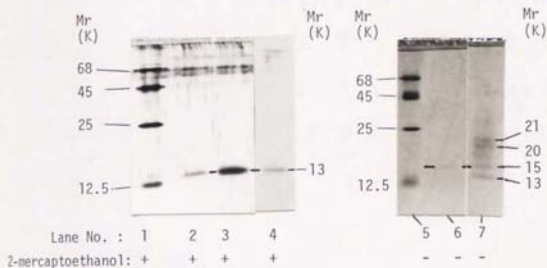


Fig. 29. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of CPIs.

Lanes 1 and 5, the standard protein mixture with (top to bottom) bovine serum albumin, ovalbumin, α -chymotrypsinogen and cytochrome c; lanes 2 and 6, CPI-M(2.8 ng); lanes 3 and 7, CPI-D(11 ng); lane 4, a mixture of CPI-M(3.3 ng) and CPI-D(3.3 ng). Electrophoresis was carried out in the presence(lanes 1-4) or absence(lanes 5-7) of 1% 2-mercaptoethanol on a 15% polyacrylamide gel.

b. pH安定性

酵素非存在下、CPI-MあるいはDをpH 3.0から9.5までの間の各種pHに30℃で1時間放置後、残存しているインヒビター活性をカタフォルシンLを用いて測定した。その結果、Fig. 30に示すようにCPI-DとMはともにpH 3.0-9.5でほぼ安定であり、K。

c. 熱安定性

酵素の非存在下、CPI-MあるいはDをpH 7.2と0-80℃の各種温度に10分間放置した後、残存しているインヒビター活性をカタフォルシンLを用いて測定した。Fig. 31に示すように、CPI-DとMはともに80℃までほぼ安定であり、K。

d. 各種酵素に対する作用

各種濃度のCPI-MあるいはDの存在下でカタフォルシンH、カタフォルシンB、カタフォルシンL、パペインの合成基質分解速度を測定し、結果をLineweaver-Burk plotで表した。なお、合

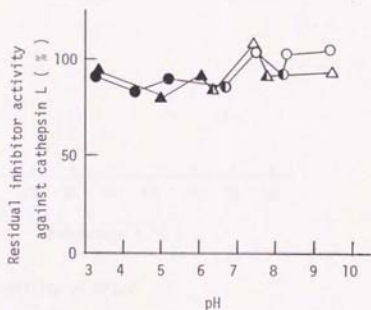


Fig. 30. pH stability of CPIs.

CPI-M(3.56 $\mu\text{g/ml}$; symbol, circle) or CPI-D(0.61 $\mu\text{g/ml}$; symbol, triangle) was incubated in the presence of 0.1 M buffer at various pH values and 30°C for 1 h. The residual inhibitor activities against cathepsin L(Z-Phe-Arg-MCA hydrolyzing activity) were measured at pH 6.2 as described under "Materials and Methods", and expressed as a percentage of the values for the inhibitors kept at pH 7.2 and 0°C for 1 h. ● and ▲, sodium acetate-HCl buffer; ◐ and ▴, sodium phosphate buffer; ○ and △, glycine-NaOH buffer.

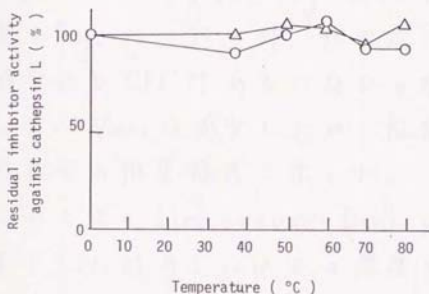


Fig. 31. Heat stability of CPIs.

CPI-M(0.99 $\mu\text{g/ml}$; symbol, circle) or CPI-D(0.16 $\mu\text{g/ml}$; symbol, triangle) in 7.5 mM Tris-HCl buffer(pH 7.2)/0.075 M NaCl was stood at various temperatures for 10 min. The residual inhibitor activities against cathepsin L (Z-Phe-Arg-MCA hydrolyzing activity) were measured as described under " Materials and Methods ", and expressed as a percentage of the original activity.

成基質は、カテプシン H には Arg-MCA, カテプシン B には γ -Arg-Arg-MCA, カテプシン L とパパイーンには γ -Phe-Arg-MCA を用いた。その結果を Fig. 32, 33, 34, 35 に示した。いずれの場合にも CPI-M あるいは D の濃度の上昇に伴い、 V_{max} は減少した¹⁾、 K_m 値は変化せず、非拮抗型の阻害様式を示した。

このときの Lineweaver-Burk plot の直線の傾きを CPI-M あるいは D の濃度に対してプロットすることにより K_i を求めた。その結果を Table 12 に示した。カテプシン B, H, L それぞれに対して、CPI-M の K_i は 110, 0.42, 0.30 mM、CPI-D の K_i は 71, 0.07, 0.17 mM であり、 K_i 。パパイーンに対しては CPI-M の K_i は 150 mM であり、 K_i ¹⁾、CPI-D の K_i は求めない¹⁾、 K_i 。

CPI-M に対するのはトリプシン (基質は BANA)、カルパイン (基質はカペイン)、カテプシン D (基質は尿素変性ヘモグロビン) のそれぞれの活性に対する影響も調べた¹⁾、いずれの酵素も阻害しなかった。

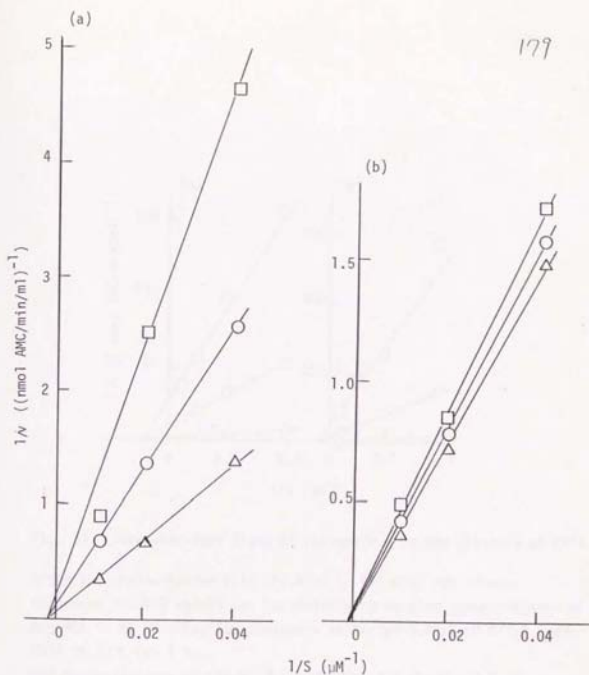


Fig. 32. Lineweaver-Burk plots of cathepsin B in the presence of CPIs.

After the preincubation with CPI-M(a) or CPI-D(b) for 10 min, cathepsin B (0.046 $\mu\text{g/ml}$) was incubated with varying concentrations of Z-Arg-Arg-MCA in 50 mM potassium phosphate buffer(pH 6.2)/3 mM DTT/1.2 mM EDTA at 30°C for 20 min.

(a) Concentrations of CPI-M: Δ , 0 nM; \circ , 95 nM; \square , 190 nM.

(b) Concentrations of CPI-D: Δ , 0 nM; \circ , 5.3 nM; \square , 10.7 nM

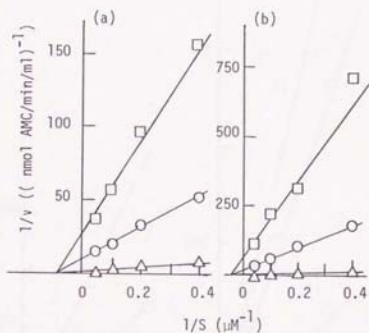


Fig. 33. Lineweaver-Burk plots of cathepsin H in the presence of CPIs.

After the preincubation with CPI-M(a) or CPI-D(b) for 10 min, cathepsin H(0.012 $\mu\text{g/ml}$) was incubated with varying concentrations of Arg-MCA in 50 mM potassium phosphate buffer(pH 6.2)/3 mM DTT/1.2 mM EDTA at 30°C for 1 h.

(a) Concentrations of CPI-M: Δ , 0 nM; \circ , 3.8 nM; \square , 7.6 nM.

(b) Concentrations of CPI-D: Δ , 0 nM; \circ , 2.6 nM; \square , 4.3 nM.

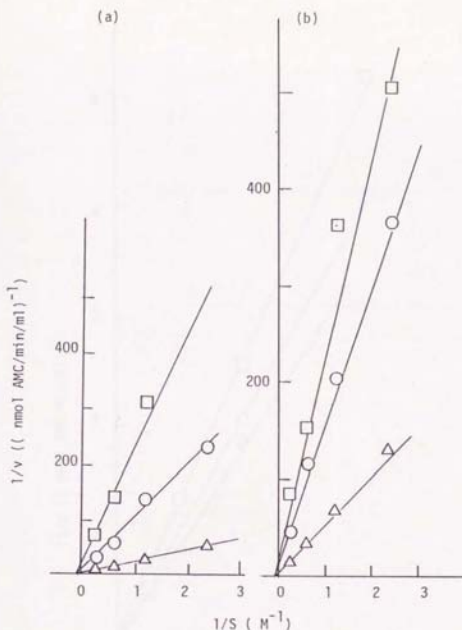


Fig. 34. Lineweaver-Burk plots of Cathepsin L in the presence of CPIs.

After the preincubation with CPI-M(a) or CPI-D(b) for 10 min, Cathepsin L (0.006 $\mu\text{g/ml}$) was incubated with varying concentrations of Z-Phe-Arg-MCA in 50 mM potassium phosphate buffer(pH 6.2)/ 3 mM DTT / 1mM EDTA at 30°C for 20 min(a) or 1h(b).

(a) Concentrations of CPI-M : Δ , 0 nM ; \circ , 4.7 nM ; \square , 19 nM.

(b) Concentrations of CPI-D : Δ , 0 nM ; \circ , 0.3 nM ; \square , 0.6 mM.

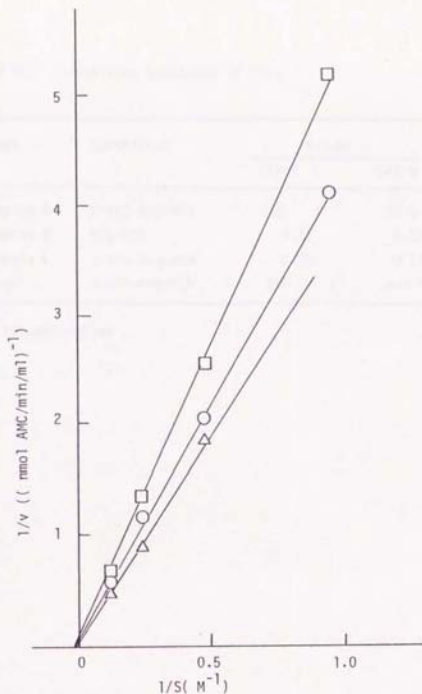


Fig. 35. Lineweaver-Burk plots of papain in the presence of CPI-M.

After the preincubation with CPI-M for 10min, papain ($1.25 \mu\text{g/ml}$) was incubated with varying concentrations of Z-Phe-Arg-MCA in 50 mM potassium phosphate buffer (pH 6.2)/ 3 mM DTT/ 1 mM EDTA at 30°C for 20 min.

Concentrations of CPI-M : Δ , 0 nM ; \circ , 33 nM ; \square , 98 nM.

Table 12. Inhibition constants of CPIs

Enzymes	Substrates	K _i (nM)	
		CPI-M	CPI-D
Cathepsin B	Z-Arg-Arg-MCA	110	70.5
Cathepsin H	Arg-MCA	0.42	0.27
Cathepsin L	Z-Phe-Arg-MCA	0.30	0.17
Papain	Z-Phe-Arg-MCA	150	n.d.*

* not determined

e. CPI-M のカタロシン L 阻害活性に対する
カタロシン H 共存の影響

複数種の酵素が共存した系での CPI 阻害活性の発現状況を知らねば、カタロシン H の存在下と非存在下において CPI-M のカタロシン L 活性阻害率を測定した (Table 13)。その結果、 $0.012 \mu\text{g/ml}$ CPI-M の $0.013 \mu\text{g/ml}$ カタロシン L 活性阻害率は 65% とあり、これに $0.012 \mu\text{g/ml}$ カタロシン H が共存するとカタロシン L 活性阻害率は 40% に減少した。これは CPI-M のカタロシン L に対する阻害がカタロシン H の共存により抑制されることを示している。

〈考察〉

ゲル濾過法で求めた CPI-D の分子量 (23,000) は、CPI-M (13,000) のほぼ 2 倍であり、SH 還元剤処理によりその分子量がほぼ半減して CPI-M と同じになることから、CPI-D は CPI-S が S-S 結合で形成した二量体であると考えられ

Table 13. Effect of cathepsin H on the inhibition of cathepsin L by CPI-M.

After the preincubation with CPI-M (0.012 $\mu\text{g/ml}$) in the presence or absence of cathepsin H (0.012 $\mu\text{g/ml}$), cathepsin L (0.012 $\mu\text{g/ml}$) was incubated with 5 μM Z-Phe-Arg-MCA in the presence of 50 mM potassium phosphate buffer (pH 6.2)/3 mM DTT/1 mM EDTA at 30°C for 1h.

Concentration of the cathepsin H. ($\mu\text{g/ml}$)	Inhibition rate against cathepsin L. (%)
0	65
0.012	40

る。CPI-MとDの還元条件下と非還元条件下でのSDS-ゲル電気泳動像およびCPI-MとDの各種性質（pH安定性、熱安定性、各種酵素に対する K_i ）における高い類似性もこの推定を支持している。

CPI-MとDは還元条件下のSDS-ゲル電気泳動ではともに分子量13,000のバンドを示した。これは、CPI-Dを形成している単量体間のS-S結合が還元条件下で切れたため、元々、単量体であるCPI-Mと同じ位置に泳動されたと理解される。他方、非還元条件下でのSDS-ゲル電気泳動では、CPI-Mで分子量15,000の1本のバンドが、CPI-Dで分子量21,000, 20,000, 15,000, 13,000の4本のバンドが観察された。この結果を、ラット肝臓のCPIが分子量内にSH基を2つ有し、そのうちの1つにより、2CPI同志で二量体を形成したり、グルタチオンと混合ジスルフィド結合を形成しているというWakamatsuら[183]が報告した知見ともとに考察するならば、次のように説明できるであろう。

すなわち、ウサギ骨格筋のCPIの単量体がラット肝臓のCPIと同様に分子内に2個のSH基を持つと仮定すると、非還元条件下のCPI-Dに観察される分子量21,000と20,000のバンドは単量体がS-S結合で形成した二量体と考えられる。21,000と20,000の分子量の差は、二量体形成に関与したSH基とは異なるもう1つのSH基にカルグチオンが結合しているかいないかによる差と考えられよう。なお、この2つの成分は分子量が近接しているために非還元条件下のゲル濾過では後列できはか、区別とされる。

他方、非還元条件下のCPI-MとDに共通に観察される分子量15,000のバンドと非還元条件下のCPI-Dのみに観察される分子量13,000のバンドはいずれも単量体であると考えられる。15,000と13,000の分子量の差は単量体のSH基の1つないしは2つにカルグチオンが結合しているかいないかによる差と考えられよう。CPI-DにおいてCPI-Mに相当する分子量15,000の単量体

が観察されたのは、ゲル濾過の段階 (Fig. 25) での分離不完全により、CPI-D と 12 分取した画分に CPI-M が混入したためと考えられる。一方、CPI-D における分子量 15,000 の単量体が観察された理由としては、Wakamatsu ら [183] が報告したように、二量体が SDS 存在下で変性したとみて、その一部の単量体間や S-S 結合と単量体内の SH 基の間で S-S, SH 変換反応が起これ、独立した単量体に変化して泳動されたことが考えられる。なお、ここで測定された CPI-M の分子量の値 15,000 が非還元条件下のゲル濾過で測定された値 12,000 と異なるのは、おそらく SDS 存在下と非存在下での分子の形の違いに起因するのであろう。

以上の推定は、CPI の単量体 (すなわち、CPI-M) が分子内に SH 基を 2 つ持つと仮定した場合に成り立つものであり、その実証は一次構造の解析を待たねばならない。しかし、S-S 結合によると考えられる二量体の存在は本研究で得られた CPI がラット肝臓のシスタチン

ρ [145]、ヒト肝臓のシスタチン ρ [146] と類似した構造を持ち、シスタチンスーパーファミリーのうちステフィンファミリーに属することと強く示唆している。

CPI-M と D_{M1} とともに広い範囲の同じ pH 域で安定であることは、 D_{M1} の二量体であることの推定を支持するものである。また、このような高い安定性はヒト多形核顆粒球のステフィン [143]、ラット肝臓のシスタチン [145] などにも認められている。しかし、ウシ骨格筋の CPI [156] は酸性 pH (pH 5-6) で不安定であると報告されており、ウサギ骨格筋から得られた本研究の CPI と性質を異にしている。このような差異は骨格筋 CPI の種特異性を示すものかもしれない。

CPI-M と D_{M1} とともに高温の同一温度域で安定であることは、 D_{M1} の二量体であることの推定を支持するものである。このような高い安定性はウシ骨格筋の CPI [156] とはいえ各種組織の CPI に広く認められた性質である。

CPI-M と D の カテアシン B、H、L に対す
る阻害様式はいずれも非拮抗阻害であつたが、
Bige ら [156] はラット骨格筋の CPI はカテアシン
H に対し拮抗阻害、カテアシン B に対して
非拮抗阻害であると報告している。このよう
な本研究との相違は CPI の種特異性を反映し
ているのかもしれない。しかし、彼らはラッ
ト肝臓から精製したカテアシン B と H を用い
ているため、酵素の種特異性や組織特異性が
反映される可能性も否定できないであらう。

カテアシン B、H、L それぞれに対する K_i
が、CPI-M と D とで大きく違わないのは、D
が M の二量体であることの推定を支持するも
のである。CPI-M のカテアシン B に対する K_i
が他のカテアシンに対する K_i より著しく大き
く、カテアシン B が比較的阻害されにくいと
いう結果は、ラット皮膚のシスタチン A [144]、
ラット肝臓のシスタチン B [145]、ヒト脳脊
髄液のシスタチン C [157] およびラット骨格筋
の CPI [156] でも認められている。しかし、

CPI-M の パパイン に対する K_i 、150mM は他の動物種や組織の CPI の パパイン に対する K_i 、例えはラット皮膚で 0.02mM [144]、ラット肝臓で 0.12mM [145]、ヒト脳脊髄液で 0.005mM [159]、ウシ骨格筋で 0.1mM [156] と報告されている値に比べてかなり大きい。これはウサギ骨格筋 CPI の特殊性を示しているのかもしれない。

CPI がいろいろなカタプシンに対して非拮抗阻害を示すということからカタプシン分子内の CPI 結合部位と基質結合部位が異なり、CPI は遊離のカタプシンに結合するばかりでなく、カタプシと基質との複合体にも結合し、その活性を抑制し得ることを示している。この場合、カタプシンと CPI と基質の混合系では、カタプシンが CPI よりも過剰に存在しない限り基質はカタプシンの作用を受けられないことになる。したがって、CPI 共存下でカタプシン B や L が筋肉タンパク質を分解していると考えられる全筋ホモジネート [75] 中では、カタプシンが CPI よりも過剰に存在している

とが強く推定される。この推定はカタロシンがCPIに對する特異抗体を用いてそれぞれ
 の存在量を測定することによりさらに確かなもの
 になるであらう。このようにカタロシンが
 CPIより過剰に存在する系においてそれぞれの
 カタロシンの働きがそれぞれ推定した場合、
 K_2 が大きいカタロシンBが最も阻害されく
 く筋肉タンパク質に作用し得ると考えられ
 る。また、 K_2 の小さいカタロシンLも Table 13
 に示したように同程度の大きさの K_2 を有する
 カタロシンHの共存により一部は阻害をまぬ
 がれ、筋肉タンパク質に作用し得ると考えら
 れる。したがって、食肉熟成中においても、
 以上と同様な機序によりインヒビターの阻害
 をまぬがれカタロシンがプロテオリシスに
 参加し、テクスチャーにかかわる筋原線維の
 構造変化やフレーバーにかかわるペプチド生
 産に寄与すると結論される。

3. 筋原線維の Mg -ATPase 活性の変化とむくらす因子の解明

第1節において、牛肉熟成中のテクスチャーの向上がミ線脆弱化はもとより Mg -ATPase 活性の変化に反映される筋原線維構造の変化ともよく対応していることが示された。すなわち、このような筋原線維構造の変化を惹起する因子が牛肉のテクスチャー向上とむくらす因子の一つであることが強く示唆された。

そこで本節では Mg -ATPase 活性の変化を引き起こす因子を解明することを主目的とした。そのための筋肉試料としては、ウシ骨格筋の代りに、前節でも述べたようにプロテイナーゼなどの情報が揃っているウサギ骨格筋を用いた。まず 1) においてミ線脆弱化因子であることが明らかにされている Ca^{2+} とカルパイン、カテプシン B、D、L および第2節で精製された高分子量プロテイナーゼとカテプシン H が筋原線維の Mg -ATPase 活性を変化させるが否かを調査した。すなわち、カルパイン [58, 61, 63]

とカチウム [61, 62] の筋原線維の Mg -ATPase
への作用について調べた結果が報告されてい
るのとこれらとここで得られた結果との比較
考察も行、た。しかし、1) で調べた因子では
熱成中の Mg -ATPase 活性の変化を完全には再現
するには至らなかった、たのと、さらに、2) にあ
いて他の因子を探索した。その結果、1) で明
らかにした因子と2) で明らかにした因子が協
同で作用して筋原線維の Mg -ATPase 活性を変化
させることの推定に至、た。また、あわせてこ
れらの因子による Mg -ATPase 活性の変化の機序
を考察した。

1) Ca^{2+} および各種内在性プロテイン-ゼによる 筋原線維 Mg -ATPase 活性の変化

< 結果と考察 >

筋原線維の Mg -ATPase 活性を変化させる因子
の候補である Ca^{2+} と各種内在性プロテイン-ゼ
とそれぞれ単離した筋原線維に作用させ、 Mg -

ATPase 活性の変化が起きるか否かを調べた。
 各候補を作用させる条件として、温度は 25°C 、
 pH は 5.5 と 7.0-7.2 を用いた。実際の熟成で、用
 いられている $0-4^{\circ}\text{C}$ よりもはるかに高い 25°C
 という温度を採用したのは反応を加速させ、
 短時間で結果を得るためである。 pH 5.5 は正常
 な肉の熟成中の pH であり、しかも、酸性プロ
 ティナーゼが働きやすい pH でもある。 pH 7.0-7.2
 は中性プロティナーゼが働きやすい pH として
 採用した。 Mg-ATPase 活性は、熟成中に顕著に
 増加する $0-0.1\text{M KCl}$ 領域での活性に特に着目し
 た。

1) Ca^{2+} は筋原線維 Mg-ATPase 活性変動を惹起しない
 筋原線維を 1mM Ca^{2+} 存在下と非存在下で 25°C
 において 18 時間インキュベートし、 $0-0.05\text{M KCl}$
 存在下の Mg-ATPase 活性を測定した。その結果、
 Fig. 36 に示すように pH 5.0 と 7.0 のいずれにおいても
 Ca^{2+} は Mg-ATPase 活性を変化させない、
 このような条件で Ca^{2+} は筋原線維のミ線と脆弱

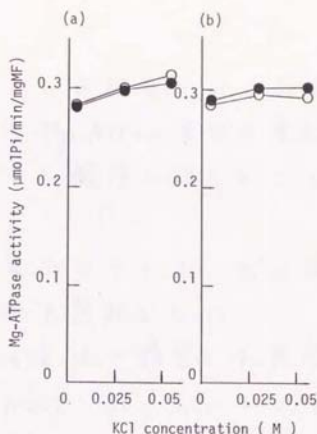


Fig. 36. Effects of Ca^{2+} treatment of myofibrils on their Mg-ATPase activity.

