

9260 煮熟肉の軟化におけるミオシンの分解と塩の影響について

助成研究者:田島真理子(鹿児島大学 教育学部)

研究目的

日本の肉の日常的な調理方法の一つとしてカレー、ポトフ、シチューなどの湿式加熱があげられるが、これまでこの湿式加熱時の肉タンパク質の変化についてはあまり報告がみられない。筆者は、肉を水中で煮熟加熱した時の筋漿タンパク質の変化について検討し、これらのタンパク質が肉から煮汁へ溶出し、変性凝固してあくへ移行することをすでに報告した。しかし、煮汁中には筋漿タンパク質に由来しないと考えられるタンパク質が存在し、筋原繊維からの溶出が示唆された。そこで、本実験においては肉加熱時の筋原繊維タンパク質の変化、特にミオシンの変化について検討し、その変化に塩濃度がどのように関わるか調べることを目的とした。

研究方法

牛もも肉30gに蒸留水100mlを加え、20分間浸漬した後、0.5,1,2,3時間沸騰加熱を行った。加熱後濾紙で濾してスープストック(煮汁)試料を調整し、加熱肉はSDS、MCEを含むリン酸緩衝液中(pH 7.0)で一晩可溶化し加熱肉試料とした。また、牛もも肉より筋原繊維を調整し、同様に0.5,1,2,3時間ドライヒーティングブロックを用いて100°Cで加熱し、これも同溶液で可溶化して加熱筋原繊維試料を得た。また、ミオシンも筋原繊維と同一条件で加熱、溶解を行った。これらの筋原繊維、ミオシンの加熱は0.15M、0.6M KCl中で行った。得られた試料は、Laemmliの方法に従ってSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)を行い、更にシグマ社製牛ミオシン抗体を用いてWestern blotting分析を行った。

研究結果

加熱肉の電気泳動パターンにおいては、加熱時間に伴いミオシン重鎖、 α -アクチニン、アクチンなどのバンドが徐々に減少し、分子量約72,000のバンドが新たに認められた。調整した筋原繊維を0.15M KCl中で100°Cで加熱した場合、ミオシン重鎖が減少し、やはり約72,000の分子量のバンドが加熱1時間以降ではっきりと認められた。加熱時のKCl濃度を0.6Mに上げると、加熱30分でこのバンドは明らかに観察された。このバンドがミオシンに由来するものであるか調べるため、抽出ミオシンを同じく0.15Mおよび0.6M KCl中で加熱し、western blot分析を行った。ミオシンは加熱時間に連れて分解し、分解物質は120,000から60,000の分子量範囲に複数見られ、0.6M KCl中で加熱した場合、更に低分子化が認められた。加熱筋原繊維のwestern blot分析においてもミオシン抗体との反応が見られ、特に0.6M KCl中での加熱では分子量170,000から100,000にかけて分解バンドが見られた。また、実際に水中で加熱された肉においてもミオシン抗体との反応バンドが観察された。

9260 煮熱肉の軟化におけるミオシンの分解と塩の影響について

助成研究者: 田島真理子(鹿児島大学 教育学部)

1. 研究目的

食肉は日常の食生活では重要なタンパク質源であるとともに、ご馳走という言葉が連想されるようにおいしい食物でもある。しかし、永い肉調理の伝統を持つ欧米に比べ、日本では畜肉が日常的に食されるようになったのはわずか数十年である。肉調理にはシチューやポトフのように湿式加熱によって調理される場合とローストやソテーのように乾式加熱によって調理される場合があるが、欧米での食形態は乾式加熱調理による場合が多く、このため、加熱終点と肉の硬さとの関わりや、加熱時の肉タンパク質の変化については多くの研究が見られるが、湿式加熱調理時の肉タンパク質の変化については、肉からストックへの溶出成分に関するもの等を除いて殆ど見られない。筆者らはこれまで、水中で肉を煮熟した時の肉タンパク質について検討し、(1)肉の浸漬液中には筋漿タンパク質が溶出していること、(2)加熱によりこの筋漿タンパク質のほとんどは早期にあくとして煮汁から分離されてくること、(3)肉の煮汁中には分子量40,000から10,000ダルトンを中心として数種のタンパク質が存在すること、(4)また、これらのタンパク質のうちには筋漿タンパク質にも筋漿タンパク質の加熱物にも由来しないタンパク質が存在することを報告し^{1), 2), 3)}、筋原繊維タンパク質からストックへの一部溶出があるのではないかと推測している。

