

異なる温度に保存したコイの筋原線維の 小片化に及ぼす順応温度の影響

三嶋 敏雄,* 藤井 潤, 橋 勝康, 植本 六良

(2002年10月10日受付, 2003年5月7日受理)

長崎大学水産学部水産栄養学研究室

The influence of thermal acclimation on fragmentation of myofibrils
from carp stored at different temperatures

TOSIO MISIMA,* JUN FUJII,
KATSUYASU TACHIBANA AND MUTSUYOSI TSUCHIMOTO

Laboratory of Fishery Nutritional Science, Faculty of Fisheries, Nagasaki University, Nagasaki, Nagasaki
852-8521, Japan

Fragmentation of myofibrils at various storage temperatures (0, 15, and 30°C) was studied using carp acclimated to 10°C (group L) and 30°C (group H). Fragmentation of myofibrils tended to proceed faster in group H than in group L at all storage temperatures. We examined some of the factors which might influence this difference in fragmentation of myofibrils between groups L and H. The increasing rate in extent of contraction of muscle was higher in group H than in group L at 0°C, hardly differed between groups L and H at 15°C, and was much lower in group H than in group L at 30°C. Calpain activity of group H was higher than that of group L at reaction temperatures of 25°C and 30°C, whereas the activity of group H was slightly lower than that of group L from 0°C to 20°C. Sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase activities were higher in group L than in group H at almost all the reaction temperatures from 0°C to 30°C. Consequently, it was suggested that the difference in the fragmentation rate of myofibrils between groups L and H might be caused by these factors.

キーワード: コイ, 水温, 死後変化, 筋原線維, 死後硬直, カルパイン

魚肉は畜肉に比べて鮮度変化が速く, 魚肉の食品としての価値は鮮度によって大きく左右される。魚肉の初期の鮮度低下は, 外観, 風味, 肉質などの変化としてみられるが, その中でも肉質の変化は重要視され, 多くの研究が行われている。

畑江ら¹⁾は, 種々の魚種について筋原線維の小片化や破断強度を調べ, 魚種により生鮮肉の肉質が違うと共に, 保存中の肉質の変化も魚種で異なることを示した。また, 著者らは²⁾養殖マダイと天然マダイの保存中の筋原線維の小片化率を測定し, 養殖ものが天然ものに比べ肉質の軟化が早いことを示した。さらに, 致死条件や保存温度が肉質の軟化に及ぼす影響,^{3,4)} 肉質軟化の原因⁵⁻⁷⁾など多くの研究課題が検討され, 明らかにされてきている。

一方, 魚類は外温性動物でありその体温を環境水温に

依存している。そして, 環境水温の違いは, 魚類の鮮度の低下,^{8,9)} 筋原線維タンパク質の温度安定性,¹⁰⁻¹²⁾ 死後硬直^{13,14)}などに影響することが報告されている。すなわち, 魚筋肉の死後変化に関する諸問題には環境水温が影響していることが多い。また, 著者らは¹⁵⁾飼育水温を変えたコイでは, 筋原線維 ATPase の諸性質に違いが生じることを報告した。このことから, コイでは飼育水温の違いが筋原線維の構造に微妙な違いをもたらしていることが推察され, 保存中の肉質の変化にも影響をもたらすことが考えられる。しかしながら, この点についての研究はこれまで行われていない。

そこで本研究では, 10°C と 30°C の水温に順応させたコイを用いて, 魚肉の保存中の筋原線維小片化に及ぼす飼育水温の影響を検討した。さらに, 小片化の遅速に影響を及ぼすことが考えられる要因についての検討を加え

* Tel : 81-95-847-1111. Email : mishima@net.nagasaki-u.ac.jp

た。

実験方法

試料魚 試料魚には養殖業者より購入した体重約 700 g のコイを用いた。試料魚は実験室内の水槽で水温 10 °C (低温群, $n=9$) または 30 °C (高温群, $n=9$) で 4 週間以上飼育した。その間、市販の餌料を十分に投餌した。試料魚は頭部を切断して即殺後、ただちに実験に供した。

筋収縮率および筋原線維の小片化率 採肉は前報¹⁶⁾と同様に、背部の頭から尾側の方向に柱状の筋肉(約 2 × 2 × 15 cm)を、皮と鱗をつけたままの状態に魚体の左右両面からそれぞれ採取した。同一魚体より採取した 2 本の筋肉は、水蒸気を飽和した容器の各温度下 (0 °C, 15 °C, 30 °C) に保存し、一方を筋収縮率の測定に、もう一方を筋原線維の小片化の測定に用いた。なお、測定は、頭部側と尾部側の両方で行った。

筋収縮率も前報¹⁶⁾と同様にして、筋肉の即殺直後に対する経時的な筋収縮の割合を測定し、筋収縮率が上昇した後、ほぼ変化しなくなるまで測定した。測定時間は、0 °C と 15 °C 保存では 48 時間までとしたが、30 °C 保存では筋収縮率の変化が非常に速くほぼ一定に達するものも早かったため、12 時間までとした。

