

各種食材に浸漬処理した牛肉ミオシン およびアクチンの定量的解析の試み

進藤 智子*, 進藤 穰**, 大久保 美智子*

Quantitative Analysis of Myosin and Actin of Beef Marinated in Food Materials

Tomoko Shindo*, Jo Shindo** and Michiko Ohkubo*

牛肉を 5, 20, 35℃ で副食材の醤油, 酒, 酢および生姜汁に浸漬処理を行った際, これらの副食材が牛肉に及ぼす影響を Sodium dodecyl sulfate-ポリアクリルアミドゲル電気泳動図から特にミオシンおよびアクチンに注目して, それらの変化を定量的に把握し, さらに客観的に区別することを試みた。ミオシンバンドは, 5℃ 処理におけるすべての副食材の影響で Broad になる現象がみられ, 処理温度の増加ならびに処理時間に伴って減少がみられた。アクチンバンドは酒の何れの処理でも Broad になる現象がみられたが, 醤油ならびに生姜の処理ではむしろ, バンド幅は減少した。さらに, ミオシンおよびアクチンのバンド変化を階層的クラスター分析により, 客観的に分類した。35℃ の処理温度において, 醤油の処理と生姜の処理が最初に融合し, 両者が及ぼす肉への影響は似たものであると分類された。また, 醤油, 酒, 酢および生姜の処理が融合する形態は, 処理温度の条件によって異なった。

Key words: [ミオシン] [アクチン] [副食材] [反応速度論解析] [クラスター分析]

(Received November 5, 2001)

緒 論

肉を調理する際, 肉を軟らかくするための前処理として, 滴物理的に叩いて軟らかくする。滷タンパク質分解酵素を含む食材であるパパイヤ果汁や生姜汁に漬ける。焼酒, 酢および醤油などその他の調味料に漬ける。などの手段が用いられており¹⁾, これらの手段は長年の経験によるものである。一方, これらの手段が肉の軟化を引き起こす現象をSodium dodecyl sulfate-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) によりタンパク質レベルで捉えて解明することが試みられている^{2,5)}。しかしながら, 調味料およびタンパク質分解酵素などの副食材がタンパク質に及ぼす影響は定量的, 系統的に識別されていない。

本研究では, 醤油, 酒, 酢, 生姜などの副食材がミオシンおよびアクチンに及ぼす影響を定量的に捉え, さらにその影響を客観的に区別することを試みた。

* 鹿児島純心女子短期大学生活学科食物栄養専攻 (〒890-8525 鹿児島市唐湊4丁目22番1号)

**鹿児島大学水産学部 (〒890-0056 鹿児島市下荒田4丁目50番20号)

実験方法

1. 試料および副食材

小売店で購入した牛もも肉の薄切り(宮崎県産)を試料とした。試料は -20°C の恒温庫で貯蔵し、実験の都度、流水解凍して用いた。副食材として、醤油、酒、酢および生姜汁を用いた。醤油は「丸大豆醤油(塩分濃度18%)」(キッコーマン)、酒は「日の出料理酒(アルコール14%, 塩分2.1%)」(キング醸造)、酢は「醸造穀物酢(酸度4.2%)」(ミツカン)をそれぞれ用いた。生姜汁は小売店で購入した生姜(高知県産)の皮を剥き、おろした後、ガーゼで濾し、7,000rpmで5分間遠心分離によりデンプンを除去して調製した。

2. 副食材による処理

試料0.5gに対して、副食材を1ml加え、5, 20, 35°C の恒温槽内で0, 24, 48, 72時間放置した。なお、本研究では、対照区におけるミオシンおよびアクチンの変化が緩やかであると考え、対照区を基に試験区と比較するために浸漬時間を24, 48, 72時間とした。所定時間放置後、5%トリクロロ酢酸2mlを加え反応を停止した。これらの処理を行った試料を試験区とした。また、副食材を添加しなかった試料を対照区とした。

3. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動用可溶化液の調製

各処理を施した試料に対して100mM Tris-HCl buffer (pH7.0)を2ml加え、ホモジナイズした溶液を1M Tris-HCl buffer (pH 8.8)でpHを7.0に調整した。さらに、溶液中のタンパク質濃度に対し所定量のSDS-Sample buffer⁶⁾⁷⁾を添加し、 100°C の熱水中で90秒間加熱後、 5°C で24時間放置し、可溶化した。なお、タンパク質はFolinの変法⁸⁾⁹⁾により定量した。

4. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動ならびにミオシンバンドおよびアクチンバンドの定量

可溶化液をLaemmliの方法¹⁰⁾により、10%のポリアクリルアミドゲルを用いてSDS-電気泳動を行った。電気泳動後、ゲルをCoomassie Brilliant Blue溶液(和光純薬, Quick-CBB)を用いて染色し、さらに脱色後、ゲル乾燥器により乾燥した。

得られたSDS-PAGE図形は、スキャナー(Canon, FB1210U)で画像として取り込み、その画像をグレースケールに変換した。グレースケール画像におけるミオシンおよびアクチンのバンドの定量は、デンストメータによる染色強度の定量法を適用した画像解析法を用いた。画像解析法にはMicrosoft VC++ (Ver. 6.0)により作成したプログラムを使用した。

5. ミオシンバンドおよびアクチンバンドの変化における客観的分類

ミオシンおよびアクチンのバンドの変化を反応速度論を用いて解析し¹¹⁾¹²⁾、速度定数および反応次数を求めた。副食材が及ぼすミオシンおよびアクチンへの影響は、速度定数および反応次数を標準化した値を変数として扱った階層的クラスター分析により客観的に分類した¹³⁾¹⁴⁾。階層的クラスター分析にはMicrosoft VC++ (Ver. 6.0)により作成したプログラムを使用した。

結 果

1. SDS-PAGE図形におけるミオシンバンドおよびアクチンバンドの変化

醤油、酒、酢および生姜により処理した試料のSDS-PAGE図形を図1に示す。対照区の場合、何れの処理温度においても処理時間の経過に伴いミオシンバンドの幅が太くなる現象(Broad)が認められた(図1-a)。また、Broadの増加の程度は、処理温度が低い程著しかった(図1-a)。また、本実験では確認していないが、20℃、35℃の長時間の処理条件下においては、微生物による影響および筋肉内の酵素による影響も考慮する必要があると考えられる。一方、5℃における何れの試験区でも、処理開始から24時間後または48時間後において、ミオシンバンドがより膨潤してBroadになる現象が認められたが(図1-a, b, c, d, e)、対照区におけるBroadとは異なるものであると考えられる。20℃および35℃において醤油試験区のミオシンバンドの幅は処理時間の経過に伴い減少した(図1-b)。酢試験区では、何れの温度でも24時間処理後にBroadになったバンドとそのバンドの下に別のバンドがみられた。この下方のバンドは主にミオシンバンド由来の分解物であると考えられる(図1-d)。酒および酢の両試験区ではバンドがBroadになった後、処理温度の増加ならびに時間経過に伴い、バンド幅は減少した(図1-c, d)。生姜試験区では、バンド幅の減少は著しく、20℃、72時間処理、35℃、48時間処理でバンドは消失した(図1-e)。さらに、35℃ではバンドのBroadが認められなかった。したがって、ミオシンが影響を受ける過程として、バンドがBroadになった後、分解されて消失していくと考えられる。

アクチンバンドの場合、5℃、20℃、35℃全ての処理温度において醤油ならびに生姜の両試験区で、バンドの減少がみられた(図1-b, e)。また、酒試験区では20℃および35℃において、処理開始24時間後、バンドがBroadになった(図1-c)。酢試験区ではミオシンバンドと同様に5℃、20℃、35℃においてアクチンバンドのすぐ下の位置に分解されたバンドが認められた(図1-d)。5℃、48時間および72時間に見られるバンドのBroadは、アクチンバンドの膨潤または、アクチンより分子量の大きいタンパク質が分解されてアクチンバンドと重なったことにより生じたと考えられる。さらに、20℃、35℃では、処理時間の経過に伴うアクチンバンドの減少が確認された(図1-d)。

以上より、アクチンよりミオシンの方が副食材の影響を受けやすく、また、この影響を肉レベルで検討する場合、ミオシンおよびアクチン以外のタンパク質の変化についても検討する必要がある、今後の課題と考えられる。

