

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：12101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26660102

研究課題名(和文)塩基ペプチドによる筋原線維加熱凝固阻止能に関する研究

研究課題名(英文)The study on the inhibitory capacity for the thermal coagulation of myofibril by basic peptides

研究代表者

宮口 右二 (Miyaguchi, Yuji)

茨城大学・農学部・教授

研究者番号：60250990

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,600,000円

研究成果の概要(和文)：サケの白子成分であるプロタミンは、食肉加工をする上で重要な性質である筋原線維の加熱ゲル形成能を阻害する効果を与えることが明らかになった。その作用機序は非常に特異的で、プロタミン中のあるペプチドに由来することが示唆された。

本研究の成果は、従来から食品添加物として使用されているプロタミンの用途開発につながるもので、プロタミンおよび同酵素分解物の性質は、これまでとは全く異なる食肉製品を物性改良剤になりうるものと考えられる。また、本研究の成果は筋原線維の加熱ゲル形成性の解明においても有益な知見を含んでおり、今後、ゲル化阻害作用を有するペプチド種の同定など、さらなる検討が必要と思われる。

研究成果の概要(英文)：This study attempted to evaluate the mechanism of inhibition of thermal coagulation of porcine myofibril by protamine (PRO) which is basic peptide originated from salmon milt. Tryptic digested PRO (DP) was prepared and the effect of DP on the rheological properties of myofibril was studied. The more PRO was digested, the less DP inhibited the thermal coagulation of myofibril. Further, DP was dialyzed against distilled water and the retentate was recovered as R-DP. The inhibitory activity of R-DP against the coagulation of myofibril was higher than that of intact PRO. Judging from the analysis of protein-protein interaction using electrophoresis, it was suggested that the inhibitory activity of DP against the coagulation of myofibril would differ from that of intact PRO.

研究分野：食品科学

キーワード：加熱凝固 筋原線維 トリプシン プロタミン 分子間相互作用

1. 研究開始当初の背景

(1) 食肉製品の物性改良剤の開発：古くから、減塩を目的に非食肉系の異種タンパク質（大豆や乳清）、あるいはデンプンやカラギーナンなどのゲルを形成する性質を有する天然物を添加物として、食肉のゲル形成性を促進する試みが国内外でなされてきた¹⁾。申請者は食肉中の塩基性タンパク質であるグリセルアルドヒド 3 リン酸でヒドゲナーゼ（GAPDH）をアクトミオシンに作用させると、ミオシンの可溶化が促進し、加熱後にゲル化の促進されることを明らかにしている²⁾。

(2) 新たな食肉の物性改良剤の可能性：塩基性アミノ酸のアルギニン（Arg）には、タンパク質の可溶化のあることが知られており、タンパク質の可溶化を目的としたいくつかの研究が知られている^{4,5)}。申請者もアルギニンも食肉中の筋原線維（Mf）に作用性について検討するため、塩基性ペプチドのプロタミンを Mf に作用させたところ、Mf は流動性を失わず、凝固（ゲル化）していない現象を見出した。この性質はアルギニン単体とは、全く反対の性質で、食肉タンパク質の加熱凝固阻害能を有することが示された。これは、今回の予備実験ではじめて明らかにされた現象であり、今後さらなる研究が必要と思われた。従来の添加物とは異なり、アルギニンリッチのプロタミンは、凝固阻止に作用することから、食肉タンパク質の物性研究の発展につながるとともに、新規な食肉の物性改良剤の開発にも寄与すると考えられる。

2. 研究の目的

(1) 魚の白子中に含まれ、DNA の安定化に寄与する塩基性ペプチドであるプロタミン（PRO）には、食肉タンパク質の加熱凝集を抑制し、流動性を失わせない性質を示すこと

が予備実験で明らかとなった。従来、食肉タンパク質の凝固阻害には、尿素や界面活性剤などの非食用化合物があるが、天然物質では知られていない。そこで本研究では、食肉タンパク質に新たな食品レオロジー特性を見出すため、PRO をモデルとした塩基性ペプチド共存下での食肉タンパク質のテクスチャーおよび熱特性に関する解析を行うことにした。

