

凍結貯蔵魚肉における生体膜変化のFreeze-Etching 電顕法による観察

花岡, 研一
九州大学農学部水産製造学教室

豊水, 正道
九州大学農学部水産製造学教室

<https://doi.org/10.15017/22271>

出版情報：九州大学農学部学藝雑誌. 35 (1/2), pp.65-70, 1981-03. 九州大学農学部
バージョン：
権利関係：

凍結貯蔵魚肉における生体膜変化の Freeze-Etching 電顕法による観察

花岡 研一・豊水 正道

九州大学農学部水産製造学教室

(1980年12月22日受理)

The Alteration of Biological Membranes Observed by Freeze-Etching Electron Microscopy during Frozen Storage of Fish Muscle

KEN'ICHI HANAOKA and MASAMICHI TOYOMIZU

Laboratory of Fisheries Technology, Faculty of Agriculture,
Kyushu University 46-04, Fukuoka 812

緒 言

凍結貯蔵魚肉においては、温度低下にもかかわらずリン脂質 (PL) 分解が促進する。その主原因は、機械的破壊や成分濃縮ではなく、凍結に伴う脱水にあることを著者らは報告してきた (Toyomizu *et al.*, 1977; 花岡・豊水, 1979 a, b)。

PL分解に伴う分解生成物が魚肉品質に与える影響として、たとえばたんぱく質の不溶化が指摘されている。一方、PLの局在部位が生体膜であることを考えると、PL分解は細胞内小器官を区画する膜系の崩壊すなわち物理的障壁としての機能喪失を意味し、小器官内成分たとえば各種酵素等品質劣化につながる成分の漏洩をもたらすと考えられる。それにもかかわらず、凍結貯蔵中の魚肉生体膜がPL分解に伴ってどのような変化を受けるかを詳細に追求した報告は見当たらない。

そこで、凍結貯蔵したコイ肉膜系の変化を電顕観察して調べた。超薄切片法によると膜系の詳細な変化を観察できないので (Meissner and Fleischer, 1972; Meissner *et al.*, 1973), Freeze-Etching 電顕法 (F-E 法) を用いた。F-E 法は、近年生体膜の微細構造の解明や、赤血球等の凍結保存の問題と関連して広く用いられるようになった。本法は、膜組織を凍結下で切断すると、膜二重層が中央の部分で剝離を受けることを利用し、露出した二重層内面のレプリカ膜を高真空下で作製して、これを電顕観察するものである。

F-E 法を用いた人工膜の観察により、生体膜の状態と F-E 像との関係が明らかにされてきており、膜二重層が脂質のみからできている場合には F-E 像に膜内粒子は認められず (Deamer *et al.*, 1970), 生体膜に認められる粒子はたんぱく質であること (Segrest *et al.*, 1974) や、膜が遷移温度以上で液晶状態にある時と、遷移温度以下で固相の状態にある時とで F-E 像が大きく相違すること (Verkleij *et al.*, 1972; Ververgaert *et al.*, 1973; Kleemann and McConnell, 1976) 等が述べられてきた。また、Krzywicki (1975) は、極性脂質-水の系およびたんぱく質-水の系について F-E 法と X線観察で膜の多形現象を検討している。このように、F-E 法は生体膜を詳細に研究する上で有効な方法であると言える。

電顕観察は九州大学超高圧電子顕微鏡室で行った。お世話になった同室職員の方々に感謝する。

材料と方法

材料

即殺コイの背側普通肉のみを用いた。10×10×10 mm³ 程度のブロックにして -5°C に貯蔵し、経日的に取り出して電顕観察した。-5°C に貯蔵したのは、PLの酵素的分解が 0°C から -20°C の範囲では -5°C で最も速かつたからである (花岡・豊水, 1979 a)。

Freeze-Etching 電顕法

前処理—コイ背側肉を 1×10×10 mm³ 程度の薄板

として切り出し、1.25%グルタルアルデヒド-0.07 M リン酸緩衝液 (pH 6.5) で 5°C, 2 時間固定し、リン酸緩衝液で数回洗浄した後、40%グリセリン-0.07 M リン酸緩衝液に 5°C, 2 時間浸漬した。