2. ミオシンバンドおよびアクチンバンドの変化における客観的分類

自然科学や工学における様々な現象を数理的(客観的)に取り扱うには、その現象を支配する法則を数学的に示す必要がある。その中でも、よく用いられる手段は、微分方程式により現象を表現することである¹¹⁾。微分方程式によって、単位時間あたりの変化量すなわち、反応の速度を解析すること(反応速度論解析)は、従来、生命科学や生物工学の分野の研究で多く利用されている。さらに、反応速度論解析は現象を動的に捉えるもので、必ずしも始めと終わりの状態が明らかでなくても、現象の途中経過を検索でき、反応の機構を解明するのに適している¹²⁾。本研究では、ミオシンバンドおよびアクチンバン

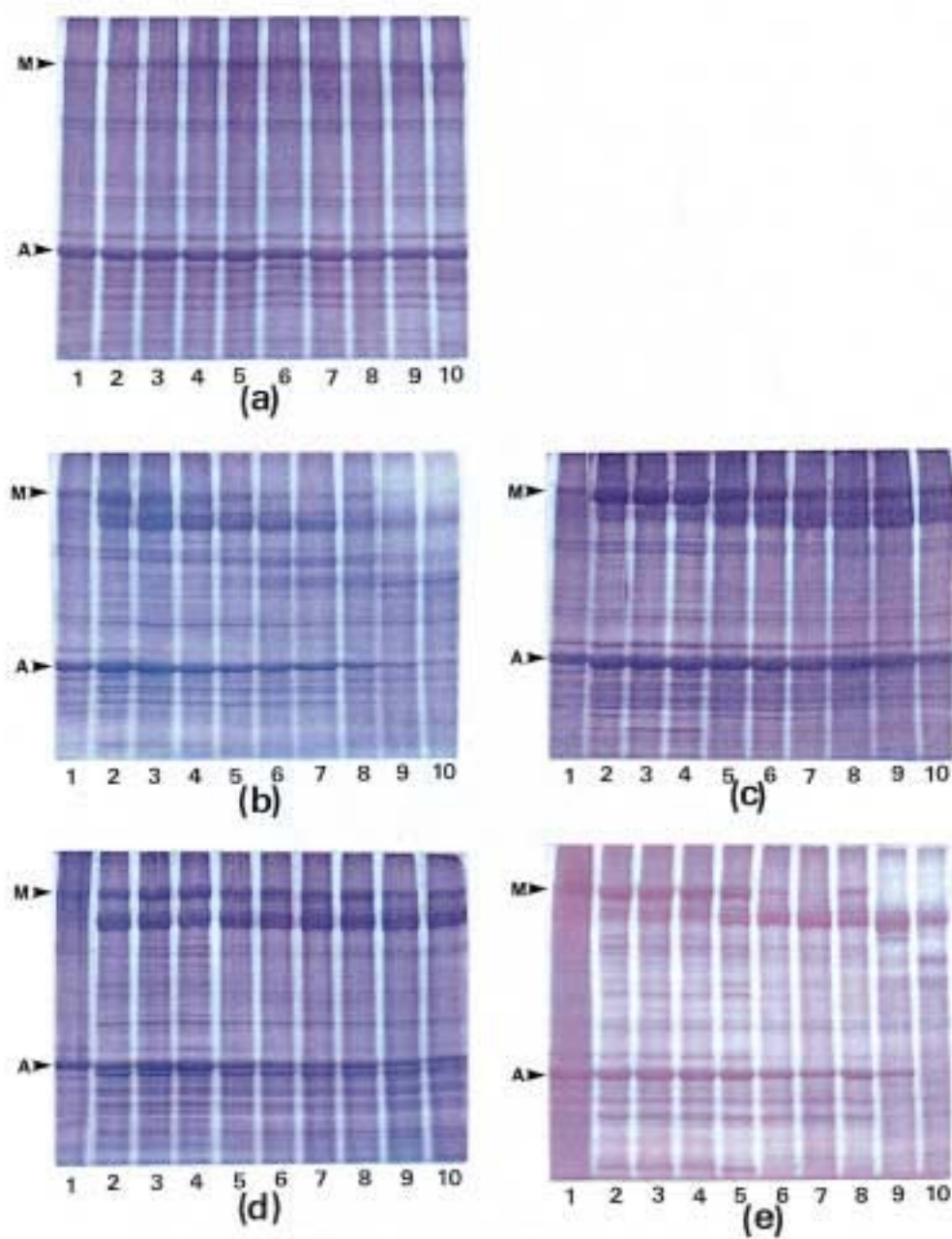


図1 副食材に浸漬した牛肉のタンパク質のSDS-PAGE

M：ミオシン，A：アクチン

(a)：対照区 (b)：醤油試験区 (c)：酒試験区 (d)：酢試験区 (e)：生姜試験区

実験温度：5℃(2,3,4), 20℃(5,6,7), 35℃(8,9,10) 反応時間0時間(1), 24時間(2,5,8), 48時間(3,6,9), 72時間(4,7,10) 1～10は、各々 10 μ gのタンパク質を供し、10%ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行った。

ドの染色強度を求め、その経時的变化を反応速度論を用いて解析し、副食材とミオシンならびにアクチンとの反応模式を構築することを試みた。

表1は、試験区および対照区における0時間処理のミオシンならびにアクチンの各バンドの染色強度を100%としたとき、各処理時間におけるミオシンバンドおよびアクチンバンドの相対染色強度を示す。前に述べたミオシンバンドおよびアクチンの各バンドにおけるBroadまたは減少の様子は相対染色強度の変化に反映されていた。また、処理開始24時間後、5℃における醤油試験区、生姜試験区、20℃における対照区、酒、酢、生姜の各試験区、ならびに35℃における酒試験区および酢試験区のミオシンバンドの相対染色強度が最大となった。アクチンバンドの場合においても同様の現象が5℃における醤油試験区、20℃における酒試験区および35℃における酒試験区で認められた。