筋原線維の小片化の測定は、深沢らの方法¹⁷⁾に準じて行なった。筋原線維の小片化は、位相差顕微鏡で計測した。筋原線維の総数 (Σ) に対する、サルコメアが 4 個以下からなる筋原線維の数 (F_{1-4}) の比を数えた。そして、総数 200 本以上の筋原線維より、 F_{1-4} 百分率を計算した ($=F/\Sigma \times 100$)。

カルパイン活性の測定 カルパイン (EC 3.4.22.17) 粗酵素液の調製は、Busch¹⁸⁾の方法に準じて行なった。まず、試料魚より採取した普通筋のミンチに、その採肉量の 3 倍量 (w/v) の 20 mM NaHCO₃ - 1 mM EDTA を加え、ホモジナイズを行なった後、10,000 × g で 15 分間の遠心分離をした。得られた上清はガラスウールで濾過した後、1 M CH₃COOH で pH 4.9 に調整し、10 分間等電点沈殿させた。その懸濁液を 4 °C, 18,000 × g で 20 分間の遠心分離を行ない、沈殿を得た。採肉量の 1/10 倍量 (w/v) の緩衝液 (0.1 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 10 mM 2-メルカプトエタノール (2-ME), pH 7.0) に溶解し、1 N NaOH で pH 7.0 に中和した。一様に溶解した後、4 °C, 100,000 × g で 60 分間の超遠心分離を行なった。上清に 1.8 M (NH₄)₂SO₄ を加えて塩析を行なった。そして、4 °C, 10,000 × g で 15 分間の遠心分離を行ない沈殿を得た。この沈殿は緩衝液に溶解させた後、48 時間の透析を行なった。透析後、再度 4 °C, 100,000 × g で 60 分間の超遠心分離を行ない、その上清をカルパイン粗酵素液とし

た。粗酵素液はタンパク質濃度を紫外吸収法 (UV 法)¹⁹⁾により測定し、20 mg/mL の濃度になるように先の緩衝液で希釈した。反応は、²⁰⁾終濃度が 3 mg/mL カゼイン、2 mM CaCl₂ または 1 mM EDTA, 5 mM 2-ME を含む 0.1 M Tris-HCl (pH 7.0), 2 mg/mL カルパイン粗酵素液の反応混液で 0~30 °C の範囲で行なった。反応停止は 10% トリクロロ酢酸 (TCA) を用いて行ない、4 °C で 15 分間放置した後、3,000 × g で 5 分間の遠心分離を行ない、上清の 278 nm の吸光度を測定した。カルパイン活性は、EDTA 存在下の吸光度を対照としたカルシウム存在下の吸光度より算出した。1 unit は 1 時間当たり 278 nm の吸光度を 1 上昇させる酵素量とした。

筋小胞体 (SR) Ca-ATPase 活性の測定 SR の調製は Whiting²¹⁾の方法に準じて行なった。全ての操作は 4 °C 以下で行った。即ち、試料魚から背部普通筋 15 g を採肉し 15 倍量の 0.01 M imidazol-HCl (pH 7.2), 0.1 M KCl, 5 mM MgSO₄, 1 mM ATP, 1 mM EDTA を加え、ホモジナイズした。その後 0 °C, 1,000 × g で 10 分間遠心分離し、沈殿を除去した。上清は 4 層のガーゼで濾過し、その濾液を 0 °C, 8,000 × g で 20 分間遠心分離した。その上清は更に 4 °C, 30,000 × g で 45 分間遠心分離し、沈殿を採肉量の 2 倍量の 0.01 M imidazol-HCl (pH 7.2), 0.6 M KCl に懸濁させた。この懸濁液を 30 分間攪拌後、再度 0 °C, 30,000 × g で 45 分間遠心分離した。この沈殿を 0.01 M imidazol-HCl (pH 7.4), 0.1 M KCl に懸濁した。SR 調製液のタンパク質濃度はマイクロビュレット法²²⁾により測定した。

SR Ca-ATPase 活性の測定は Ushio²³⁾の方法に準じて行なった。反応は、終濃度で 0.1 M KCl, 5 mM MgCl₂ と 0.1 mM CaCl₂ または 1 mM EGTA を含む 25 mM Tris-maleate (pH 7.4), 1 mM ATP 0.25 mL, 0.1 mg/mL SR 酵素液の反応混液 1.5 mL で行なった。反応温度は 0 °C から 30 °C までの温度範囲で 5 °C 間隔とした。反応停止は 20% TCA 0.5 mL を加えて行なった。遊離のリン酸量は Fiske と Subbarow の方法²⁴⁾で定量した。

統計処理 筋原線維の小片化や筋収縮率の結果として得られたデータは、2 つの順応温度間、あるいは 2 つの保存温度の間で保存時間にもなう変化に対しての分散分析により検定を行なった。また、カルパイン活性の温度依存性の比較は 2 つの順応温度間の平均値の差異を *t*-test により検定した。

結 果

筋原線維の小片化の経時変化 0 °C, 15 °C, 30 °C の各保存温度下における頭部側の筋原線維小片化の経時変化を Fig. 1 に示した。0 °C 保存では、両飼育群とも F_{1-4} 百

