ミオシン B, 大豆蛋白質 CIF のゲル形成至適条件†

芳 賀 聖 一*・大 橋 登 美 男*

The Optimum Conditions for Gel Formation of Myosin B and/or
Soybean Protein CIF

SEIICHI HAGA* and TOMIO ÔHASHI*

The conditions for gel formation with myosin B and/or soybean protein CIF (Cold Insoluble Fraction) were studied, and following results were obtained:

(1) It was made clear that 15 mg/ml myosin B and 50 mg/ml CIF begin to form the gel when heated at 70°C for 4 min and at 100°C for 10 min, respectively.

(2) In the mixture of myosin B with CIF, the gel can be formed even under such conditions that the gel has been impossible to form with single protein, and it was observed to form a more stable and rigid gel by the interaction of both proteins.

(3) It was confirmed that most of the myosin-heavy chains concern directly with gel formation.
(Received Sep. 6, 1977)

畜肉製品に限らず食品のほとんどすべての製造工程に加熱操作があるが畜肉製品の場合、その構成蛋白質の加熱変性による品質（特に保水性、結着性）の決定が筋原線維蛋白質に大きく依存することが認められている。そこで我々の研究室においては、筋原線維蛋白質ミオシンBの加熱挙動を畜肉製品製造の理論と技術に貢献する目的で検討を行い、また、近年の諸情勢を考え、フィラーとして用いられる大豆蛋白質についてもその共存効果を検討してきた。

第2報¹⁾、第3報²⁾において、筋原線維蛋白質ミオシンBと大豆蛋白質CIF (Cold Insoluble Fraction) の凝集体形成至適温度 60°C 及び 100°C でゲル形成能を検討したが本報では、両蛋白質の加熱ゲル形成至適条件をより詳細に検討したので報告する。

実 験 方 法

1. 材料

第2報¹⁾と同様に、ミオシンBは屠殺直後の家兔骨格筋より、大豆蛋白質CIFは脱脂大豆粉体(吉原製油GP-

SL)より調製し、所定濃度に希釈し供試した。なお、希釈溶液は実際面に即したイオン強度のもの、すなわち、0.6M 塩化カリウム-50mM リン酸緩衝液(pH 7.0)を用いた。

2. 方法

(1) 加熱処理

所定濃度に調整した蛋白質溶液 5ml を内径 1.51cm の試験管に分注した後、加熱時における発泡を防ぐため水流ポンプで10分間各試験管に脱気をほどこしてフロン製キャップで密栓した。次に所定温度に調整した恒温槽中で所定時間加熱し氷冷後室温に戻してゲル形成能を測定した。

(2) ゲル形成能測定

第2報¹⁾と同様にして破断エネルギー、弾性率、ゲル内部安定性及び溶解度を求めた。

(3) 保水性測定

加熱処理後の試料について大橋らの方法³⁾により求めた。

(4) SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動

† 筋肉蛋白質と大豆蛋白質の相互作用(第4報)(前報、文献2)参照)
Interaction of Muscle Protein and Soybean Protein. Part IV.

* 宮崎大学農学部(宮崎市船塚3)

Faculty of Agriculture, Miyazaki University. Funatsuka, Miyazaki-shi

加熱後の試料を $34880 \times g$ で 10 分間遠心分離して得られた上澄液及び沈殿物について Weber, K. and Osborn, M. の方法⁴⁾ を参考に泳動を行い、得られたバンドを富士理研製 FD-AIV 型デンストメーター (波長 570 nm) を用いて検討した。

(5) 蛋白質濃度測定

第 2 報¹⁾ と同様に行なった。

結果と考察

既報^{1,2)} における加熱ゲル形成の条件については予備的に行なった実験に基づいたものであったのでそれらの条件を確立するため、蛋白質濃度、加熱温度及び加熱時間について検討した。

1. 蛋白質濃度依存性

予備実験で得た加熱ゲル形成至適温度、すなわち、ミオシン B では 70°C 、CIF では 100°C で 30 分間加熱処理を行ない種々の蛋白質濃度におけるゲル形成能を調べた。その結果は Fig. 1 に示す通りであった。

