

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 1 日現在

機関番号：34311

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22500743

研究課題名（和文） 抗酸化能を始めとする各種機能性を保持した

糖修飾鶏肉タンパク質の最適化法による開発

研究課題名（英文） Development using the optimization method of the glycosylated chicken protein which maintained various functionality including the antioxidant ability

研究代表者

西村 公雄（NISHIMURA KIMIO）

同志社女子大学・生活科学部・教授

研究者番号：60167567

研究成果の概要（和文）：

メイラード反応により得られたマルトース修飾鶏筋原線維（Mf）タンパク質は、低イオン強度溶液に対する溶解性および微弱ながら抗酸化能を獲得していた。そこで、ランダムセントロイド最適化法を用いて最大の抗酸化能を発揮する糖化 Mf タンパク質の調製条件を検索し、得られた糖化 Mf タンパク質が加熱ゲルを形成することも認めた。これらのことは、この糖化 Mf タンパク質から貯蔵に酸化防止剤を必要としない練り製品を無塩にて製造できる可能性を示唆している。

研究成果の概要（英文）：

The chicken myofibrillar (Mf) protein was glycosylated using maltose by the Maillard reaction. The glycosylated Mf protein showed solubility in low ionic strength medium and mild antioxidative ability. The optimum preparation condition was assessed using the random centroid optimization method to obtain the glycosylated chicken Mf protein that showed the highest antioxidant ability. The obtained glycosylated chicken Mf protein formed a gel when heated. These results suggested that the processed food could be prepared similar to that as sausage without salt and be stored without an antioxidant additive.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：食素材，筋原線維タンパク質，マルトース，メイラード反応，抗酸化能，スーパーオキシドアニオンラジカル，ランダムセントロイド最適化法

## 1. 研究開始当初の背景

畜産動物や魚介類の筋肉は人類にとって重要なタンパク質資源であり、そのタンパク質が有する優れた加工特性を利用して様々な加工食品が開発・製造されてきた。筋肉タンパク質の加工特性は、その主要構成成分である筋原線維 (Mf) タンパク質の溶液に対する溶解性と密接に関わっている。例えば、ソーセージやかまぼこは、Mf タンパク質のゲル形成能と高イオン強度溶液への溶解性を利用したものである。これらの加工食品は、肉に食塩を加えて播ることで筋肉中の Mf タンパク質を溶解させ、それを加熱することによってタンパク質間の相互作用を増加させ、網目構造を形成させることにより調製する。このように、Mf タンパク質は高イオン強度溶液にしか溶けない。そこで、Mf タンパク質をより広範なイオン強度の溶液に溶解することができれば食品素材としての Mf タンパク質の利用価値はさらに向上することとなる。

Saeki ら<sup>1)</sup>は、魚類の Mf タンパク質にメイラード反応を利用してグルコースを修飾することで、低イオン強度溶液に対する溶解性を改良した。また、Nishimura ら<sup>2)</sup>は魚肉タンパク質よりも熱安定性に優れている鶏 Mf タンパク質を用いることで Saeki らが用いた量より少ないマルトース量で 60°C、相対湿度 (RH) 35% 下、36h 反応させると、低イオン強度溶液への溶解性とスーパーオキシドアニオンラジカル ( $O_2^-$ ) 消去能を獲得することを見出した。これらのことは、流動食などへの Mf タンパク質の利用や低塩の練り製品開発、さらに、貯蔵のために食品添加物 (酸化防止剤) の使用を必要としない加工食品の開発を可能とするもので、高齢化や健康志向の現在のニーズにマッチするものである。ただ、糖化鶏 Mf タンパク質の抗酸化能は、それほど強いものではなく、その改善が望まれる。また、その加工特性も明らかではない。そこで本研究では、鶏 Mf タンパク質の食品素材としての付加価値を向上させるために、強い抗酸化能を発揮しうる調製条件の検索と抗酸化能発現の解明並びに加熱ゲル形成性の有無を中心に検証した。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、鶏 Mf タンパク質の食品素材としての付加価値を向上させることである。そのため本来鶏 Mf タンパク質が持ちえなかった低イオン強度溶液への溶解性を確保しながら、最大の抗酸化能を発揮するメイラード反応の条件を突き止める。また、抗酸化能発現の原因を明らかとすることで、他の食品素材にその原理を活かし新たな機能性を保持した加工食品の開発に役立てる。さらに、Mf タンパク質を加工食品として用い

る際には、加熱ゲルとすることが多い(ソーセージやかまぼこ) ことから、この点につき、得られた糖化鶏 Mf タンパク質が加熱ゲル形成能を保持しているか否につき検証する。具体的には以下の 3 点につき検討を行った。