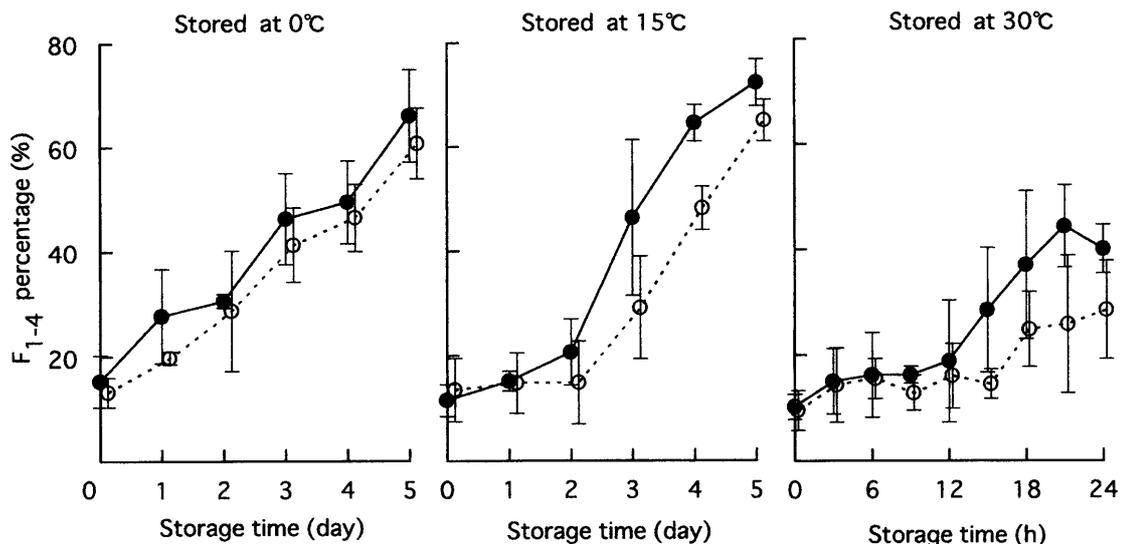


Fig. 1 Influence of acclimating temperature of carp on changes in F_{1-4} percentage of myofibrils from the dorsal part of fish body during storage at different temperatures. The open and closed circles represent the changes in carp reared at 10°C (group L, $n=3$) and 30°C (group H, $n=3$), respectively.

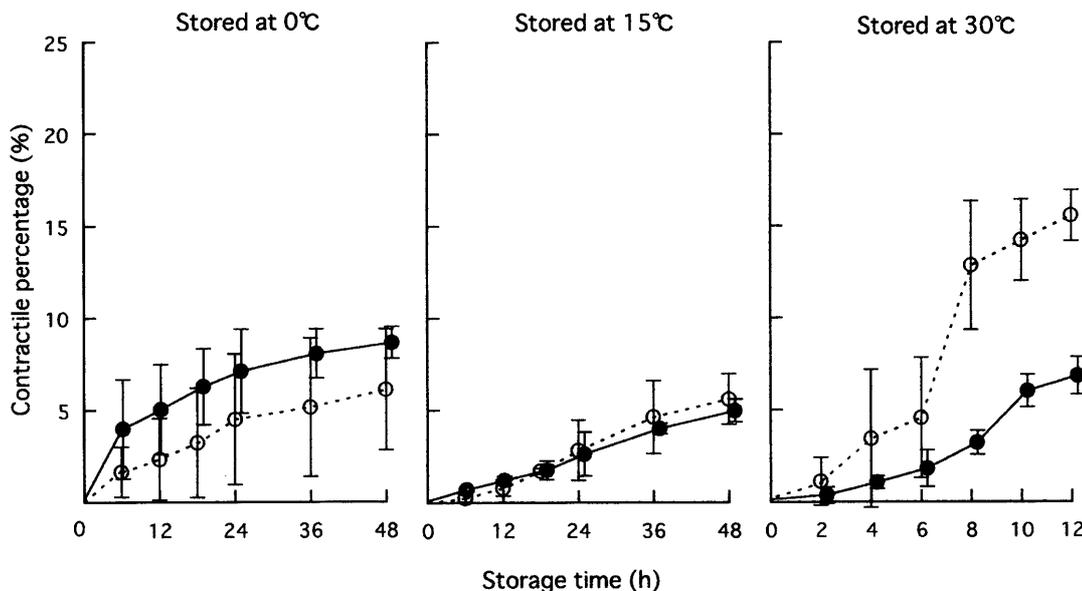


Fig. 2 Influence of rearing temperature of carp on changes of contractile percentage of muscle during storage at different temperatures. Symbols are the same as in Fig. 1.