レプリカ膜作製—前処理した肉を $1 \times 1 \times 3 \text{ mm}^3$ 程度の小片に切り出して試料台にセットし、液体フレオン 12 中で凍結後、液体窒素中で凍結し、日本電子製真空蒸着装置 JEE-4 X 中で 2×10^{-6} Torr. の真空中、 -100°C で割断し、30 秒のエッチングの後、白金-パラジウムによるシャドウイングとカーボンによる補強でレプリケーション後ハイター：水 (1:3) で筋肉を溶解し、得られたレプリカ膜をアルコール：水 (1:3) で数回洗浄後 300 メッシュにすくって日本電子製 JEM 200 B を用い、200 KV で電顕観察を行った。

実験結果

死直後普通肉の電顕像

死直後コイ普通肉の縦断面を Fig. 1a に示す。コイ普通肉の細胞内小器官としては、筋原繊維の各ザルコメアを取り巻く連続的な閉じられた小胞系である筋小胞体 (Armstrong, 1975; 野々村・若林, 1975) が主であり、筋小胞体に Ca^{2+} 遊離の信号を伝達する横断系統が観察された以外には、ミトコンドリア等の小器官はほとんど観察されなかつた。この結果とウサギ骨格筋において筋小胞体の全脂質の 80% 近くは PL であり、そのうち 65% は phosphatidylcholine であること (MacLennan *et al.*, 1971), およびカエル縫工筋において、筋小胞体の表面積は筋繊維表面積の 40~50 倍であるのに対し、横断系統の表面積は 7 倍にすぎないこと (Peachey, 1965) から類推して、コイ普通肉の主要な PL 局在部位を筋小胞体と考え、その凍結貯蔵に伴う変化を観察することとした。

この死直後の F-E 像において、筋小胞体末端のふくらんだ部分である terminal cisternae と横断系統とからなる triad が認められた。筋小胞体膜二重層の中間で剥離を受けて内面を露出させている剥離面には凹面と凸面があり、凹面は膜二重層の筋原繊維側に面するモノレイヤーの内面であり、膜面に密に存在している粒子は主として Ca^{2+} -pump protein と考えられる (Saito *et al.*, 1978)。凸面は筋小胞体二重層の筋小胞体内部に面するモノレイヤーであり、粒子がほとんど存在しない。この二種の膜面の他に剥離を受けず断面として認められるものも存在する。Fig. 1b は横断面である。縦断面と同様の膜面が観察された。

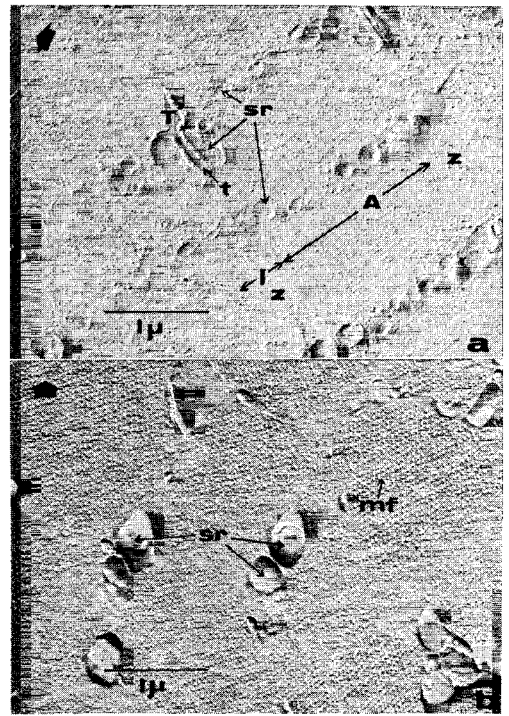


Fig. 1. Freeze-etching images along (a) and across (b) the myofibrils of ordinary muscle in carp immediately after death. Particles were packed densely in a concave fracture face and scarcely any in a convex one. Arrow at upper left indicates the direction of shadowing. sr, sarcoplasmic reticulum; t, transverse system; T, triad; z, z line; mf, myosin filament; A, A band; I, I band