シチューや肉スープにおいては加熱は通常3時間程度行われるが、この加熱過程において肉のうま味成分が溶出するとともに肉は軟化する。この軟化は結合組織タンパク質の1つであるコラーゲンのゼラチン化によるところが大きい。筋原繊維を構成する筋原繊維タンパク質の加熱変化は肉の硬さにも影響すると考えられる。

本実験は、肉中の筋原繊維タンパク質が、煮熟加熱によりどのような変化を受けるか、また、その変化に塩がどのように影響するか検討することを目的とした。

2. 研究方法

2. 1. 肉およびストック試料の調製方法

加熱には市販の新鮮な牛もも肉を購入して使用した。肉は30gの角切りとし、蒸留水100mlを加え20分間浸漬した後、約15分間で沸騰するよう火力を調節し、その後は軽く沸騰を続けて、点火後30分、1、2、3、6時間それぞれ加熱した。加熱終了後肉を取り出し、汁はあくを除くため東洋濾紙 No.2 で濾して蒸留水を補い100mlに定容しストック試料とした。取りだした肉は中心部0.5gを切り出し、これに5%ラウリル硫酸ナトリウム(以下SDSと

略す)、5% 2-メルカプトエタノール、燐酸緩衝液 pH7.0 (以下SDS-MCE液と略す) の溶液 14.5ml を加えてホモジナイズし一夜攪拌溶解し、加熱肉試料とした。

2. 2. 筋原繊維およびミオシンの加熱方法

筋原繊維の調整は以下のように行った。牛もも肉を挽き肉とし、これに10倍量の塩溶液 (10mM KCl、20mMリン酸緩衝液 pH 6.4、2mM EGTA、2mM MgCl₂、2mM NaN₃) を加えてホモジナイズし、1,000×Gで遠心分離により上清液を除き、更にこの操作を3回繰り返した。3回目のホモジナイズ後ナイロンゴースでホモジネートを1回濾過した。次に、この塩溶液に1%濃度になるようTritonX-100を加えた溶液6倍量を加えて懸濁し、1,500×Gで遠心分離した。さらに1回上記塩溶液で懸濁、遠心分離を行った後、100 mM KCl で2回懸濁および遠心分離を行い、得られた筋原繊維を0.15Mまたは0.6M KCl濃度に調整した。

筋原繊維は、Fig.1 に従い、ドライヒーティングブロック (エムエス機器株式会社製) を用いて 100°Cで0,0.5,1,2,3 時間加熱した。加熱終了後、3倍量の SDS-MCE 液を加えて溶解し、加熱筋原繊維試料とした。

ミオシン (シグマ社製) は、タンパク質濃度を 2.7mg/mgに調整し、KCl濃度 0.15M、および 0.6M 溶液とした。加熱および溶解は筋原繊維と同様に行った。

Myofibril (in 0.15M or 0.6M KCl)

Myosin (in 0.15M or 0.6M KCl)

- heated at 100°C for 0,0.5,1,2,3 hrs in a dry heating block
- 3 vol. of SDS-MCE solution was added
- homogenized in a Waring Blendor for two 15-sec periods with 15-sec interval
- stirred for one night

Heated myofibril

Heated myosin

Fig.1 Heating of myofibril and myosin

2. 3. SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動

SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動は Laemmli の方法⁴⁾に従った。上述の試料は電気泳動に供するため、試料 1mlに対して tracking dye試薬 200μl、2-MCE 60μlを加え60°Cで15分間加熱した。分離ゲルのアクリルアミド濃度は10%とし、アクリルアミド:ビスアクリルアミドは 37:1とした。泳動後、ゲルをクマジーブリアントブルーにより染色した。

2. 4. ミオシン由来物質の検出方法

肉および筋原繊維中のミオシンおよびミオシン由来物質の検出には western blotting 法を用いた。概略を Fig.2に示す。

Laemmliの方法に従い、同一試料について3枚の泳動ゲルを得、1枚はクマジーブリアントブルーにより染色し、2枚のゲルは染色せず、ニトロセルロース膜 (BIO-RAD製) への転写を行った。転写は、90Vで5時間とした。この転写時間ではミオシン重鎖の転写は不十分になるが、分子量10数万以下のタンパク質は十分に転写された。転写時間を延長するとミオシン重鎖の転写は改善されるが、低分子量域のタンパク質がニトロセルロース膜を通過するため、5時間の転写とした。得られた転写膜の一枚を抗体反応に用い、残りの一枚は転写された全タンパク質の検出のため、アミドブラックで染色した。一次抗体にはシグマ社製牛ミオシン抗体を用い、二次抗体にはperoxidase-conjugated IgGを用いた。検出にはナフトール-過酸化水素水溶液 (ナフトール30 μ g/メタノール10mlを過酸化水素水60 μ l/PBS 50mlに溶解)を用い、暗室で約20分間反応させてバンドを確認した後、蒸留水で洗浄した。