分率は保存日数の経過に伴い直線的に上昇したが、その上昇速度は高温飼育群が低温飼育群よりも若干速い傾向にあった。15°C 保存では、両飼育群とも 2 日目以降に急激な上昇がみられ、その上昇速度は高温飼育群が低温飼育群よりも有意に ($p < 0.05$) 速かった。30°C 保存では、両群の上昇速度は 15 時間以後において明らかな差異を示し、高温飼育群が低温飼育群に比べて速い傾向にあった。また、同時に行った尾部側の結果は図示しなかったが頭部側の結果とほぼ同様であった。以上より、筋

原線維小片化の上昇速度はいずれの保存温度でも高温飼育群が低温飼育群よりも速い傾向にあると考えられた。

あらためて、飼育水温別に保存温度による影響をみると、両飼育群とも小片化の進行は保存温度 30°C が最も速く、次いで 0°C, 15°C の順であった。すなわち、保存温度の低い 0°C 保存が 15°C 保存よりも筋原線維小片化の進行が速くなるという現象が認められた。

筋収縮の経時変化 各保存温度における筋収縮率の経時変化を Fig. 2 に示した。0°C 保存では、両飼育群とも

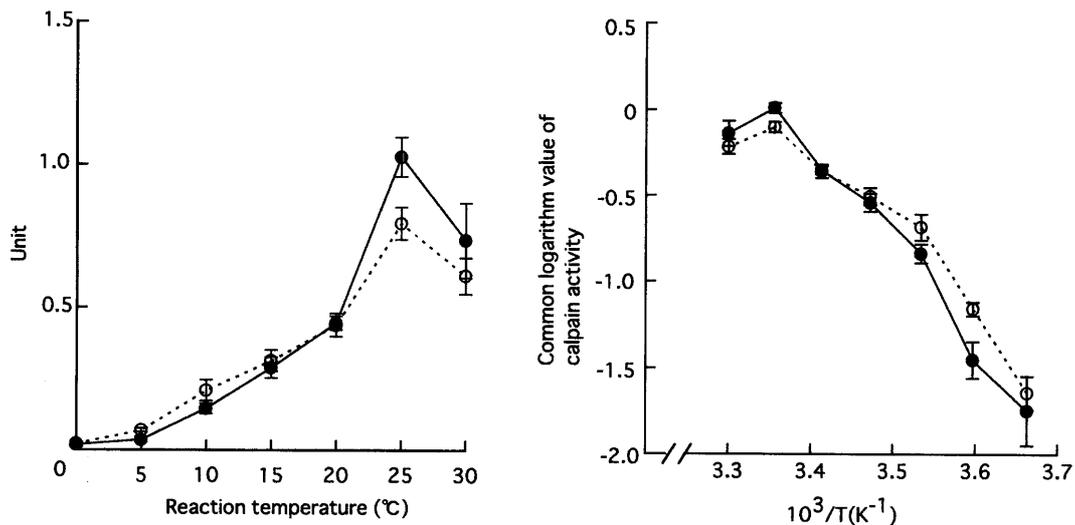


Fig. 3 Effect of the reaction temperature on calpain activity for carp reared at 10°C ($n=3$) and 30°C ($n=3$). Symbols are the same as in Fig. 1.

筋収縮率は48時間まで上昇した。その上昇速度は、高温飼育群が低温飼育群よりも速い傾向にあり、ピークのレベルも高かった。15°C保存では、両飼育群ともその上昇速度に差異はみられず、48時間でほぼピークに達し、ピークレベルもほぼ同じであった。30°C保存では、その上昇速度は高温飼育群が低温飼育群よりも顕著に遅く ($p < 0.001$)、両飼育群とも12時間でほぼピークに達した。筋収縮の上昇速度の飼育水温による差異は、保存温度で異なっていた。この結果は、筋原線維小片化の結果 (Fig. 1) と0°Cでよく対応したが、15°Cと30°Cでは対応しなかった。

あらためて保存温度による影響をみると、低温群の筋収縮の進行は30°C保存が顕著に速く、次いで0°C保存、15°C保存の順であった。また、高温群においては、30°C保存が0°C保存よりやや速く、15°C保存が顕著に遅かった。すなわち、筋収縮の進行は、15°Cよりむしろ0°Cが速いという (高温飼育群, $p < 0.05$) 結果が認められたが、この現象は先の筋原線維小片化の結果 (Fig. 1) とよく一致した。

カルパイン活性 両飼育群の各反応温度におけるカルパイン活性を Fig. 3 に示した。両飼育群とも反応温度0°Cから25°Cまで上昇したが、25°Cから30°Cでは低下し、至適温度は25°Cにあった。各反応温度における両飼育群の活性を比較すると15°C以下では高温飼育群は低温飼育群よりもやや低かったが、25°C以上では逆に高温飼育群は低温飼育群よりも明らかに高かった。0~20°Cにおいては、両群の活性レベルにはあまり差がみられなかったため、前述した筋原線維小片化の0°Cと15°C保存における両群の差にはあまり影響していないことが考えられた。しかし、30°Cにおいて、高温飼育

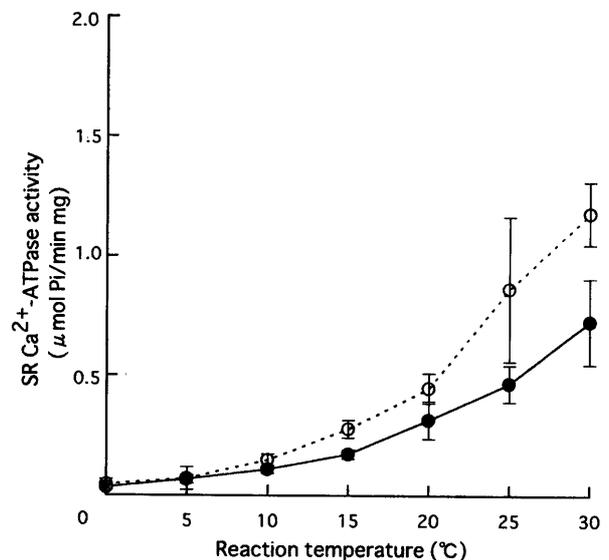


Fig. 4 Effect of the reaction temperature on sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase activity for carp reared at 10°C ($n=3$) and 30°C ($n=3$). Symbols are the same as in Fig. 1.