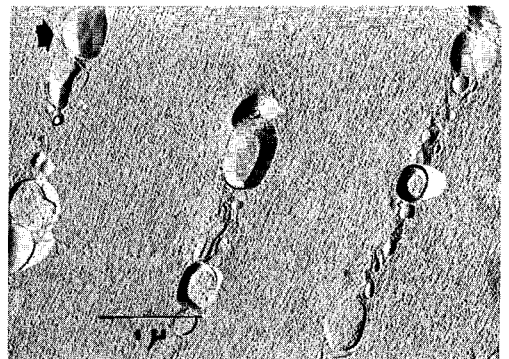


Fig. 2. F-E image along the myofibril of ordinary muscle which was placed at -5°C only for 10 hours.

凍結そのものが F-E 像に与える影響を明らかにするために、PL 分解のほとんどない -5°C , 10 時間放置したものの縦断面を Fig. 2 に示す。全体的な像

に差異はないが、二重層内で剝離を受けず断面になったものが増加している。

凍結貯蔵魚肉の筋小胞体膜変化

Fig. 3 は -5°C 、22 日間貯蔵のものの縦断面である。凹面の粒子は密に存在し、Fig. 2 と大差がなく、22 日間貯蔵では筋小胞体膜に変化をほとんど認めなかった。

-5°C 、30 日のものの縦断面を Fig. 4 a に示す。剝離面および断面の占める面積が低下した。Fig. 4 b は横断面であり、粒子分布が密でなく、不均一化が一部の凹面に認められた。Fig. 4 c はその拡大である。

-5°C 、60 日のものの縦断面を Fig. 5 a に示す。剝離面および断面の占める面積がさらに低下した。Fig. 5 b は横断面である。著しい粒子分布の不均一化が認められた。

-5°C 、90 日のものの縦断面を Fig. 6 に示す。剝離面および断面の占める面積が著しく減少し、正常な剝離面が消失し、残存している剝離面の輪郭や粒子が不明瞭であった。

Table 1 に剝離面と断面の総数に対する断面の数の割合を示す。断面の割合は -5°C に 10 時間放置して凍結するだけでも増加したが、貯蔵中にさらに増加した。90 日では断面であるかどうか判別できない程の変化を受けたので測定しなかった。

Table 1. Rate of cross section to total section.

Storage period	0	10 h	22	30	60	90
	(control)		days	days	days	days
%	5	11	12	16	16	—

考 察

藤川 (1978) は、ヒト赤血球をフレオン 22 中に浸漬させて急速凍結を行うと、膜内面付近に形成された氷晶のため膜面が機械的破壊を受けた結果、膜内粒子の認められない部分が出現し、剝離を受ける面積が減少し、断面が増加すると報告している。 -5°C に 10 時間放置して凍結すると断面の割合が増加することは、生成した氷晶が膜を機械的に脆弱化させたことと関連するものであろう。これに対し、貯蔵中における断面の増加、剝離面積の減少、膜内粒子分布の不均一化は、次に述べるように PL 分解によるものであろう。

phospholipase 処理をした膜小胞の変化は *in vitro*

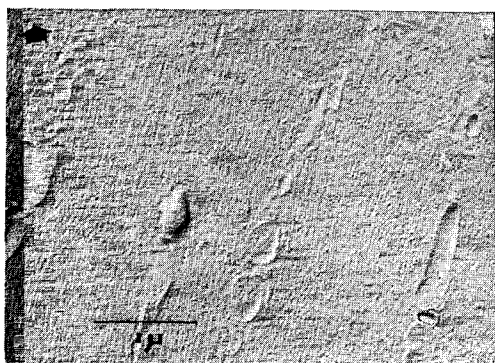


Fig. 3. F-E image along the myofibril of ordinary muscle stored at -5°C for 22 days. A great difference was not observed as compared with Fig. 2.