Myofibrils (MF, 5 mg/ml) were incubated with 1 mM CaCl_2 (●) or 1 mM GEDTA (○) in the presence of 50 mM sodium acetate buffer (pH 5.5) (a) or 50 mM Tris-maleate buffer (pH 7.0) (b). 3 mM DTT, 0.08 M KCl and 7.5 mM NaN_3 at 25°C for 18 h. After incubation, the samples were diluted five times, being made to 0.3 mM, 0.2 mM and 20 mM with respect to CaCl_2 , GEDTA and Tris-HCl buffer (pH 8.0), respectively. The obtained solutions were homogenized with an autohomogenizer at 10,000 rpm for 15 s and used for measurements of Mg-ATPase activities. Condition of Mg-ATPase assay: Treated myofibrils (0.25 mg/ml) were incubated with 1 mM ATP in the presence of 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0), 2 mM MgCl_2 and KCl as indicated on the abscissa at 25°C for 5 min. The reaction was stopped by the addition of 4% trichloroacetic acid, and the liberated inorganic phosphate was measured by the modified Allen's method.

化させることが報告されている[37,38]、この結果から Mg-ATPase 活性の変化はミ線網の脆弱化とは異なる機序で起こることが示唆された。

11) 高分子量タンパク質アーゼは筋原線維 Mg-ATPase 活性変動を惹起しない

第2節の方法で精製した高分子量タンパク質アーゼを pH5.5 と 7.0 のいずれにおいても 25°C で 18 時間筋原線維に作用させた。ここで採用した比活性(1 体積当たり)は第2節で述べたように、本酵素が筋肉中で均一に分散したと想定したときの値、 $1.0 \text{ nmol AMC/min/ml}$ の近いものに設定した。作用後、筋原線維の 0.01 MKCl 存在下での Mg-ATPase 活性を測定した。その結果、Fig. 37 に示したように、pH5.5 と 7.0 のいずれにおいても高分子量タンパク質アーゼは Mg-ATPase 活性と変化させなかった。活性化剤である SDS が存在しない条件でしかも、温度が 25°C と低いために、その作用を発現しにくかったであろう。

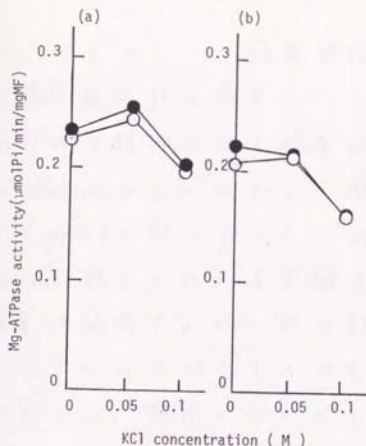


Fig. 37. Effects of HMP treatment of myofibrils on their Mg-ATPase activities.

Myofibrils (MF, 5 mg/ml) were incubated with (●) or without (○) HMP (specific activity against SLLVT-MCA, 0.679 nmol AMC/min/ml) in the presence of 50 mM Tris-acetate buffer (pH 5.5(a) or pH 7.0(b)), 0.08 M KCl and 7.5 mM NaN_3 at 25°C for 18 h. After incubation, the samples were diluted five times, being made to 20 mM with respect to Tris-HCl buffer (pH 8.0). Mg-ATPase activities of the treated myofibrils were measured as in Fig. 36.

カルパインによる筋原線維 Mg -ATPase 活性の
KCl 濃度依存性の増大

筋肉の中性抽出物の硫酸 25-65% 飽和画分を
DEAE-cellulose カラムにかかり分離したカルパイ
ン II を pH 5.5 と 7.2 にあいて、25℃ で 5 時間筋原
線維に作用させた。本実験を行うにあたり、
本酵素が筋肉中に均一に分散していることと想定
したときの比活性とそのカゼイン分解活性より
概算した。筋肉の全カゼイン分解活性の約
50% がカルパイン II に帰属し、そのうちの約
50% が硫酸 25-65% 飽和画分に回収され、さら
に、DEAE-cellulose カラムクロマトグラフィーで
の回収率が約 50% と仮定すると求めた値は約
 $1.6 \Delta OD_{280}/h/ml$ と概算された。本実験で採用し
た比活性はこの値に近いものである。作用後、
筋原線維の 0-0.05M KCl 存在下での Mg -ATPase 活性
を測定した。その結果、Fig. 38 に示したように、
カルパイン II は pH 7.2 にあいては、0.025、0.05M
KCl での活性を低下させることにより 0-0.1M KCl
での Mg -ATPase 活性の KCl 濃度依存性を増大させ

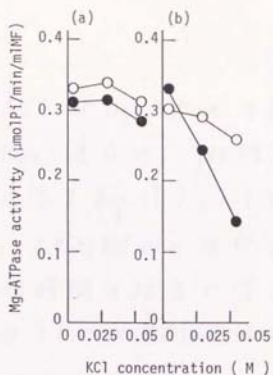


Fig. 38. Effects of calpain treatment of myofibrils on their Mg-ATPase activities.

Myofibrils (MF, 5 mg/ml) were incubated with (●) or without (○) calpain II (specific activity against casein, $0.87 \Delta OD_{280}/h/ml$) in the presence of 50 mM sodium acetate buffer (pH 5.5) (a) or Tris-HCl buffer (pH 7.2) (b), 3 mM DTT, 1mM $CaCl_2$, 0.08 M KCl and 7.5 mM NaN_3 at 25°C for 5 h. After incubation, the samples were diluted five times, being made to 20 mM with respect to Tris-HCl buffer (pH 8.0). Mg-ATPase activities of the treated myofibrils were measured as in Fig. 36.

た¹⁰⁰、 $\text{pH} 5.5$ では Mg-ATPase 活性をあまり変化させない。さらに、 $\text{pH} 7.2$ における変化を経時的に調べた (Fig. 39)。1時間作用させたとき pH は 0 、 0.05M KCl での活性は若干増加したが、その後作用時間の延長に伴い、 0.05 、 0.1M KCl での活性が低下し、 KCl 濃度依存性の増大が顕著であった。

Suzuki と Goll [63] は粗カルパイン (筋肉からの中性抽出物の pH を 4.9 にしたときの沈澱からの $\text{pH} 7.0$ で再抽出し、さらに、硫酸 46% 飽和で沈澱させて得た画分) を $\text{pH} 7.0$ において筋原線維に経時的に作用させた結果、初期には $0-0.065\text{M KCl}$ での Mg-ATPase 活性は 20% 程度増加するが、作用時間の延長に伴い、 0.065M KCl での活性は低下し KCl 濃度依存性は増大することと報告している。また、Ouali ら [58] は精製したカルパイン I を $\text{pH} 7.0$ において筋原線維に作用させた結果、 $0.15-0.17\text{M KCl}$ での Mg-ATPase 活性は若干増加し、 $0.17-0.30\text{M KCl}$ での活性は減少し、 $0.15-0.30\text{M KCl}$ での活性の KCl 濃度依存性は増大することと認めている。本結果は、作用

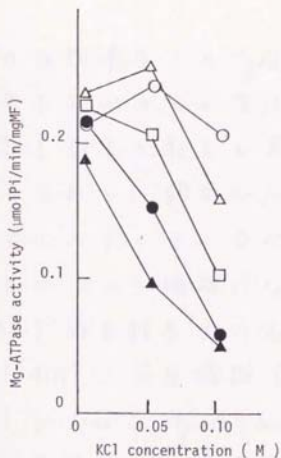


Fig. 39. Mg-ATPase activities of myofibrils treated with calpain at pH 7.2 for varying periods.

Myofibrils (MF, 5 mg/ml) were incubated with calpain I (specific activity against casein, $1.66 \Delta OD_{280}/h/ml$) in the presence of 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.2), 3 mM DTT, 1 mM $CaCl_2$, 0.08 M KCl and 7.5 mM NaN_3 at $25^\circ C$ for 0 (○), 1 (△), 2 (□), 5 (●) and 10 (▲) h. After incubation, the samples were diluted five times, being made to 20 mM with respect to Tris-HCl buffer (pH 8.0).

Mg-ATPase activities of the treated myofibrils were measured as in Fig. 36.

初期の低 KCl 濃度での Mg -ATPase 活性の増加の程度は若干小さいものの変化全体の傾向は、Suzuki と Goll [63] の報告と同じであると考えられる。すなわち、粗カルパインでの加見はまた、カルパインそのものの作用を示していること PM ここで明確になつたことである。Quarles [58] は本結果より高い濃度の ATP ($4mM$)、 $MgCl_2$ ($4mM$)、筋原線維 ($1-2mg/ml$)、 KCl ($0.15-0.35M$) において Mg -ATPase 活性を測定しているため、本結果との直接的な比較はできないが、 KCl 濃度依存性の増大という傾向とは一致している。

IV) カテコシン類による筋原線維 Mg -ATPase 活性の KCl 濃度依存性の増大

筋肉の中性抽出物の pH を 3.7 にしたとまの上清から硫酸 25-65% 飽和画分として得られる粗カテコシン調整物 (カテコシン B、D、H、L などのカテコシン類を含む。カルパインは pH 3.7 にしたとまの沈殿として除かれている。)

pH 5.5 と 7.0 に おい て、25 °C で 18 時間 筋原線維
 に 作用 せ せ け。本 実験 を 行 う に あ た り、粗 カ
 テ ア シ ン 調 製 物 の う ち カ テ ア シ ン B と L を 主
 酵 素 と 仮 定 し、こ れ ら が 筋 肉 中 に 均 一 に 分 散
 し て い る と 想 定 し た と き の 比 活 性 を そ の α -Phe-
 Arg-MCA 分 解 活 性 より 概 算 し た。筋 肉 の 全 α -Phe-
 Arg-MCA 分 解 活 性 の 約 50% が 硫 安 25-65% 飽 和 画
 分 に 回 収 さ れ た と 仮 定 可 き と 求 め る 値 は 約 2.0
 $\mu\text{mol AMC/min/mg}$ と 概 算 さ れ た。本 実験 で 採 用 し
 た 比 活 性 は こ の 値 に 近 い の で あ る。作 用 後、
 筋 原 線 維 の 0-0.1M KCl 存 在 下 で の Mg-ATPase 活 性 を
 測 定 し た。そ の 結 果、Fig. 40 に 示 し た よ う に、
 粗 カ テ ア シ ン は pH 5.5 と 7.0 の い づ れ に お い て も、
 0.05, 0.1M KCl の 活 性 を 低 下 さ せ る こ と に よ り
 0-0.1M KCl の Mg-ATPase 活 性 の KCl 濃 度 依 存 性 を
 増 大 さ せ た。通 常 酸 性 に 活 性 の 至 適 pH を 持 つ
 カ テ ア シ ン 類 に よ り、こ の 中 性 の pH 7.0 に お い て も
 Mg-ATPase 活 性 の 変 化 が 引 き 起 こ さ れ た の は、基
 質 と な る 筋 原 線 維 が 酸 性 より も 中 性 に お い て
 カ テ ア シ ン 類 の 作 用 を 受 け が り 構 造 と せ る

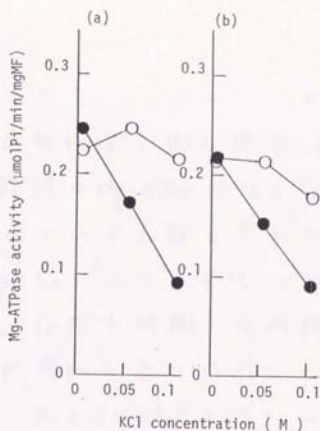


Fig. 40. Effects of crude cathepsins treatment of myofibrils on their Mg-ATPase activities.

Myofibrils (MF, 5 mg/ml) were incubated with (●) or without (○) crude cathepsins (specific activity against Z-Phe-Arg-MCA, 1.46 nmol AMC/min/ml) in the presence of 50 mM Tris-acetate buffer (pH 5.5(a) or pH 7.0(b)), 3 mM DTT, 1 mM EDTA, 0.08 M KCl and 7.5 mM NaN_3 at 25°C for 18 h. After incubation, the samples were diluted five times, being made to 20 mM and 1 mM with respect to Tris-HCl buffer (pH 8.0) and CaCl_2 , respectively. Mg-ATPase activities of the treated myofibrils were measured as in Fig. 36.

たのである。このように中性でカチオン類が比較的よく働く現象は、カチオンレ筋原線維の Mg -ATPase 活性の Ca^{2+} 感受性を除去する場合について報告されている [17]。

さらに、pH 5.5 における変化を経時的に調べた (Fig. 41)。作用 6 時間と 12 時間では $0.004M KCl$ での活性が増加したのに対し $0.05M KCl$ での活性が減少し、 $0.05M KCl$ での活性の KCl 濃度依存性が増大した。その後、作用時間の延長に伴い、 KCl 濃度依存性が増大した。このとき $0.05M KCl$ での活性のみならず $0.004M KCl$ での活性も減少した。

Quali et al. [62]

はラット肝臓のカチオン B 、 D 、 H とウサギの肝臓のカチオン L を pH 5.8 において筋原線維に作用させた結果、 $0.15-0.3M KCl$ での Mg -ATPase 活性が低下し、活性の KCl 濃度依存性も減少することと報告している。本結果と彼らの結果が異なる原因としては 2 つの可能性が考えられる。1 つは彼らが $0.15-0.3M KCl$ という高い KCl 濃度での変化を見ていることに原因がある可能性である。本結果

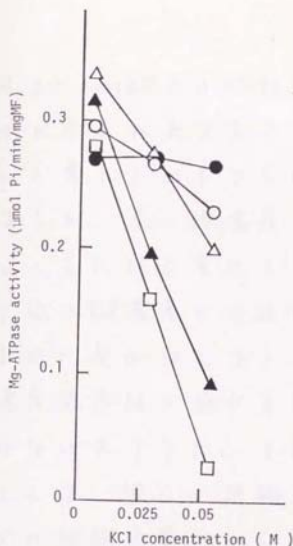


Fig. 41. Mg-ATPase activities of myofibrils treated with crude cathepsins at pH 5.5 for varying periods.

Myofibrils (MF, 5 mg/ml) were incubated with crude cathepsins (specific activity against Z-Phe-Arg-MCA, 1.78 nmol AMC/min/ml) in the presence of 50 mM sodium acetate buffer (pH 5.5), 3 mM DTT, 0.08 M KCl and 7.5 mM NaN_3 at 25°C for 0 (●), 6 (○), 12 (△), 24 (▲) and 33 (□) h. After incubation, the samples were diluted five times, being made to 20 mM with respect to Tris-HCl buffer (pH 8.0). Mg-ATPase activities of the treated myofibrils were measured as Fig. 36.

では $0.15-0.3M$ KCl の活性は測定していないが、
 Fig. 41 に示されたグラフを高い KCl 濃度の方から外
 挿して考えれば、ある程度酵素が作
 用すると、高い KCl 濃度での活性が先に 0 に近
 づくといふ以上変化しなくなり、その後から
 より低い KCl 濃度での活性が 0 に向って低下す
 るために見かけ上グラフの傾斜はゆるくなり
 KCl 濃度依存性が減少するよう観察されるの
 ではないだろうか。また、もう一つの可能性
 としては、彼らが肝臓の酵素を使用している
 ために組織特異性からその筋原線維に対する
 作用が筋肉の酵素と異なるといふことも考え
 られる。

ここに用いた粗カテプシン調製物にはカテ
 プシンが複数種存在するため、そのいずれが
 主に Mg -ATPase 活性の変化を引き起こすかを特定で
 きない。そこで粗カテプシン調製物をさらに
 分離した。

粗カテプシン調製物を $10mM$ sodium acetate buffer
 (pH 5.0) / $0.05M$ $NaCl$ / $0.1mM$ TTA / $1mM$ NaN_3 で平衡化し

K Sephadex G-75 カラム に かけ て 分画 し た 結果 を
 Fig. 42 に 示 し た。 フラクション 38 付近 に 尿 素 変
 性 ハモグロビン 分解 活性 ピーク、 フラクシ
 ョン 42 付近 に Z-Phe-Arg-MCA 分解 活性 ピーク、 フラ
 クション 48 付近 に BAWA 分解 活性 ピーク と Lys-NA
 分解 活性 ピーク が 現 れ た。 基質 特異性 から
 フラクション 38 付近 に カテパシン D、 フラク
 ション 42 付近 に カテパシン L と B、 フラクシ
 ョン 48 付近 に カテパシン B と H が 溶 出 し た と
 考 え ら れ た。 こ の よう に し て 分画 し た フラク
 ション を 図 中 に 示 す よう に S1-S7 の 7 つ に 分
 け ら れ て それ ぞれ を 5 倍 に 濃 縮 し た。 これ ら を そ
 れ ぞれ 筋原線維 に 作用 さ せ 0.205MKCl 存 在 下 の
 Mg-ATPase 活 性 の 変 化 を 調 べ た。 ま た、 各 種 プロ
 ティン イーゼ インヒビター の 影 響 を 調 べ て 各 酵
 素 の 作 用 の 優 劣 を 行 い た。 そ の 結 果 を Fig. 43 に
 示 し た。 インヒビター を 添 加 し な い と ま た は
 S2 から S5 の Mg-ATPase 活 性 の KCl 濃 度 依 存 性 が 大
 き く な り、 ま た は S3 と S4 の 活 性 の 低 下 も
 著 し く な り た。 こ の 活 性 の 低 下 は Fig. 41 の 経 時 変

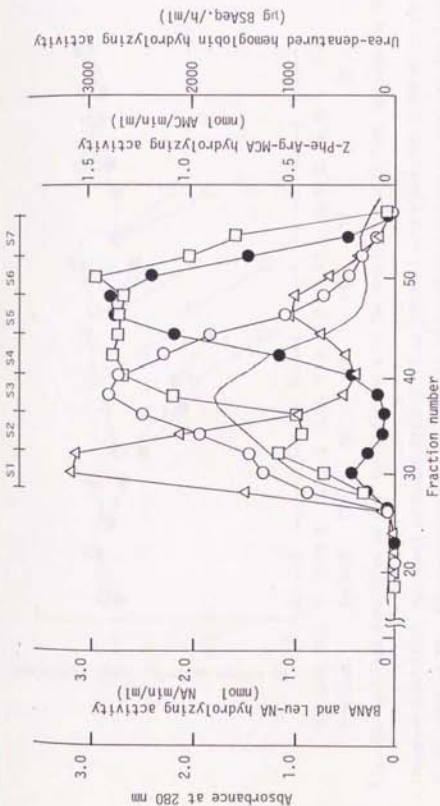


Fig. 42. Sephadex G-75 column chromatography of crude cathepsins.

Crude cathepsins (721 mg protein and 0.1 mM TTA) was applied to a column (4.0x54.4cm) equilibrated with 10 mM sodium acetate buffer (pH 5.0)/0.05 M NaCl/0.1 mM TTA/1 mM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ and eluted with the same solution. Fractions of 10 ml were collected. Absorbance at 280 nm, —; BANA hydrolyzing activity, ●; Leu-NA hydrolyzing activity, Δ; Z-Phe-Arg-MCA hydrolyzing activity, □; Urea-denatured hemoglobin hydrolyzing activity, ○.

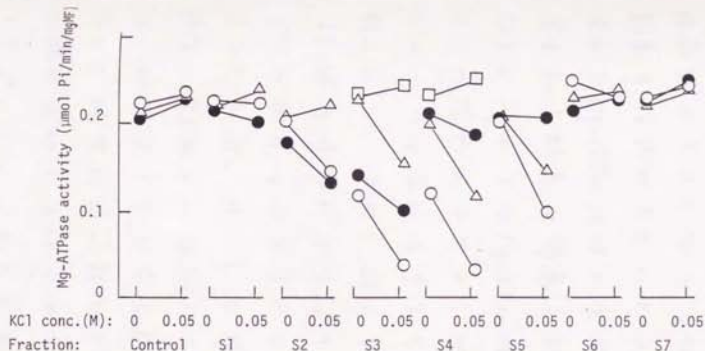


Fig. 43. Mg-ATPase activities of myofibrils treated with the fractions eluted from the Sephadex G-75 column.

Treatment conditions: Myofibril solutions (0.605 ml, 5 mg protein) were mixed with 0.395 ml of the fractions (S1-S7 shown in Fig. 42) concentrated to one-fifth of their original volumes or their medium (control, 10 mM sodium acetate buffer (pH 5.0)/0.05 M NaCl/0.1 mM TTA/1 mM NaN_3) and incubated at 25°C for 18 h. The mixtures contained 50 mM sodium acetate buffer (pH 5.5), 0.08 M KCl, 3 mM DTT, 1 mM EDTA, 7.5 mM NaN_3 and when added none (○), 0.1 mM pepstatin (Δ), 0.1 mM E-64 (●), 0.1 mM pepstatin and 0.1 mM E-64 (□). After incubation, the incubated mixtures were diluted five times, being made to 20 mM and 0.4 mM with respect to Tris-HCl buffer (pH 8.0) and CaCl_2 , respectively. Mg-ATPase activities of the treated myofibrils were measured as in Fig. 36.

此から推測できると酵素が過剰に作用した結果
 と考えられる。したがって、ここではKCl濃度
 依存性が大きくなり活性が低下したもうひとつ
 酵素の作用が大きいとみなした。得られた結
 果からMg-ATPase活性の変化をもたらし各画分に
 含まれる酵素の帰属を判断できると次のよう
 なる。S2に於けるMg-ATPase活性の変化はパ
 ースタチンの添加により、よく抑制されること
 からこのものは主にカタロシンDに帰属でき
 ると判断される。また、S5に於けるMg-ATP
 ase活性の変化はE-64の添加により、よく抑
 制されることから、このものはシステイン
 プロテイナーゼのカタロシンB、H、Lに帰
 属できると判断される。他方、S3あるいは
 S4に於けるMg-ATPase活性の変化は、パ
 ースタチンとE-64をそれぞれ単独で添加
 した場合に一部しか抑制されず、両者を
 一緒に添加してはじめて完全に抑制される。
 したがって、これらの画分ではカタロシンD
 とカタロシンB、H、Lがともに作用してい
 ると推察される。

次にカタアシン B、H、L のうち Mg -ATPase と変化させる主要酵素を特定するためにさらに分画した。Sephadex G-75 カラムクロマトグラフィーで得られた画分、S5-S7 を集めて DTT と $3mM$ になるように添加したのを $10mM$ sodium acetate buffer (pH 5.0) / $0.05M$ NaCl / $1mM$ NaN_3 で平衡化して P-cellulose カラムにかけた。NaCl 濃度 $0.05M$ から $0.55M$ へ傾斜法で溶出させると、第2節のカタアシン H の場合と同様に NaCl 濃度 $0.14M$ 付近にカタアシン H、 $0.23M$ 付近にカタアシン B、 $0.4M$ 付近にカタアシン L が溶出した (Fig. 44)。このように分画したフラクションを図中に示したように P1-P8 の8つに分けそれぞれを15倍に濃縮した。これらをそれぞれ筋原線維に作用させ $0.005M$ KCl 存在下の Mg -ATPase 活性の変化を調べた。その結果、Fig. 45 に示すように、P7において最も Mg -ATPase 活性の KCl 濃度依存性が増大し、各種カタアシンのうちカタアシン L の作用が最も大きく、カタアシン B、H の作用は小さいと考えられた。しかし、この結果はカタ

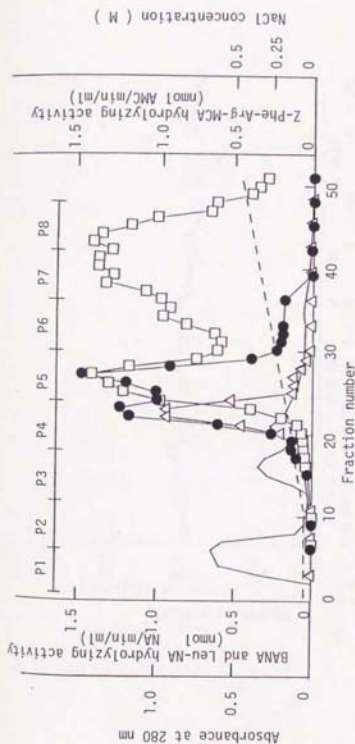


Fig. 44. P-cellulose column chromatography of cathepsins.