群が低温飼育群より活性レベルが明らかに高いことは、前述した筋原線維小片化の30°C保存において、高温飼育群が低温飼育群より速かったことに影響することが考えられた。

両飼育群のカルパイン活性の反応温度の低下に伴う変化をアレニウスプロットにとり (Fig. 3), 0°Cから25°Cの範囲における回帰直線の傾きを算出したところ高温飼育群 (-5.78 ± 0.53 , $n=3$) が低温飼育群 (-4.81 ± 0.28 , $n=3$) よりも有意に ($p < 0.05$) 大きかった。

筋小胞体 Ca-ATPase 活性 両飼育群の各反応温度に

おける筋小胞体 Ca-ATPase 活性を Fig. 4 に示した。両飼育群の活性レベルを比較すると、ほとんどの反応温度で高温飼育群が低温飼育群に比べて低かった。そして、温度が高い程、両者の差は大きくなった。すなわち、両飼育群の間には Ca 取り込みの能力に違いがあると思われる。このことも筋原線維小片化における両群の差異に影響を及ぼすことが考えられた。

また、反応温度による活性の変化は高温飼育群が低温飼育群より小さい傾向にあった。これは先のカルパイン活性の反応温度依存性とは逆の傾向であった。

考 察

死後の魚肉の品質低下は、軟化が大きな要因の一つであると考えられている。魚肉の軟化に関する研究は、これまでも数多く行われてきたが、飼育水温の影響については研究が全く行われていない。Heap^{25,26}は淡水魚類の中でコイなどは飼育水温の違いにより、筋原線維 Mg-ATPase の Vmax レベルが異なることを明らかにした。また、Penney ら²⁷は金魚の筋原線維 Mg-ATPase の熱失活や反応温度依存性が飼育水温の違いで異なることを示した。また、われわれのこれまでの研究においても、飼育水温を変えたコイでは、筋原線維 Ca-ATPase および Mg-ATPase の反応温度依存性、最大反応速度や基質親和性に違いが認められた。¹⁵ さらに、コイ筋原線維 Ca-ATPase の熱安定性 (K_D) も飼育水温により違いを生じることが明らかになっている。¹² また、これらの順応機構の背景として、温度順化に伴うミオシン重鎖,^{28,29} タンパク質および mRNA の発現変動³⁰ といった分子レベルでの解明も行われている。これらのことから、コイのような幅広い水温に棲める魚種では、低水温下に棲息することにより筋原線維の構造を変化させて、筋肉の運動能力を維持するという順応機構があることが推察される。この飼育水温によるコイ筋原線維の構造変化は死後の肉質の変化に影響することも十分に考えられる。

そこで本研究では、肉質の軟化の一指標である筋原線維の小片化を 10°C と 30°C で飼育したコイを用いて測定した。その結果、0°C, 15°C, 30°C のいずれの保存温度においても、筋原線維の小片化は高温飼育群が低温飼育群より速い傾向にあった。すなわち、死後の肉質の低下には飼育水温が影響することが本研究により明らかにされた。

さらに、この飼育水温による筋原線維小片化の違いの原因を検討するために、まず死後の筋肉の収縮速度を測定した。収縮が大きいことは、大きな張力を発生させ、筋原線維の小片化を促進する可能性も考えられるからである。その結果、筋収縮率の進行は、0°C 保存では、高温飼育群が低温飼育群より速く、筋原線維小片化におい

て高温飼育群が低温飼育群より速かったことに呼応しており、筋原線維の小片化の原因であることが考えられた。15°C 保存では筋収縮率の進行は 2 日間まで高温飼育群と低温飼育群で著しい差はなかったが、この期間においては筋原線維の小片化もさほど大きな差はなかったので、筋原線維の小片化に収縮率が関係する可能性は考えられた。しかし、30°C 保存では筋収縮率は高温飼育群が低温飼育群より低く、筋原線維の小片化は逆に高温飼育群が低温飼育群より速かった。すなわち、30°C 保存においては筋原線維の小片化には筋収縮率以外の別の要因が大きく影響していることが考えられた。

そこで次に、コイ筋肉中のカルパイン活性を測定した。カルパインは筋原線維の小片化を促進する可能性のあるプロテアーゼとして知られている。³¹ その結果、0~20°C の低い保存温度では両群の差異は小さかったが、25°C や 30°C の高温では高温飼育群が低温飼育群より明らかに高い活性を示した。従って、この結果は 30°C 保存の筋原線維の小片化において、高温飼育群が低温飼育群より速かったことを説明し得る可能性が考えられる。