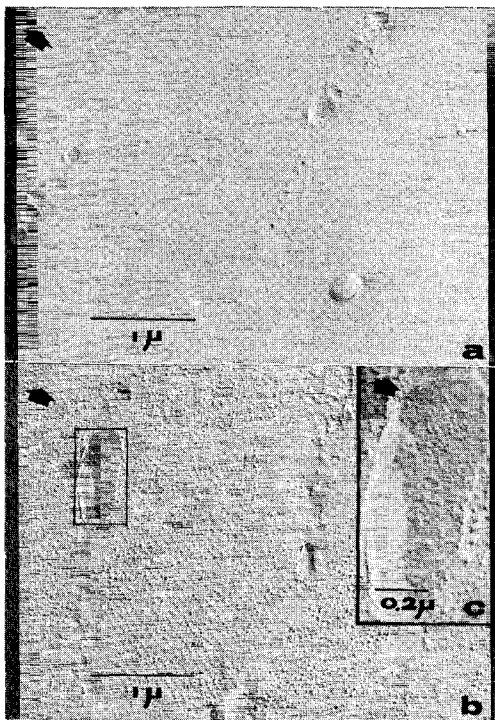


Fig. 4. (a) F-E image along the myofibril of ordinary muscle stored at -5°C for 30 days. The area of fracture faces and of cross sections of sarcoplasmic reticulum were decreased to some degree. (b) F-E image across the myofibril of ordinary muscle stored at -5°C for 30 days. The particles in some concave fracture faces were not packed densely but distributed irregularly (square). (c) The enlarged concave fracture face (the same square).

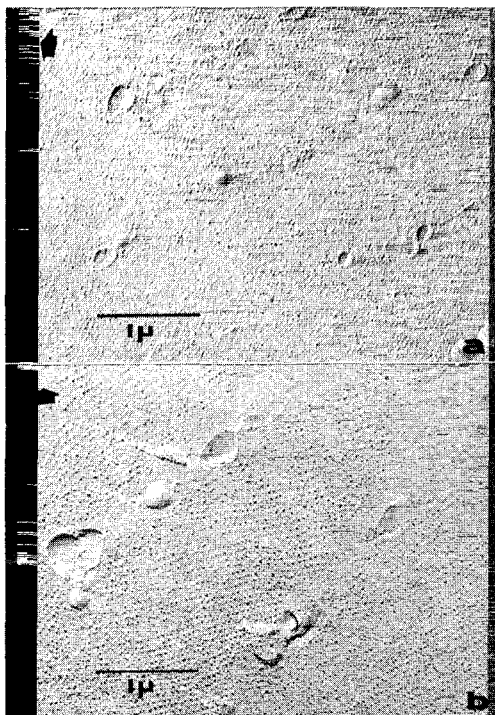


Fig. 5. (a) F-E image along the myofibril of ordinary muscle stored at -5°C for 60 days. The area of sarcoplasmic reticulum was more decreased than that in Fig. 4 a. (b) F-E image across the myofibril of ordinary muscle stored at -5°C for 60 days. The irregular particle distribution in some concave fracture faces was more notable than that in Fig. 4(b).

で研究されている。たとえば Coleman *et al.* (1970) は、ラットおよびヒト赤血球ゴーストをヘビ毒 phospholipase C で処理するとゴースト表面積が低下し、その表面にジグリセリドとセラミドからなる油滴が付着していることを、Verkley *et al.* (1973) は、ヒト赤血球ゴーストを phospholipase A_2 で処理すると粒子の凝集をおこすこと、および *Bacillus cereus* の phospholipase C はゴーストにのみ作用して剝離面を減少させることを報告している。また Packer *et al.* (1974) は、ウシ心筋ミトコンドリアを phospholipase A_2 で処理すると膜内粒子の凝集、剝離面の減少および断面の増加をもたらして最終的には剝離面が消失すること、およびウサギ骨格筋の筋小胞体ヴェジクルは phospholipase A_2 処理により剝離面が減少して最終的には消失することを報告している。これらは、純粋に取り出した膜調製物に対して単一の phospholipase を作用させた結果であるが、*in vivo* で各