Three fractions (S5, S6, S7) from the Sephadex G-75 column, indicated by the bar in Fig. 42, were mixed. The obtained mixtures (103 mg protein) was applied with 3 mM DTT to a column

(2x15.2cm) equilibrated with 10 mM sodium acetate buffer (pH 5.0)/0.05 M NaCl/1 mM NaH₂PO₄ and eluted with a 0.05-0.55 M NaCl gradient in the same solution. Fractions of 20 ml were collected.

Absorbance at 280 nm, —; BANA hydrolyzing activity, ●; Leu-NA hydrolyzing activity, Δ; Z-Phe-Arg-MCA hydrolyzing activity, □; NaCl concentration, -----.

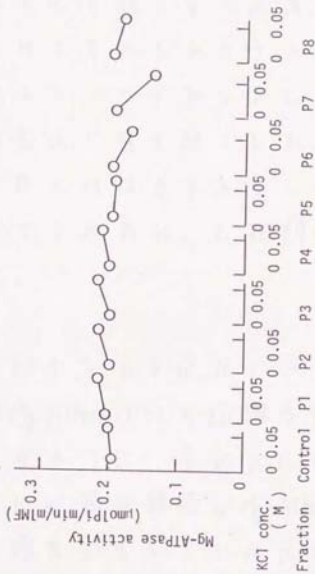


Fig. 45. Mg-ATPase activities of myofibrils treated with the fractions eluted from the P-cellulose column. Treatment conditions: NaCl concentrations of the fractions (P1-P8 shown in Fig. 44) from the P-cellulose column were adjusted to 0.5 M and the fractions were concentrated to one-fifteenth of their original volumes. Myofibril solutions (0.575 ml, 5 mg protein) were mixed with 0.425 ml of the concentrated fractions or their medium (control, 10 mM sodium acetate buffer (pH 5.0)/ 0.5 M NaCl), and incubated at 25°C for 38 h. The mixtures contained 50 mM sodium acetate buffer (pH 5.5), 0.08 M KCl and 3 mM DTT. After incubation, the samples were diluted five times, being made to 20 mM with respect to Tris-HCl buffer (pH 8.0). Mg-ATPase activities of the treated myofibrils were measured as in Fig. 36.

アシンBとHのMg-ATPase活性を変化させる因子としてこの可能性を否定するわけではない。何故ならば、Fig. 4bに示すように、単独ではMg-ATPase活性の変化を起こす力があまりないカタアシンBとHをそれぞれカタアシンLと一緒に作用させると、カタアシンL単独の場合よりも大きな変化を引き起こした。すなわち、カタアシンBとHはカタアシンLがMg-ATPase活性を変化させるに助け、この相対的に働くことが示された。

v) カルパインおよびカタアシン類による筋原線維Mg-ATPase活性のKCl濃度依存性増大の秩序以上のよう、主にカルパイン、カタアシンD、Lが筋原線維のMg-ATPase活性のKCl濃度依存性を増大させることが示された。しかし、これらの場合にも、第1章あるいはYangら[57]の報告に示された熟成中の筋原線維に見られる低KCl濃度(0-0.1M)での50%以上の顕著な活性の増加は説明できない。したがって、この

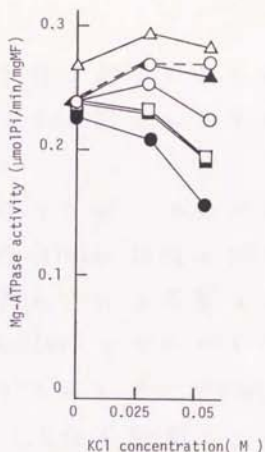


Fig. 46. Mg-ATPase activities of myofibrils treated with cathepsins B, H and L.

The fractions 21-24 (cathepsin H), 25-28 (cathepsin B) and 34-46 (cathepsin L) eluted from the P-cellulose column, indicated in Fig. 44, were pooled, respectively. Each cathepsin solution (30 ml) was diluted with water to adjust its NaCl concentration to 0.05 M and then concentrated to 1 ml. Myofibril solutions (0.585 ml, 5 mg protein) were mixed with the concentrated cathepsins solutions and/or their medium, Sol.A (10 mM sodium acetate buffer (pH 5.0)/0.05 M NaCl/1 mM NaN_3) as follows: 0.415 ml Sol.A, -○-; 0.215 ml cathepsin L and 0.2 ml Sol.A, -○-; 0.1 ml cathepsin B and 0.315 ml Sol.A, -△-; 0.1 ml cathepsin H and 0.315 ml Sol.A, -▲-; 0.215 ml cathepsin L, 0.1 ml cathepsin B and 0.1 ml Sol.A, -□-; 0.215 ml cathepsin L, 0.1 ml cathepsin H and 0.1 ml Sol.A, -■-; 0.215 ml cathepsin L, 0.1 ml cathepsin B and 0.1 ml cathepsin H, -●-.

The mixtures contained finally 50 mM sodium acetate buffer (pH 5.5), 3 mM DTT, 1 mM EDTA, 0.08 M KCl and 7.5 mM NaN_3 . After incubation at 25°C for 38 h, the mixtures were diluted five times, being made to 20 mM and 0.4 mM with respect to Tris-HCl buffer (pH 8.0) and CaCl_2 , respectively. Mg-ATPase activities of the treated myofibrils were measured as in Fig. 36.

より変化を引き起こす因子は別に存在すること
が予想される。これについては、2)に記述
した。

ここではさらに、カルパイン、カタラシン
D、L が Mg -ATPase 活性の KCl 濃度依存性を増大
させる機序について考察したい。

Suzuki と Goll [63] はカルパインを筋原線維に短
時間作用させたときの $0.065 M KCl$ の Mg -ATPase 活性
の増加は、活性を抑制するというトロポニンの
分解が原因であると推察した。また、カルパイ
ンの作用時間を延長したときの $0.065 M KCl$ での
活性の低下はアクチオシンに対し活性化作
用を持つ α -アクチニンがミ線から除去される
ことが原因であると推察している。しかし、
トロポニンによる活性の抑制は Ca^{2+} がいない場合
に起こるものもあり、彼らが活性測定に用い
た $0.07 mM Ca^{2+}$ 存在下ではむしろ抑制が解除され
ているとみるべきであり、 $0.065 M KCl$ での活
性の上昇をトロポニン分解による抑制解除の
ため求めるのは難しいであろう。また、

吸うの測定法ではエチレンから遊離した α -アクチニンは Mg -ATPase活性測定中にも筋原線維溶液中に共存するため、アクトミオシンと活性化させることは可能であり、 $0.065M KCl$ での活性低下の原因を α -アクチニンの遊離に求めることにも無理があろう。

他方、Oualiら[61]はカルパインを筋原線維に作用させたときの $0.15-0.17M KCl$ での Mg -ATPase活性の増加はエチレンから遊離した α -アクチニンがアクトミオシンに結合して活性化することから原因であると見做し、 $0.17M$ 以上の KCl での活性の低下についてはカルパインによりミオシンの溶解度が変化することに関係があると推測しているが、それ以上の詳しい考察はしていない。また、彼らはカテプシンを作用させたときの活性の低下の原因については考察していない。

そこで、ここではカルパインあるいはカテプシン類を作用させたときの筋原線維タンパク質の変化を調べ、 Mg -ATPase活性の KCl 濃度依存性増大との関係と明らかにした。

カルパインを pH 7.2 において 25℃ で 5 時間、あるいは粗カラプシン調製物を pH 5.5 において 25℃ で 18 時間、筋原線維に作用させ、SDS-ゲル電気泳動によりタンパク質の変化を観察した (Fig. 47)。カルパインを作用させたものではトロポニン T と I が分解され、粗カラプシンを作用させたものではミオシン重鎖、 α -アクチニン、トロポニン T と I、トロポミオシン、ミオシン軽鎖が分解された。分解の程度は粗カラプシンを作用させた方がカルパインを作用させたものより大きい。両者で共通に分解されたのはトロポニン T と I である。上記の条件で粗カラプシンとカルパインをそれぞれ作用させた筋原線維はいずれも Mg -ATPase 活性の KCl 濃度依存性が増大することから、この変化の主要因はトロポニンの T と I の分解であると推察した。

そこでトロポニン T と I の分解により Mg -ATPase 活性が変化する機序を考えてみたい。

それにはまず、アクトミオシンの超必濃と

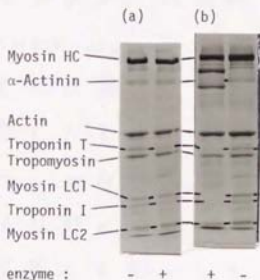


Fig. 47. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of myofibrils treated with calpain (a) or crude cathepsin (b).

(a) Myofibrils (5 mg/ml) were incubated with (+) or without (-) calpainII (specific activity against casein, $0.92 \Delta OD_{280}/h/ml$) in the presence of 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.2), 0.08 M KCl, 3 mM DTT, 1 mM $CaCl_2$ and 7.5 mM NaN_3 at $25^\circ C$ for 5 h. The incubated mixtures were diluted ten times with water and centrifuged at $10,000 \times g$ for 10 min.

The precipitated myofibrils (6.6 μg) were applied to a 10% gel.

(b) Myofibrils (5 mg/ml) were incubated with (+) or without (-) crude cathepsins (specific activity against Z-Phe-Arg-MCA, 5.5 nmol AMC/min/ml) in the presence of 50 mM sodium acetate buffer (pH 5.5), 3 mM DTT, 1 mM EDTA, 0.08 M KCl and 7.5 mM NaN_3 at $25^\circ C$ for 18 h. The incubated mixtures were diluted ten times with water and centrifuged at $10,000 \times g$ for 10 min. The precipitated myofibrils (6.6 μg) were applied to a 10% gel.

Mg -ATPase 活性の KCl 濃度依存性との関係を説明
 する必要がある。比較的低いイオン強度（例
 えば $0.06 M KCl - 20 mM Tris-maleate (pH 8.0)$ ）条件下の
 アクトミオシン溶液（このときアクチンモノマ
 ーが重合したアクチンフィラメントにミオシ
 ンモノマーが多数結合した集合体が分散した
 懸濁液の状態にある。）に Mg -ATP を添加して経
 時的濃度変化を調べると、添加直後には一旦
 濃度が低下するが（透明化と呼ばれる）その
 後次第に濃度が上昇し、最終的には凝集塊を
 生じ沈殿する。このときの沈殿は Mg -ATP 添加
 前のアクトミオシンと遠心して得られる沈殿
 に比べると著しく脱水されたものである。こ
 の一連の現象が超沈殿である。このときアク
 トミオシン分子には次のような変化が起これ
 ると理解されている。添加された Mg -ATP が
 ミオシンに結合すると、ミオシンの構造が変
 化してアクチン-ミオシン間の結合が切れ、
 アクチンフィラメントとミオシンモノマーに
 解離し、ミオシンモノマーは即座に互いに重

合してミオシンフィラメントを作る。これが透明化である。この状態ではミオシン単独の Mg -ATPase により ATP が分解されるがその分解速度は非常に小さい。しかし、それでも ATP は徐々に減少し、ある一定濃度以下になると再度アクチンとミオシンが結合できるようになる。このときアクチンのアロステリックな効果によりミオシンの Mg -ATPase は著しく活性化され ATP は加速度的に分解され、これに伴ってミオシンフィラメントのかわりにアクチンフィラメントが多数結合して凝集塊と形成可なり。

以上の様な過程で透明化の状態の時間、つまり、アクチン-ミオシン間結合が切れこいる状態の時間は、最初に添加可なり Mg -ATP 濃度が一定ならば、イオン強度に左右され、それが大きいほど長いことが知られている。これは、低いイオン強度では重合したフィラメントで存在可なりに対して、高いイオン強度ではモノマーとして存在可なりという様な、著しくイオン強度に影響されるミオシンの高次構造

の変化が反映されるためと考えられている。
 すなわち、ミオシンは、高いイオン強度ほど、
 $Mg\text{-ATP}$ を添加したときにアクチンとの結合が
 切れやすいかあるいは一旦切れると再結合し
 にくいような高次構造をとると考えられる。

アクトミオシンの $Mg\text{-ATPase}$ 活性と測定可能なとい
 うことは、以上のようなアクトミオシン分子
 が状態変化を起こしている間に分解される ATP
 量を測定していることになる。したがって、
 KCl 濃度が高い（イオン強度が高い）条件では
 透明化が長くミオシン単独の $Mg\text{-ATPase}$ となるた
 めに活性は低いのに対し、 KCl 濃度が低い（イ
 オン強度が低い）条件では透明化が短く、ア
 クチンにより活性化されるミオシンの $Mg\text{-ATPase}$
 となるための活性は高くなる。以上がアクトミオシ
 ンの $Mg\text{-ATPase}$ 活性に KCl 濃度依存性がある理由である。

筋原線維も、その構造中にアクトミオシン
 が組み込まれているために、同様な理由によ
 って、その $Mg\text{-ATPase}$ 活性が KCl 濃度依存性と有
 るが、その大きさは遊離のアクトミオシンに

比べ小さい。これは筋原線維中でアクチン
 ミオシンが他のタンパク質の影響でその構造が
 とり得る自由度が制限されるために、Mg-ATP
 を添加したときと比較的高イオン強度でもア
 クチン-ミオシン間結合が切れにくい、あ
 りいは一旦切れとも再結合しやすい、 $0.05-0.1M$
 KCl存在下でも透明化の状態が抑えられ、 $0.1M$
 KCl域と同程度の活性を発現するためと考えられる。

このとき、アクチンミオシンの構造を制限
 しているタンパク質の一つとしてトロポニン
 が考えられる。

筋原線維中ではトロ
 ポニンはアクチンフィラメントに結合し、ト
 ロポミオシンと介してアクチン-ミオシン間
 の結合を調節することにかかれ、という。ト
 ロポニンは直接結合しているアクチンフィラ
 メントの構造に制限を与えるばかりでなく、
 アクチンフィラメントと平行に配置されてい
 るミオシンフィラメントに対してもおおまか
 空間的な障害という形で自由な構造をとらせ
 ないようになっていると考えられる。したがって、

2. トロポニンがプロテアーゼにより、2分
 解されるとアクチンフィラメントとミオシン
 フィラメントが比較的自由的な構造をとるよう
 になり、それにより、特に後者はイオン強
 度の影響を強く受けるようになると考えられ
 る。このため、遊離のアクチンミオシンの場合
 と同様に $0.05-0.1 \text{ M KCl}$ 存在下では Mg-ATP を添加
 した際に、アクチン-ミオシン間結合が切れ
 やすいが、あるいは一旦切れると再生しにく
 い状態になり、その結果 $0.05-0.1 \text{ M KCl}$ での活性
 が低下し、 $0-0.1 \text{ M KCl}$ での活性のイオン強度依
 存性が増大すると考えられる。ただし、以上
 のような機序と考えた場合、筋原線維中のア
 クチンミオシンの構造を、SDS-ゲル電気泳動上で
 観察しにくい微量のタンパク質がトロポニン
 と同様な様式で制限している可能性はないわ
 けではない。したがって、そのようなタンパ
 ク質の分解により、 Mg-ATPase 活性の変化が引
 き起こされる可能性も完全には否定できない
 とわらう。

2) 筋原線維の低KCl濃度でのMg-ATPase活性を増加させる因子の検索

1) K⁺の濃度カルパイン、カタゾシンD、Lが筋原線維のMg-ATPase活性のKCl濃度依存性を増大させることが示された。しかし、これらの因子では0-0.1M KClでの活性の増加はごくわずかに引き起こされたにすぎず、また、SuzukiとGoll [63]、Quailら [58]の報告でもカルパインによる活性の増加は小さかった。したがって、食肉熟成中の0-0.1M KClでの活性の増加の原因をプロテアーゼの活性の増加の増加と見做すのはないと考えられる。そこで、この変化を引き起こす因子を別に検索した。

<結果と考察>

1) 筋肉抽出物による筋原線維Mg-ATPase活性の増加

筋原線維のMg-ATPase活性を増加させる因子を筋肉より分離する前段階として、まず、筋肉ホモジネートを貯蔵したときにも、肉塊で貯

蔵したときと同様の变化が起きるかどうかに
 調べた。筋肉に2倍量の $6\text{mM Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 溶液を加え
 て、チンキ剤オートホモジナイザーで $10,000$
 r.p.m. 30秒間ホモジナイズし、これに少量の
 INH を加えて pH 5.7 に合わせ、 4°C に貯蔵
 した。貯蔵の4, 8日目にはホモジネート 5g を
 とり、 40ml の 40mM Tris-HCl ($\text{pH} 7.2$) / 0.16M KCl / $5\text{mM Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$
 を加えて $10,000\text{ r.p.m.}$, 15秒間ホモジナイズした
 のを $2,300 \times \text{g}$ で遠心した。泥殿に 30ml の 0.16M KCl /
 $5\text{mM Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$ を加えて洗浄することとを3回繰り返して
 筋原線維を調製した。その Mg-ATPase 活性と
 測定した結果、Fig. 48 に示したように、貯蔵4
 日目では $0-0.05\text{M KCl}$ での活性が約50%増加したの
 に対し、 0.1M 以上の KCl 濃度での活性はあまり
 増加せず、活性の KCl 濃度依存性は増大した。
 貯蔵8日目では、4日目と比べて $0-0.05\text{M KCl}$
 での活性はわずかに減少した。これは、筋細胞の
 ホモジナイズにより作用成分間の接触確率が
 増大するため反応が加速された、肉塊の場合
 よりも早く最大値に達したと理解される。

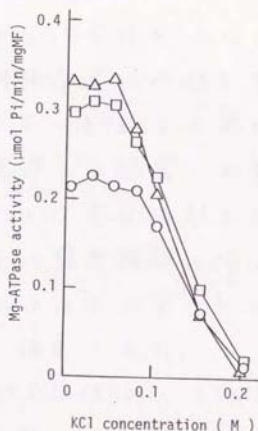


Fig. 48. Changes in Mg-ATPase activity of myofibrils at various KCl concentrations during storage of the muscle homogenate at 4°C.

Storage conditions: Minced muscle was homogenized with two volumes of 6 mM NaN_3 at 10,000 rpm for 30 s. The pH of the homogenate was adjusted to 5.7 with 1 N HCl. The homogenate was stored at 4°C for 8 days.

Myofibrils were prepared from the 0 (○), 4 (△) and 8 (□) day-stored homogenates.

Myofibril preparation; 5 g of homogenates were re-homogenized with 40 ml of 40 mM Tris-HCl buffer (pH 7.2)/0.16 M KCl/5 mM NaN_3 at 10,000 rpm for 15 s. The suspensions were centrifuged at 2,300xg for 10 min and the supernatants were discarded. The residues were resuspended in 30 ml of 0.16 M KCl/5 mM NaN_3 and centrifuged at 2,300xg for 10 min. This process was repeated twice. Then, the residues were finally dispersed in 30 ml of 0.16 M KCl/5 mM NaN_3 and passed through a nylon net to remove connective tissues. Mg-ATPase activities of myofibrils were measured as in Fig. 36.

しかしながら、定性的にはほぼ肉塊と貯蔵した場合と同様な変化が起きたといえる。他方、このホモジネートから水溶性成分を $0.16M\ KCl/5mM\ Na_2HPO_4$ で洗浄して調製した筋原線維と貯蔵してもこのような変化は起きなかった。これらより、筋原線維の Mg -ATPase 活性を増加させる因子はホモジネートの水溶性成分の1つであると推定された。

そこで、それを実証するために、ホモジネートを遠心して得た上清と、別に筋肉から精製した筋原線維に作用させて Mg -ATPase 活性の変化を調べた。精製した筋原線維 $60mg$ にホモジネートの上清 $2ml$ を加えて懸濁し、 $25^\circ C$ に38時間インキュベートした。対照はホモジネート上清のかわりにそれとメンブレンフィルターで一種である $Centriflo$ CF-25 にかけて除タンパク液を加えてインキュベートした。インキュベート後 $9000 \times g$ で遠心分離し沈殿した筋原線維に $6ml$ の $0.16M\ KCl$ を加えて再度懸濁したのを遠心分離して筋原線維を沈殿させた。この操作をさらに2回

練り返して水溶性の成分と洗い流したものを 4ml
の 0.16M KCl/5mM NaN₃ に懸濁した。こうして得た筋
原線維の Mg-ATPase 活性を測定した結果、Fig. 49
に示したように、ホモジネート上清を作用マ
セタ中の対照に比べて 0-0.1M KCl の Mg-ATPase
活性が増加した。したがって、Mg-ATPase 活性
を増加させる因子がホモジネートの上清中に
存在することが明確となった。

この因子は pH 5.7 のホモジネートの上清の状
態で貯蔵されると、低温でも数日で失活した。
おそらく、pH 5.7 付近の酸により変性したので
あろう。したがって、一週間以上の日数を要
するこの因子の性質の調査には、pH 5.7 での抽
出は不適当である。そこで、代りに pH 7.2 での
因子を抽出し、その性質を調査したところ
良好な結果が得られたのである。以下
に記述した。10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.2) / 0.05M NaCl/
1mM NaN₃ を加えて 10,000 r.p.m., 30 秒間ホモジナ
イズした。得られたホモジネートに 1N NaOH を
加えて pH 7.2 に合わせ、5000xg で 10 分間遠心し

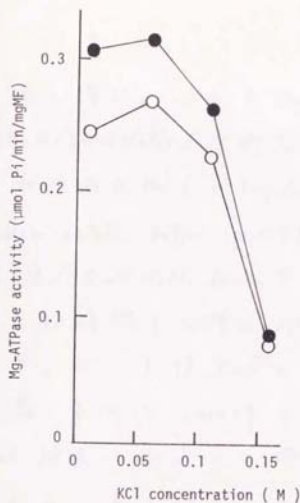


Fig. 49. Mg-ATPase activities of myofibrils incubated with the supernatant solutions of the muscle homogenates.

The muscle homogenates, prepared as in Fig. 48, were centrifuged at 10,000xg for 20 min to obtain supernatant solutions. The supernatant solutions were filtered through Centriflo CF25 membrane to remove high molecular weight materials and used as the filtrates. Myofibrils (60 mg) were suspended in 2 ml of the supernatant solutions (●) or the filtrates (○) and incubated at 25°C for 38 h. After incubation, the mixtures were centrifuged at 9,000xg for 10 min and the supernatants were discarded. The residues were resuspended in 6 ml of 0.16 M KCl/5 mM NaN_3 and centrifuged at 9,000xg for 10 min. This process was repeated twice. Then, the residues were finally dispersed in 0.16 M KCl/5 mM NaN_3 and their protein concentrations were adjusted to 10 mg/ml. The aliquots of the suspensions were diluted ten times with water to measure the Mg-ATPase activities as in Fig. 36.

2 L 清を得た。これを 10mM Tris-HCl buffer (pH 7.2) / 0.05M NaCl / 1mM NaN₃ で透析し中性抽出物を得た。
 この中性抽出物 (10.9mg/ml のタンパク質) を 50mM sodium acetate buffer (pH 5.5) / 3mM DTT / 1mM EDTA / 0.08M KCl / 7.5mM NaN₃ 存在下で 5mg/ml の筋原線維と 25°C で 18 時間 インキュベートした (全量 2ml)。
 インキュベート後 8ml の 0.16M KCl / 5mM NaN₃ を加えて懸濁したのを 2300g で 10 分間遠心し、上清を 8ml 除去した。この操作をもう一度繰り返したのを、水を加えて 5 倍に希釈し、すく。
 Tris-HCl buffer (pH 8.0) と CaCl₂ をそれぞれ 20mM と 1mM になるように加えた。このようにして得られた筋原線維の Mg-ATPase 活性を測定した結果、
 Fig. 50 に示したように中性抽出物を加えないでインキュベートしたものに比べて $0-0.15\text{M}$ KCl での活性が増加した。以後、筋原線維に対する作用条件ならびに作用後の筋原線維の洗浄の条件は特に断わらない限りここで用いたものに採用した。

中性抽出物と 25°C で 18 時間インキュベートの経時的に筋

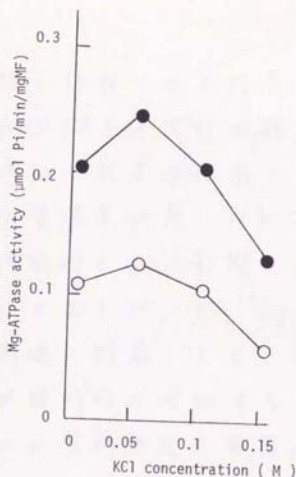


Fig. 50. Mg-ATPase activities of myofibrils incubated with the neutral extracts of the muscles.