### (1) 第一の課題

マルトースを鶏 Mf タンパク質に効率よく付与させるために、ランダムセントロイド最適化 (RCO) 法<sup>3)</sup>を用いて、低イオン強度溶液への溶解性をある程度保持しながら、最大の抗酸化能を発現できるマルトース修飾鶏 Mf タンパク質調製条件を最小限の実験数で明らかとすること。

### (2) 第二の課題

マルトース修飾鶏 Mf タンパク質を軽度でペプシンで分解し、その溶解性および  $O_2^-$  消去能の変化、さらに  $O_2^-$  消去能におけるタンパク質の関与を調べ、抗酸化能発現の原因を探ること。

### (3) 第三の課題

マルトース修飾鶏 Mf タンパク質の加工食品素材としての可能性を検討するため加熱ゲル形成能を確認し、そのゲル化機構を明らかとすること。また、その際、抗酸化能を保持しているか否かについても考える。

## 3. 研究の方法

### (1) 第一の課題

抗酸化能を最大限発揮するマルトース修飾鶏 Mf タンパク質の調製条件の検索のために RCO 法<sup>3)</sup>を用いた。調製条件の各因子と実験範囲は、Nishimura らの調製条件<sup>2)</sup>を参考にして、温度 40~70°C、相対湿度 25~45%、反応時間 24~48h、マルトース/鶏 Mf タンパク質量比 2~8 とした。この条件設定により、まず 9 つの調製条件 (first cycle) が提示され、この条件にしたがってマルトース修飾鶏 Mf タンパク質を調製した。各調製条件の評価は、0.1M NaCl に溶解するマルトース修飾鶏 Mf タンパク質による  $O_2^-$  残存率とした。なお、 $O_2^-$  消去能 ( $O_2^-$  残存率) に関しては、電子スピン共鳴 (ESR) 法を用いて行った。よって、評価が低値の方が抗酸化能が強いことになる。また、本研究では、 $O_2^-$  消去能測定時にタンパク質濃度 4 mg/ml 未満しか溶けないものについては評価を 100% とした。9 つの実験条件から得られた評価をもとに re-centroid を行い、さらに 4 つの条件を得、同様に評価を求めた。以上合計 13 の調製条件から得られた評価をもとに、マッピングにより最小の評価値を示すマルトース修飾鶏 Mf タンパク質の調製条件を求めた。

また、抗酸化能の評価は、以下のように行った。様々なタンパク質濃度のマルトース修飾鶏 Mf タンパク質を添加した際の  $O_2^-$  残存率を求め、マルトース修飾鶏 Mf タンパク質のタンパク質濃度に対する  $O_2^-$  残存率をプロッ

とし、近似曲線から 50%の阻害を示すマルトース修飾鶏 Mf タンパク質のタンパク質濃度 (IC<sub>50</sub>) を求めた。一方、同様にして標準のスーパーオキシドディスムターゼ(SOD)で得られる IC<sub>50</sub> を求め、その SOD 溶液の活性と IC<sub>50</sub> を示すマルトース修飾鶏 Mf タンパク質の試料溶液が等価であるとしてマルトース修飾鶏 Mf タンパク質のタンパク質重量当たりの SOD 等価活性、すなわちスーパーオキシドアニオンラジカル消去活性(SOSA)を算出した。この SOSA 値を比較することにより抗酸化能の評価を行った。

## (2) 第二の課題

マルトース修飾鶏 Mf タンパク質のペプシン分解は以下のように行った。マルトース修飾鶏 Mf タンパク質 30 mg を 0.1M NaCl 溶液 2 ml に ULTRA-TURRAX T25-S1(IKA-Labortechnik (Germany) 製) を用いて氷中でホモジナイズ (13,500 rpm, 30 s) し、30 秒静置後再度同条件でホモジナイズした。その後、泡立ったタンパク質を消泡するために遠心分離 (900×g, 10 min, 4°C) した。泡立たないように再度懸濁した後、未反応のマルトースを除去するために、0.1M NaCl 溶液を用いて一晚透析し、マルトース修飾鶏 Mf タンパク質懸濁液を得た。なお、以上の操作は 8°C 以下で行った。懸濁液の一部を分取して 1M 水酸化ナトリウム溶液 (終濃度 0.9M 水酸化ナトリウム溶液) で 10 倍に希釈・溶解し、Lowry 法<sup>4)</sup>を用いてタンパク質濃度を測定した。盲検は 0.1M NaCl 溶液を用いて同様に希釈したものを用いた。マルトース修飾鶏 Mf タンパク質懸濁液を 10 mg/ml となるように 0.1M NaCl 溶液で希釈し、37°C で 10 分間ブレインキュベートした。1M HCl で pH 2.0 に調整した後、2.5 mg/ml ペプシン溶液をペプシン重量:タンパク質重量 = 0.25:100 となるように添加し、マルトース修飾鶏 Mf タンパク質を 37°C 下で分解した。18 分 30 秒後、1M 水酸化ナトリウムの添加により pH を 7.5 に調整して反応を停止させ、氷上で急冷し、一晚透析することにより溶媒を 0.1M NaCl を含む 20mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) に置換した。この透析物の一部を分取し、タンパク質濃度 1.5 mg/ml となるように同緩衝液で希釈し、ペプシン分解後のマルトース修飾鶏 Mf タンパク質の溶解度を測定した。残りの透析物はさらに、遠心分離 (30,000×g, 30 min, 4°C) し、上清を得、これをマルトース修飾鶏 Mf タンパク質分解試料とし、低イオン強度溶液への溶解性および O<sub>2</sub> 消去能を調べた。