したがって、24時間～72時間の処理におけるミオシンおよびアクチンのバンド変化を微分方程式（式滴）で表し、反応速度論解析を行うことを試み、測定値と計算値の相関係数が0.999

表1 副食材に浸漬処理した牛肉のミオシンバンドおよびアクチンバンドの相対染色強度

処理温度 (°C)	処理時間 (h)	相対染色強度 (%)									
		ミオシンバンド					アクチンバンド				
		肉	醤油	酒	酢	生姜	肉	醤油	酒	酢	生姜
5	0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
	24	131.7	226.0	179.4	187.0	232.3	100.6	104.3	114.7	94.8	84.8
	48	134.6	184.6	209.2	216.5	227.7	101.3	97.2	118.1	104.7	78.2
	72	164.0	129.0	221.9	210.8	199.6	103.2	83.6	115.9	114.3	76.4
20	0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
	24	186.7	96.5	191.9	164.7	172.4	102.7	84.5	161.9	48.9	70.9
	48	190.9	55.1	168.6	150.9	66.1	99.4	74.0	149.5	38.1	60.1
	72	196.4	44.1	141.4	131.1	39.4	97.5	74.0	145.3	35.9	52.1
35	0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
	24	96.6	53.0	165.9	141.7	57.2	104.4	61.0	164.9	38.5	60.0
	48	124.7	7.6	123.4	133.4	-1.0	100.0	41.7	138.8	35.3	48.7
	72	126.6	-4.0	119.9	95.3	-1.1	100.0	30.1	93.9	31.1	4.6

になった時の見かけ上の速度定数および反応次数を表2に示す。なお、処理開始48時間後においてバンドの相対染色強度が最大になり、その後減少した試験区ならびに処理開始48時間以降にバンドの相対染色強度変化が認められない試験区については微分方程式で表せないことから定数および次数を求めなかった。