ところで、カルパインについては約 30 年にわたり多くの研究が積み重ねられており、高等動物の種々の組織に広く分布する細胞内プロテアーゼとして知られている。至適 pH が中性にあり、活性発現に非生理的な濃度の Ca イオンを必要とする。³² 数十 μM 程度の低 Ca イオン要求性のカルパイン I と 1 mM 程度の高 Ca イオン要求性のカルパイン II が存在する。また、カルパインの生体における存在意義はまだ十分にわかっていないが、タンパク質の代謝回転ではなく、細胞内の情報伝達系に参与すると考えられている。すなわち、Ca イオンによって活性化される酵素を限定分解して Ca イオン依存性をなくすように働き、刺激の受容に伴う一過的な Ca イオン濃度の上昇の効果を延長する役割をもつかも知れないとされている。そして、カルパインによるプロテオリシスは不可逆的なので十分な制御が必要であり、カルパインに特異的な内因性インヒビターであるカルパスタチンが細胞内には存在することなどが明らかにされてきた。³³

魚類筋肉におけるカルパインの存在は種田ら³⁴によって、コイ筋肉を用いて明らかにされた。また、坂本らはコイとウサギのカルパイン II を精製し、それらの諸性質の比較³⁵ や、ミオシンに対する作用³⁶ を報告している。コイとウサギのカルパインは、至適 pH やミオシンに対する作用に違いはあるものの、活性の温度依存性や活性化に必要な Ca イオン濃度などの性質は基本的に似ていることを示している。

一方、筋原線維の小片化とプロテアーゼの関わりについては、Dayton ら³⁷ がブタの筋肉からカルパインを精製し、筋原線維の小片化に影響している因子である可能

性を示した。鈴木ら³¹⁾もカルパインを筋原線維に作用させると肉の貯蔵中の変化を *in vitro* で再現できるとしており、食肉の軟化にはカルパインが最も重要な酵素であろうと述べている。本研究の両飼育群のカルパイン活性の違いが、30°C 保存の筋原線維の小片化に呼応したことはこのことを支持しているように思える。しかし、高橋ら³⁸⁾は筋原線維の小片化は Ca イオンで直接的におこる可能性を示している。また、関ら³⁹⁾は、コイ筋原線維の小片化は Ca イオン存在下でも EGTA 存在下でもおこり、軟化は細胞内の Ca イオン濃度の増大に関係なく起こると報告し、複数の種類のプロテアーゼが関与することを推察していることから、カテプシン群の関与も考えられる。カテプシンについては、常盤ら⁴⁰⁾が調製した筋原線維にカテプシンの粗酵素液を加えた時の小片化が保存した魚肉に比べて小さく、カテプシンの関与は小さいかもしれないとしている。また、種々のプロテアーゼ阻害剤の全身灌流という新しい手法を用いて、原ら⁴¹⁾は筋肉の軟化に関係するプロテアーゼの特定を試みている。その中で、 α -アクチニンの分解については、システインプロテアーゼの阻害剤である E-64 が分解を抑えることから、システインプロテアーゼのカルパインやカテプシン B, L, S が関与するのではないかと述べている。以上のような知見が集積されてきているが、カルパインの活性化に必要な Ca イオン要求量は、生理的濃度や死後における筋肉中の濃度に比べて明らかに高いという問題がある。この点について、鈴木ら⁴²⁾はカルパイン活性は自己消化により Ca イオンに対する感受性が高まることを報告しているものの、現在においても生体内におけるカルパイン活性化の明確なメカニズムや、どのような時に活性化するかといったことは不明な点が多いとされている。⁴³⁾ 以上のことから、本研究の 30°C 保存の結果では筋原線維の小片化に筋収縮率以外の要因が影響し、その一要因としてカルパイン活性の寄与が推察されたが、Ca イオンや他のプロテアーゼの寄与など今後も検討すべき点があると思われる。

一方、カルパイン活性は Ca イオンにより活性化されるが、死後の筋肉中の Ca イオン濃度は筋小胞体の能力の低下によって高まると考えられている。そこで、SR Ca-ATPase 活性を両群について測定した。その結果、SR Ca-ATPase 活性は全ての温度で高温飼育群が低温飼育群より低かった。すなわち高温飼育群は低温飼育群より死後の筋原線維上の Ca イオン濃度の上昇が速くなり、カルパイン活性を高めることで筋原線維小片化が促進される可能性も推察された。

他方、筋収縮率の進行を保存温度の間で比較すると、両群ともに 0°C が 15°C より速く、筋原線維の小片化においても同様であった。0°C 保存における死後硬直の促進については、潮ら⁴⁴⁾が筋原線維中の Ca イオン濃度の

増加に起因することを明らかにしており、本研究の筋収縮率の結果もこのことを裏付けている。そして、筋原線維の小片化にも同様の保存温度による逆転がみられたことは、筋収縮の度合いが筋原線維の切れやすさを促進するという先の推測もよく反映していると思われる。