## (3) 第三の課題

マルトース修飾鶏 Mf タンパク質 30 mg を 0.1M NaCl を含む 20mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) 1 ml に ULTRA-TURRAX T25-S1 を用いて氷中でホモジナイズ (13,500 rpm, 30

s) し、30 秒静置後再度同条件でホモジナイズした。その後、未反応のマルトースを除去するために、同緩衝液を用いて一晚透析し、マルトース修飾鶏 Mf タンパク質溶液 (以下、修飾 Mf -0.1) を得た。また、対照の非修飾鶏 Mf タンパク質は、溶媒を 0.5M NaCl を含む 20mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) に変えて上述と同様に調製した。以下、これを非修飾 Mf -0.5 と呼ぶ。さらに、マルトース修飾鶏 Mf タンパク質を 0.5M NaCl を含む 20mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) に溶解させたもの (以下、修飾 Mf -0.5) も比較として用いた。これらを遠心分離 (30,000×g, 30 min, 4°C) して上清を得、Amicon® Ultra-15 遠心ろ過用デバイス (10,000 nominal molecular weight limit, Millipore Co. (MA) 製) を用いて 15mg/ml となるまで濃縮し、ゲル化用試料とした。

また、これらとは別に、native な Mf タンパク質も調製し、タンパク質、NaCl、Tris-HCl の終濃度がそれぞれ 15mg/ml、0.5M、20mM としものを対照試料として用いた。以下、これを Mf -0.5 と呼ぶ。

なお、以上の調製工程はすべて 8°C 以下で行った。

加熱形成ゲルは、各ゲル化用試料溶液 (タンパク質濃度 15mg/ml) をそれぞれ 1ml ずつ試験管 (内径 16mm) に分注し、4 重にしたラップと輪ゴムで栓をし、90°C のウォーターバス上で 240 分まで加熱し、加熱後氷水中で急冷して得た。この加熱形成ゲルを SDS-PAGE 分析に用いた。また、クライオ走査電子顕微鏡 (SEM) によるゲル微細構造の観察用に、10ml 容ビーカー (内径 21mm) に 3ml 分注して 90°C 120 分加熱して調製したゲル (高さ 5mm) を調製した。

## 4. 研究成果

(1) マルトース修飾鶏 Mf タンパク質が最大の抗酸化能を発揮する調製条件のランダムセントロイド最適化法を用いた検索

溶解性を失わない条件下で最大の O<sub>2</sub> 消去能を発揮するマルトース修飾鶏 Mf タンパク質の最適調製条件を RCO 法<sup>3)</sup>を用いて得るために、温度、RH、反応時間、マルトース/Mf タンパク質重量比を因子として選んだ。RCO 法<sup>3)</sup>によりまず first cycle として 9 つの実験条件 (Table 1 No. 1-9) が得られ、re-centroid により条件範囲を絞ってさらに 4 つの実験条件 (Table 1 No. 10-13) が示された。以上合計 13 の調製条件に従ってマルトース修飾鶏 Mf タンパク質を調製し、O<sub>2</sub> 消去能測定を行い、O<sub>2</sub> 残存率を評価した (Table 1)。よって、O<sub>2</sub> 残存率の低いものほど O<sub>2</sub> 消去能が強い。O<sub>2</sub> 消去能測定時にタンパク質濃度 4 mg/ml 未満しか溶けないものについては評価を 100%とした。

Table 1. Summary data for RCO.