Myofibrils (MF, 5 mg/ml) were incubated with (●) or without (○) the neutral extracts (10.9 mg/ml protein) in 2 ml of solutions containing 50 mM sodium acetate buffer (pH 5.5), 3 mM DTT, 1 mM EDTA, 0.08 M KCl and 7.5 mM NaN_3 at 25°C for 18 h. After incubation, 8 ml of 0.16 M KCl/5 mM NaN_3 was added to the incubated mixtures and centrifuged at 21,000xg for 10 min and then 8 ml of the supernatants were discarded. The residues were resuspended with 8 ml of 0.16 M KCl/5 mM NaN_3 and centrifuged at 21,000xg for 10 min and then 8 ml of the supernatants were discarded. Then, the residues (2 ml) were mixed with 8 ml of 25 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)/1.25 mM CaCl_2 /2.5 mM NaN_3 . The obtained myofibril suspensions (1 mg/ml) were used for measurements of the Mg-ATPase activities as in Fig. 36.

原線維に作用させた結果、Fig. 51に示したよう
 に $0-0.15M$ KCl の活性は経時的に増加した。活
 性の増加の程度は作用させた中性抽出物のイ
 ンパクト濃度が高いほど大きく (Fig. 52)、ま
 た、作用時の pH に影響され、 pH 5.6-7.0 では pH が
 低いほど大きかった (Fig. 53)。これらの性質
 は、肉塊を貯蔵したときに筋原線維の Mg -ATPase
 活性は経時的に増加すること、また、そうし
 た変化は食肉熟成の極限 pH 5.5-5.7 付近で起き
 ることとよく符合しており、中性抽出物中の
 因子は食肉熟成中にも作用していることを強
 く示唆している。なお、中性抽出物にはカル
 パイン、カウアシンなどの1)で明らかにした
 筋原線維の Mg -ATPase 活性の KCl 濃度依存性を増
 大させる因子が存在するが、本条件下ではそ
 の作用をあまり発現していない。なぜならば、
 中性抽出物を作用させた筋原線維では $0-0.1M$ KCl
 ばかりでなく $0.1-0.15M$ KCl の活性も増加するか
 らである。カルパインは EDTA を含む本条件下
 では Ca^{2+} がキレートされるためにその活性を発

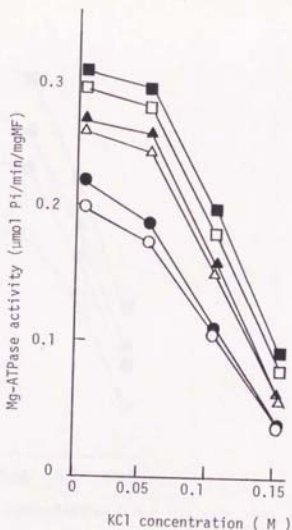


Fig. 51. Mg-ATPase activities of myofibrils incubated with the neutral extract for varying periods.

Myofibrils(MF, 5 mg/ml) were incubated with the neutral extract (5.8 mg/ml protein) in 2 ml of solutions containing 50 mM sodium acetate buffer(pH 5.5), 3 mM DTT, 1 mM EDTA, 0.08 M KCl and 7.5 mM NaN_3 at 25°C for 0(●), 3(△), 6(▲), 18(□) and 38(■) h. Open circle(○) indicates unincubated myofibrils without the neutral extract. Treatments of the incubated myofibrils for the measurement of Mg-ATPase activities were the same as in Fig. 50.

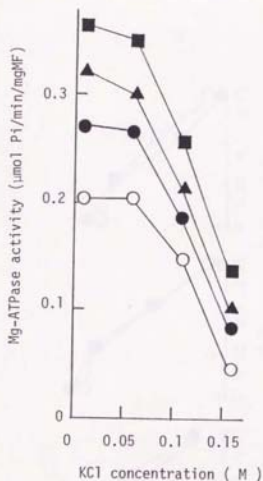


Fig. 52. Mg-ATPase activities of myofibrils incubated with varying concentrations of neutral extract.

Myofibrils (MF, 5 mg/ml) were incubated with the neutral extract (0 (○), 2.6 (●), 5.3 (▲) and 10.9 (■) mg/ml protein) in 2 ml of solutions containing 50 mM sodium acetate buffer (pH 5.5), 3 mM DTT, 1 mM EDTA, 0.08 M KCl and 7.5 mM NaN_3 at 25°C for 18 h. Treatments of the incubated myofibrils for measurements of Mg-ATPase activities were the same as in Fig. 50.

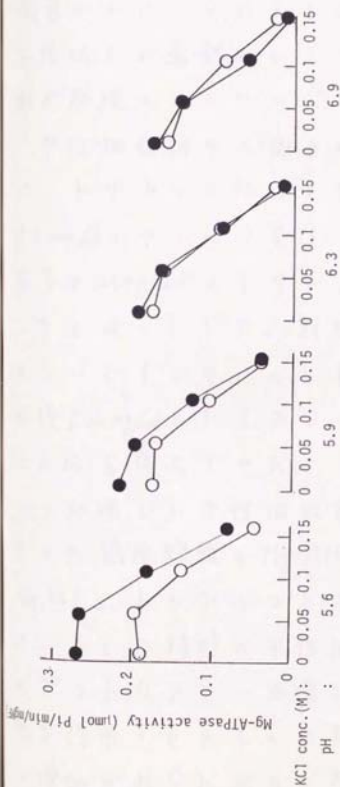


Fig. 53. Mg-ATPase activities of myofibrils incubated with the neutral extract at various pHs.

Myofibrils (MF, 5 mg/ml) were incubated with the neutral extract (5.8 mg/ml protein) in 2 ml of solutions containing 50 mM Tris acetate buffer (pH 5.6, 5.9, 6.3 and 6.9), 3 mM DTT, 1 mM EDTA, 0.08 M KCl and 7.5 mM NaN_3 at 25°C for 18 h. Treatments of the incubated myofibrils for measurements of Mg-ATPase activities were the same as in Fig. 50.

現でできないのであろう。カテホシンは中性抽出物を調製する際に不安定な中性条件に長時間置かれることによる失活と、肉中に比べて6倍以上に希釈されたことによりその作用が発現しにくいのであろう。

中性抽出物中の因子の正体を推定するために、トリホシン処理を行った。中性抽出物(21.8 mg/ml のタンパク質)を20 mM Tris-HCl (pH 8.0) 存在下 0.125 mg/ml のトリホシンと25℃で18時間インキュベートした。対照はトリホシンを添加しないでインキュベートした。インキュベート後 0.25 mg/ml のトリホシンインヒビターを加えて反応を停止させた。このようにしてトリホシン処理した中性抽出物を25℃、18時間作用させた筋原線維のMg-ATPase活性を測定した(Fig. 54)。トリホシンを添加しないでインキュベートした対照の中性抽出物を作用させたものではトリホシン処理をしていない中性抽出物を作用させたものと同程度のMg-ATPase活性の増加がみられるのに対し、トリホシン処理

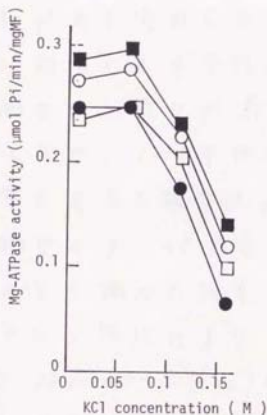


Fig. 54. Mg-ATPase activities of myofibrils incubated with the trypsin-treated neutral extract.

The neutral extract (21.8 mg/ml protein) was incubated with or without trypsin (0.125 mg/ml) in the presence of 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) and 2 mM NaN_3 at 25°C for 18 h. The tryptic action was stopped by addition of trypsin inhibitor (0.25 mg/ml). Myofibrils (MF, 5 mg/ml) were incubated with the neutral extracts (6.5 mg/ml protein) in 2 ml of solutions containing 100 mM sodium acetate buffer (pH 5.5), 3 mM DTT, 1 mM EDTA, 0.08 M KCl and 7.5 mM NaN_3 . □, without the neutral extract; ■, with the unincubated neutral extract; ●, with the neutral extract incubated with trypsin; ○, with the neutral extract incubated without trypsin. Treatment of the incubated myofibrils for measurements of Mg-ATPase activities were the same as in Fig. 50.

をした中性抽出物を作用させたものの活性の増加があまりみられなかつた。これはトリプシン処理により中性抽出物の Mg -ATPase 活性を増加させる能力が消失することを示している。したがって、中性抽出物中の因子はタンパク質であると推定された。このとき、中性抽出物中のタンパク質の変化を SDS-ゲル電気泳動により調べた結果、Fig. 55 に示したように、トリプシン処理により主に 93,000、62,000、37,000、35,000、28,000 ダルトン (Da) 成分が消失していることがわかる。したがって、これらのタンパク質が筋原線維の Mg -ATPase 活性の増加に関与している可能性が示唆された。

ii) 筋漿より分離した塩基性タンパク質による筋原線維 Mg -ATPase 活性の増加

中性抽出物より筋原線維の Mg -ATPase 活性を増加させる因子を液体等電点電気泳動により分離することを試みた。中性抽出物に、タンパク質の電気的酸化を抑える DTT と pH 勾配を



Fig. 55. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of neutral extracts treated with trypsin.

The neutral extract was incubated with(+) or without(-) trypsin as in Fig. 56. The incubated neutral extracts (13 μ g) were applied to a 12.5% polyacrylamide gel.

形成させるための両性担体 (3/10 Bio-Lyte) をそれぞれ終濃度 0.3 mM と 2% になるように加えて全量を 50 ml とした。これを $0-5^\circ\text{C}$ において 12 W で 4 時間泳動し、泳動後に pH 勾配に沿って 20 の画分に分取した。各画分は pH を実測後、それぞれ $10 \text{ mM Tris-HCl (pH 7.2) / 0.05 \text{ M NaCl} / 1 \text{ mM Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 中で透析して両性担体を除き、タンパク質濃度、Z-Phe-Arg-MCA 分解活性、カゼイン分解活性を測定した。その結果、Fig. 56 に示したようにタンパク質濃度は $\text{pH} 7$ と 9 付近に 2 つのピーク、Z-Phe-Arg-MCA 分解活性は $\text{pH} 5$ 付近に 1 つのピーク、カゼイン分解活性は $\text{pH} 4$ と 7 付近に 2 つのピークとして認められた。また、各画分の SDS-ゲル電気泳動像を Fig. 57 に示した。先述 (Fig. 55) の $93,000$ 、 $28,000 \text{ Da}$ 成分は主にフラクション 8-10 ($\text{pH} 7$ 付近) に、 $62,000 \text{ Da}$ 成分は主にフラクション 11-14 ($\text{pH} 8$ 付近) に、 $37,000$ 、 $35,000 \text{ Da}$ 成分は主にフラクション 14-17 ($\text{pH} 9$ 付近) に分画された。

このように分離された全画分を各々フラクション 1-5、6-7、10-13、14-17、18-20 からなる 5 つ

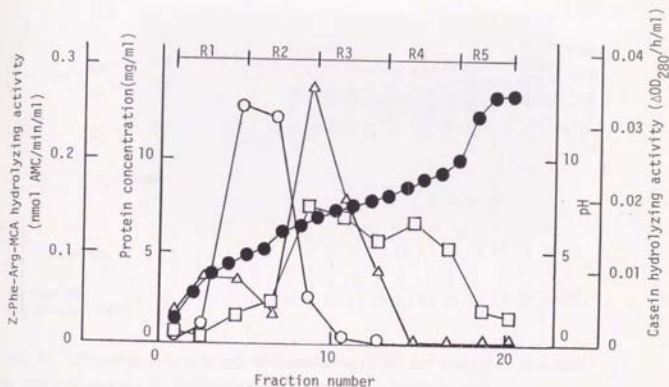


Fig. 56. Isoelectric focusing of the neutral extract on a Rotofor cell.

The neutral extract (160 mg protein, 50 ml) was applied with 2% Bio-Lyte 3/10 Ampholyte and 0.3 mM DTT to a Rotofor cell and focused with 12 watts of power for 4 h. The focused solution in the cell was fractionated to twenty fractions and the pH (●) of the fractions were measured. Then, the fractions were dialyzed against 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.2)/0.05 M NaCl/1 mM Na₂S₂O₃ overnight to remove Ampholyte and analyzed for their protein concentrations (□), Z-Phe-Arg-MCA hydrolyzing activities (○) and casein hydrolyzing activities (Δ).

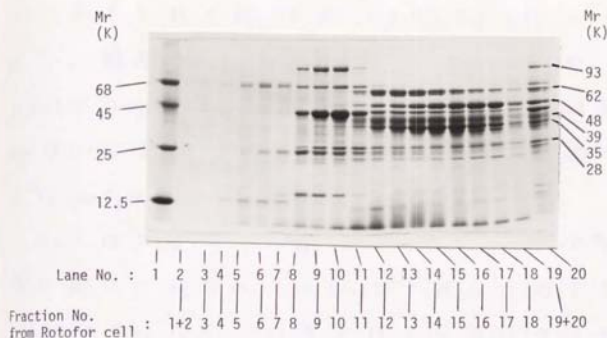


Fig. 57. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the fractions obtained by electrofocusing of the neutral extract with a Rotofor cell.

Every fraction shown in Fig. 56 (0.05 ml) was mixed with 0.15 ml of water and 0.1 ml of 3% SDS/30 mM Tris-HCl buffer (pH 6.8)/3% 2-mercaptoethanol/60% glycerol/0.03% bromophenol blue and heated at 100°C for 5 min.

The heated mixtures (10 μ l) were applied to a 12.5% gel.

Lane 1 shows protein standards mixture (bovine serum albumin, ovalbumin, α -chymotrypsinogen, cytochrome c).

Lane 20 shows the neutral extract (6.4 μ g) before electrofocusing.

Lanes 2-19 show the fractions obtained by electrofocusing.

の画分 (それぞれ R1, R2, R3, R4, R5 とした) により、筋原線維に 25℃、18 時間作用させ、0-0.05 M KCl での My-ATPase 活性を測定した。その結果、Fig. 58 に示したように、My-ATPase 活性の増加の程度は R4 (pH 8-10) で最も大きかった。

R4 には Z-His-Arg-MEA 分解活性とカゼイン分解活性が検出されないこと (Fig. 56) から、カタプシン B, L, カルパインは含まれていないのは明らかである。また、活性を測定していないが、カタプシン H [126, 127]、D [184]、高分子量プロテイナーゼ (Fig. 10) の等電点はそれぞれ 6-7、5.5-6.5、5.5 という結果が得られており、やはり R4 には含まれていないと考えられる。さらに、ここには示さないが、R4 自身には My-ATPase 活性は検出されなかった。したがって、筋原線維の My-ATPase 活性を増加させる因子は筋肉の既知のプロテイナーゼとは異なり、R4 に含まれる等電点 8-10 の塩基性タンパク質であると考えられた。なかでも R4 に主に分画され、トリプシン処理で消失する 39,000、35,000 Da 成分が

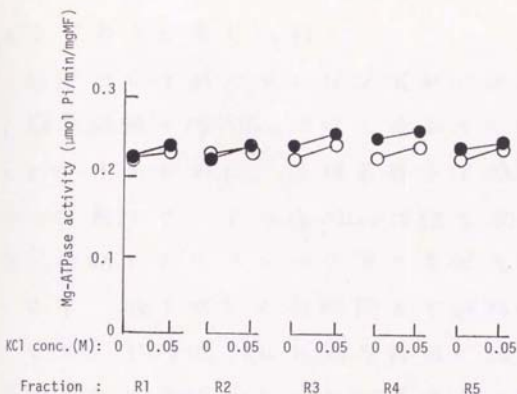


Fig. 58. Mg-ATPase activities of myofibrils treated with the fractions obtained by electrofocusing

Myofibril solutions of (5 mg protein, 1.17 ml) were mixed with 0.83 ml of pooled fractions (●) shown in Fig. 56 or their medium (○, 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.2)/0.05 M NaCl/1 mM NaN_3) at 25°C for 18 h. The mixtures contained 50mM sodium acetate buffer (pH 5.5), 0.08 M KCl, 3 mM DTT, 1 mM EDTA and 7.5 mM NaN_3 . Treatment of incubated myofibrils for measurements of Mg-ATPase activities were the same as in Fig. 50.

有力であると考えられた。

R4中のいずれのタンパク質がいかなる機序で筋原線維の Mg -ATPase活性を増加させるかを明らかにするために、各種条件下で筋原線維にR4を作用させ、その Mg -ATPase活性を測定し、SDS-電気泳動によりタンパク質の変化を調べた。

まず、R4を25℃で30時間まで経時的に作用させた。0時間(R4を筋原線維と混合し、10-20分間水中に保持したうち、常法通り筋原線維を洗淨した)ですぐに Mg -ATPase活性が増加し、3時間でさらに増加したが、それ以降はあまり増加しなかった(Fig.57)。電気泳動(Fig.60)では0時間で新たに48,000 Daと35,000 Da成分が出現し、その量は3時間で増加し、それ以降はあまり変化せず、 Mg -ATPase活性の増加の現象と対応していた。このとき、筋原線維に由来する成分には全く変化が見られないことから、これらはR4から移行した成分と推定された。

次に、作用時のpHの影響について調べた結果、pH 5.7-7.2の範囲ではpHが低いほど Mg -ATPase活

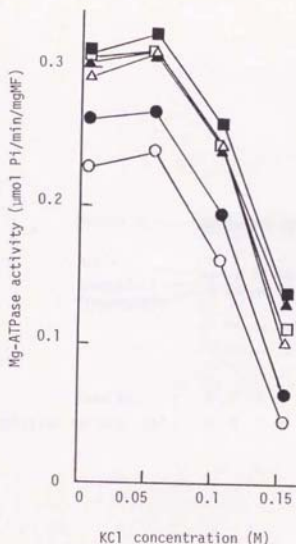


Fig. 59. Mg-ATPase activities of myofibrils incubated with R4 for varying periods.

Myofibrils(MF 5 mg/ml) were incubated with R4 (shown in Fig. 56, 1.9 mg/ml protein) in 2 ml of solutions containing 7.5 mM sodium acetate buffer(pH 5.5), 3 mM DTT, 1 mM EDTA, 0.08 M KCl and 10 mM NaN_3 at 25°C for 0(●), 3(△), 6(▲), 18(□) and 38(■) h. Open circle(○) indicates the unincubated myofibril.

Treatments of the incubated myofibrils for measurements of Mg-ATPase activities were the same as in Fig. 50.

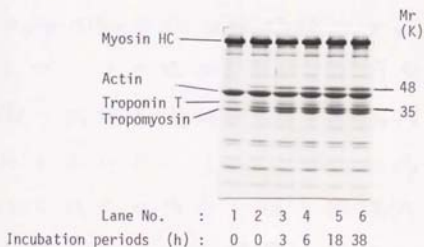


Fig. 60. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of myofibrils incubated with R4 for varying periods.

Myofibrils (13 μ g) were applied to a 12.5% polyacrylamide gel.

Lane 1 shows the unincubated myofibril.

Lanes 2-6 show the myofibrils incubated with R4 for varying periods (indicated below the lane No.), as shown in Fig. 59.

性の増加の程度は大きかった(Fig. 61)。電気泳動(Fig. 62)では、 pH が低いほど 48,000、35,000 Da の各成分の量が多く、 Mg -ATPase 活性の増加の程度と対応していた。

以上のように筋原線維に R_4 を作用させるとその Mg -ATPase 活性は経時的かつ pH 依存的に増加したが、その増加の程度と筋原線維の電気泳動像に出現する 48,000、35,000 Da 成分の量はよく対応していた。したがって、 Mg -ATPase 活性の増加はこれらの成分が筋原線維への結合により引き起こされると推察された。他方、先述したトリプシン処理で消失する塩基性の 37,000 Da 成分(Fig. 55、57)は以上の結果からもわかるように筋原線維への結合が認められないことから、その Mg -ATPase 活性増加への関与は否定されるものと結論した。

それでは、これらの成分は食肉熟成中においても筋原線維に結合するのであろうか。これを知るために、と殺後 0℃で 12 日間まで貯蔵した家兎肉より筋原線維と筋漿を分離し、前者の Mg -ATPase 活性の変化と両者のタンパク

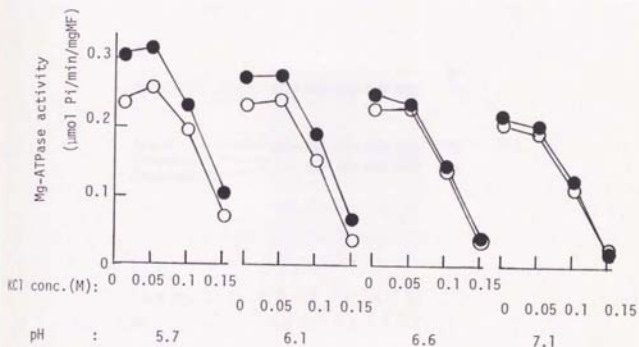


Fig. 61. Mg-ATPase activities of myofibrils incubated with R4 at various pHs.

Myofibrils (MF 5 mg/ml) were incubated with R4 (shown in Fig. 56, 1.9 mg/ml protein) in 2 ml of solutions containing 75 mM Tris acetate buffer (pH 5.7, 6.1, 6.6 and 7.1), 3 mM DTT, 1 mM EDTA, 0.08 M KCl and 10 mM NaN_3 at 25°C for 18 h. Treatments of the incubated myofibrils for measurements of Mg-ATPase activities were the same as in Fig. 50.

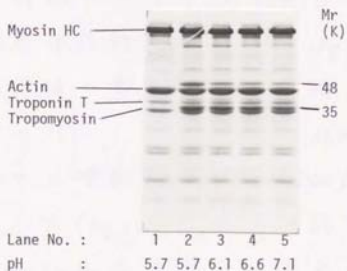


Fig. 62. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of myofibrils incubated with R4 at various pHs.

Myofibrils (13 μ g) incubated with (lanes 2-5) or without (lane 1) R4, shown in Fig. 56, at various pHs (indicated below the lane No.) as in Fig. 61 were applied to a 12.5% polyacrylamide gel.

質の変化を調べた。その結果、筋原線維の My-ATPase 活性は第1節で示した牛肉の場合と同様に、貯蔵により低 KCl 濃度での活性が増加し、 KCl 濃度依存性が増大した (Fig. 63)。これに伴い、筋原線維の電気泳動像では、トロポミオシンのバンドのすぐ上に 35,000 Da 成分が出現し、徐々に増加したが、48,000 Da 成分は認められなかった (Fig. 64)。他方、筋漿の電気泳動像では 35,000 Da 成分の減少が認められた (Fig. 64)。この結果より、熟成中にも筋漿の 35,000 Da 成分が筋原線維に結合し、 My-ATPase 活性を増加させると推定された。このとき 48,000 Da 成分が関与しないことは、中性抽出物をトリプシン処理した実験 (Fig. 65) で、筋原線維の増加には 35,000 Da 成分は必要であるが、48,000 Da 成分は必要でない (トリプシンで消化されない) という結果からも支持される。48,000 Da 成分は、肉中では何らかの補助因子により安定化されているために、変性を経由したりして筋原線維に結合することがないのであろう。

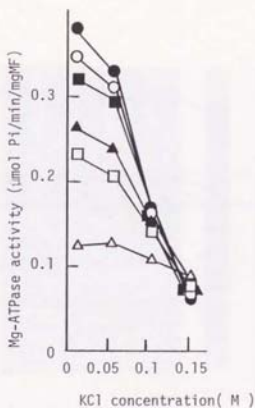


Fig. 63. Changes in Mg-ATPase activities of myofibrils during storage of rabbit muscles.