Fig. 1. Effects of protein concentration on gel formation

Myosin B(○) and CIF(●) were heated at 70°C for 30 min and 100°C , 30 min, respectively. B.E.: breaking energy, E.M.: elastic modulus, S.I.G.: stability of inner gel, W.H.C.: water holding capacity

ゲル形成を開始する濃度はレオロジー値よりミオシン B では 12 mg/ml 、CIF では 32 mg/ml と判明し、また、安定したゲルを形成したと判断される濃度はミオシン B では 15 mg/ml 、CIF では 50 mg/ml となった。保水性に関しては濃度増加に伴ない漸次高くなる傾向が認められた。従って以後の実験には、蛋白質濃度をミオシン B では 15 mg/ml 、CIF では 50 mg/ml になるよう調整した。

Fig. 2. Effects of heating temperature on gel formation

Sample was heated for 30 min. ○: 15 mg/ml myosin B, ●: 50 mg/ml CIF, △: 15 mg/ml myosin B + 50 mg/ml CIF. Proteins were showed with the final concentration. All abbreviation are the same as in Fig. 1.

2. 加熱温度依存性

前述の濃度になるよう調整した蛋白質溶液を Fig. 2 に示す温度域 ($50 \sim 100^\circ\text{C}$) でそれぞれ 30 分間加熱しそのゲル形成能を検討した結果、ミオシン B については $50, 100^\circ\text{C}$ を除く温度域でゲルが形成された。レオロジー値、保水容量値は 70°C で最も高い値を示し、溶解度の値もその温度で蛋白質がゲル形成に最も多く関与していると判断される傾向を示した。CIF においては、 100°C のみでゲルが形成され溶解度もそれとよく対応する傾向を示し、ゲル形成において CIF の温度感受性領域はミオシン B と比較して狭いことが判明した。

ゲル形成に関して、かなりその条件と挙動を異にする両蛋白質を共存させた場合単独の場合と異なり、全温度域でゲルを形成し、特に 100°C におけるレオロジー値は高い値を示した。しかし、溶解度はレオロジー値から予想される値よりも高く、この共存によるゲル形成能の助長が蛋白質量の増加によるものではなく、両蛋白質間の相互作用によるものであることが示唆された。

3. 加熱時間依存性

前述のゲル形成至適条件 (蛋白質濃度、加熱温度) で、それぞれの蛋白質の加熱時間についてゲル形成能を検討し、その結果を Fig. 3 に示した。

ミオシン B では加熱開始後 4 分より、また、CIF では 10 分よりゲル形成が始まり、ここでもミオシン B の方が CIF より加熱に対する反応性が大きいことが示された。しかし、加熱時間がある程度長くなると CIF の方がより強固なゲルを形成した。また、溶解度の値からゲル形

Fig. 3. Effects of heating times on gel formation

○: 15 mg/ml myosin B (70°C), ●: 50 mg/ml CIF (100°C). All abbreviation are the same as in Fig. 1.

成に与する蛋白質量は 10~20 分以後変化のないことから、時間経過に伴うゲル強度の増加は蛋白質の量的変化によるものでなくネットワーク構成による質的变化によるものと判断され、それは加熱初期における保水性値の不安定さにも現われていた。大豆蛋白質については 11 S 成分で HASHIZUME, K. ら⁵⁾, WOLF, W.J. ら⁶⁾ が加熱変性の時間経過に伴う変化を述べている。すなわち、11 S 成分は加熱後一旦低分子成分に解離し、その後会合する。そして不溶性凝集物は 6~7 分より急激に増加するとなっている。本研究においても、CIF は加熱開始後 10 分よりゲル形成が始まったが試験管内の蛋白質溶液中心部が 100°C になるのに約 3 分を要することから彼らの結果とよく一致している。

次に、両蛋白質共存下における加熱時間依存性についてそれぞれの蛋白質のゲル形成至適条件下で検討した結果を Fig. 4 に示した。

Fig. 4. Effects of heating times on gel formation

Mixtures of 15 mg/ml myosin B with 50 mg/ml CIF were heated at 70°C (○) or 100°C (●). Proteins were showed with the final concentration. All abbreviation are the same as in Fig. 1.