Vertex No.	Temperature (°C)	RH (%)	Reaction			Evaluation
			time (h)	Weight ratio of protein-maltose (w/w)	ratio of (Residual $O_2^-$ ) <sup>a)</sup> (%)	
1	46.2	42.4	47.92	4.77	100.0	
2	57.0	36.6	28.69	6.79	40.8	
3	68.6	38.0	38.37	5.16	100.0	
4	49.7	36.7	44.58	5.63	100.0	
5	46.4	40.0	38.69	2.62	100.0	
6	40.3	33.3	32.38	5.66	100.0	
7	58.6	35.0	44.94	6.95	73.7	
8	64.1	40.7	30.68	2.36	49.0	
9	63.2	41.7	43.66	2.02	62.8	
10 <sup>b)</sup>	62.3	38.4	37.27	4.66	30.7	
11 <sup>b)</sup>	62.4	37.9	34.79	5.50	30.7	
12 <sup>b)</sup>	64.9	40.7	36.20	5.03	21.9	
13 <sup>b)</sup>	63.3	39.2	34.53	4.52	23.7	

a) When 4 mg of glycosylated myofibrillar protein per ml did not solve in sample mixture for ESR spectroscopy, the evaluation (residual ratio of  $O_2^-$ ) of this vertex was regarded as 100%.

b) Re-centroid points of first cycle.

以上の各因子に対する評価をプロット (マッピング) した (データは示さない) 結果, 温度は 64.9°C, RH は 40.7%, 反応時間は 36.20h, マルトース/鶏 Mf タンパク質重量比は 5.03 の時, ある程度低イオン強度溶液への溶解性を保持した (溶解度 30%, データは示さない) まま, 最大の抗酸化能を示すことが判明した。

次に, この抗酸化能が, どの程度のものであるのか SOSA を ESR 測定による  $O_2^-$  残存率より算出した。その結果, 541±74 units of SOD/g of protein (n = 3) となった。これは, Nishimura ら<sup>2)</sup> が調製したマルトース修飾鶏 Mf タンパク質の SOSA が 184 units of SOD /g of protein を示したのに対して, 約 3 倍の値であり, 調製条件の最適化により  $O_2^-$  消去能を強化できたことが示された。また, この値は抗酸化物質としてよく知られているアントシアニンを多く含むデラウエア抽出物の 700 units of SOD /g dry<sup>5)</sup> と近い値であった。最適化法を用いることで Mf タンパク質に, メイラード反応を用いて, デラウエア抽出物と同等の抗酸化能を付与できることが明らかとなった。

しかしながら, 抗酸化能は, 大きく改善されたものの, 得られた糖化鶏 Mf タンパク質の低イオン強度への溶解性は, 30%まで, 減少した。今後, 低イオン強度溶液への溶解性を大幅に下げない(60%を割らない) 条件で, 抗酸化能を増大させる調整条件の検索が再度必要である。

(2) マルトース修飾鶏筋原線維タンパク質のペプシン分解が溶解性および抗酸化能に与える影響

RCO 法<sup>3)</sup> を用いた調製条件の最適化により, より強い  $O_2^-$  消去能を発揮するマルトース修飾鶏 Mf タンパク質が得られたが, メイラード反応の進行により変性が進み, 溶解度は 30%程度にまで低下した。そこで, マルトース修飾鶏 Mf タンパク質の軽度のペプシン分解を行い, その溶解性および  $O_2^-$  消去能の変化, さらに  $O_2^-$  消去能におけるタンパク質の関与を調べた。その結果, ペプシン分解により, 溶解度は 31.5±8.5% (n = 6) から 58.5±22.4% (n = 3) となり (Fig. 1), Nishimura ら<sup>2)</sup> が調製したマルトース修飾鶏 Mf タンパク質と同程度にまで増加した。これはミオシンなどの高分子タンパク質がペプシン分解により低分子化して可溶化したためであると考えられる。

さらに, 分解試料の  $O_2^-$  消去能を測定し, SOSA を算出した (Fig. 2)。ペプシン分解により, マルトース修飾鶏 Mf タンパク質の IC<sub>50</sub> 値は 2.77±0.40 mg/ml (n = 3) から 6.74±0.40 mg/ml (n = 3) に増加し, SOSA は 541±74 units/g of protein (n = 3) から 220±13 units/g of protein (n = 3) へと半分以下に有意に ( $p > 0.01$ ) 減少した (Fig. 2)。

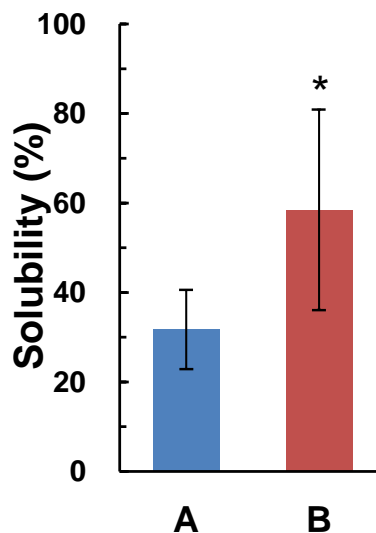


Fig. 1. Effects of pepsin hydrolysis on the solubility of glycosylated myofibrillar proteins.

The solubility of the glycosylated myofibrillar proteins obtained under the condition at vertex 12 was measured before (A) and after (B) the hydrolysis. Values are mean ± standard deviation (n ≥ 3). \*, significant differences between values ( $p < 0.05$ ).