$$\frac{d[\text{相対染色強度}]}{dt} = K[\text{相対染色強度}]^n \quad \text{滴}$$

ここで、 K：速度定数 n：反応次数 t：処理時間

表2 副食材に浸漬処理した牛肉のミオシンバンドおよびアクチンバンドの変化における速度定数および反応次数

処理温度 (°C)	対照区 試験区	ミオシンバンド		アクチンバンド	
		速度定数	反応次数	速度定数	反応次数
5	肉	2.432×10^{-65}	30.0	1.500×10^{-152}	75.0
	醤油	-0.451×10	-0.6	-1.300×10^9	-4.8
	酒	—	—	—	—
	酢	2.131×10^{16}	-7.1	0.025×10	0.1
	生姜	7.100×10^{71}	-30.0	-3.600×10^{-46}	23.5
20	肉	2.299×10^{-33}	14.0	-1.100×10^{-37}	18.0
	醤油	-2.800×10^{-6}	3.1	—	—
	酒	-9.330×10^3	-1.9	-1.200×10^{-42}	19.0
	酢	-0.175×10	-0.1	-1.200×10^{-18}	10.8
	生姜	-0.015×10^{-1}	1.7	-3.600×10^{-4}	1.7
35	肉	1.215×10^{87}	-42.0	—	—
	醤油	-0.0252×10	0.6	-0.001×10	1.1
	酒	-6.700×10^{18}	-9.0	-2.197×10^3	-1.5
	酢	-1.958×10^{-48}	22.5	-1.117×10^3	-2.5
	生姜	-2.400×10^{-8}	5.8	-1.499×10^3	-2.0

ミオシンおよびアクチンの各バンドの相対染色強度が処理時間の経過に伴って増加した場合と減少した場合との識別は、速度定数の符号により示される。しかしながら、副食材や処理温度の条件によって反応次数が異なることは、相対染色強度における増加または減少の形態が異なることを示した。したがって、速度定数の大小のみによって相対染色強度の変化を一概に比較し、分類することは不可能であった。

そこで、階層的クラスター分析によりミオシンおよびアクチンのバンド変化における客観的分類を試みた。階層的クラスター分析は、異質なものが混ざり合っている対象の中で、互いに似たものを階層的に集めて集落（クラスター）を作り、対象を数値的に分類する方法であり、対象間の非類似度を表す尺度として距離が計算される¹³⁾¹⁴⁾。この方法は遺伝子の研究分野においても、塩基配列の形状による生物の分類に用いられている。本研究では、表2に示す速度定数および反応次数を標準化した値を変数として扱い、クラスターの形成には最長距離法を用いた。図2はクラスターの形成過程を表した樹形図を示す。なお、速度定数および反応次数が求められなかった試験区については他の試験区に融合しない状態で樹形図に示した。

ミオシンバンドにおいては、20°C および35°C の処理温度で、醤油試験区と生姜試験区が最初に融合しており、アクチンバンドにおいても35°C の処理温度で、同様の融合がみられた。したがって、処理温度が高い場合、醤油と生姜が及ぼす肉への影響は似たものであることが客観的に確認された。また、ミオシンバンドとアクチンバンドのそれぞれにおいて、生姜処理区が対