Myofibrils were prepared from rabbit muscles stored at 0 °C for 0 (Δ), 1 (▲), 2 (□), 4 (■), 7 (○) and 12 (●) days according to the method described under "Materials and Methods". Conditions of Mg-ATPase assay were the same as in Fig. 36.

256

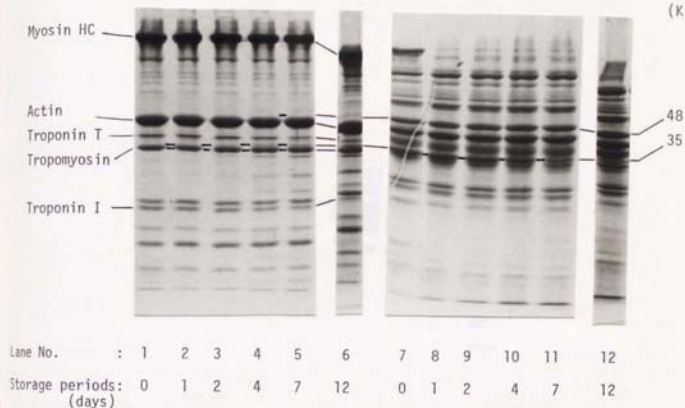
Mr
(K)

Fig. 64. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of myofibrillar proteins and sarcoplasmic proteins prepared from rabbit muscles stored at 0°C.

Amounts of proteins applied to 12.5 % polyacrylamide gels were 13 μ g for lanes 1-5 and 7-11, and 26 μ g for lanes 6 and 12.

Lanes 1-6 show myofibrillar proteins.

Lanes 7-12 show sarcoplasmic proteins.

McCormick ら [181] がブタ骨格筋の筋漿タンパク質を SDS-ゲル電気泳動で同定した結果から、ウサギ骨格筋の筋漿タンパク質の種類を推定すると、35,000 Da 成分はグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) であると推定される。ちなみに、48,000 Da 成分はエノラーゼであらう。

GAPDH による筋原線維の Mg -ATPase 活性増加は、経時的に起こりしかも pH に依存していることから、その機序は次のように考えられよう。本来、水溶性である GAPDH は、肉の極限 pH である 5.0 付近での酸により徐々に変性して筋原線維に結合する。この結合には塩基性タンパク質である GAPDH の正電荷と酸性タンパク質であるアクチン、ミオシンの負電荷が促進的な効果を持つと考えられる。筋原線維に結合した GAPDH は、 Mg -ATP を添加したときにアクチン-ミオシン間の結合を切れにくくしたり、あるいは一旦切れたものを再結合しやすくするなどの、いわば接着剤のような役目を果たすこ

とにより、透明化の状態を抑制すると考えられる。これにより低活性のミオシン型 $ATPase$ の状態よりも、高活性のアクトミオシン型 $ATPase$ の状態が優勢になり、一定時間内での ATP の分解量が増加するのであろう。

Ⅲ 筋原線維 Mg - $ATPase$ 活性に対する塩基性タンパク質とフロテイナーゼの協働作用

以上のように塩基性タンパク質を作用させ、筋原線維では、 $0-0.1M$ の低い KCl 濃度での Mg - $ATPase$ 活性のみならず、 $0.1M$ 以上の高い KCl 濃度での活性をも増加させる。このため KCl 濃度依存性の増大はあまり顕著ではなかった。したがって、食肉熟成中に起きる筋原線維の低い KCl 濃度での活性の増加と活性の KCl 濃度依存性の増大がこの塩基性タンパク質のせいで引き起こされると考えるのは難しい。よって、 $0-0.1M$ KCl での活性の増加は塩基性タンパク質が引き起こし、 KCl 濃度依存性の増大はⅡと同じく Ca^{2+} の作用が引き起こすとい

う両者の協働作用を推定し、これを実証するため実験を行、く。

まず、R4をpH5.5において25℃で18時間作用させて、0-0.15MKCl濃度全域でのMg-ATPase活性を増加させた筋原線維に、引き続き数段階に濃度を変えてpH5.5で粗カテアロシン調製物を作用させた。その結果、Fig.65に示すように低濃度のカテアロシン (α -Phe-Arg-MCA 分解活性が $0.83 \mu\text{mol AMC/min}/\mu\text{l}$) を作用させたものでは、カテアロシンを作用させないもの比べて0-0.1MKClでの高い活性をほぼ維持したまま0.1-0.15MKClでの活性が減少してKCl濃度依存性が増大した。これとR4とカテアロシンのいずれも作用させていないものとの筋原線維と比較すると、R4とカテアロシンを連続して作用させることにより、0-0.1MKClでの活性が増加したのに対し、0.1-0.15MKClでの活性はあまり増加せず、活性のKCl濃度依存性が増大したとみることが出来る。これは食肉熟成中の筋原線維のMg-ATPase活性の変化と極めて似ている。したがって、食肉熟成

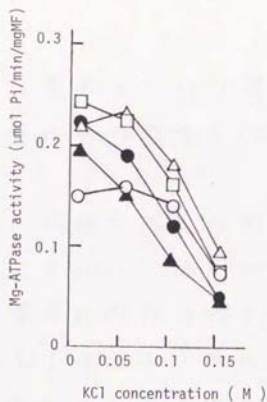


Fig. 65. Effects of crude cathepsin treatment on Mg-ATPase activities of myofibrils pretreated with R4

Conditions of R4 treatment: Myofibrils(MF, 5 mg/ml) were incubated with or without R4(shown in Fig. 56, 3.7 mg/ml protein) in 5 ml of solutions containing 75 mM sodium acetate buffer(pH 5.5), 3 mM DTT, 1 mM EDTA, 0.08 M KCl and 10 mM Na_3N at 25°C for 3 h. After incubation, 20 ml of 0.16 M KCl/5 mM Na_3N were added to the incubated mixtures and centrifuged at 21,000xg for 10 min and then 20 ml of the supernatants were discarded. The residues were resuspended with 20 ml of 0.16 M KCl/5 mM Na_3N and centrifuged at 21,000xg for 10 min and then 22.5 ml of the supernatants were discarded. Then, the residues were used for crude cathepsin-treatment.

Conditions of crude cathepsins treatment: Myofibrils(5 mg/ml) preincubated with (Δ , \square , \bullet , \blacktriangle) or without(\circ)R4 were incubated with crude cathepsins (specific activity against Z-Phe-Arg-MCA, 0(Δ , \circ), 0.83(\square), 1.7(\bullet) and 2.5(\blacktriangle) nmol AMC/min/ml) in the presence of 50 mM sodium acetate buffer (pH 5.5), 3 mM DTT, 1 mM EDTA, 0.08 M KCl and 7.5 mM Na_3N at 25°C for 18 h. After incubation, the samples were diluted five times, being made to 20 mM and 1 mM with respect to Tris-HCl buffer (pH 8.0) and CaCl_2 , respectively. Mg-ATPase activities of the treated myofibrils were measured as in Fig. 36.

中にも塩基性タンパク質とカテプシンの協働作用で Mg -ATPase 活性の変化が起こる可能性が示された。

他方、同様に R4 を作用させた筋原線維にカルパインを pH5.5 で作用させたが、 Mg -ATPase 活性の KCl 濃度依存性は増大した (Fig. 66)。これは 1) で示したようにカルパインの作用が pH5.5 で小さいためであろう。したがって、食肉熟成中での筋原線維の Mg -ATPase 活性の変化への寄与は小さいと推察された。しかし、肉中のカルパインの活性量を正確には推定できない現状では、この結果によってカルパインの寄与を完全に否定するのは不適当であろう。

したがって、以上の結果より、食肉熟成中には、筋原線維に対して塩基性タンパク質が結合することにより低 KCl 濃度における Mg -ATPase 活性が増大し、カテプシン D、L、カルパインなどのプロテアーゼが作用することにより Mg -ATPase 活性の KCl 濃度依存性が増大すると結論した。

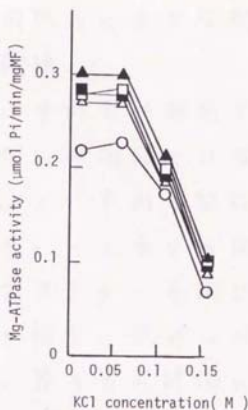


Fig. 66. Effects of calpain treatment on Mg-ATPase activities of myofibrils pretreated with R4.

Conditions of R4 treatment were the same as in Fig. 65. Conditions of calpain treatment: Myofibrils (MF 5mg/ml) preincubated with (Δ , \square , \blacksquare , \blacktriangle) or without (\circ) R4, shown in Fig. 56, were incubated with calpain II (specific activity against casein, 0 (\circ , Δ), 0.25 (\square), 0.49 (\blacksquare) and 0.74 (\blacktriangle) $\Delta OD_{280}/h/ml$) in the presence of 50 mM sodium acetate buffer (pH 5.5), 3 mM DTT, 1 mM $CaCl_2$, 0.08 M KCl and 7.5 mM NaN_3 at 25°C for 18 h. After incubation, the samples were diluted five times, being made to 20 mM and 1 mM with respect to Tris-HCl buffer (pH 8.0) and $CaCl_2$, respectively. Mg-ATPase activities of the treated myofibrils were measured as in Fig. 36.

第II章 食肉熟成による生鮮香気の発生とその機構

柳[1]は牛肉では豚肉や鶏肉に比べて熟成中の味の向上が明確ではないことを報告した。また、牛肉の熟成による風味向上ではテクスチャーと香りの向上が期待される。確かに、テクスチャーの向上は序論で述べたように多くの報告で認められており、本研究の第1章第1節の官能評価によ、これも検証された。

しかし、熟成中の香りの向上については統一した結論に至、ていない。牛肉の香りのうち、加熱調理後の肉の香気は比較的良く調べられており、熟成により芳香が生じる[10, 11]、香気が増強される[14]という結果を示す報告がある一方で、熟成による香りの向上を否定する結果を示す報告[15]もある。他方、加熱調理前の生肉の香気、すなわち、生鮮香気と調べた報告は少ない。わずかにと殺直後に乳酸臭や血液臭がするとは報告されてい

る[11]が、これらの香気が熟成によりいかに変化するかは明らかにされていない。

そこで本章では牛肉の熟成による生鮮香気の変化を官能評価ならびに実施調査により、究明し、芳香が生成することをも明示することにした。さらにその芳香の主因と考えられる特徴ある生鮮香気(熟成香; ジュクセイカ)の生成機構の大筋を示した。

1. 牛肉の熟成による生鮮香気、熟成香の生成

〈結果と考察〉

1) 牛肉の熟成による生鮮香気の変化

ホルスタイン種の去勢肥育牛2頭のロイン部(胸最長筋)をと殺後0-4℃に2日間放置して最大硬直期を経過させたのち、その一定部位を縦に等分割し、それぞれが700g前後の肉塊とした。その一方を0℃に18日間貯蔵し(冷蔵肉)、他方は-20℃に15日間凍結貯蔵した

のろ 0°C に3日間置いて解凍した(冷凍肉)。
このとき、牛肉は肉汁の温度においても酸
素透過性の高いポリエチレンの袋に入れ含気
貯蔵した。

このようにして得られた冷蔵肉と冷凍肉の
加熱前の匂いと嗅いざ結果、前者には甘い豊
かな香りが感じられ、後者にはそうして
香りは感じられず、血液臭のみが感じられた。

さらに両者を加熱したのろ香味(flavor)に
ついて2点嗜好試験法による官能評価を行
った。未訓練の大学生11人のパネラーによる99
回の試験の結果、Table 14に示すように、冷蔵
肉が有意に優れていることが明らかにな
った。冷蔵肉では加熱後にも加熱前に感じられ
た甘い豊かな香りが明らかに残存していた。
加熱後の肉を嗅覚を遮断して評価しても冷蔵肉と
冷凍肉の間の味の差は感知できなかつた。こ
れから、加熱後に残存する甘い豊かな香りが
冷蔵肉の香味が優れていることの主要因であ
ると推定された。この芳香は熟成によつて生
成する。

Table 14. Flavor of beef loins after storage.

Numbers of samples judged to be preferable		
0°C-stored beef ^a	Frozen beef ^b	Difference
64	35	**

Significant differences were indicated with ** ($P < 0.01$).

Cattles #1 and 2 were used.

a: stored at 0°C for 18 days after 2 days postmortem.

b: stored at -20°C for 15 days after 2 days postmortem
and then thawed at 0°C for 3 days.

る香りであることから、熟成香（じゅくせい
か）と命名した。この熟成香は、牛肉を生食
する場合、例えば、牛肉のステーキやタルタル
ステーキの場合に特にその効果を発揮すると
考えられるが、ここでも示されたように、加
熱後の肉にも残存して充分にその良好な風味
形成に寄与すると考えられる。

Caulら[10]、Wilsonら[11]および Weir[12]は熟成牛肉
を加熱調理したものにほ甘い香りや芳香が感
じられると報告している。彼らは、生肉の持
つ生鮮香気と加熱して初めて生成する加熱香
気の両方を含む、加熱調理肉の香気と調べた
あり、生鮮香気のみを調べたわけではないが
明確なことは言えないが、彼らも感知した
ものには熟成香も含まれているかもしれない。

CoppockとMacLeod [14]も熟成による加熱調
理肉の香気の変化を調べている。彼らは1個
体の牛肉のサーロインを4分割し、それぞれ
を0, 2, 3, 4週間0-3℃で真空包装して
貯蔵した。貯蔵後の試料は-18℃で凍結してあ

ま、4つの試料がそう、ところで解凍し、脂肪を除いて加熱し、香氣成分をドゥイアイスアセトンでコールドトラップし、これを評点法で官能評価した。その結果、熟成により加熱調理肉の香氣が増強され、香りの質についても甘さとバター様の香りが増す傾向にあることを認めている。しかし、彼らは牛肉を真空包装して貯蔵しているためこの変化は熟成香とは別な加熱香氣の増強である可能性が高いと考えられる。こう考える根拠となる真空包装が熟成香に与える影響については次節において説明したい。

一方、Minks と Stringer [3]、Fieldら [2] および Parrish ら [13] は牛肉を熟成させても加熱調理肉のフレーバーは向上しないと報告している。彼らは味と香りを区別しないとフレーバーとして官能評価している。柳 [1] が報告したように牛肉の味に限るとその熟成による向上は明確ではないため、フレーバーのうち味に重きを置いて評価するとフレー

バーの向上を否定する結果にも可能性が高い。したがって、彼らのフレーバー向上の否定の結果は必ずしも熟成による香りの向上を否定するものにはならないであろう。

地方、HoodとAllen[15]は牛肉を2と7日間と21日間貯蔵し、加熱したのち、とらの香気を評点法により官能評価した結果、7日間貯蔵肉と21日間貯蔵肉とは香気に差がないことを報告している。彼らの場合、評価者の経験値と基準にのみ評点法で評価したことや、生鮮香気ではなく加熱調理肉の香気を評価したこと、熟成香の生成を明確に把握できなかった原因になつていふかもしれない。この点、本研究では、第1章のテクスチャー向上と調べたときと同様に、同一個体の牛肉を2分し、それぞれを冷蔵あるいは冷凍し両者を比較するという、熟成による変化を識別しやすい方法を用いていることと、加熱調理肉の香気ばかりでなく生鮮香気も比較したことによつて熟成香の生成を感知できたと考えられる。な

り、以後の実験では加熱によ、て優勢となる加熱香氣の影響を排除するため生鮮香氣のみを調査した。

熟成者の生成が実際に流通している牛肉に認められるかどうかを調査した。

高級ステーキ店（銀座モリス）にて供された和牛ステーキ（焼き加減はレアあるいはミディアムレア）には先の実験で示されたものと同種の熟成者が認められるものがあった。同店シェフ（森 寿一郎氏）からの聞き取り調査の結果、その香りは経験的に以下に述べる方法で貯蔵した和牛肉に生じる場合があり、甘い乳臭として認知され、その肉の商品価値を高めていることが判明した。その貯蔵方法とは、と殺後の和牛ロイン部を肉表面と同程度の水分を含んだ布製ミートウップで包み、1日に1~2回ミートウップを水道水で洗浄して包みなおし、間接冷却型冷蔵庫内に置いて1~2週で1週間以上貯蔵可能というものである。なお、このときには含気貯蔵である

ことは言うまでもない。以上のことはノウハラであり、その所有権は保護するとの了解で聞き出すことができた。

他方、市販の国産牛肉（ホルスタイン種肥育牛のもの）と和牛肉のサーロインステーキを入手し、それぞれ生鮮香氣と加熱調理後の香氣を調べた結果、前者には比較的強く、後者には弱く^{感じ}感じられた。このように熟成者の強さの差があるのは、熟成者生成に充分な期間貯蔵したか否か、また、その貯蔵の条件が熟成者生成に適していたか否か（例えば、真空包装の有無）によつて熟成者の生成程度に差が生じるためであろう。熟成者の生成に適した条件については熟成者の生成機構と関係するため、第2節において議論したい。

2) 豚肉および鶏肉の熟成による生鮮香氣の変化

熟成者は牛肉に特有のものであるだろうか。この疑問を解決するため、市販の豚ばう肉と

鶏胸肉を0℃で21日間冷蔵し、それらの生鮮香気調べた (Table 15, 16)。その結果、豚肉には若干の腐敗臭とともに牛肉の熟成香と類似の芳香が感じられ、酸化臭は特に感じられなかつた。一方、鶏肉には生ぐさい臭が感じられ芳香は感じられなかつた。本結果は、豚肉には牛肉と共通の熟成香の生成系が存在するが鶏肉には存在しない可能性を示唆している。

豚肉はHarrisonら[7]が2℃で12日間、Bennetら[6]が0-4℃で6日間貯蔵した結果、いずれもその加熱調理後のフレーバーは向上しないと報告している。しかし、この場合、味と香りを区別しないフレーバーを評価しており、香りのみの変化は明確でないため、これらの報告によつて熟成香の生成を否定するのは妥当ではないだろう。また、彼らの報告では貯蔵の日数が短かく熟成香の生成に不充分であり、その可能性や不適当な条件 (Harrisonら[7]は真空包装して貯蔵している) で貯

Table 15. Development of the conditioned meat aroma in pork berries.

Three pork berries were stored in air at 0°C for 21 days.

Five panelists judged whether the conditioned meat aroma developed in the berries or not.

Numbers of judgements	
Developed	Undeveloped
15	0

Table 16. Development of the conditioned meat aroma in chicken thighs

Three chicken thighs were stored at 0°C for 21 days in air.

Three panelists judged whether the conditioned meat aroma developed in the thighs or not.

Numbers of judgements	
Developed	Undeveloped
0	9

成したために熟成香が生成しにくが、可能性もあるだろう。

2. 牛肉の熟成香の生成機構

〈結果と考察〉

前節において明らかにされた牛肉の熟成香は生鮮香気であるためにその生成機構は加熱香気のものとはかなり異な、ということが予想される。肉の加熱香気の生成機構については序論にも述べたように多くの研究がなされているが、生鮮香気の生成機構についてはほとんど研究がなされていない。そこで本節では生鮮香気である熟成香の生成機構を明らかにするためにその生成条件について検討を行なう。

1) 熟成香の生成に対する酸素の必要性

現在の牛肉の流通に用いられている真空包装が熟成香の生成に影響を与えていることは

けいかと予想した。なぜならば、次章で述べるように熟成者の不足した輸入牛肉はいずれも真空包装されたところからである。そこでホルスタイン種経産牛(4頭)のロイン部を2分し、一方を酸素透過性の高いポリエチレンの袋に入れ含気包装し、他方は酸素透過性の低い厚さ50 μ mのナイロンビニロン積層フィルム製の袋に入れ真空包装し、それぞれを0℃で25日間貯蔵した。貯蔵後に7人のパネラーがそれぞれ4組の試料の熟成者の強さを比較した結果、Table 17に示したように、28回の判定中24回で含気貯蔵の方が脱気貯蔵より熟成者強いと判定された。また、同様に牛肉ロイン部を2分し、一方を開放がうす容器に入れ、他方を脱酸素剤(三菱瓦斯化学社エージレスSS-200)のない、に密閉がうす容器に入れ4組に8日間貯蔵した。貯蔵後に3人のパネラーがそれぞれ2組の試料の熟成者の強さを比較した結果、Table 18に示したように6回の判定すべてにおいて脱酸素剤のない方が熟成

Table 17 Strength of the conditioned meat aroma of beef loins stored in air or vacuum.

Cattles #9,10,11 and 12 were used.

After beef loins were cut in half, one portions were stored in air and the other portions were in vacuum at 0°C for 25 days.

Aroma evaluation was performed by seven panelists.

One panelist judged four pairs of samples.

Strength of the conditioned meat aroma	Numbers of judgements
In air > In vacuum	24
In air = In vacuum	4
In air < In vacuum	0

Table 18. Strength of conditioned meat aroma of beef loins stored with or without oxygen absorbers.

Cattles #9 and 10 were used.

After beef loins were cut in half, one portions were stored with Ageless SS-200s(oxygen absorbers) and the other portions were without them at 4°C for 8 days.

Aroma evaluation was performed by three panelists.

One panelist judged two pairs of samples.

Strength of the conditioned meat aroma	Numbers of judgements
Without Ageless > With Ageless	6
Without Ageless < With Ageless	0

香が強いと判定された。これらの結果より熟成香の生成には酸素が必要であり、真空包装により酸素が遮断されると熟成香の生成が抑制されること明らかになった。Coppock と MacLeod [14] は真空包装して貯蔵した牛肉で、加熱調理肉の香気の増強を認めている。しかし、本結果から推定すると彼らが把之に变化は熟成香の生成とは無関係である可能性が高い。おそらく熟成により、アミノ酸やペプチドなどの前駆体が増加したことによる加熱香気の量的な増強であろう。

真空包装は牛肉の熟成中の好気性細菌の繁殖を抑えることによりその食品としての安全性を保つとともに、ミオグロビンの酸化によるメト化を抑制することによりその外観を良好に保つという目的のために行われている。このようにして牛肉の流通においてシエルパウイフを延長するという利益をもたらす真空包装が、牛肉の風味については熟成香の生成抑制という不利益をもたらしていると考え

られる。

2) 熟成香の生成に対する赤身と脂身の必要性

熟成香の前駆物質の手がかりを得るために、牛肉の筋肉部（赤身部）と脂肪部（脂身部）の熟成香生成に果たす役割を調査した。牛肉ロイン部を脂身と赤身の共存部、赤身部、脂身部の3つに分けて0℃で24日間含気貯蔵した。貯蔵後に、脂身と赤身の共存部と赤身部の熟成香の強さを、6人のパネラーがそれぞれ4組の試料を判定して比較した。Table 19に示したように24日の判定のうち17回で脂身と赤身の共存部の方が熟成香が強いと判定された。他方、同様にして、赤身部と脂身部と比較した結果、Table 20に示したように24日の判定のうち赤身部の方が強いと判定されたものが9回、脂身部の方が強いと判定されたものが8回、両者同じと判定されたものが7回である。ただし、脂身部には腐敗臭も感じら

Table 19. Strength of the conditioned meat aroma of leans stored with or without fats.

Cattles #9,10, 11, and 12 were used.

Leans from beef loins were stored with or without fats in air at 0°C for 24 days.

Aroma evaluation was performed by six panelists.

One panelists judged four pairs of samples.

Strength of the conditioned meat aroma	Numbers of judgements
With fats > Without fats	17
With fats = Without fats	7
With fats < Without fats	0

Table 20. Strength of the conditioned meat aroma of stored leans and fats.

Cattles #9,10,11 and 12 were used.

Leans and fats from beef loins were stored in air at 0°C for 24 days.

Aroma evaluation was performed as in Table 19.