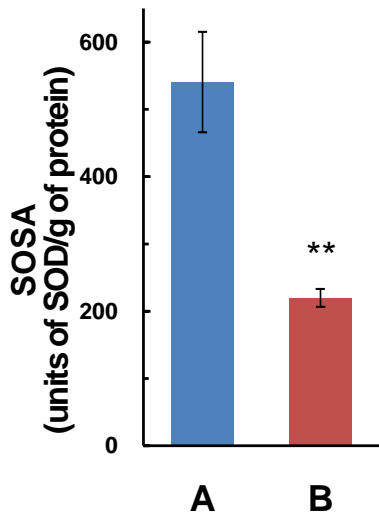


Fig. 2. Effects of pepsin hydrolysis on the SOSA of glycosylated myofibrillar proteins. The antioxidation activity against  $O_2^-$  of the glycosylated myofibrillar proteins obtained under the condition at vertex 12 was measured before (A) and after (B) the hydrolysis. Values are mean  $\pm$  standard deviation ( $n = 3$ ). \*\*, significant differences between values ( $p < 0.01$ ).

これらのことは、ペプシンによってタンパク質鎖が切断されることにより抗酸化能が減少したものと考えられ、タンパク質の切断部位に抗酸化能を発揮するために重要なアミノ酸配列が存在しているのか、または、三次構造はともかくも、タンパク質の一次構造が無傷で存在することが抗酸化能の要因であると推察された。しかし、詳細は不明で、今後の検討が必要である。

### (3) マルトース修飾鶏 Mf タンパク質の加熱ゲル形成能

#### ① マルトース修飾が鶏筋原線維タンパク質の加熱ゲル形成性に与える影響

次に、各ゲル化用 Mf タンパク質溶液を  $90^\circ\text{C}$  で 240 分まで加熱しゲル化を試みた結果を Fig. 3 に示す。

Mf -0.5 (Fig. 3A) では、加熱前、溶液はわずかに白濁しており、加熱するとさらに白濁し、凝集物が見られた。加熱 15 分から 240 分の間で白濁に差は見られなかった。

非修飾 Mf -0.5 (Fig. 3B) では、加熱前、溶液は白色透明であったが、加熱すると白濁し、凝集物が見られた。加熱 15 分から 240 分の間で白濁に差は見られなかった。

修飾 Mf -0.5 および修飾 Mf -0.1 (Fig. 3C, D) では、ともに加熱前、溶液は淡い黄色透明の溶液であったが、加熱後白濁し、加熱 240 分後ではわずかに淡黄色に着色した。この着色は、加熱によりメイラード反応が進行したか、もしくは長時間の加熱によって焦げたた

めの着色と考えられる。

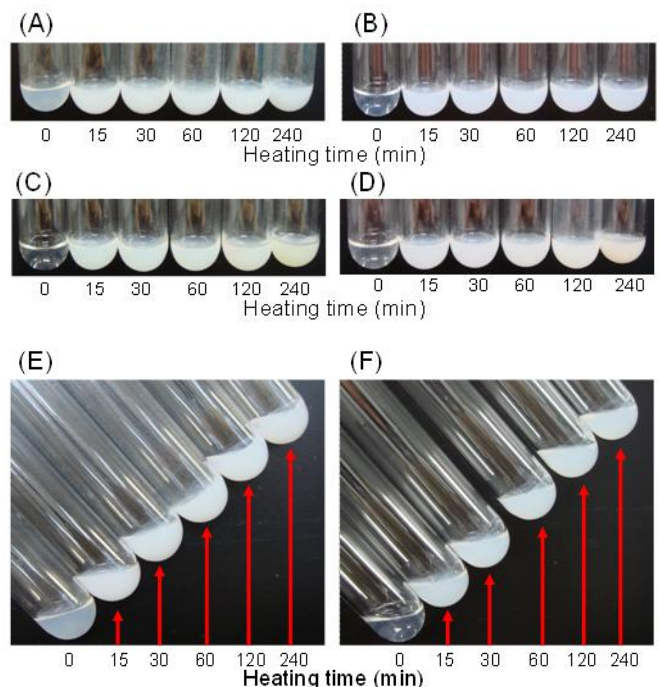
次に、これらのゲルを傾けたところ、Mf -0.5 (Fig. 3E) では、すべての加熱時間において液面が流れた。

非修飾 Mf -0.5 (Fig. 3F) においても、すべての加熱時間において液面が流れた。

このことから、Mf -0.5 および非修飾 Mf -0.5 では、 $90^\circ\text{C}$  で 240 分加熱してもしっかりしたゲルを形成しないことがわかった。非修飾 Mf -0.5 では糖を添加していないので、インキュベーション処理中でのタンパク質変性が危惧される。それによりゲル形成能が低下して、ゲル形成性が悪かったと考えられる。