(2) また、上記ペプチド共存下での食肉構成タンパク質（ミオシン、アクチンなど）の分子レベルでの挙動解析および性状改変を示すペプチドの同定を試みた。すなわち、PRO 分解物を透析により分画し、各分画物の諸性質を明らかにするとともに、Mf の物性に及ぼす PRO および同分画物の効果並びに PRO 分画物と Mf との分子間相互作用を電気泳動法により調べた。さらに電気泳動ゲル中に検出されたタンパク質バンドをゲルから切り出し、MALDI-TOF-MS による解析から、プロタミンおよび同分解物が作用する Mf 中のタンパク質の同定を試みた。

3. 研究の方法

(1) 試料の調製

① PRO および同トリプシン分解物の調製
市販 PRO 硫酸塩 を RO 水に溶解し、種々の酵素/基質の重量比（E/S 比）のトリプシンで処理（37℃、120 分）した。その後、加熱処理で酵素反応を停止させた後、得られた溶液を凍結乾燥することで、トリプシン分解 PRO（DP）粉末を得た。

② トリプシン分解物の透析処理

RO 水を透析外液として用いて、24 時間以上 DP を透析した。透析内液を凍結乾燥し、DP の透析画分（R-DP）を得た。

③ ブタ Mf の調製

ブタ Mf の調製は Perry および Grey (1956)

の方法を一部改変して行った。得られた Mf のスラリーを回収し、ケルダール法により、粗タンパク質量を求めた。

(2) プロタミン分画物の性状解析

① アミノ酸分析

PRO および DP にトリクロロ酢酸溶液を添加し、得られた上清画分をアミノ酸分析計（日立ハイテクサイエンス、L-8800）の分析に供した。

② 加水分解度の測定

PRO および DP の遊離アミノ基を Mckellar (1981) の方法により定量し、未分解の PRO および 6 N HCl による完全加水分解 PRO の遊離アミノ基量をそれぞれ分解度 0% および 100% とし、DP の加水分解度を計算した。

③ ヘパリン結合能

ヘパリンカラムを用いたアフィニティークロマトグラフィー法により、ヘパリン結合能を測定した。なお、カラムには HiTrap ヘパリン HP カラム (GE Healthcare) を使用した。

(3) Mf の物性評価

Mf スラリーのタンパク質濃度が 5.0% になるように、50 mM Imidazole-HCl 緩衝液 (pH 6.5) で調整し、全量を 20 mL とした。得られた同ホモジネートに PRO、DP または R-DP を添加し、振動式粘度計 (セコニック、VM-10A) で粘度を求めた。

その後、Mf ホモジネートを指定の秤量ビン (2.0 cm × 1.5 cm φ) に分注し、加熱処理 (70 °C、30 分) することで Mf の凝固能を確認した。

(4) プロタミン分画物および Mf との分子間相互作用の解析

プロタミン分画物および Mf との分子間相互作用の解析は SDS-PAGE (Laemmli, 1970) に準じて行った。得られたバンドのタンパク

質の同定はマトリックス支援レーザー脱離イオン化法飛行時間型質量分析 (MALDI-TOF MS) で行った。

4. 研究成果

(1) PRO および DP の性状

トリプシンで PRO を加水分解したところ、遊離アミノ酸量は E/S 比に依存して高くなった。すなわち、E/S 比が 1/10000 では PRO の加水分解度は 9% で、1/5000 (E/S) では 12%、また、1/1000 (E/S) では 26% の PRO が分解されていることが確認された。以上のことから、12% および 26% 分解 PRO を 12DP および 26DP として標品が得られた。