本研究では、魚肉保存中の肉質の変化に飼育水温による違いがみられ、その一要因としてカルパイン活性の影響が推察された。飼育水温によるカルパイン活性の違いがタンパク質の発現量の変化によるのか、酵素活性が何らかの機構により増大しているのかは重要な課題である。この点について、本実験に用いた粗酵素では精製レベルが低く比較が困難であると思われる。従って、より精製レベルの高い酵素を用いた両飼育群のカルパイン活性の性質やタンパク質量の比較が必要であると考えられる。また、魚肉の自己消化に関与することが考えられる酵素にはカルパイン以外にもカテプシン群があるが、これらの酵素に環境水温が及ぼす影響についても知見が乏しく、併せて今後の検討課題であると思われる。

文 献

- 1) 畑江敬子, 玉利朱美夏, 宮永邦子, 松本重一郎. 魚肉の物性の魚種間の差異および鮮度低下による変化. 日水誌 1985; **51**: 1155-1161.
- 2) 橋 勝康, 土居達也, 植本六良, 三嶋敏雄, 小倉理一, 松清恵一, 保田正人. 養殖マダイの肉質に対する遊泳運動の効果. 日水誌 1988; **54**: 677-681.
- 3) 岡 弘康, 大野一仁, 二宮順一郎. 養殖ハマチの致死条件と冷蔵中における魚肉の硬さとの関係. 日水誌 1990; **56**: 1673-1678.
- 4) 望月 聡, 佐藤安岐子. マアジ筋肉の死後変化に及ぼす致死条件と貯蔵温度の影響. 日水誌 1994; **60**: 125-130.
- 5) Ando M, Toyohara H, Shimizu Y, Sakaguchi M. Post-mortem tenderization of fish muscle due to weakening of pericellular connective tissue. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1993; **59**: 1073-1076.
- 6) Ando M, Toyohara H, Sakaguchi M. Post-mortem tenderization of rainbow trout muscle caused by the disintegration of collagen fibers in the pericellular connective tissue. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1992; **58**: 567-570.
- 7) Ando M, Yoshimoto Y, Inabu K, Nakagawa T, Makinodan Y. Post-mortem change of three-dimensional structure of collagen fibrillar network in fish muscle pericellular connective tissues corresponding to post-mortem tenderization. *Fish. Sci.* 1995; **61**: 327-330.
- 8) Tsuchimoto M, Misima T, Utsugi T, Kitajima S, Yada S, Senta T, Yasuda M. The speed of lowering in freshness of fishes in several waters and the effect of the habitat temperature on the speed. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1986; **52**: 1431-1441.
- 9) Tsuchimoto M, Misima T, Utsugi T, Kitajima S, Yada S, Senta T, Yasuda M. Resolution characteristics of ATP related compounds in fishes from several waters and the effect of habitat temperatures on the characters. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1988; **54**: 683-689.
- 10) 橋本昭彦, 小林章良, 新井健一. 魚類筋原線維 Ca-ATPase 活性の温度安定性と環境適応. 日水誌 1982; **48**: 671-684.