一方、修飾 Mf -0.5 および修飾 Mf -0.1 (Fig. 3G, H) では、ともに加熱 15 分後および 30 分後では液面が流れた。しかし、目視では、Mf -0.5 および非修飾 Mf -0.5 よりもまとまりのあるゲルを形成しているようであった。また、加熱 60 分以降は試験管を傾けてもゲル表面は流れなかった。これは加熱時間の増加に伴って締まったゲルになっていったことを表している。

以上のことから修飾 Mf -0.5 および修飾 Mf -0.1 は  $90^\circ\text{C}$  加熱によりゲルを形成し、240 分までは加熱時間に依存してよりリジッドなゲルを形成することがわかった。また、そのゲルは加熱時間が同じ Mf -0.5 および非修飾 Mf -0.5 よりもしっかりしたゲルであった。





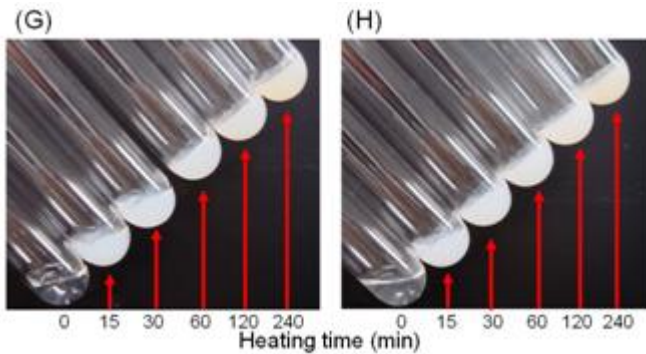


Fig. 3. Gelation of myofibrillar protein solutions during a heating..

Cheken myofibrillar proteins with or without maltose were incubated under the condition at vertex 12. Native myofibrillar protein (A), incubated myofibrillar protein without maltose (B), and glycosylated myofibrillar protein (C) were dissolved in 20mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) containing 0.5M NaCl Buffer, while glycosylated myofibrillar protein was also dissolved in 0.1M NaCl Buffer (D). One ml of 15 mg of protein concentration in each sample was placed in a test tube (diameter 16mm) and heated at 90°C in water-bath up to 240 min, and heat-induced gelation were observed. State of heat-induced gels of (E), (F), (G) and (H) were observed by leaning the test tubes of (A), (B), (C) and (D), respectively.

②マルトース修飾が鶏筋原線維タンパク質の加熱形成ゲルの微細構造に与える影響

上記ゲルの状態の差違は、微細構造によるのではないかと考え、120分加熱ゲルを選び、その微細構造をクライオ SEM によって観察した。各 Mf タンパク質ゲルを倍率 5,000 倍で観察した結果を Fig. 4 に示す。

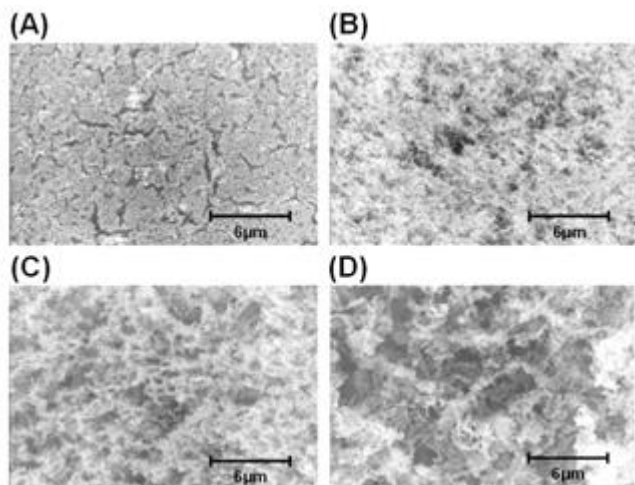


Fig. 4. Microstructure of myofibrillar protein gel obtained by 120 min-heating at 90°C.

Native myofibrillar protein (A), incubated myofibrillar protein without maltose (B) and glycosylated myofibrillar protein in 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) including 0.5 (C) or 0.1 M NaCl (D) were heated at 90°C for 120 min. Microstructure of each gel was observed with cryo-SEM. Magnification was x5,000, and the scale bar indicates 6 micrometer.