Strength of the conditioned meat aroma	Numbers of judgements
Leans > Fats	9
Leans = Fats	7
Leans < Fats	8

と云。これらの結果より熟成香は脂身と赤身の共存部で多く生成可能なことが明らかにされた。赤身部、脂身部それぞれにも多少熟成香が生じたりは、赤身部には脂肪交雜があり、脂肪部にも完全に除去できないが、赤身の一部が残存していつからであろう。したがって、本結果より、熟成香の生成機構としては脂身の脂溶性物質と赤身の水溶性物質との直接的な反応、脂身と赤身の接触面における酵素あるいは微生物の作用による脂溶性物質の変化あるいは脂身と赤身それぞれから独立して生成可能な物質の混合や二次的な反応などの可能性が考えられるだろう。

3) 熟成香の生成に対する微生物の関与

熟成香の生成に対して微生物が関与するの否かを明らかにするために、静菌剤の熟成香生成に対する影響を調べた。牛肉ロイン部を4つに分け、1つはそのままで（対照区）、他の3つにはそれぞれ2000 ppm のラウリン酸

コール水溶液、10mM NaN_3 水溶液あるいはエタノールを噴霧した（各処理区）のうち、0℃で24日間含気貯蔵した。貯蔵後、対照区と処理区の熟成者の強さを6人のパネラー¹の試料を判定して比較した。その結果、Table 2に示したように、12回の判定のうち、11回はクロウムフェニコール処理区の熟成者は対照区のものより弱いと判定され、クロウムフェニコール処理区より熟成者の生成が²顕著に抑制されたことが明らかになった。他方、 NaN_3 処理区では肉の一部が³緑変し、脂肪の酸化臭が強く感じられ、ミオグロビンと NaN_3 の反応を介した脂肪の酸化が示唆された。また、アルコール処理区ではアルコールそのものの香気が強く熟成者の生成は判別できなかったが、リンゴに似たエステル臭が⁴あるというコメントを⁵するパネラーもいた。

以上の結果より、熟成者の生成には微生物が関与していることが明らかとなった。

食肉の微生物の香気成分への関与について

Table 21. Effects of chloramphenicol treatment on the development of the conditioned meat aroma of beef loins.

Cattles #9 and 10 were used.

After beef loins were cut in half, one portions were sprayed with 2,000 ppm chloramphenicol solution and the other portions were not. Then, they were stored in air at 0°C for 24 days.

Aroma evaluation was performed by six panelists.

One panelist judged two pairs of samples.

Strength of the conditioned meat aroma	Numbers of judgements
Untreated > Treated	11
Untreated = Treated	1
Untreated < Treated	0

は、いくつか報告されている。SmithとAlford [185] は牛肉で優勢な菌種である *Pseudomonas fragi* がアルカナル、アル 7-2-エナル、アル 7-2-オンを生成し、アル 7-2.4-ジエナルを分解することを示し、Bothastら [186] は *Staphylococcus aureus* がアルカナルとアル 7-2-エナルを分解することを示した。これらのカルボニル化合物の具体的な香気特性は明らかではないが、Sinkら [187] はこれらの微生物の作用により牛肉熟成中のカルボニル化合物の消長を説明できるとしている。また、食肉加工品のドゥーソーセージ [188] や発酵ソーセージ [189] にスターターとして添加される微生物は種々の特徴的香気物質の生成に関与することが報告されている。したがって、牛肉熟成中に自然に繁殖した微生物が熟成香のような特徴的香気生成に関与、たとえとも何ら不思議ではない。

熟成香生成に関与する微生物は、原核生物の 50S リボソームに選択的に結合して 9-10

の質合成を阻害するクロラムフェニコールにより生育が抑制されることから、細菌類であり、少なくともカビではないと考えられる。Kotulaら[190]は牛肉にカビの一種である *Thamnidium elegans* を接種して熟成と短縮する方法を報告しているが、そのとき生じる香りは熟成香とは異なるものであろう。

また、熟成香生成に酸素が必要であることからその微生物は好気性あるいは通性嫌気性であることが強く推定される。しかし、酸素は微生物の生育ばかりでなく、その代謝系の一部の熟成香生成反応そのものにも酸化あるいは酸素添加反応として関与する可能性もあるだろう。また、熟成香生成反応そのものに脂肪の自動酸化反応が含まれている可能性も完全には否定できない。微生物の代謝産物が自動酸化する可能性もあるだろう。しかし、熟成香はいわゆる脂肪の自動酸化のせいによる酸化臭とは質的に全く異なることを記しておきたい。熟成香生成に脂身と赤身の共存部

適しているのは、赤身中のアミノ酸や糖などを栄養源として微生物が生育し、それが脂身の脂肪を代謝して熟成香を生成していることを示しているのがおもしろい。

4) 熟成香生成系の簡略化の試み

熟成香生成に関与する微生物の分離・同定は今後の重要な課題として残されているが、これを解決するには熟成香生成系を簡略化する必要がある。そこでそれを試みた。

先にも述べたように、目的微生物は赤身中成分を栄養源とし、脂身と赤身の接触部付近で生育して熟成香を生成するという仮説を立てた。これにむとづき次のような反応系を組み立てた。脂身と殺菌を兼ねて沸騰浴中で5倍量以上の水とともに20分間加熱して溶解し、上層に浮いた脂肪を採取した。これにアルコールで殺菌してから乾燥させ、濾紙を浸漬してから取り出して冷却し、脂肪を濾紙中に固定

した。一方、赤身は2倍量の水とホモジナイズし、 $10,000 \times g$ で20分間遠心して菌を含むと想定される上清を採取し、これも殺菌した濾紙に浸み込ませた。脂肪を浸み込ませた濾紙と赤身抽出液を浸み込ませた濾紙と互いに張り合わせた状態、あるいはそれぞれ単独の状態の合計3つの状態で殺菌したシャーレの中に置いて4℃で2-4週間貯蔵し、生成する生鮮香気と人のパネラーにより調べた。その結果、3つの貯蔵状態により生鮮香気は異なる変化を示した。脂肪のみでは何ら香りを生じなかった。赤身抽出液のみでは汗臭または腐敗臭が生じた。汗臭は香気物質標品との比較からジアセチルあるいはアセトインが原因物質であると考えられた。脂肪と赤身抽出液を接触させたものでは、汗臭も生じたが、別のヒト体臭様の香りが生じた。しかし、いずれにおいても熟成香と同じものは生じなかった。この結果の原因としては、脂肪を加熱したことにより何らかの必要な因子が除かれたが、ある

いは破壊されてしまふ、云々。赤身抽出液に必要な微生物が捕集できなかつた、云々などが考えられるだろう。また、反応の場としてこのような濾紙に浸み込ませた状態が適している可能性があろう。

5) 熟成香を呈する本体物質の検索

熟成香を呈する本体物質については、各種の香気物質標品と比較を行つて推定を試みた。特にバターの香気へ重要とされるジアセチルとアセトイン、甘いこくのある香りが特徴的なラクトン類（肉の加熱香気成分の α -オクトラクトン、 ϵ -デカラクトン、 δ -デカラクトン、ココナッツ様香気を持つ γ -ナラクトン、モモの香気成分の ϵ -ウンデカラクトン）、カラムルの香気成分で甘い香りを持つマルトールとシクロテンなどと比較した結果、いずれも単品で熟成香と同一の香りを有するものではないが、また、ジアセチルやアセトインとラクトン類と1:1で混合したものと比較し

てみたがやはり熟成香とは異なっていた。熟成香には複数の香気物質が関与する可能性もあり、それらを分離し同定することが今後の重要な課題として残された。

3. 総合考察

以上の結果より、牛肉は熟成により確実に香りが向上し、それは生鮮香気である熟成香の生成が主因であることが明らかにされた。しかも、その香気生成には好気性あるいは通性嫌気性の微生物が関与することが明らかになった。本研究は熟成香の香気成分とその生成に関わる微生物を分離・同定するに至、していないが、その香気の生成条件を確定したことは実際の牛肉の取り扱いに大きなインパクトを持つと考えられる。なぜならば、熟成香生成に酸素が必要であるということは、現在主流を占める真空包装による牛肉の流通に大きな問題を提示することになるからである。すなわち、これを以て通り真空包装によるジェ

ルフライの延長をとるか、含気包装による熟成者の生成をとるかという二者択一を迫ることになる。現時点では真空包装により流通コストを下げ、風味では劣るが安価な牛肉を供給する方向と、含気包装で貯蔵条件を制御しつつ熟成者を充分生成させてコストはかかるが高品質な牛肉を供給する方向の2つを設定し消費者に選択の余地を残すことが妥当な解決策であろう。

他方、牛肉の熟成者に類似した香りを持つ豚肉にも生じることが示されたが、これは熟成者の生成機構解明の上で牛肉と豚肉を比較して研究するという道を開いたばかりでなく、豚肉そのものの熟成についても再考を必要とすることと提示したことになる。

第三章 食肉の熟成効果発現に及ぼす凍結貯蔵（冷凍）の影響

これまでに、熟成された冷凍牛肉は熟成されたいない冷凍牛肉に比べてテクスチャーは軟らかく、香りが良好であることと明らかにした。冷蔵肉ではミ線の脆弱化とMg-ATPase活性の特徴的な変化に反映される筋原線維構造の変化が、軟らかいテクスチャーに結びついていると考えられる。また、熟成香という芳香の生成が良好な香りにつながり、これと考える。一方、冷凍肉ではこれらのテクスチャーと香りの向上につながり変化が抑制されていることが示された。

近年、わが国では国外産の牛肉の輸入量が増加している。その多くは凍結貯蔵（冷凍）牛肉として輸入されている[167]。ところが、その冷凍輸入牛肉は国産の牛肉よりも不味であるという消費者のアンケート結果がある[168]。その原因は一般には肥育和牛に代わられる肉質の高度な軟らかさと脂肪交雑が輸

入牛肉には乏しいことにあると考へられたい。しかし、原因の全てがこれにあるのではない。一部は冷凍輸入牛肉において非凍結牛肉で認められる肉質の軟化や香味向上といふ、成熟効果が十分に発現していないことにある可能性が残されている。また、そうであるならば、冷凍輸入牛肉を解凍後に追加熟成させることによりその風味を向上させる可能性が残されることになる。しかし、これらの可能性についてはこれまで調べられていない。

よこす本章では、まず第1節で冷凍輸入牛肉を調査する前段として、熟成前に冷凍した国産の牛肉を、解凍後に冷蔵したときのテクスチャーと香りについての熟成効果の発現度を調べた。次に第2節で実際に流通している冷凍輸入牛肉の解凍時点での熟成効果の発現度を調査し、その風味改良に対する解凍後熟成の有効性について検討した。

1. 冷凍牛肉の解凍後冷蔵によるテクスチャーと香りの変化とその要因

1) 冷凍牛肉の解凍後冷蔵によるテクスチャーの変化とその要因

<結果と考察>

ホルスタイン種経産牛のロイン部を2分し、一方は -20°C で58日間冷凍したのを、 4°C で2日間置いて解凍し、他方は -20°C で44日間冷凍したのを 4°C で2日間置いて解凍してから 0°C で14日間貯蔵した。このようにして得られた前者を冷凍肉と呼び、後者を解凍冷蔵肉と呼ぶ。両者を加熱したのを軟らかさについて2点嗜好試験法による官能評価を行、た。未訓練の大学生11人のパネリストによる44回の試験の結果、Table 22に示すように、解凍冷蔵肉が有意に軟らかいことが示された。しかし、解凍冷蔵肉は第I章で調べた一度も冷凍していない冷蔵肉に比べて口あたりが粗いとコク

Table 22. Effects of 0°C-storage after thawing on the tenderness of frozen beef loins.

Numbers of samples judged to be preferable		
Frozen beef ^a	0°C-stored thaw-beef ^b	Difference
13	31	*

Significant differences were indicated with * ($P < 0.05$)

Cattles #5,6,7 and 8 were used

a: stored at -20°C for 58 days after 2 days postmortem and then thawed in 4°C-air for 2 days.

b: stored at -20°C for 44 days after 2 days postmortem and thawed in 4°C-air for 2 days, and then stored at 0°C for 14 days.

ントあるパネリストがいる。

このような解凍後の冷蔵中の肉質の軟化に
対応して筋原線維の構造変化は冷凍を経験し
ていない肉の場合と同様に起きているのであ
ろうか。そこで、以下の解凍後冷蔵中の筋原
線維の脆弱度とMg-ATPase活性の変化を調べた。

筋原線維の脆弱度はその小片化率で測定し、
Table 23 に示した。解凍後の14日間の冷蔵中に
小片化率は約39%から60%へ増加し、筋原線
維のZ線が脆弱化していることが明らかであ
る。冷凍中には筋原線維のZ線が脆弱化しな
いことはすでに第1章で示した。

筋原線維のMg-ATPase活性の変化はFig. 67に示
した。解凍後の14日間の冷蔵中に、それはほ
とんど変化しなかった。試料によつては低KCl
濃度での活性が多少増加するものもあり、だが、
その増加の程度は第1章で示した一度も冷凍
していない冷蔵肉に比べて小さいが、。

これらの結果より解凍後の冷蔵中には筋原
線維のZ線は脆弱化して肉質の軟化を反映す

Table 23. Changes in fragmentation rates of myofibrils during the storage of thaw-beef loins.

Cattle number	Storage time after thaw (days)	
	0	14
	%	%
#5	36.6	51.4
#6	41.6	69.2
Average	39.1	60.3

Storage condition: stored at -20°C for 44 days and thawed in 4°C -air for 2 days, and then stored at 0°C .

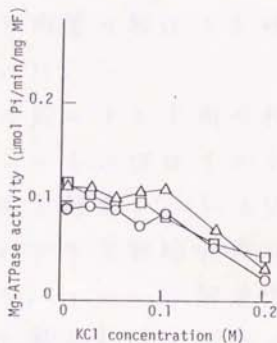


Fig. 67. Changes in Mg-ATPase activities of myofibrils at various KCl concentrations during storage of beef loins at 0°C after -20°C-storage.

The loins of the cattle #3 were stored at -20°C for 50 days after 2 days postmortem, thawed in 4°C-air for 1 day, and then stored at 0°C for 0 (○), 7 (△) and 14 (□) days. The Mg-ATPase activities of myofibrils(MF) were measured as in Fig.1 except that the incubation time was 10 min.

るが、筋原線維の Mg -ATPase 活性は変化しにくく、必ずしも肉質の軟化を反映しないことが明らかになつた。

解凍後冷蔵による牛肉の軟化は Cohen [164] も報告している。彼はイスラエルに輸入された冷凍牛肉を解凍し、 $5-6^{\circ}C$ に 2-9 日間貯蔵することにより官能的に軟らかくなることを認めている。しかし、解凍後冷蔵中の筋原線維の小片化率の変化は試料により異なり、小片化率が徐々に増加するものもあり、小片化率が低いままあまり変化しないものや小片化率が最初から高くあまり変化しないものがあり、必ずしも肉質の軟化を反映しないと報告している。彼は小片化率が最初から高いものについては、凍結そのものによる筋原線維の脆弱化が原因であると考察しているが、小片化率が低いままあまり変化していないものについては明確な説明をしていない。これはおそらく、本研究とは異なり彼らが筋原線維の懸濁液の濁度をもって小片化率としている

ることには原因があると考えられる。すなわち、非凍結肉では筋原線維が脆弱化して小片となり懸濁液中に分散すると濁度が上昇するので、解凍冷蔵肉では、筋原線維が脆弱化しても、凍結変性により小片同士が凝集して分散しにくくなるために濁度が上昇せず、その結果小片化が低いまま変化しないことになるのであろう。

解凍後冷蔵中の筋原線維の Mg -ATPase 活性が変化しにくくことは本研究により初めて示された。これは Mg -ATPase 活性を担うアクトミオシン自身あるいは第 I 章第 3 節で明らかにした Mg -ATPase 活性を変化させる因子がともにタンパク質であることから、いずれかが凍結変性により損傷されたことが原因であろう。アクトミオシンの凍結変性の原因を求める場合も、凍結変性により活性低下するようなアクトミオシンの活性中心が構造変化したと考えられるのはおかしい。なぜならば、第 I 章第 1 節で示したように冷凍そのものの Mg -ATPase

活性は低下しないからである。したがって、 Mg-ATPase 活性を変化させる因子の作用を受けにくい構造に変化したと考えるべきであろう。他方、 Mg-ATPase 活性を変化させる因子の凍結変性の原因を求めた場合には、プロテイナーゼについて変性による活性の低下が考えられ(本論文では示さないが、カテプシンBは牛肉の凍結貯蔵により一部失活することが確認された)、塩基性タンパク質については pH 5.7 付近の酸で変性した場合とは異なる、 Mg-ATPase 活性を増加させることができない構造に変化したと考えられるだろう。いずれの損傷が Mg-ATPase 活性が変化しにくくする原因であるにしても、このようなタンパク質の凍結変性による損傷が、官能評価における解凍冷蔵肉の口おわりの悪さの一因であろう。

本項で得られた結果により、熟成前に冷凍した牛肉は解凍後に冷蔵することがよりその肉質を軟化させることができると明らかになった。また、本項で得られた結果と第 I

章第1節の冷蔵肉での結果とあわせて考察すると、口当たりを良好に保、この状態で、可なり、冷蔵に付、この肉質が軟化した場合に、筋原線維のミミ線、脆弱化はもとより Mg -ATPase 活性の特徴的变化が必ず起きることが明らかである。さらには、冷凍牛肉について、それが熟成前に凍結したものと、熟成後に凍結したものとを判定するための指標の一つとして筋原線維の Mg -ATPase 活性が使用できることも明らかとな、た。

2) 冷凍牛肉の解凍後冷蔵による香りの変化とその要因

< 結果と考察 >

1) この貯蔵した冷凍肉と解凍冷蔵肉は加熱したのち香味について2点嗜好試験法による官能評価を行な、た。なお、両者は空気下で貯蔵したものであることと特記しておきたい。未訓練の大学生11人のパネリストによる

44回の試験の結果、Table 24に示すように、有意な差はないが解凍冷蔵肉の方が優れている傾向があった。このとき、解凍冷蔵肉には確実に熟成香が感じられた。しかし、試料によらずジアセチルあるいはアセトイン様の汗臭を感じるものがあつた。この汗臭は不快な匂いであり、これが存在する場合には熟成香があつたとしても全体の香りの評価は低くなると思われる。冷凍肉に対する香りの優位性が、解凍冷蔵肉は一度も冷凍していない冷蔵肉ほどに明瞭でないのは、この汗臭が原因の一つであると考えられる。

Cohen [164]はイスラエルに輸入された冷凍牛肉をポリエチレンフィルムで包装して $5-6^{\circ}\text{C}$ で9日間以上貯蔵した結果、生肉の状態である種の不快臭が生じたことを報告している。この不快臭には本研究で示されたような汗臭も含まれているのかもしれない。

この汗臭は、解凍した牛肉^全2000ppmクロウレンニコール木精油を噴霧して貯蔵した場合

Table 24. Effect of 0°C-storage after thawing on flavor of frozen beef loins.

Numbers of samples judged to be preferable		
Frozen beef ^a	0°C-stored thaw-beef ^b	Difference
21	23	NS

NS, not significant.

Cattle #5,6,7 and 8 were used

a: stored at -20°C for 58 days after 2 days postmortem and then thawed in 4°C-air for 2 days.

b: stored at -20°C for 44 days after 2 days postmortem and thawed in 4°C-air for 2 days, and then stored at 0°C for 14 days.

には生成しなかつた。したがって、この匂いも熟成者と同様に微生物の作用によつて生成すると推察される。

第II章で示したように、牛肉の赤身からの水抽出物の汁と貯蔵すると汗臭が生じる。したがって、牛肉の解凍冷蔵中に生じる汗臭は浸出液（ドリツプ）中で生じると推定される。この推定は第I章で調べた一度も冷凍していない冷蔵肉ではドリツプが少なく、汗臭もほとんど感じられなかつたことによつても支持される。これを実証するため解凍した牛肉をドリツプとの接触を避けて冷蔵してその香りを調べた。解凍した牛肉を2つに分け、一方を底部一面に直径16mmのガウス球を敷きつめたガウス容器に入れ、他方をガウス球を敷かないガウス容器に入れそれぞれ0℃で2日間貯蔵した。このとき、前者では、一旦浸出したドリツプはガウス球同士のすき間に落ちることにより牛肉との接触が避けられた。貯蔵後に牛肉とそれぞれ別の清浄な容器に移し

でドリッパ自身の匂いを除いたもの、両者の香りを調べる。その結果、ドリッパとの接触と避けた牛肉では避けながら、牛肉より汗臭が少なく、熟成香が明瞭に感知できた。これにより汗臭はドリッパ中で生成し、そのドリッパとの接触と避けて牛肉を冷蔵することにより、牛肉への汗臭の移行を抑制できることが明らかにされた。

ドリッパ中では熟成香が生成する肉表面に比べて水分活性や酸素分圧などの条件が異なるため、熟成香を生成する菌とは別の菌の繁殖が優勢となるが、あるいは熟成香を生成する菌そのものの代謝系が変動することにより汗臭の原因物質であるジアセチルやアセトインなどが生成されるのであろう。

以上の結果より、熟成前に冷凍した牛肉にも解凍後に冷蔵することにより熟成香を生成させてその香りを向上させることが可能であることが明らかにされた。そして、そのときドリッパから発生する汗臭は肉の香り全体の

損を低下させるため、ドリットツの管理が重要であることを説明された。

2. 冷凍輸入牛肉における熟成効果の発現度

＜結果の考察＞

これまでに明らかにレキテクスチャーや香りについても熟成効果が、実際に流通している冷凍輸入牛肉（フローズンビーフ）においてどの程度発現しているかを調査した。このとき冷蔵輸入牛肉（チルドビーフ）と冷蔵輸入牛肉を輸入後冷凍したものの（エージドビーフ）を対照として、比較調査した。

レテクスチャーについての熟成効果の発現度

オーストラリア産のフローズンビーフ（と殺数日後（正確な日数は不明であるが最大硬直期を経た）と殺2日後位と推定される。以下同様に）を真空包装し0℃で21日間貯蔵し、さらに69日間凍結貯蔵したものを4℃に3日間

置いて解凍した牛肉)、チルドビーフ(と殺数日後に真空包装し、 0°C で44日間貯蔵した牛肉)、エージドビーフ(と殺数日後に真空包装し、 0°C で27日間貯蔵し、さらに76日間凍結貯蔵したのち、 4°C で3日間置いて解凍した牛肉)と入手した。これらと加熱したのち、そのうちの2者ずつと組み合わせそれぞれ2点嗜好試験法により軟らかさについての官能評価を行った。

軟らかさについては、10人のパネリストによる20回の試験の結果、Table 25に示すように、いずれの組み合わせでも有意差はなく、また3者の中で順位をつけられるような傾向も認められなかった。また、第1章で調べた国産のホルスタイン種の牛肉を熟成させて得た冷蔵肉と比べてもいずれの肉も充分軟らかかった。

この軟らかさに対応して筋原線維のZ線の脆弱化とMg-ATPase活性の変化が進行しているかどうかを調べる。筋原線維の小片化率は、

Table 25. Tenderness of imported beef loins.

Combination	Numbers of samples judged to be preferable			Difference
	Chilled beef ^a	Frozen beef ^b	Aged beef ^c	
Chilled beef vs Frozen beef	8	12	-	NS
Chilled beef vs Aged beef	12	-	8	NS
Frozen beef vs Aged beef	-	8	12	NS

NS, not significant.

Two packs of loins were used as to each imported beef.

a: stored at 0°C for 44 days after a few days postmortem.

b: stored at 0°C for 21 days after a few days postmortem and stored in the frozen state for 69 days, and then thawed in 4°C - air for 3 days.

c: stored at 0°C for 27 days after a few days postmortem and stored in the frozen state for 76 days, and then thawed in 4°C - air for 3 days.