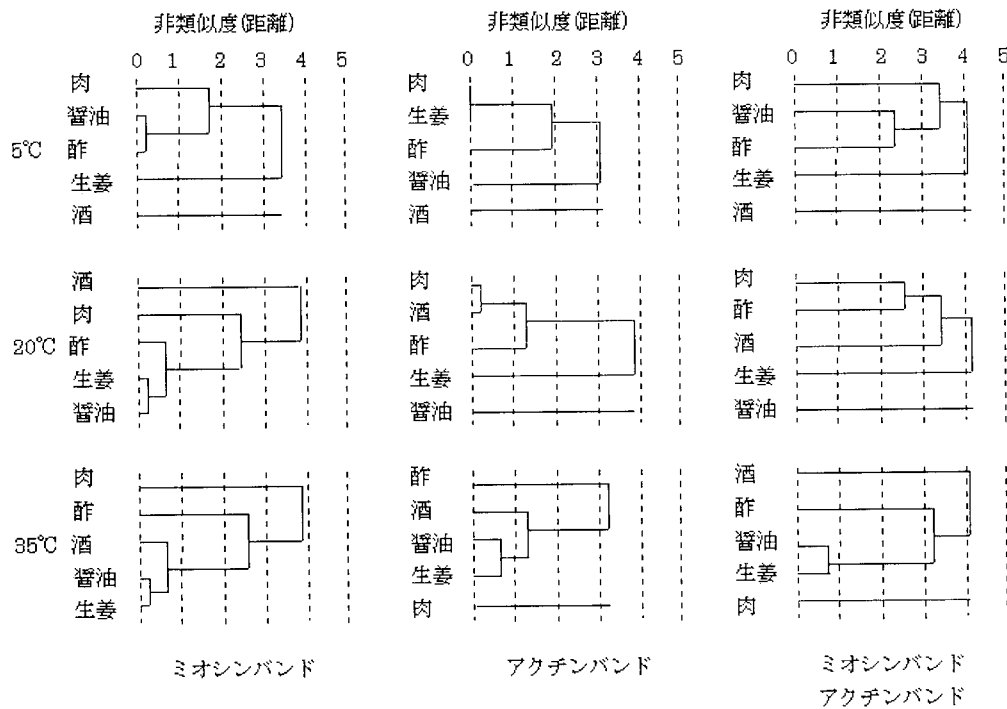


図2 副食材に浸漬処理した牛肉のミオシンバンドおよびアクチンバンドの樹形図

照区に融合した時の非類似度は、5℃の処理温度の場合に最も低い値を示すことから、生姜酵素が低温において試料に作用していないことが再確認された。また、ミオシンおよびアクチン両方のバンドの変化を考慮した場合、各処理温度によっても、融合の形態が異なることが客観的に明らかになった。したがって、副食材のみで系統的に分類することが不可能であった。

考 察

すでに、赤ワイン、パパイア、塩、および塩を含んだ酢をタンパク質に添加した場合、ミオシンバンドが消失することが報告されている²⁻⁵⁾。しかし本研究では、副食材を肉レベルで添加してSDS-PAGEで解析した。その結果、ミオシンとアクチンのバンドが分解または消失する前にBroadになる現象が確認された。この要因として、SDS-PAGEに供試する試料の可溶化は肉レベルで行ったために、ミオシンやアクチンより大きな分子が存在し、それらが低分子化して各バンドに融合することが考えられる。今後、ポリアクリルアミドの濃度を検討し、また、2次元の電気泳動法を用いて、アクチンより大きくミオシンより小さい分子およびミオシンより大きい分子の挙動も検討する必要があると考えている。また、試験区において、バンドのBroadになる過程も、反応速度論で解析し、階層的クラスター分析における変量の指標に加えることが必要となった。

pH, 塩濃度, 酵素が及ぼすミオシンおよびアクチンの変性は質的に異なるものであることから, 肉の軟化の程度も添加する副食材によって異なると推察される。本研究の結果は各副食材が及ぼす影響を断定するには至らなかったが, 副食材が及ぼすタンパク質の変質状態を客観的に分類し, 肉の軟化と照らし合わせる場合, 本研究で用いた手法が有用であると示唆された。

文 献

- 1) 浦上 智子:「調理科学」, 理工学社, 東京, 13(1990).
- 2) Toyohara M., Murata M., Ando M., Kubota S., Sakaguchi M., and Toyohara H.: *J. Food Sci.*, **64**, 804(1999).
- 3) Lin C. Y., Chen W. T., and Chou: *J. Food Sci.*, **65**, 906 (2000).
- 4) Offer G. and Trinick J.: *Meat Sci.*, **8**, 245 (1983).
- 5) Yates D. L., Dutson T. R., Caldwell J., and Carpenter L. Z.: *Meat Sci.*, **9**, 157 (1983).
- 6) 沼倉忠弘, 溝口 竜, 木村邦夫, 豊田恭平, 藤田孝夫, 関 伸夫, 新井健一: 日水誌, **55**, 1083(1989).
- 7) Patrick H. O'Farrell.: *J. Biol. Chem.*, **250**, 4007 (1975).
- 8) Folin O., Ciocalteu V.: *J. Biol. Chem.*, **73**, 627 (1927).
- 9) Meller. G. L.: *J. Biol. Chem.*, **146**, 339 (1942).
- 10) Laemmli, U. K.: *Nature*, **227**, 680 (1970).
- 11) 平田光穂, 須田精二郎, 竹本宜弘:「パソコンによる数値計算」, 朝倉書店, 東京, 74(1995).
- 12) 大西正健:「酵素反応速度論実験入門」, 学会出版センター, 東京, 1 (1988).
- 13) 菅 民郎:「多変量解析の実践」, 現代数学社, 東京, 180(1999).
- 14) 田中 豊, 垂水共之, 脇本和昌, 辻谷将明:「パソコン統計解析ハンドブックⅡ 多変量解析編」(田中 豊, 垂水共之, 脇本和昌 編), 共立出版, 東京, 267(1987).