それぞれの蛋白質単独の場合、ミオシン B で加熱開始後 4 分、CIF で 10 分よりゲル形成が始まったが両蛋白質を共存した場合 2 分よりゲルの形成は始まりそれぞれのパラメーターの値にも共存による大きな効果が認められた。また、70°C と 100°C におけるゲル形成能はそれぞれの蛋白質の加熱に対する反応性がよく現れていた。すなわち、ミオシン B のゲル形成至適温度である 70°C では、CIF の構造変化が小さいことよりそれぞれの値にもそれ程顕著な増加は認められなかった。しかし、CIF の解離が若干起っていると考えられ、それがゲル形成開始時間を早めたものと思われる。一方、CIF のゲル形成至適温度である 100°C では、ミオシン B の構造変化は大きくおそらく反応基の露出を促進するような Unfolding が起り、一旦低分子に解離した CIF との間に相互作用を生じより強固なゲルを形成するものと判断した。しかし、長時間加熱は過熱によって生じるエンタルピーの増加により両蛋白質で構成されるネットワーク、特にミオシン B に変化をもたらし、ゲルネットワークを破壊し内部の不安定ゲルを形成するものと考えられる。

4. ゲル形成至適条件下におけるミオシン B と CIF の SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動

単独及び共存の両蛋白質をゲル形成至適条件下で処理した後、遠心分離 (34880 × g, 10 分間) を行なって得られた上澄液及び沈殿物について 0.1% SDS (Sodium dodecyl sulfate), 0.1% メルカプトエタノールを含む 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液に 1 晩 (3 回) 透析して電気泳動を行なった。その結果を Fig. 5, 6 に示した。

それぞれの蛋白質単独の場合 (Fig. 5) ミオシン B では、未加熱で約 40% を占めたミオシン A (band, G) が加熱によりそのほとんどを沈殿物中にヘビーチェーンとして移行し、ゲル形成に直接関与している。上澄液中には、分子量 25,000 以下のもの (band, A, B, C) が全体の 50% 近くを占めミオシン A の解離によるライトチェーンの増加が認められた。ミオシン A の解離については、DREIZEN, P. ら⁷⁾ が 40°C 加熱よりライトチェーン、ヘビーチェーンにわかれるとしている。また、沈殿物中のバンド B はライトチェーン-g₂ を含み Iro, T. ら⁸⁾ が示唆した g₂ の凝集体形成あるいはゲル形成への関与が推察された。WEEDS, A.G. ら⁹⁾ によるとミオシン中の g₁, g₂, g₃ の SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動染色強度比は 1.0 : 1.5 : 0.48 となっており、本研究で未処理の蛋白質のライトチェーン-g₂ 割合が 1.0 (g₁ を 1.0 として) と低いにもかかわらず 70°C 加熱後の上澄液、沈殿物には (1.0 : 0.70 : 0.76), (1.0 : 1.47 : 0.70) と

Fig. 5. Densitometer scans of SDS polyacrylamide gel electrophoresis.

Myosin B and soybean protein CIF after heat treatment were applied.

A-G; myosin B A'-H'; soybean protein CIF

Fig. 5 含有率に差が認められた。しかし、ここではバンド C, B にトロポニン-C, トロポニン-I を含んでいることからより詳細な言及は避けるべきと思われる。また、アクチン (band. E) については、上澄液中で全蛋白質中の 35% を占めるがトロポミオシン, トロポニン-T (band. D) と重複しており、また従来の研究^{10,11)}よりその多くは沈殿物中でゲル形成に関与していると推察される。以上のような傾向は 70°C 加熱をピークに 50, 100°C も含む他の温度域でも示されている。また、データには示さないが、電気泳動結果から、構成蛋白質の分布変化は加熱開始後 2 分より起こっていた。

また、CIF については、未加熱では KITAMURA, K. ら¹²⁾も示したように酸性サブユニット (band, A'-D') と塩基性サブユニット (band, E'-H') が示され、100°C で加熱することにより、上澄液では、バンド E', F' が減少し、他の温度域では未加熱と大きな変化は認められなかった。また、100°C でのサブユニットの分布変化は加熱開始後 6 分より起った。沈殿物については、加熱開始後 2 分よりバンド H' が明瞭になった。