90°Cで120分加熱した Mf -0.5 (Fig. 4A) では網目構造の発達は見られず、構造体の形式は確認されなかった。すなわち、凝集体を構成していた。

非修飾 Mf -0.5 (Fig. 4B) は、Mf -0.5 に比べると網目構造の形式は認められるものの、それを支える繊維は細く脆弱で、発達した構造とはなっていない。

修飾 Mf -0.5 (Fig. 4C) では、大きな構造体が観察され、またそれを形成する繊維は太く、発達した網目構造が見られた。この網目構造により、全体がひと塊の明確なゲルを形成し、また、太い繊維を形成したことにより、よりしっかりしたゲルを形成したと考えられる。修飾 Mf -0.1 (Fig. 4D) も、同様の繊維の太い大きな構造体が観察され、発達した網目構造が見られた。

以上のことより、修飾 Mf -0.5 および修飾 Mf -0.1 は、交差結合体の形成により、Mf -0.5 および非修飾 Mf -0.5 に比べて、タンパク質が寄り集まり太い繊維を形成し、発達した網目構造を形成することで、よりリジッドなゲルを形成することが示唆された。

アクチンは加熱により短い数珠状の凝集体を形成するものの、単独ではゲルを形成できない<sup>9)</sup>。しかし、マルトース修飾鶏 Mf タンパク質は SDS-ポリアクリルアミド電気泳動(PAGE)法による分析によりアクチンが主体ではあることが判明している(データは示さない)。が、ミオシンなどの他のタンパク質も少量ながら存在する。そのため、わずかに残っているミオシンが核となってアクチン凝集体間に架橋を作り、ゲルを形成したと考えられる。しかし、アクチンが多量に含まれる場合、アクトミオシンのゲル強度は、同じミオシン濃度のミオシン単独ゲルのゲル強度と差がなく、ゲル強度はミオシン濃度に依存する<sup>9)</sup>。そのため、ミオシンをほとんど含まないアクチン主体の Mf タンパク質ではさほど強固なゲルは形成できないと考えられる。したがって、糖修飾 Mf タンパク質において交差結合を持つしっかりしたゲルを形成するようになった(SDS-PAGE 分析による、データは示さない)ことには、Mf タンパ

ク質に結合した糖の働きが関与しているものと考えられる。そのため、修飾 Mf -0.5 および修飾 Mf -0.1 は Mf -0.5 および非修飾 Mf -0.5 に比べて太い繊維を持つ発達した網目構造を形成し、よりしっかりしたゲルを形成したと考えられる。なぜ、糖修飾によりリジッドなゲル形成性を持つようになったのかについては不明であり、今後検討する必要がある。

また、加熱前のマルトース修飾鶏 Mf タンパク質溶液は抗酸化能を保持していた。したがって、その加熱形成ゲルにおいても抗酸化能を持っている可能性が示唆される。マルトース修飾鶏 Mf タンパク質と修飾 Mf-0.1 ゲルをタンパク質変性剤を加えた溶液に溶かし、ESR にて両者の SOSA を測定したところ 40 前後の値を示した。この値は、本研究で得られた SOSA 値の 1/10 程度の値となる。これは、変性剤の影響により値が抑えられたものと考えられる。が、ゲル化前後で SOSA 値の変化があまり見られなかったことは、ゲル化してもこのマルトース修飾鶏 Mf タンパク質は保持している可能性が高い。このことは、抗酸化添加物を必要としない加工食品の開発につながる。しかしながら、変性剤存在化における SOSA 値の信頼性は、今のところ不確定で、ゲル化後も抗酸化能を保持しているか否かについては、今後、新たな測定法の開発によらねばならないと考える。

#### (4) 成果のまとめと今後の課題

ランダムセントロイド最適化法<sup>3)</sup>により、最大の抗酸化能を発揮するマルトース修飾鶏 Mf タンパク質の最適調製条件は温度 64.9°C、相対湿度 (RH) 40.7%、反応時間 36.20h、マルトース/Mf 重量比 5.03 であった。最適調製条件は、Nishimura ら<sup>2)</sup>が行った温度 60°C、RH 35%、反応時間 36h、マルトース/Mf 重量比 4 の調製条件と比べてメイラード反応が進行しやすくタンパク質が変性しにくい条件であり、Nishimura ら<sup>2)</sup>以上のスーパーオキシドアニオン消去活性 (SOSA) を引き出した。しかし、SOSA は Nishimura ら<sup>2)</sup>と比べて約 3 倍に高められたものの、溶解度は半分程度にまで低下した。この溶解度の低下は、主にミオシンの変性が原因であった。そこで、溶解度の改善および SOSA のさらなる強化を期待してマルトース修飾鶏 Mf タンパク質のペプシン分解を行った。ペプシン分解により、溶解度は Nishimura ら<sup>2)</sup>と同程度にまで回復したものの、SOSA は分解前の半分まで減少した。このことは、メイラード反応で得られる糖修飾タンパク質の抗酸化能にはタンパク質中の一部のアミノ酸配列、または、一次構造が保存されていることが重要な役割を果たしているものと考えられる。