Table 26 に示したように、いずれの牛肉でも 70% を超え、ミ線が脆弱化がかなり進行しており、その進行程度には、3 者間で大きな差はないことが明らかに、 K 。また筋原線維の Mg -ATPase 活性は Fig. 68 に示したように、いずれの牛肉においても低 KCl 濃度に存在する極大値は約 $0.2 \mu\text{mol Pi/min/mg MF}$ と大きく、 KCl 濃度依存性も大であり、第 I 章で調べた国産の牛肉を熟成させたもの (Fig. 1) と類似のパターンを示した。 K 。これらの結果はミ線の脆弱化と Mg -ATPase 活性の変化に反映される筋原線維の構造変化がチルドビーフではもちろんその冷蔵中、また、フローズンビーフとエージドビーフではそれらの冷凍前の冷蔵中に進行したことを示している。また、後 2 者の Mg -ATPase 活性のパターンは、 Mg -ATPase 活性が冷蔵中に一旦変化するとその後の冷凍による影響をあまり受けないことも示している。これらのことは前節で示したように冷凍牛肉が熟成前に凍結したものがあっても、それは熟成後に凍結したものとあ

Table 26. Fragmentation rates of myofibrils of imported beef loins.

Samples	Fragmentation rates(%)
A	79.8
B	90.2
C	73.9
D	74.7
E	67.9
F	76.6

A and B show chilled beef loins.

C and D show frozen beef loins.

E and F show aared beef loins.

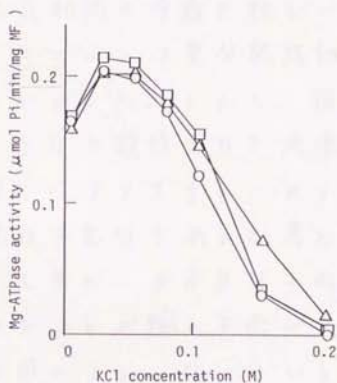


Fig. 68. Mg-ATPase activities of myofibrils at various KCl concentrations prepared from imported beef loins. Chilled (O), frozen (Δ) and aged (\square) beef loins were stored as shown in Table 25. The Mg-ATPase activities of myofibrils (MF) were measured as in Fig. 1.

るかと判定する指標の一つとして Mg -ATPase 活性が使用できることを示す例である。

以上のよう、今回調査した冷凍輸入牛肉は冷凍前に長期間の冷蔵と経ていたため、テクスチャーについては充分熟成効果が発現しており軟らかかった。しかし、根岸[169]が報告したようなと殺後2日で冷凍された輸入牛肉ではテクスチャーについての熟成効果の発現は不充分であると考えられる。こうしてテクスチャーが不良な牛肉が一部でも流通していることが輸入牛肉が一般に不味と言われる原因の一つとなつていなければならない。しかし、このような牛肉も前節で示した解凍後冷蔵により熟成効果を発現させてテクスチャーを改善することが可能であろう。

2) 香味についての熟成効果の発現度

1) と同じ種類の輸入牛肉の香味について、1) と同じ方法で官能評価した。10人のパネリストによる20回の試験の結果、Table 27 に示す

Table 27. Flavor of imported beef loins.

Combination	Numbers of samples judged to be preferable			Difference
	Chilled beef ^a	Frozen beef ^b	Aged beef ^c	
Chilled beef vs Frozen beef	8	12	-	NS
Chilled beef vs Aged beef	12	-	8	NS
Frozen beef vs Aged beef	-	10	10	NS

NS, not significant

Two packs of loins were used as to each imported beef.

a, b and c were designated in Table 25.

ように、いづれの組合わせでも有意差はなく、すなわち、三者の中で順位をつけることもできません。しかし、第2章で示した冷蔵牛肉や前節で示した解凍冷蔵肉に比較して決定的に熟成率が不足している。この熟成率の不足が一般に言われる輸入牛肉の不味さの原因の一つであろう。

このような輸入牛肉の熟成率不足の原因は冷凍による熟成期間の短かさに平めなことはできない。なぜならば、ここに調べた冷凍輸入牛肉は冷凍前に充分長期間冷蔵されしており、すなわち、一度も冷凍していない冷蔵輸入牛肉にも熟成率が不足しているからである。

それによって、その原因としては次の2つが考えられる。1つは輸入牛肉と国産の牛肉との種差であり、もう1つは輸入牛肉の貯蔵条件である。

前者については、熟成率の生成が和牛特有のものではないことは、

国産のホルスタイン種でも熟成率が生成している

から明らかであるが、なお外国産と国産との
 牛の種差が原因である可能性があった。そこで、
 アメリカ合衆国のアンガス種の枝肉を冷
 蔵状態で輸入したもののサーロインの香りを
 調べた。入手した時点でと殺後19日が経過し
 ていたが、このときには熟成者は感じられな
 かった。しかし、さらにホリエチレンの袋に
 含気包装して0℃で10日間貯蔵した結果、良
 好な熟成者が生じた。この結果より輸入牛肉
 の熟成者不足の原因は牛の種差ではなく貯蔵
 条件に求められることが予想された。

貯蔵条件のうち最も可能性が高いのは真空
 包装による酸素の遮断である。第II章で明ら
 かにしたように熟成者の生成には酸素が必要
 であるにもかかわらず調査した輸入牛肉はい
 ずれもと殺後すべて真空包装されていたから
 である。そこでこれを検証するため、真空
 包装されたアメリカ合衆国産の冷凍輸入牛肉
 の検体（それぞれ7ヶ月間と11ヶ月間凍結貯蔵）
 と同じく真空包装されたオーストラリア産（

16ヶ月間凍結貯蔵)の冷凍輸入牛肉をそれぞれ
 4℃に7日置いて解凍したのち、包装を解
 ちあらためてポリエチレンの袋に含気包装し
 て0℃に13日間貯蔵した。その結果、アメリ
 カ合衆国産の2検体には熟成香が生じたと同
 時に汗臭も生じた。他方、オーストラリア産
 の1検体には熟成香は生じず、酸敗臭が感じ
 られた。この結果より、輸入牛肉にも潜在的
 には熟成香を生成する能力があるにわかかわ
 らず、真空包装がその能力の発現を妨げとい
 うと推察された。微生物の関与を考慮するな
 らば輸入牛肉にも国産の牛肉と同様に熟成香
 を生成する微生物が存在するが、真空包装に
 よりその生育が抑制されるために熟成香が不
 足すると説明できるだろう。アメリカ合衆国
 産の牛肉に生じた汗臭は前節で示したように
 冷蔵中に生じたドリツブが原因と考えられた。
 他方、オーストラリア産の牛肉に熟成香が生
 じないのは、冷凍と真空包装により微生
 物叢が影響を受けにくいためと考えられるが、

元々、オーストラリア産の牛肉の微生物叢が
アメリカ産や国産の牛肉とは異なる可能性も
否定できないであらう。これについてはいま
に調査する必要が残る。いずれにしても
本結果により冷凍輸入牛肉の香りの改善に解
凍後に空気下で追加熟成することが有効であ
る可能性が示される。

総括

以上の本研究での知見は、食肉、特に牛肉の熟成による風味向上の機構解明のみならず、生肉の取り扱い法の改良にも大いに貢献するものであろう。

熟成中のテクスチャー向上については、良好な多汁性とロザわりを維持した状態で食肉が軟化する場合とは、すでに明らかにされている筋原線維のミ線の脆弱化の他に、 $MgATPase$ 活性の低 KCl 濃度 に存在する極大値の増加と KCl 濃度依存性の増大という特徴的な変化を必然的に伴うことを示した。そしてその変化の機序として、低 KCl 濃度での活性の増加は、食肉熟成中の酸 (pH 5.5 付近) で変性した塩基性タンパク質の筋原線維への結合により、また、活性の KCl 濃度依存性の増大は、主にカテプシン D、L、カルパインによるトリポニン成分の分解によりそれぞれ説明しうることを示した。特に前者の塩基性タンパク質が筋原

線維に結合するという知見は、本研究で初めて提示されたものであり、熟成中のテクスチャー向上につながる筋原線維構造変化の理解に少なからぬ進歩を加えたと言えよう。

筋原線維の My-ATPase 活性の変化が、軟化を必ずしも反映しないことは、冷凍肉が解凍後冷蔵中に軟化するにもかかわらず、 My-ATPase 活性が変化しにくいことから明らかである。しかし、そのことは凍結による筋原線維タンパク質あるいはそれに变化を惹起する因子の損傷を示していることになる。したがって、 My-ATPase 活性の変化を、解凍肉が熟成前に凍結されたものであるか、あるいは熟成後に凍結されたものであるかを判定する指標の一つとして採用できることが明らかである。また、このようなタンパク質の損傷が官能的な口ざわりの悪さとして認知されると考えられることは、 My-ATPase 活性の変化を、口ざわりを良好に保った状態での食肉の凍結や解凍の方法を開発するときの指標として使用できることを示

している。さらにそれは、熱成を人為的に速めようとする高温熱成や電気刺激後の熱成によるラクトサチャー変化の内容を知るための指標にも応用できる可能性があるであろう。

本研究では、 Mg -ATPase 活性の変化を起こす因子を探索する前段として、これまで食肉熱成への関与が明らかにされていなかった、高分子量プロライナーゼ、カラプシンHおよびシステインプロテイナーゼインヒビターを精製し、性質を明らかにした。結果として、2つのプロライナーゼは、筋原繊維の Mg -ATPase 活性の変化はもとより、食肉熱成中のラクトサチャー変動への寄与は小さいと推定されたが、このことは、すでにラクトサチャー変動要因であることが明らかにされているカラプシンB、D、L、カルバインおよび Ca^{2+} の優位性をさらに確かなものにしたと言えよう。一方、システインプロテイナーゼインヒビターに関しては、肉中にはカラプシンがインヒビターより過剰に存在することが強く推定され、また、

カタプシン間での阻害の受けやすさの差や、カタプシン同士がインヒビターに対して競合する現象も明らかにされ、これらによ、アインヒビター共存下でのカタプシンの作用発現が可能であることが示された。このことも食肉熟成へのカタプシン類の寄与を強く支持するものであると言えよう。

このように、高分子量プロテイナーゼ、カタプシンHおよびシスライソプロテイナーゼインヒビターの食肉熟成への寄与は、小さいかあるいは否定的であることが示されたわけであるが、これがそのまま、これらの生筋での役割の小ささを示すものでないことは言うまでもない。本研究で得られた知見は、これらの因子が生筋のタンパク質分解を果たす役割を解明するために必ずや貢献するであろう。

他方、熟成中の香りの向上については、牛肉の熟成による芳香、すなわち熟成香の生成を認知した。そして、その生成には酸素が必要であり、微生物が関与するという生成機構

の大筋を示すことができた。

これまで、食肉熟成中の風味向上のうち、テクスチャーと味の向上は内在性因子（プロテアーゼや Ca^{2+} ）により非微生物的に起こることが明らかにされている。したがって、巷間言われる「肉は腐りがけがうまい」という言葉は、食品科学の立場では、微生物による腐敗が起きるほどの長い期間熟成させることにより、内在性因子がよく働いて軟化や味の向上が起きることを示すと理解されてきた。しかし、熟成香生成に微生物が関与するという結果は、図らずも先の言葉に、科学的にも一方の真実が含まれていたことを示し、極めて興味深く、また、非微生物的に起こるとされてきた食肉熟成の機序の理解に一石を投ずることになるであろう。

本研究で得られた熟成香についての知見は、実用的に即座に重大な意味を持つと考えられる。なぜならば、熟成香生成に対する酸素の必要性は、真空包装一辺倒の現行の牛肉の流

通形態に變革を求むることになるからである。それは流通形態において、シエルフライフの延長のための真空包装をとるか、熟成香生成のための含気包装をとるかの二者択一を迫ることになるであろう。

本研究では、熟成香の本体物質およびその生成に関与する微生物の分離・同定は今後の重要な課題として残された。その解決は、食品科学的な興味の充足にとどまらず、おそらく、熟成香本体物質の食品香料としての利用や、微生物接種による低品質牛肉の高品質化への道を開くことになるであろう。そうした応用面での可能性の端緒として、本研究の持つ意義は極めて大きいと言えよう。

さらに、本研究で得られたラクスチャーと香りについての知見は、熟成が不十分な冷凍輸入牛肉の風味を解凍後冷蔵により改善する方法開発への道筋を示したことにもなり、輸入牛肉の高品質化にも大いに貢献するであろう。

論文内容の要旨

論文題目 食肉熟成中の食味性向上に関与する因子の解明

氏 名 松 石 昌 典

序

味、香りおよびテクスチャーで構成される食肉の風味は熟成によって向上するため、特に死後硬直で著しく硬化する牛肉では熟成は必須である。これまでに熟成による呈味性向上の機序はほぼ解明され、牛肉での味の向上は豚肉や鶏肉ほどには明確ではないことが示された。従って、牛肉の熟成ではテクスチャーと香りの向上が期待されるものとして残される。確かに熟成でテクスチャーは軟らかく、多汁性になるが、その機構はまだ完全には解明されていない。テクスチャー向上の主因である筋原線維構造の変化を反映するものとして、Z 線の脆弱化と Mg-ATPase 活性の変化の 2 つの主現象が報告されている。前者の惹起因子には Ca^{2+} と内在性プロテイナーゼが提示されているが、後者のそれはこれまで未知であった。従って、本研究の目的の 1 つをこの解明におき、本現象とテクスチャー向上との直接的な関わりを明らかにした。

他方、熟成による香りの向上では調理肉での加熱香気の増強が報告されている。しかし、生肉では血液臭の消失が示されているのみであった。従って、本研究では生肉で感知される生鮮香気（熟成香（じゅくせい）と命名）が牛肉で生成し、その食味性の向上に大きく寄与することを明らかにし、その生成機構の大筋を提示した。

さらに、これらの知見をもとに、国産の牛肉に比べておいしくないとされる冷凍輸入牛肉の不味さの原因解明に資するため、凍結貯蔵が牛肉の熟成効果の発現に及ぼす影響について調べた。その結果、解凍後の冷蔵によって軟らかさの増加と熟成香の生成が進行することが明らかになった。これらの知見をもとに現在流通している冷凍輸入牛肉の風味の改良を試みた。

I、食肉熟成におけるテクスチャーの向上と筋原線維 Mg-ATPase活性の挙動

1、牛肉の冷蔵および凍結貯蔵（冷凍）におけるテクスチャーと筋原線維（MF）Mg-ATPase活性の挙動

と殺後、乳牛ロースの一部を冷蔵（0°C, 18日間）し、他方を冷凍（-20°C, 15日間）して肉質を比較した結果、官能的に前者が後者より軟らかく、多汁であることが確認された。冷蔵中には筋原線維（MF）のZ線が脆弱化し、Mg-ATPase活性のKCl濃度依存性が増大し、かつ低KCl濃度に存在する極大値も増加したが、冷凍中にはそれらの変化は起きなかった。このようなMF構造変化の有無がテクスチャーの差となって感知されると推定された。

2、食肉のテクスチャー変動要因の新候補としての2つの筋肉プロテイナーゼと1つのプロテイナーゼインヒビターの精製と性質

上記のテクスチャー変動要因の候補として、これまでに Ca^{2+} とプロテイナーゼのカルバイン、カテプシン B, D, L が挙げられている。ここでは Mg-ATPase

活性の変化の惹起因子を検索するために、新たに筋肉での存在が報告された下記のものを精製し、それらの新候補としての可否を明らかにした。

1) 筋肉高分子量プロテイナーゼの精製と性質

活性測定に基質には succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-methylcoumarylamide を用いた。家兎背最長筋より通常の方法で精製し、単一な酵素を得た。その推定分子量は 60 万～80 万で、鎮重 2.0 万～2.9 万のヘテロサブユニットから成ることが示唆された。本酵素はセリンプロテイナーゼであると推定され、至適 pH は 8.0 であった。本酵素は 0.01-0.02% の SDS で活性化され、その存在下でのみ MF タンパク質を分解した。従って、SDS 様の活性化物質がない限りテクスチャー変動への寄与は小さいと推定された。

2) 筋肉カテプシン II の精製と性質

アミノエンドバプチダーゼである本酵素の活性測定には benzoyl-Arg-naphthylamide (BANA) と Leu-naphthylamide (Leu-NA) を基質として用いた。家兎背最長筋より通常の方法で精製し、単一な酵素を得た。本酵素の分子量は 2.8 万～3.0 万であった。至適 pH は BANA に対して 6.6、Leu-NA に対して 7.0 であった。本酵素はエンドバプチダーゼとして MF タンパク質を分解したが、その活性総量はカテプシン B、L よりは少なく、テクスチャー変動への寄与は小さいと推定された。

3) 筋肉ステインプロテイナーゼインヒビター (CPI) の精製と性質

CPI の活性はカテプシン B の活性を阻害する量として測定した。家兎背最長筋より通常の方法で精製し、分子量が 1.3 万の CPI-N とその二量体と推定される分子量 2.3 万の CPI-D が得られた。両 CPI はカテプシン B、II、L を非拮抗的に阻害した。B は II、L より阻害されにくく、L に対する阻害は II の共存により抑制された。これらのことなどから、カテプシンが CPI より過剰に存在し、かつ CPI に対してカテプシン同士で競合することが、肉中でのカテプシンの活性発現を可能にする一因であると推察された。

3、筋原線維(MF) Mg-ATPase活性に変化をもたらす因子の解明

MFに 25°Cにおいて pH 5.5と 7.0-7.2で Ca^{2+} あるいは各種筋肉プロテイナーゼを作用させて Mg-ATPase活性の変化を調べた。その結果、 Ca^{2+} と高分子量プロテイナーゼはいずれの pHにおいても Mg-ATPase活性を変化させなかったが、カルパインⅡは主に pH 7.2において、またカテプシン類は pH 5.5と7.0においてそれぞれ Mg-ATPase活性の KCl濃度依存性を増大させた。カテプシン類の中では、DとLの作用が大きく、BとHの作用は小さかった。しかし、これらの因子はいずれも Mg-ATPase活性の低 KCl濃度に存在する極大値を増加させなかった。従って、この現象を引き起こす別の因子の存在が予想された。

その因子は筋肉の pH 7.2抽出物中に見い出された。それは液体等電点電気泳動により等電点が pH 8-10のタンパク質であることが判明した。SDS-電気泳動での分析により、この塩基性タンパク質が肉中の酸(pH 5.5 付近)で徐々に変性し、経時的にMFに結合して活性を増加させると推察された。しかし、この場合の活性増加は極大値のみならず全 KCl濃度域(0-0.15 KCl)の活性値に及ぶため、KCl濃度依存性の増大は明確ではなかった。そこで MFに塩基性タンパク質を作用させたのちにカテプシン類を作用させた結果、熟成中の変化に酷似した現象、即ち、Mg-ATPase活性の KCl濃度依存性の増大と低 KCl濃度に存在する極大値の増加が起こった。従って、熟成中の MFの Mg-ATPase活性の変化は塩基性タンパク質とプロテイナーゼの協働作用により惹起されると推定された。

Ⅱ、食肉熟成による生鮮香気の発生とその生成機構

1、牛肉の熟成による生鮮香気、熟成香の生成

と殺後、乳牛ロースの一部を空気下で冷蔵し、他方を凍結貯蔵して生鮮香気

を比較した結果、前者は甘い豊かな香りがしたが、後者は血液臭しかなかった。前者の香りは肉を加熱したのちにも残存し、その嗜好性を高めた。この熟成により生じる芳香を熟成香と命名した。ステーキ店等を实地調査した結果、和牛でも熟成香を有するものが供されているケースが認められた。市販の豚肉と鶏肉を冷蔵した結果、牛肉に類似した熟成香は豚肉にのみ生じた。

2、牛肉熟成香の生成機構

牛肉を真空包装あるいは脱酸素剤の入った密閉容器で冷蔵すると熟成香の生成が抑制され、生成への酸素の必要性が示された。牛肉を脂身と赤身の共存部、脂身部、赤身部に分けて冷蔵した結果、脂身と赤身の共存部で最も強く熟成香が生じた。従って、熟成香の生成には脂身と赤身の共存が必要であることが明らかとなった。また、熟成香の生成は牛肉への chloramphenicol 水溶液の噴霧により抑制されたため、生成への微生物の関与が強く示唆された。

Ⅲ、食肉の熟成効果の発現に及ぼす凍結貯蔵（冷凍）の影響

1、冷凍牛肉の解凍後冷蔵によるテクスチャーと香りの変化とその要因

冷凍乳牛肉を解凍して冷蔵した結果、官能的に冷凍牛肉より軟らかくなったが、一度も冷凍しないで冷蔵した牛肉より口ざわりが粗かった。解凍後冷蔵中には MF の Z 線が脆弱化したが、Mg-ATPase 活性の変化は小さかった。これは Mg-ATPase 活性を担うアクトミオシン自身または活性を変化させる因子が凍結により損傷したことを示唆している。この様な損傷が口ざわりの粗さとして感知されると推察された。

上記と同条件で冷凍乳牛肉を解凍して空気下で冷蔵した結果、熟成香が生じた。しかし、試料によっては diacetyl や acetoin 様の汗臭を強く感じるものがあった。この汗臭の発生は冷蔵中に出るドリップと肉との接触を避けるこ

とにより抑制でき、ドリップの管理の重要性が判明した。

2、冷凍輸入牛肉における熟成効果の発現度

冷凍輸入牛肉（真空包装して21日間冷蔵後、69日間冷凍）の解凍直後の肉質は軟らかく、口ざわりもかなり良好であった。また、Z線の脆弱化とMg-ATPase活性の変化が既に充分進行していた。これは、凍結前の冷蔵中にテクスチャーに関する熟成効果が十分に発現した結果であると考えられた。しかし、この牛肉には熟成香が決定的に不足していた。これが一般的に言われる冷凍輸入牛肉の不味さの一因であろう。この熟成香の不足は、先に明らかにしたように真空包装による酸素の遮断が一因であると推察された。そこで冷凍輸入牛肉を解凍後に空気下で冷蔵した。その結果、熟成香が生成するケースが認められた。

総括

以上の本研究での知見は、食肉特に牛肉の熟成による風味向上の機構解明のみならず、生肉の取り扱い法の改良にも大いに貢献するであろう。良好な多汁性と口ざわりを維持した状態での食肉の軟化現象には、既に明らかにされているMFのZ線の脆弱化の他に、Mg-ATPase活性の特徴的な変化を必然的に伴うという知見を示し、その機序を解明したことは、熟成温度の選択、凍結及び解凍法の改良に有力な助けとなろう。また、牛肉の熟成香を認知し、その生成機構を解明したことは、と殺後の牛肉の取り扱い方に重大な変革をもたらすものと予想される。少なくとも、真空包装一辺倒の現行の流通形態に改良が必要となろう。さらには、熟成香の乏しい輸入牛肉の風味改良も可能となろう。

1. 柳 美羅 (1989) 東京大学博士論文
2. Field, R.A., Riley, M.L. and Chang, Y. (1971) *J. Food Sci.* 36, 611-612.
3. Minks, D. and Stringer, W.C. (1972) *J. Food Sci.* 37, 736-738.
4. Smith, G.C., Culp, G.R. and Carpenter, Z.L. (1978) *J. Food Sci.* 43, 823-826.
5. Gould, P.F., Bratzler, L.J. and Magee, W.T. (1965) *Food Technol.* 248, 146
6. Bennett, M.E., Bramblett, V.D., Aberle, E.D. and Harrington, R.B. (1973) *J. Food Sci.* 38, 536-538.
7. Harrison, D.L., Bowers, J.A., Anderson, L.L., Tuma, H.J. and Kropf, D.H. (1970) *J. Food Sci.* 35, 292-294.
8. Sayre, R.N. (1970) *J. Food Sci.* 35, 7-10.
9. Dransfield, E., Jones, R.C.D. and Macfie, H.J.H. (1980-81) *Meat Sci.* 5, 139-147.
10. Caul, F. (1957) Military Subsistence Problems, 1 (9), 152, through Wasserman, A.E. (1972) *J. Agr. Food Chem.* 20(4), 737-741.
11. Wilson, G.D. (1960) "The Science of Meat and Meat Products," W.H. Freeman Company, San Francisco and London, 260-279.
12. Wier, C.E. (1960) "The Science of Meat and Meat Products," W.H. Freeman Company, San Francisco, California, Chapter 6, p.212.
13. Parrish, F.C. Jr., Rust, R.E., Popenhagen, G.R. and Miner, B.E. (1969) *J. Animal Sci.* 29, 398-403.
14. Coppock, B.M. and MacLeod, G. (1977) *J. Sci. Fd Agric.* 28, 206-214.
15. Hood, R.L. and Allen, E. (1971) *J. Food Sci.* 36, 786-790.
16. Terasaki, M., Kajikawa, M., Fujita, E. and Ishii, K. (1965) *Agr. Biol. Chem.* 29(3), 208-215.
17. 渡辺乾二 (1980) 香料の事典、朝倉書店、p.178-185
18. 西村敏英、加藤博通 (1988) 肉の科学、29(1), 1-13.
19. Suzuki, A., Nakazato, M. and Fujimaki, M. (1967) *Agr. Biol. Chem.* 31(8), 953-957.
20. Khan, A.W. and van der Berg, L. (1964) *J. Food Sci.* 29, 49.
21. Nishimura, T., Rhue, M.R., Okitani, A. and Kato, H. (1988) *Agric. Biol. Chem.* 52(9), 2323-2330.
22. Kassemarn, B., Perez, B.S., Murray, J. and Jones, N.R. (1963) *J. Food Sci.* 28, 28-36.
23. Dannert, R.D. and Pearson, A.M. (1967) *J. Food Sci.* 32, 49-52.
24. Bodwell, C.E., Pearson, A.M. and Spooner, M.E. (1965) *J. Food Sci.* 30, 766-772.
25. 加藤博通、沖谷明雄、西村敏英 (1986) 伊藤記念財団 食肉に関する助成研究調査成果報告書、p.1-8