(2) DP の透析処理の影響

PRO および DP の透析処理を行ったところ、PRO では、約 50% が透析内液に留まっていた (以後、R-PRO と称す)。一方、DP を透析すると、数% 程度、透析内液中に DP 由来の成分である R-DP が含まれていた (12DP および 26DP に由来する透析残留物はそれぞれ、R-12DP および R-26DP と表記する)。また、遊離 Arg 量を調べたところ、透析内液にでも遊離 Arg が検出された。なお、遊離 Arg 量は R-12DP、12DP、R-26DP、26DP の順に高かった (表 1)。

表 1 トリプシン分解 PRO の遊離 Arg 量

	遊離 Arg (μmol/g)
Cont (PRO)	0.0
12DP	10.7
26DP	39.3
R-12DP	5.7
R-26DP	26.7

(3) PRO および DP の筋原線維加熱凝固阻害能

Mf 加熱物のゲル強度に及ぼす PRO および DP の影響を調べたところ、未分解の PRO は

Mf の加熱凝固能を有意に阻害した。一方、12DP および 26DP の添加では、Mf の加熱凝固能をいずれも阻害しなかった。

このことから、トリプシン処理を行うと、PRO の Mf 凝固阻害能を低下させる可能性が示唆された。DP 中には、Mf 凝固阻害能を示すペプチドがトリプシンで分解された可能性が考えられるが、一方で DP 中のペプチドには、依然として Mf の凝固阻害能を示す成分の存在することも考えられた。

そこで、12DP および 26DP を透析処理したところ、得られた R-12DP および R-26DP はいずれも Mf の加熱凝固阻害能を示した。

とくにその効果は未分解の PRO 透析物である R-PRO よりも R-26DP で強く確認された。このことから、R-26DP には、未分解の PRO または R-PRO 以上に Mf の加熱凝固阻止能を強く示す成分の存在が示された (表 2)。

表 2 Mf ゲルの物性に及ぼす DP の影響

	かたさ応力 (N/m ²)
Cont (Mf のみ)	1092 ± 19 ^a
PRO	773 ± 28 ^b
R-PRO	773 ± 6 ^b
R-12DP	864 ± 6 ^a
R-26DP	494 ± 36 ^c

a-c: 異符号間で有意差あり ($p < 0.05$)

(4) R-DP と Mf との分子間相互作用

SDS-PAGE 法により R-DP と Mf との分子間相互作用を調べ、得られたタンパク質バンドを MALDI-TOF MS で分析したところ、未分解物の PRO および R-PRO を Mf に添加した場合のみ、Mf 由来のミオシン結合タンパク質 C のバンドが新たに出現する一方、 α アクチニンのバンドは消失することが明らかとなった。

次に、R-12DP および R-26DP を添加した場合は、上記の反応は確認できなかった。こ

の結果より、未分解の PRO および R-PRO はトリプシンで処理した PRO (R-12DP や R-26DP) とは異なる作用機序で Mf の物性を改変することが強く示唆された (図 1)。

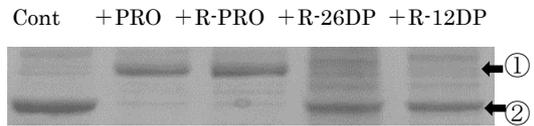


図 1 Mf と DP との分子間相互作用が SDS-PAGE パターンに及ぼす影響

Cont, Mf のみ; +PRO +R-PRO +R-26DP +R-12DP, Mf と PRO, R-PRO, R-26DP, R-12DP にそれぞれ添加したもの

①、ミオシン結合タンパク質 C; ②、 α -アクチニン

(5) R-DP と Mf の加熱混合物中の分子間相互作用

R-DP と Mf の加熱混合物中の分子間相互作用を SDS-PAGE パターンを調べたところ、R-PRO を添加した場合、アクトミオシンに由来するバンドには影響を示さなかった。

しかし、R-12DP を作用させると、アクトミオシン由来のアクチンのバンドは検出されたものの、ミオシンヘビーチェーン (MHC) のバンドは全く検出されなかった。次に R-26DP を作用させた場合、アクチンおよび MHC のいずれのバンドも検出されなくなった (図 2)。これらの結果は、アクトミオシンと DP との間では、分子間相互作用の起こったことを示唆している。