また、最適条件で調製したマルトース修飾

鶏 Mf タンパク質は、90°C の加熱によりゲルを形成し、240 分まで加熱時間に依存してより締まったゲルを形成した。さらに、同じ加熱時間の鶏 Mf タンパク質および非修飾鶏 Mf タンパク質よりもリジッドなゲルであった。90°C、120 分の加熱で調製したマルトース修飾鶏 Mf タンパク質ゲルをクライオ SEM により観察すると、鶏 Mf タンパク質および非修飾鶏 Mf タンパク質に比べて構造体の繊維が太く大きく、発達した網目構造をとっていた。そのため、よりリジッドなゲルを形成したと考えられる。マルトース修飾鶏 Mf タンパク質がゲル形成能を保持していたことは食品素材としての用途がより広がり、大変意義深い。また、この加熱形成ゲルにおいても抗酸化能を保持している可能性が示唆でき得た。得られた鶏 Mf タンパク質の低イオン強度溶液への溶解性をさらに高め、加熱ゲルの抗酸化能を増強することが出来れば、大変魅力ある機能性をもった食品素材となるものと考えられる。

- 1) Saeki H and Inoue K, Improved solubility of carp myofibrillar proteins in low ionic strength medium by glycosylation, *J. Agric. Food Chem.*, 45, 3419-3422 (1997).
- 2) Nishimura K, Murakoshi M, Katayama S and Saeki H, Antioxidative Ability of Chicken Myofibrillar Protein Developed by Glycosylation and Changes in the Solubility and Thermal stability, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 75, 247-254 (2011).
- 3) Nakai S, Horimoto Y, Dou J and Verdini RA, Randon-Centroid Optimization in "Optimization in Food Engineering," ed. Erdogdu F, CRC Press, Boca Raton, pp. 141-152 (2009).
- 4) Lowry, OH, Rowebrough NJ, Farr AL and Randall RJ, Protein measurement with the Folin-phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275 (1951).
- 5) 森山洋憲, 片山泰幸, 中林錦一, 受田浩之, 沢村正義, 高知県産茶および青果物の有するスーパーオキシドアニオン消去能の測定, *食科工*, 49, 679-682 (2002).
- 6) Yasui T, Ishioroshi M, Samejima K, Effect of actomyosin on heat-induced gelation of myosin, *Agric. Biol. Chem.*, 46, 1049-1059 (1982).

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Mai Isono, Hiroki Saeki and Kimio Nishimura, Properties of Glycated Chicken Myofibrillar Proteins with Enhanced Antioxidant Abilities, *J. Home Econ. Jpn.*, 63, 461-467 (2012), 査読有り

[学会発表] (計 4 件)

- ① 西村 公雄, 佐伯 宏樹, ランダムセントロイド最適化法を用いた強い抗酸化能を発揮するマルトース修飾鶏筋原線維タンパク質の調製条件検索, 第 66 回日本栄養・食糧学会大会, 2012 年 5 月 20 日, 東北大学
- ② 磯野 舞, 佐伯 宏樹, 西村 公雄, 抗酸化能を発揮するマルトース修飾鶏筋原線維タンパク質のゲル化およびそのゲル特性, 日本農芸化学会 2012 年度大会, 2012 年 3 月 24 日, 京都女子大学
- ③ 磯野 舞, 佐伯 宏樹, 西村 公雄, 抗酸化能を発揮する糖化鶏筋原線維タンパク質調製条件の最適化, 日本栄養・食糧学会 第 50 回近畿支部大会, 2011 年 10 月 15 日, 近畿大学 農学部キャンパス
- ④ 磯野 舞, 真部 真里子, 西村 公雄, 佐伯 宏樹, 抗酸化能を発揮するマルトース修飾鶏筋原線維タンパク質の最適化法を用いた調製条件の検索, 日本農芸化学会関西支部大会, 2010 年 10 月 3 日, 近畿大学 農学部キャンパス

[その他]

ホームページ等

[https://www.dwc.doshisha.ac.jp/research/parts/pdf/faculty/nutrition\\_science/nishimura.pdf](https://www.dwc.doshisha.ac.jp/research/parts/pdf/faculty/nutrition_science/nishimura.pdf)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

西村 公雄 (NISHIMURA KIMIO)  
同志社女子大学・生活科学部・教授  
研究者番号：60167567

### (2)研究分担者

佐伯 宏樹 (SAEKI HIROKI)  
北海道大学・水産科学研究科・教授  
研究者番号：90250505

### (3)連携研究者

なし ( )

### (4)研究協力者

磯野 舞(ISONO MAI)  
同志社女子大学・生活科学研究科修士課程  
現 三栄源エフ・エフ・アイ株式会社勤務  
真部 真里子(MANABE MARIKO)  
同志社女子大学・生活科学部・教授  
研究者番号：50329968