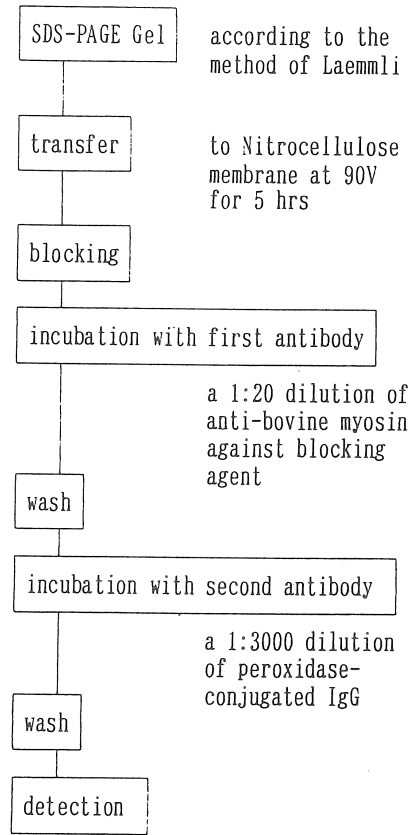


Fig.2 Western blotting method

3. 実験結果

3. 1. 加熱肉およびストック中のタンパク質の変化

肉を水中で加熱した時に肉から溶出するタンパク質のSDS-PAGEパターンを Fig.3に示した。すでに報告したように肉を水中に浸漬した時、水中には筋漿タンパク質が溶出するが加熱により早期にそのほとんどがあくへ移行し、加熱30分以降では分子量40,000から10,000を中心いくつかのタンパク質が見られる²⁾。これらのうちには、筋漿タンパク質のパターンにも、また、筋漿タンパク質のみを加熱した場合においても見られないバンドが見られ、これまでの実験経過から筋原繊維からのタンパク質の溶出の可能性が示唆された²⁾が、本実験においても同様の結果が得られた。

一方、加熱された肉中のタンパク質のSDS-PAGEパターンの経時変化は、Fig.4の通りであった。加熱時間に伴い、ミオシン重鎖、 α -アクチニン、アクチン、トロポミオシンな

どの筋原繊維タンパク質バンドは徐々に薄くなった。特にミオシン重鎖は加熱 3時間、および 6時間ではほとんど消失した。これは加熱による凝集のため、SDS-MCE液への溶解性が低下したためと考えられる。しかし、一方で分子量約72,000に新たなバンドがわずかながら認められた。このバンドは未加熱肉では見られないため、加熱により新たに生じたタンパク質であると考えられる。筋原繊維タンパク質について変化が認められたので、次に筋原繊維を調整してタンパク質の加熱変化について検討した。