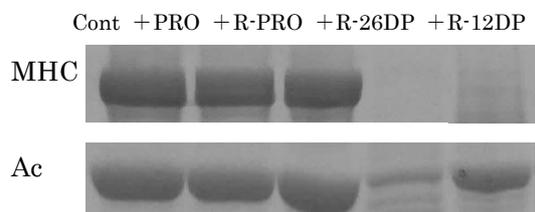


図 2 DP を添加した Mf の加熱物の SDS-PAGE パターンに及ぼす影響

MHC、ミオシンヘビーチェーン; Ac、アクチン
Cont, Mf のみ; +PRO +R-PRO +R-26DP +R-12DP, Mf と PRO, R-PRO, R-26DP, R-12DP にそれぞれ添加したもの

以上のことから、未分解の PRO では、PRO 分子が Mf のアクチンに結合することにより、アクトミオシン中のアクチンとミオシンとの相互作用が阻害され、加熱凝固能が低下するものと推察された。

一方、PRO をトリプシンで分解し、さらに透析後の残留物として得られた R-DP は、未分解物とは異なる作用機序で Mf の加熱凝固阻害能を示しているものと思われた。

すなわち、R-12DP では、未分解の PRO を添加した場合と同程度の Mf 加熱凝固阻害能を示したが、これはミオシンとアクチンとの分子間相互作用が阻害されたためと推察された。

また、R26DP は、未分解の PRO を Mf に添加した場合よりも強い加熱凝固阻害能を示したが、その理由として、Mf 加熱凝集の主成分であるアクトミオシンの不可逆的な不溶化によるためと考えられた。

本研究の成果は、従来から食品添加物として使用されている PRO の用途開発につながるものと思われる。また、PRO および同酵素分解物の性質は、これまでとは全く異なる食肉製品を物性改良剤になりうるものと考えられる。

<引用文献>

- 1) Davis CE, Anderson JB. 1984. Size exclusion/HPLC of heated water soluble bovine and porcine muscle proteins. *J. Food Sci.* **49**, 598-602.
- 2) Miyaguchi Y, Hayashi Y, Sakamoto T. 2007. Physicochemical properties of the thermal gel of water-washed meat in the presence of the more soluble fraction of porcine sarcoplasmic protein. *Anim. Sci. J.* **78**, 77-84.
- 3) Miyaguchi Y, Sakamoto T, Sasaki S, Nakade K, Tanabe M, Ichinoseki S, Numata M, Kosai K. 2011. Simple method for isolation of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase and the improvement of myofibril gel properties. *Anim. Sci. J.* **82**, 136-143.
- 4) Reddy KRC, Lilie H, Rudolph R, Lange C. 2005. L-Arginine increases the solubility of unfolded species of hen egg white lysozyme. *Protein Sci.* **14**, 929-935.
- 5) Umetsu M, Tsumoto K, Nitta S, Adschiri T, Ejima D, Arakawa T, Kumagai I. 2005. Nondenaturing solubilization of $\beta 2$ microglobulin from inclusion bodies by L-arginine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **328**, 189-197.

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 3 件)

- ① 宮口右二・渋谷朋美・小川恭喜「ブタ筋原線維の物性に及ぼす加水分解プロタミンの影響」(日本畜産学会大会第 122 回大会, 2017.03.29)
- ② 渋谷朋美・小川恭喜・宮口右二「ブタ筋原線維とプロタミン酵素分解物との分子間相互作用」(日本畜産学会大会第 121 回大会, 2016.03.29)
- ③ 渋谷朋美・小川恭喜・宮口右二「ブタ筋原線維ホモジネートの物性に及ぼすプロタミンの影響」(日本畜産学会大会第 119 回大会, 2015.3.29)

6. 研究組織

宮口 右二 (MIYAGUCHI Yuji)

茨城大学・農学部・教授

研究者番号 : 60250990