26. 沖谷明雄 (1984) 食品の熟成. 光琳. p.551-578
27. Hay, J.D., Currie, R.W. and Wolfe, F.H. (1973) *J. Food Sci.* 38, 987-990.
28. Olson, D.G., Parrish, F.C.Jr., Dayton, W.R. and Goll, D.E. (1977) *J. Food Sci.* 42, 117-124.
29. 松本照代 (1984) 東京大学博士論文. p.179-184
30. Okitani, A., Matsumoto, T., Kitamura, Y. and Kato, H. (1981) *Biochim. Biophys. Acta* 662, 202-209.
31. Matsukura, U., Okitani, A., Nishimuro, T. and Kato, H. (1981) *Biochim. Biophys. Acta* 662, 41-47.
32. MacBride, M.A. and Parrish, F.C.Jr. (1977) *J. Food Sci.* 42(6), 1627-1629.
33. Penny, I.F. and Dransfield, E. (1979) *Meat Sci.* 3, 135-141.
34. Henderson, D.W., Goll, D.E. and Stromer, M.H. (1970) *Am. J. Anat.* 128, 117-136.
35. Takahashi, K., Fukazawa, T. and Yasui, T. (1967) *J. Food Sci.* 32, 409-413.
36. Olson, D.G., Parrish, F.C.Jr. and Stromer, M.H. (1976) *J. Food Sci.* 41, 1036-1041.
37. Hattori, A. and Takahashi, K. (1979) *J. Biochem.* 85(1), 47-56.
38. Hattori, A. and Takahashi, K. (1982) *J. Biochem.* 92(2), 381-390.
39. Takahashi, K., Kim, O.H. and Yano, K. (1987) *J. Biochem.* 101(3), 767-773.
40. Busch, W.A., Stromer, M.H., Goll, D.E. and Suzuki, A. (1972) *J. Cell Biol.* 52, 367-381.
41. Dayton, W.R., Schollmeyer, J.V., Lepley, R.A. and Cortés, L.R. (1981) *Biochim. Biophys. Acta* 659, 48-61.
42. Zeece, M.G., Robson, R.M., Lusby, M.L. and Parrish, F.C.Jr. (1986) *J. Food Sci.* 51, 797-803.
43. Matsukura, U., Matsumoto, T., Tashiro, Y., Okitani, A. and Kato, H. (1984) *Int. J. Biochem.* 16(9), 957-962.
44. Maruyama, K., Natori, R. and Nonomura, Y. (1976) *Nature*, 262, 58.
45. Maruyama, K., Matsubara, S., Natori, R., Nonomura, Y., Kimura, S., Ohashi, K., Murakami, F., Hanada, S. and Eguchi, G. (1977) *J. Biochem.* 82, 317-337.
46. Suzuki, A., Hoshino, K., Sasaki, E., Sano, N., Nakane, M., Ikeuchi, Y. and Saito, M. (1988) *Agric. Biol. Chem.* 52(6), 1439-1444.
47. Paxhia, J.M. and Parrish, F.C.Jr. (1988) *J. Food Sci.* 53(6), 1599-1601.
48. Takahashi, K. and Saito, H. (1979) *J. Biochem.* 85, 1539-1542.
49. 高橋興成 (1985) 肉の科学. 28(2), 93-101
50. Maruyama, K., Kimura, M., Kimura, S., Ohashi, K., Suzuki, K. and Katunuma, N. (1981) *J. Biochem.* 89, 711-715.
51. King, N.L. and Harris, P.V. (1982) *Meat Sci.* 6, 137-148.
52. Fujimaki, M., Arakawa, N., Okitani, A. and Takagi, O. (1965) *J. Food Sci.*, 30, 937-943.

53. Takahashi, K., Nakamura, F. and Okamoto, M. (1982) *J. Biochem.* 92, 809-815.
54. Takahashi, K., Nakamura, F., Hattori, A. and Yamanoue, M. (1985) *J. Biochem.* 97, 1043-1051.
55. Takahashi, K., Yamanoue, M., Murakami, T., Nishimura, T. and Yoshikawa, R. (1987) *J. Biochem.* 102, 1187-1192.
56. Hattori, A. and Takahashi, K. (1988) *J. Biochem.* 103, 809-814.
57. Yang, R., Okitani, A. and Fujimaki, M. (1970) *Agr. Biol. Chem.* 34, 1765-1772.
58. Ouali, A., Obléd, A., Cottin, P., Merdaci, N., Ducasting, A. and Valin, C. (1983) *J. Sci. Food Agric.* 34, 466-476.
59. Ouali, A. (1984) *Meat Sci.* 11, 79-88.
60. Yang, R., Okitani, A. and Fujimaki, M. (1972) *Agr. Biol. Chem.* 36(12), 2087-2095.
61. Ouali, A. and Valin, C. (1980-81) *Meat Sci.* 5, 233-245.
62. Ouali, A., Garrel, N., Obléd, A., Deval, C. and Valin, C. (1987) *Meat Sci.* 19, 83-100.
63. Suzuki, A. and Goll, D.E. (1974) *Agr. Biol. Chem.* 38, 2167-2175.
64. 渡辺乾二、佐藤 泰 (1974) *日畜会報* 45(3), 113-128
65. MacLeod, G. and Seyyedain-Ardebili, M. (1981) *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 14(4), 309-437.
66. Brinkman, H.W., Copier, H., de Leuw, J.J.M. and Tjan, S.B. (1972) *J. Agr. Food Chem.* 20(2), 177-181.
67. MacLeod, G. and Ames, J.M. (1986) *Flavour and Fragrance J.* 1, 91-104.
68. Gasser, U. and Grosch, W. (1988) *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 186, 489-494.
69. Mottram, D.S. and Edwards, R.A. (1983) *J. Sci. Food Agric.* 34, 517-522.
70. Merritt, C. Jr., Bresnick, S.R., Bazinet, M.L., Walsh, J.T. and Angelini, P. (1959) *Agric. Food Chem.* 7, 784-787.
71. Burks, R.E. Jr., Baker, E.B., Clark, P., Esslinger, J. and Lacey, J.C. Jr. (1959) *Agric. Food Chem.* 7, 778-782.
72. Brooks, G.M. and Ammerman, G.R. (1978) *J. Food Sci.* 43, 1348-1349.
73. Sink, J.D. and Smith, P.W. (1972) *J. Food Sci.* 37, 181-182.
74. Okitani, A., Otsuka, M., Sugitani, M. and Fujimaki, M. (1974) *Agric. Biol. Chem.* 38, 573-579.
75. Okitani, A., Matsukura, U., Otsuka, Y., Watanabe, M. and Fujimaki, M. (1977) *Agric. Biol. Chem.* 41, 1821-1823.
76. 神谷明雄 (1981) *化学と生物* 19(2), 108-113
77. 松倉 灌 (1981) *東京大学博士論文*, p.85
78. Iodice, A.A., Leong, V. and Weinstock, I.M. (1966) *Arch. Biochem. Biophys.* 117, 477-486.
79. Schwartz, W.N. and Bird, J.W.C. (1977) *Biochem. J.* 167, 811-820.
80. Okitani, A., Matsumoto, T., Kiatamura, Y. and Kato, H. (1981) *Biochim. Biophys. Acta* 662, 202-209.

81. Matsumoto, T., Okitani, A., Kitamura, Y. and Kato, H. (1983)
Biochim. Biophys. Acta 755, 76-80.
82. 青柳高明 (1980) 蛋白質、核酸、酵素 25, 597-608
83. Okitani, A., Matsuishi, M., Matsumoto, T., Kamoshida, E., Sato, M.,
Matsukura, U., Watanabe, M., Kato, H. and Fujimaki, M. (1988)
Eur. J. Biochem. 171, 377-381.
84. Hirao, T., Hara, K. and Takahashi, K. (1984) J. Biochem. 95, 871-879.
85. Barrett, A.J. (1972) Anal. Biochem. 47, 280-293.
86. Barrett, A.J. (1980) Biochem. J. 187, 907-912.
87. Barrett, A.J. and Kirschke, H. (1981) Methods Enzymol. 80, 535-560.
88. Kirschke, H., Langner, J., Wiedersanders, B., Ansorge, S. and Bohley, P.
(1977) Eur. J. Biochem. 74, 293-301.
89. Towatari, T., Tanaka, K., Yoshikawa, D. and Katunuma, N. (1978)
J. Biochem. 84, 659-671.
90. Mason, R.W., Taylor, M.A.J. and Etherington, D.J. (1984) Biochem. J.
217, 209-217.
91. Lokshina, L.A., Gureeva, T.A., Lubkova, O.N. and Orekhovich, V.N.
(1981) Biokhimiya, 47, 1299-1307.
92. Okitani, A., Matsukura, U., Kato, H. and Fujimaki, M. (1980)
J. Biochem. 87, 1133-1143.
93. Matsukura, U., Okitani, A., Nishimuro, T. and Kato, H. (1981)
Biochim. Biophys. Acta 662, 41-47.
94. 神奈木玲児、村地 孝 (1987) 蛋白質、核酸、酵素 32(2), 24-37
95. Inomata, M., Hayashi, M., Nakamura, M., Imahori, K. and Kawashima, S.
(1983) J. Biochem. 93, 291-294.
96. Wolfe, F.H., Sathe, S.K., Goll, D.E., Kleese, W.C., Edmunds, T. and
Duperret, S.M. (1989) Biochim. Biophys. Acta 998, 236-250.
97. Dayton, W.R., Goll, D.E., Zeece, M.G., Robson, R.M. and Reville, W.J.
(1976) Biochemistry, 15(10), 2150-2158.
98. Ishiura, S., Murofushi, H., Suzuki, K. and Imahori, K. (1978)
J. Biochem. 84(1), 225-230.
99. Azanza, J.-L., Raymond, J., Robin, J.-M., Cottin, P. and Ducasting, A.
(1979) Biochem. J. 183, 339-347.
100. Inomata, M., Nomoto, M., Hayashi, M., Nakamura, M., Imahori, K. and
Kawashima, S. (1984) J. Biochem. 95(6), 1661-1670.
101. Noguchi, T. and Kandatsu, M. (1971) Agr. Biol.Chem. 35(7), 1092-1100.
102. Katunuma, N., Kominami, E., Kobayashi, K., Banno, Y., Suzuki, K., Chichibu, K.,
Hamaguchi, Y. and Katunuma, T. (1975) Eur. J. Biochem. 52, 37-50.

103. Yasogawa, N., Sanada, Y. and Katunuma, N. (1978) *J. Biochem.* 83, 1355-1360.
104. Woodbury, R.G., Everitt, M., Sanada, Y., Katunuma, N., Lagunoff, D. and Neurath, H. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75(11), 5311-5313.
105. Noguchi, T. and Kandatsu, M. (1970) *Agr. Biol. Chem.* 34(3), 390-394.
106. Otsuka, Y., Okitani, A., Katakai, R. and Fujimaki, M. (1976) *Agric. Biol. Chem.* 40, 2335-2342.
107. Okitani, A., Otsuka, Y., Katakai, R., Kondo, Y. and Kato, H. (1981) *J. Food Sci.* 46, 47-51.
108. Okitani, A., Nishimura, T. and Kato, H. (1981) *Eur. J. Biochem.* 115, 269-274.
109. Nishimura, T., Okitani, A., Katakai, R. and Kato, H. (1983) *Eur. J. Biochem.* 115, 23-27.
110. 西村敏英 (1984) 東京大学博士論文
111. 田中啓二 (1989) *生化学* 61(3), 157-176
112. Tanaka, K., Ii, K. and Ichihara, A. (1986) *J. Biol. Chem.* 261(32), 15197-15203.
113. Yamamoto, T., Nojima, M., Ishiura, S. and Sugita, H. (1986) *Biochim. Biophys. Acta* 882, 297-304.
114. Nojima, M., Ishiura, S., Yamamoto, T., Okuyama, T., Furuya, H. and Sugita, H. (1986) *J. Biochem.* 99, 1605-1611.
115. McGuire, M.J. and DeMartino, G.N. (1986) *Biochim. Biophys. Acta* 873, 279-289.
116. Dahlmann, B., Kuehn, L., Rutschmann, M. and Reinauer, H. (1985) *Biochem. J.* 228, 161-170.
117. Ishiura, S., Sano, M., Kamakura, K. and Sugita, H. (1985) *FEBS Lett.* 189(1), 119-123.
118. Driscoll, J. and Goldberg, A.L. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 787-791.
119. Dahlmann, B., Rutschmann, M., Kuehn, L. and Reinauer, H. (1985) *Biochem. J.* 228, 171-177.
120. Ishiura, S., Yamamoto, T., Nojima, M. and Sugita, H. (1986) *Biochim. Biophys. Acta* 882, 305-310.
121. Tanaka, K. and Ichihara, A. (1988) *FEBS Lett.* 236(1), 159-162.
122. Etlinger, J.D., Speiser, S., Wajsborg, E. and Glucksman, M.J. (1981) *Acta Biol. Med. Germ.* 40, 1285-1291.
123. 田中啓二 (1985) *蛋白質、核酸、酵素* 30, 441-450
124. Kirschke, H., Langer, J., Wiederanders, B., Ansorge, S., Bohley, P. and Hanson, H. (1977) *Acta Biol. Med. Germ.* 36, 185-199.
125. Järvinen, M. and Hopps-Hava, V.K. (1975) *Acta Chem. Scand. B* 29, 772-780.
126. Sigh, H and Kalnitsky, G. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 369-374.
127. Schwartz, W.N. and Barrett, A.J. (1980) *Biochem. J.* 191, 487-497.

128. Pontremoli, S., Melloni, E., Salamino, F., Sparatore, B., Michetti, M. and Horecker, B.L. (1982) Arch. Biochem. Biophys. 214, 376-385.
129. Yamamoto, K., Kamata, O. and Kato, Y. (1984) J. Biochem. 95, 477-484.
130. Roisen, F.J., Kirschke, H., Colella, R., Wood, L., St. John, A.C., Fekete, E., Li, Q.-S., Yorke, G. and Bird, J.W.C. (1983) "Proteinase Inhibitors: Medical and Biological Aspects", p.97-109.
131. Nakamura, M., Inomata, M., Hayashi, M., Imahori, K. and Kawashima, S. (1984) J. Biochem. 96, 1399-1407.
132. Ishiura, S., Tsuji, S., Murofushi, H. and Suzuki, K. (1982) Biochim. Biophys. Acta 701, 216-223.
133. Murakami, T., Hatanaka, M. and Murachi, T. (1981) J. Biochem. 90, 1809-1816.
134. Nishiura, I., Tanaka, K., Yamato, S. and Murachi, T. (1978) J. Biochem. 84, 1657-1659.
135. Melloni, E., Salamino, F., Sparatore, B., Michetti, M., Pontremoli, S. and Horecker, B.L. (1984) Arch. Biochem. Biophys. 232, 513-519.
136. Murachi, T., Hatanaka, M., Yasumoto, Y., Nakamura, N. and Tanaka, K. (1981) Biochem. Intern. 2, 651-656.
137. Takano, E., Yumoto, N., Kannagi, R. and Murachi, T. (1984) Biochem. Biophys. Res. Commun. 122(3), 912-917.
138. Maki, M., Takano, E., Mori, H., Kannagi, R., Murachi, T. and Hatanaka, M. (1987) Biochem. Biophys. Res. Commun. 143(1), 300-308.
139. Emori, Y., Kawasaki, H., Imajoh, S., Imahori, K. and Suzuki, K. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 3590-3594.
140. Emori, Y., Kawasaki, H., Imajoh, S., Minami, Y. and Suzuki, K. (1988) J. Biol. Chem. 263 (5), 2364-2370.
141. Kominami, E., Bando, Y., Wakamatsu, N. and Katunuma, N. (1984) J. Biochem. 96, 1437-1442.
142. Barrett, A.J., Fritz, H., Grubb, A., Isemura, S., Järvinen, M., Katunuma, N., Machleidt, W., Müller-Esterl, W., Sasaki, M. and Turk, V. (1986) Biochem. J. 236, 312.
143. Machleidt, W., Borchart, U., Fritz, H., Brzin, J., Ritonja, A. and Turk, V. (1983) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 364, 1481-1486.
144. Takio, K., Kominami, E., Bando, Y. and Katunuma, N. (1984) Biochem. Biophys. Res. Commun. 121, 149-154.
145. Takio, K., Kominami, E., Wakamatsu, N., Katunuma, N. and Titani, K. (1983) Biochem. Biophys. Res. Commun. 115, 902-908.
146. Ritonja, A., Machleidt, W. and Barrett, A.J. (1985) Biochem. Biophys. Res. Commun. 131, 1187-1192.
147. Turk, V., Brzin, J., Longer, M., Ritonja, A., Eropkin, M., Borchart, U. and Machleidt, W. (1983) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 364, 1487-1496.

148. Schwarbe, C., Anastasi, A., Crow, H., McDonald, J.K. and Barrett, A.J. (1984) *Biochem. J.* 217, 813-817.
149. Barrett A.J., Davies, M.E. and Grubb, A. (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 120, 631-636.
150. Isemura, S., Saitoh, E., Ito, S., Isemura, M. and Sanada, K. (1984) *J. Biochem.* 96, 1311-1314.
151. Sasaki, M., Taniguchi, K. and Minakata, K. (1981) *J. Biochem.* 89, 169-177.
152. Sueyoshi, T., Enjyoji, K., Simada, T., Kato, H., Iwanaga, S., Bando, Y., Kominami, E. and Katunuma, N. (1985) *FEBS Lett.* 182, 193-195.
153. Müller-Esterl, W., Fritz, H., Machleidt, W., Ritonja, A., Brzin, J., Kotnik, M., Turk, V., Kellermann, J. and Lottspeich, F. (1985) *FEBS Lett.* 182, 310-314.
154. Schwartz, W.N. and Bird, J.W.C. (1977) *Biochem. J.* 167, 811-820.
155. Matsumoto, T., Okitani, A., Kitamura, Y. and Kato, H. (1983) *Agric. Biol. Chem.* 47, 2365-2371.
156. Bige, L., Ouali, A. and Valin, C. (1985) *Biochim. Biophys. Acta.* 843, 269-275.
157. Hamm, R. (1986) "Muscle As Food", Academic Press, New York, 164-172.
158. 土井 悦四郎 (1986) *New Food Industry*, 28(6), 80-87.
159. Anon, M.C. and Calvelo, A. (1980) *Meat Sci.* 4(1), 1.
160. 鬼原 新之丞 (1989) *肉の科学* 10(4), 264-277
161. Marsh, B.B. and Thompson, J.F. (1958) *J. Sci. Food Agric.* 9, 417.
162. Fischer, C. and Honikel, K.O. (1980) *Fleischwirtsch.* 60, 1703.
163. Honikel, K.O. and Fischer, C. (1980) *Fleischwirtsch.* 60, 1709.
164. Cohen, T. (1984) *J. Food Sci.* 49, 1174-1177.
165. Winger, R.J. and Fennema, O. (1976) *J. Food Sci.* 41, 1433-1438.
166. Locker, R.H. and Danies, G.J. (1973) *Sci. Fd. Agric.* 24, 1273-1275.
167. 毎日新聞昭和63年6月4日付記事
168. 宮崎 宏 (1988) 第29回日本食肉研究会講演要旨集, p.11-27
169. 根岸晴夫 (1989) *肉の科学* 20(1), 107-112
170. Nakamura, M. (1950) *Nippon Nougai Kagaku Kaishi* 24, 1.
171. Okitani, A., Matsukura, U., Kato, H. and Fujimaki, M. (1980) *J. Biochem.* 87, 1133-1143.
172. Matsutani, M., Takehisa, M., Fukuba, R., Simasue, A. and Kikukawa, N. (1967) *J. Med. Technol.* 11, 300-302.
173. Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265.
174. Spector, T. (1978) *Anal. Biochem.* 86, 142-146.
175. Gornall, A.G., Baradawill, C.J. and David, M.M. (1949) *J. Biol. Chem.* 177, 751-766.
176. Davis, B.J. (1964) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 121, 404-407.

177. Laemmli, U.K. (1970) *Nature (London)* 227, 680-685.
178. Anastasi, A., Brown, M.A., Kembhavi, A.A., Nicklin, M.J.H., Sayers, C.A.,
Sunter, D.C. and Barrett, A.J. (1983) *Biochem. J.* 211, 129-138.
179. 田中啓二 (1989) *代謝* 26(9), 797
180. Murakami, K. and Etlinger, J.D. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 7588-7592.
181. McCormick, R.J., Reeck, G.R. and Kropf, D.H. (1988)
J. Agric. Food Chem. 36, 1193-1196.
182. 加藤博通、加藤 豊、西村敏英、沖谷明祐、日本農芸化学会 昭和60年度大会講演要旨集、p.624
183. Wakamatsu, N., Kominami, E., Takio, K. and Katunuma, N. (1984)
J. Biol. Chem. 259(22), 13832-13838.
184. Barrett, A.J. (1977) "Proteinase in Mammalian Cells and Tissues";
North-Holland, p.209-248.
185. Smith, J.L. and Alford, J.A. (1968) *J. Food Sci.* 33, 93-97.
186. Bothast, R.J., Kelly, R.F. and Graham, P.P. (1973) *J. Food Sci.* 38, 75.
187. Sink, J.D. (1973) *J. Am. Oil Chem. Soc.* 50, 470-474.
188. 三浦弘之 (1980) *食肉加工ハンドブック*、光琳、p.451-475
189. 沼田正寛、富家崇弘、水谷祥彦、橋本小由利、山田浩之、中村豊郎
(1988) *日畜会報*、59(2), 136-145
190. Kotula, A.W., Campano, S.G. and Kinsman, D.M. (1988)
J. Food Prot. 51(2), 126-129.
191. Lineweaver, H. and Burk, D. (1934) *J. Am. Chem. Soc.* 56, 658.
192. 高河原 勇、蛋白質・酵素の実験法、南江堂、p.308

謝 辞

本研究を行うにあたり、終始ご懇篤なるご指導、ご鞭達を賜りました東京大学教授、加藤博通先生ならびに日本獣医畜産大学教授、沖谷明弘先生に深く感謝申し上げます。

また、数々の有意義なご助言をいただきました東京大学助教授、荒井綜一先生をはじめとする東京大学食糧化学研究室の皆様にも厚く御礼申し上げます。

さらに、貴重なノウハウをご教示いただきました銀座モリス、森寿一郎氏にも厚く御礼申し上げます。

そして、本研究に多大なご協力をいただきました日本獣医畜産大学食品化学研究室の皆様および明治乳業中央研究所、吉川純夫氏ならびに根岸晴夫氏に心から感謝いたします。



Kodak Color Control Patches

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black



Kodak Gray Scale

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19



© Kodak, 2007 TM Kodak