次に両蛋白質を共存させた場合、レオロジー的には全温度域でゲルを形成することが示されたが、それぞれの

ゲル形成至適温度での加熱による電気泳動的挙動をみると Fig. 6 に示すようになった。70°C 及び 100°C 共にミオシンヘビーチェーン (band, G) が沈殿物に移行したことが確認された。また、CIF では比較的ゲル形成への関与の小さいものとしてバンド A', C', E', G' があげられ、大きいものとして B', D' があげられる。

Fig. 6. Densitometer scans of SDS polyacrylamide gel electrophoresis

The mixtures of myosin B and soybean protein CIF after heat treatment were applied.

A-G; myosin B A'-H'; soybean protein CIF

以上、両蛋白質の加熱下の挙動を電気泳動法により検討したが、CIF にはミオシン B にみられるような明瞭な変化 (例えば、構成蛋白質中のミオシン A の変化) は観察されなかった。しかし、LEE ら^{13,14)}も示すように肉中の大豆蛋白質の検出あるいは定量は SDS ポリアクリルアミドを用いた電気泳動で十分できることが判明した。ここで用いた方法では CIF がミオシン B と重複しないバンド (F', G') とミオシン A (G) で観察できるが加熱条件によって両蛋白質間の相互作用が異なるので十分検討が必要と思われる。

要 約

筋肉蛋白質 ミオシン B と大豆蛋白質 CIF について加熱ゲル形成を検討した結果、次のようになった。

- (1) ミオシン B の加熱ゲル形成は蛋白質濃度 15 mg/ml で 70°C, 4 分, CIF のそれは 50 mg/ml で 100°C, 10 分で開始することが判明した。
- (2) 両蛋白質が共存した場合、単独ではゲルを形成し

ないような条件下でもゲルを形成し、また、共存によってより強固なゲルを形成するような両蛋白質間相互作用が推察された。

(3) ミオシンのヘビーチェーンのほとんどがすべてがゲル形成に直接関与していることが確認された。

原稿の校閲と有益な批判とを賜りました九州大学農学部深沢利行教授に深謝の意を表します。

文 献

- 1) 芳賀聖一・大橋登美男: 食品工誌, 24, 243(1977).
- 2) 芳賀聖一・大橋登美男: 食品工誌, 24, 319(1977).
- 3) 大橋登美男・安藤則秀: 宮大農報, 14, 381(1967).
- 4) WEBER, K. and OSBORN, M.: *J. Biol. Chem.*, 244, 4406 (1969).
- 5) HASHIZUME, K., NAKAMURA, N. and WATANABE, T.: *Agric. Biol. Chem.*, 39, 1339 (1975).
- 6) WOLF, W. J. and TAMURA, T.: *Cereal Chem.*, 46, 331 (1969).
- 7) DREIZEN, P., and RICHARDS, D.H.: *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 37, 29 (1973).
- 8) ITO, T. and ANDO, N.: *Agric. Biol. Chem.*, 39, 575 (1975).
- 9) WEEDS, A.G. and POPE, B.: *J. Mol. Biol.*, 111, 129 (1977).
- 10) SAMEJIMA, K., HASHIMOTO, Y., YASUI, T. and FUKAZAWA, T.: *J. Food Sci.*, 34, 242 (1969).
- 11) NAKAYAMA, T. and SATO, Y.: *Agric. Biol. Chem.*, 35, 208 (1971).
- 12) KITAMURA, K. and SHIBASAKI, K.: *Agric. Biol. Chem.*, 39, 945, (1975).
- 13) LEE, Y. B., RICKANSRUD, D. A., HAGBERG, E. C. and FORSYTHE, R.H.: *J. Food Sci.*, 41, 589 (1976).
- 14) LEE, Y.B., RICKANSRUD, D. A., HAGBERG, E. C. and GREASER, M.L.: *J. Food Sci.*, 40, 380 (1975). (昭和52年9月6日受理)