- 11) Tsuchimoto M, Tanaka N, Misima T, Yada S, Senta T, Yasuda M. The influence of habitat water temperature on the relative thermostability of myofibrillar Ca^{2+} -ATPase in fishes collected in the waters from tropical to frigid zones. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1988; **54**: 787-793.
- 12) Tsuchimoto M, Tanaka N, Uesugi Y, Misima T, Tachibana K, Yada S, Senta T, Yasuda M. The influence of rearing water temperature on the relative thermostability of myofibrillar Ca^{2+} -ATPase and on the lowering speed of freshness in carp. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1988; **54**: 117-122.
- 13) Abe H, Okuma E. Rigor-mortis progress of carp acclimated to different water temperatures. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1991; **57**: 2095-2100.
- 14) Hwang G, Ushio H, Watabe S, Iwamoto M, Hashimoto K. The effect of thermal acclimation on rigor mortis progress of carp stored at different temperatures. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1991; **57**: 541-548.
- 15) Misima T, Yokoyama T, Yano K, Tsuchimoto M. The influence of rearing water temperature on the properties of Ca^{2+} - and Mg^{2+} -ATPase activity on carp myofibril. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1990; **56**: 477-487.
- 16) Misima T, Fujii J, Tachibana K, Tsuchimoto M. Influence of contracture on breaking strength in carp muscle. *Fish. Sci.* 1995; **61**: 209-213.
- 17) Fukazawa T, Hashimoto Y, Tonomura Y. Isolation of single sarcomere and its contraction on addition of adenosine triphosphate. *Biochim. Biophys. Acta* 1963; **75**: 234-240.
- 18) Busch WA, Stromer MH, Goll DE, Suzuki A. Ca^{2+} -specific removal of Z Lines from rabbit skeletal muscle. *J. Cell Biol.* 1972; **52**: 367-381.
- 19) 梅本 滋. タンパク質の迅速定量. 「水産生物化学・食品学実験書」(斉藤恒行, 内山 均, 梅本 滋, 河端俊治編) 恒星社厚生閣, 東京. 1974; 215-216.
- 20) 川崎博史, 鈴木紘一. カルシウム依存性プロテアーゼ(カルパイン). 「蛋白質分解酵素 I」(鶴 大典, 船津勝編) 学会出版センター, 東京. 1993; 60-61.
- 21) Whiting RC. Calcium uptake by bovine muscle mitochondria and sarcoplasmic reticulum. *J. Food Sci.* 1986; **45**: 288-292.
- 22) 梅本 滋. タンパク質の迅速定量. 「水産生物化学・食品学実験書」(斉藤恒行, 内山 均, 梅本 滋, 河端俊治編) 恒星社厚生閣, 東京. 1974; 208-212.
- 23) Ushio H, Watabe S. Effects of temperature acclimation on Ca^{2+} -ATPase of the carp sarcoplasmic reticulum. *J. Exp. Zool.* 1993; **265**: 9-17.
- 24) Fiske CH, Subbarow Y. The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.* 1925; **66**: 375-400.
- 25) Heap SP, Watt PW, Goldspink G. Consequence of thermal change on the myofibrillar ATPase of five freshwater teleosts. *J. Fish Biol.* 1985; **26**: 733-738.
- 26) Heap SP, Watt PW, Goldspink G. Myofibrillar ATPase activity in the carp *Cyprinus carpio*: interactions between starvation and environmental temperature. *J. Exp. Biol.* 1986; **123**: 373-382.
- 27) Penney RK, Goldspink G. Short term temperature acclimation in myofibrillar ATPase of a stenotherm *Salmo gairdneri* Richardson and an eurytherm *Carassius auratus*. *J. Fish Biol.* 1981; **18**: 715-721.
- 28) Imai J, Hirayama Y, Kikuchi K, Kakinuma M, Watabe S. cDNA cloning of myosin heavy chain isoforms from carp fast skeletal muscle and their gene expression associated with temperature acclimation. *J. Exp. Biol.* 1997; **200**: 27-34.
- 29) Watabe S, Hirayama Y, Nakaya M, Kakinuma M, Kikiuchi K, Guo XF, Kanoh S, Chaen S, Ooi T. Carp expresses fast skeletal myosin isoforms with altered motor functions and structural stabilities to compensate for changes in environmental temperature. *J. Therm. Biol.* 1998; **22**: 375-390.
- 30) 菊池 潔. 魚類の温度馴化に伴う生化学的变化に関する研究. 日本誌 2000; **66**: 611-614.
- 31) Suzuki A, Goll DE. Quantitative assay for CASF (Ca^{2+} -activated sarcoplasmic factor) activity, and effect of CASF treatment on ATPase activities of rabbit myofibrils. *Agr. Biol. Chem.* 1874; **38**: 2167-2175.
- 32) 今堀和友. Ca 依存性プロテアーゼと生体制御. 「蛋白質核酸 酵素 Vol 25」共立出版, 東京. 1980; 483-490.
- 33) 村地 考. 細胞機能におけるカルパインとカルバスタチンの役割. 「蛋白質 核酸 酵素 Vol 33」(遠藤 實, 西塚泰美, 八木康一, 宮本英七編) 共立出版, 東京. 1988; 2193-2206.
- 34) 種田貴司, 渡辺孝博, 関 伸夫. コイ筋肉中のカルパインの精製と一般的性質. 日本誌 1983; **49**: 219-228.
- 35) 坂本慎一, 山田祐三, 関 伸夫. コイおよびウサギ筋肉のカルパイン II の含量と酵素的性質の比較. 日本誌 1985; **50**: 825-831.
- 36) 坂本慎一, 関 伸夫. カルパインによるコイミオシンの限定分解. 日本誌 1985; **51**: 1551-1557.
- 37) Daiton WR, Reville WJ, Goll DE, Stromer MH. A Ca^{2+} -activated protease possibly involved in myofibrillar protein turnover. Partial characterization of the purified enzyme. *Biochemistry* 1976; **15**: 2159-2167.
- 38) Hattori A, Takahashi K. Studies on the post-mortem fragmentation of myofibrils. *J. Biochem.* 1979; **85**: 47-56.
- 39) 関 伸夫, 土谷英樹. コイ筋原線維の貯蔵中のタンパク質組成変化と小片化. 日本誌 1991; **57**: 927-933.
- 40) Tokiwa T, Matsumiya H. Fragmentation of fish myofibril. Effect of storage condition and muscle cathepsin. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1969; **35**: 1099-1109.
- 41) Hara K, Pangkey H, Kurihara M, Tachibana K, Cao M, Osatomi K, Ishihara T. Proteolytic degradation of fish myofibrillar proteins by internal proteases. Proc. 9th JSPS Joint Sem. Mar. Fish. Sci. 1999: 299-309.
- 42) Suzuki K, Tsuji S, Ishiura S, Kimura Y, Kubota S, Imahori K. Autolysis of calcium-activated neutral protease of chicken skeletal muscle. *J. Biochem.* 1981; **90**: 1787-1793.
- 43) 反町洋之, 鈴木紘一. Ca^{2+} 結合蛋白質としてのカルパイン. 「蛋白質 核酸 酵素 Vol 43」(御子柴克彦, 遠藤 實, 宮本英七編) 共立出版, 東京. 1998; 1666-1674.
- 44) 潮 秀樹. 魚類の筋小胞体. 「魚類の死後硬直, 水産学シリーズ 86」(山中英明編) 恒星社厚生閣, 東京. 1991; 21-30.