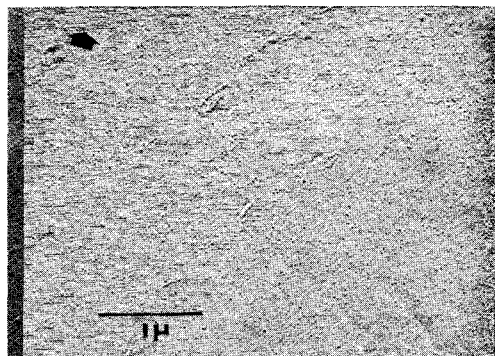


Fig. 6. F-E image along the myofibril of ordinary muscle stored at -5°C for 90 days. The area of sarcoplasmic reticulum was extremely decreased and fracture faces were obscure.

種 phospholipase によって PL 分解の進行する魚肉筋小胞体の変化もこれらと共通している。すなわち、PL の分解に伴って断面の増加、剝離面積の減少、膜内粒子分布の不均一化が認められた。本実験で観察された粒子の不均一化は縦断面には現われず、横断面あるいはそれに近い角度で割断したものに現われた。横断面では、同じ筋小胞体膜面でも junctional SR が剝離を受けやすいと思われる。粒子の不均一化と junctional SR とが関係するのかもしれないが、筋小胞体を部位別に分画することは現在できず、明らかなことは分らなかった。

本実験で示した各貯蔵期間における筋小胞体の形態はそれぞれ典型的なものであり、貯蔵日数の増加に伴い F-E 像に占める筋小胞体の面積は減少した。しかし、PL がほとんど分解されても、PL に結合していた脂肪酸が完全に膜から遊離してしまうとは考えられないし、また膜系にはたんぱく質も存在しているので筋小胞体膜が完全喪失する可能性は少なくとも本実験程度の貯蔵日数ではないと考えられる。事実、PL がほとんど残存しないと思われる 200 日近く貯蔵したもののでも膜組織として観察される部分があった。したがって、凍結貯蔵中における PL 分解に伴う生体膜変化をさらに生体膜の脆弱化として捉えるには本実験結果だけでは不充分であるので、ミクロゾームを分画してさらに研究を進めた。それについては別に報告する。

要 約

凍結貯蔵魚の PL 分解に伴う生体膜の変化を調べるために、コイ背側普通肉を -5°C に貯蔵し、経日的に取り出して F-E 法で電顕観察した。

死直後のものの観察の結果、コイ普通肉の細胞内小器官としては筋小胞体が主であり、一部に観察された横断系統以外には、ミトコンドリア等の小器官はほとんど見いだされなかつた。それゆえ、筋小胞体を主要なPL局在部位と考え、その凍結貯蔵に伴う変化に注目した。

22日貯蔵普通肉では、死直後のものと比べてほとんど差異がなかつたが、30日から観察される筋小胞体面積の減少、粒子分布の不均一化等が認められ、90日貯蔵では正常と考えられる剝離面が喪失した。なお、剝離面とならず断面として観察されるものが30日まで漸増した。

文 献

- Armstrong, C. F. 1975 Membrane particles and transmission at the triad. *Feder. Proc.*, 34: 1382-1389
- Coleman, R., J. B. Finean, S. Knutton and A. R. Limbrick 1970 A structural study of the modification of erythrocyte ghosts by phospholipase C. *Biochim. Biophys. Acta*, 219: 81-92
- Deamer, D. W., R. Leonard, A. Tardieu and D. Branton 1970 Lammellar and hexagonal lipid phase visualized by freeze-etching. *Biochim. Biophys. Acta*, 219: 47-60
- 藤川清三 1978 細胞内氷晶形成による生体膜の障害。凍結および乾燥研究会会誌, 24: 31-33
- 花岡研一・豊水正道 1979a 魚肉の凍結によるリン脂質分解。日水誌, 45(4): 465-468
- 花岡研一・豊水正道 1979b 魚肉の凍結に伴う脱水と成分濃縮がリン脂質分解に与える影響。九大農学誌, 33(4): 225-229
- Kleemann, W. and H. M. McConnell 1976 Interactions of proteins and cholesterol with lipids in bilayer membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, 419: 206-222
- Krzywicki, T. G. 1975 Structural studies of the associations between biological membrane components. *Biochim. Biophys. Acta*, 415: 1-28
- MacLennan, D. H., P. Seeman, G. H. Iles and C. C. Yip 1971 Membrane formation by the adenosine triphosphate of sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.*, 246(8): 2702-2710
- Meissner, G., G. F. Coner and S. Fleischer 1973 Isolation of sarcoplasmic reticulum by zonal centrifugation and purification of Ca^{2+} -pump and Ca^{2+} -binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 298: 246-269
- Meissner, G. and S. Fleischer 1972 The role of phospholipid in Ca^{2+} -stimulated ATPase activity of sarcoplasmic reticulum. *Biochim. Biophys. Acta*, 255: 19-33
- 野々村禎昭・若林健之 1975 電子顕微鏡。日本生化学会編：筋肉。東京化学同人，東京，363-430頁
- Packer, L., C. W. Mehrdo, G. Meissner, W. L. Zahler and S. Fleischer 1974 The structural role of lipids in mitochondrial and sarcoplasmic reticulum membranes. Freeze-fracture electron microscopy studies. *Biochim. Biophys. Acta*, 363: 159-181
- Peachey, L. D. 1965 The sarcoplasmic reticulum and transverse tubules of the sartorius. *J. Cell Biol.*, 25: 209-231
- Saito, A., C. T. Wang and S. Fleischer 1978 Membrane asymmetry and enhanced ultrastructural detail of sarcoplasmic reticulum revealed with use of tannic acid. *J. Cell Biol.*, 79: 601-616
- Segrest, J. P., T. G. Krzywicki and C. Sardet 1974 Association of the membrane-penetrating polypeptide segment of the human erythrocyte Mn-glycoprotein with phospholipid bilayers I. Formation of freeze-etch intramembranous particles. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 71(8): 3294-3298
- Toyomizu, M., K. Hanaoka, K. Satake and H. Nakagawa 1977 Effect of storage temperatures on accumulation of glycerylphosphorylcholine and decomposition of phosphatidylcholine in fish muscle during cold storage. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 43(10): 1181-1187
- Verkleij, A. J., P. H. J. Ververgaert, L. L. M. van Deenen and P. F. Elbers 1972 Phase transitions of phospholipid bilayers and membranes of *Acholeplasma laidlawii* B visualized by freeze-fracturing electron microscopy. *Biochim. Biophys. Acta*, 288: 326-332
- Verkleij, A. J., R. F. A. Zwaal, B. Roelofsen, P. Comfurius, D. Kastelijn and L. L. M. van Deenen 1973 The asymmetric distribution of phospholipids in the human red cell membrane. *Biochim. Biophys. Acta*, 323: 178-193
- Ververgaert, P. H. J., A. J. Verkleij, P. F. Elbers and L. L. M. van Deenen 1973 Analysis of the crystallization process in lecithin liposomes: A freeze-etch study. *Biochim. Biophys. Acta*, 311: 320-329

Summary

Phospholipids (PL) are localized in biological membranes. So the decomposition of PL might result in the disintegration of subcells in fish muscle. Therefore, in order to study an alteration of biological membranes caused by the PL decomposition in frozen fish, carp ordinary muscle was stored at -5°C , because the most rapid rate of enzymatic hydrolysis of PL has been observed at -5°C in the range from 0 to -20°C , and the muscle was periodically taken out and observed by freeze-etching (F-E) electron microscopy.

Sarcoplasmic reticulum (SR) was principal subcell in carp ordinary muscle immediately after death, and mitochondrion or other subcells were scarcely observed except transverse tubules. This indicated that PL were localized predominantly in SR. So the change of SR was observed during storage of carp ordinary muscle at -5°C . The frequency of occurrence of cross sections of SR in F-E images increased only by freezing of the ordinary muscle, and then increased further up to 30 days. The F-E images of ordinary muscle after storage for 22 days showed little difference as compared with that immediately after death. But after 30 days, the area of SR began to decrease, and the irregular distribution of particles was also observed in some fracture faces of SR. After 90 days, few normal fracture faces of SR were observed.