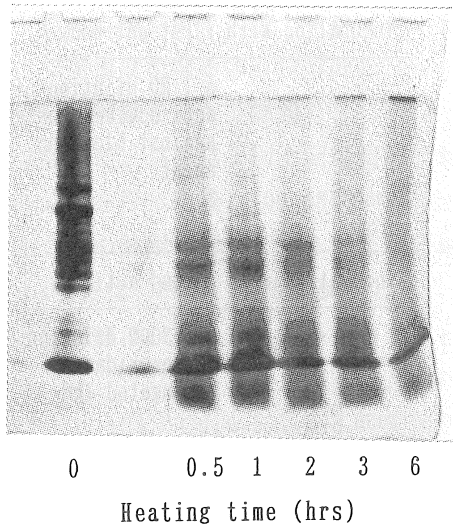


Fig.3 SDS-PAGE pattern of proteins in soup stock

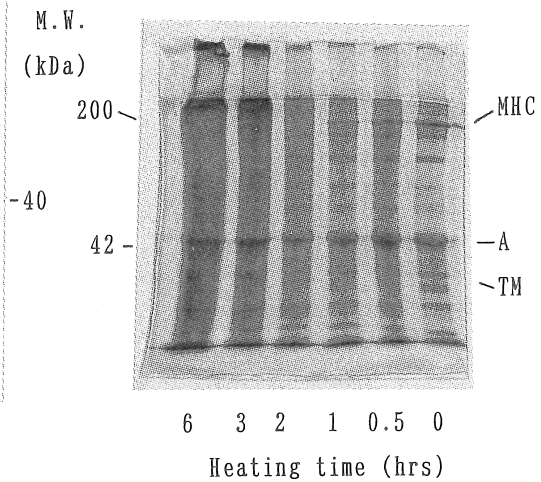


Fig.4 SDS-PAGE pattern of proteins in meat

3. 2. 筋原繊維タンパク質の加熱による変化と塩の影響

筋原繊維タンパク質を 0.15M KCl下で加熱した時のSDS-PAGEパターンをFig.5に示した。加熱肉のPAGEパターンと同様に、加熱時間に伴いミオシン重鎖、 α -アクチニン、アクチン等のタンパク質のバンドが徐々に薄くなり、ミオシン重鎖のバンドは加熱3時間ではごくわずかしかが見られなかった。加熱1時間以降では肉の場合と同様、やはり分子量72,000前後のバンドが新たに生じた。従って筋原繊維を 0.15M KCl下で加熱すると一部のタンパク質に分解が生じるのではないかと推定される。

筋原繊維タンパク質の抽出性は塩濃度によって影響を受けるため、加熱時の変化にも塩濃度は影響を及ぼすと考えられる。そこで、KCl濃度を 0.6Mに調整して同様に筋原繊維の加熱を行った。結果を Fig.7に示した。加熱に伴う筋原繊維タンパク質のPAGEパターンの変化は概ね 0.15M KCl に同じであったが、変化時間において差が見られた。0.15M KClにおいてはミオシンバンドは3時間加熱においてもごくわずかながら観察されたが、0.6M

KClでは加熱2時間においてすでにミオシンバンドは見られず、また、アクチン、その他のバンドの変化も0.15Mに比べはやかかった。一方、分子量約72,000のバンドは0.6M KClでは加熱30分で認められた。更に、わずかながらこのバンドの下にも新たなバンドが見られた。従って0.6M KClでは、0.15M KClに比べ筋原繊維の熱変化が早く、分子量72,000前後のバンドも早く出現することがわかった。この新たなバンドがいずれのタンパク質に由来するか調べるため、加熱によるバンドの減少が最も大きいミオシンについて加熱変化を調べた。

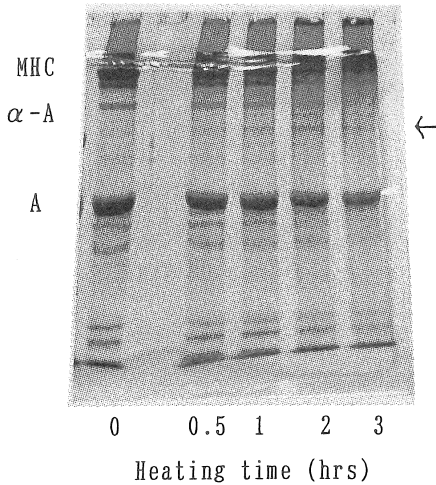


Fig.5 SDS-PAGE patterns of heated myofibrillar proteins in 0.15M KCl

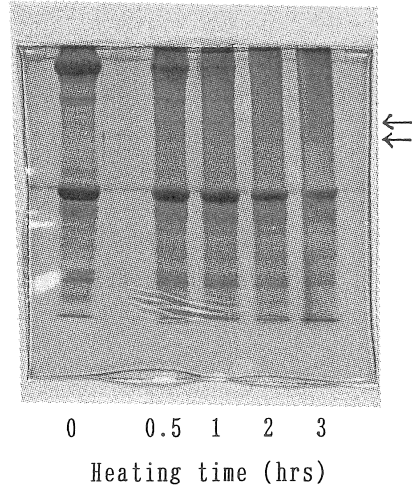


Fig.6 SDS-PAGE patterns of heated myofibrillar proteins in 0.6M KCl

3.3 ミオシンの加熱変化

ミオシンは先の2.2.に示した方法により、30分から3時間加熱を行った。結果をFig.8に示した。いずれのKCl濃度においても、加熱時間に伴いミオシンバンドは徐々に減少した。しかし、ミオシンの加熱によって生じたと考えられるバンドは分子量68,000付近に見られるごくかすかに見られるバンドを除いてほとんどみられず、またKCl濃度による影響もほとんど観察されなかった。

そこで、ミオシン抗体を用いて加熱ミオシンの泳動ゲルのWestern blotを行った。結果をFig.9に示した。いずれのKCl濃度においても明らかに経時的な分解を起こしていることが認められた。加熱30分で約120,000から60,000前後まで多くのバンドが観察され、加熱時間に伴い各バンドは濃くなった。0.6M KClで加熱した場合、加熱2時間および3時間では更に低分子域にもバンドが観察された。SDS-PAGEパターンではミオシンの分解によるバンドはほとんど観察されなかったが、western blotによって観察されたことからやはりミオシンが加熱により一部分解を起こしているのではないかと考えられる。

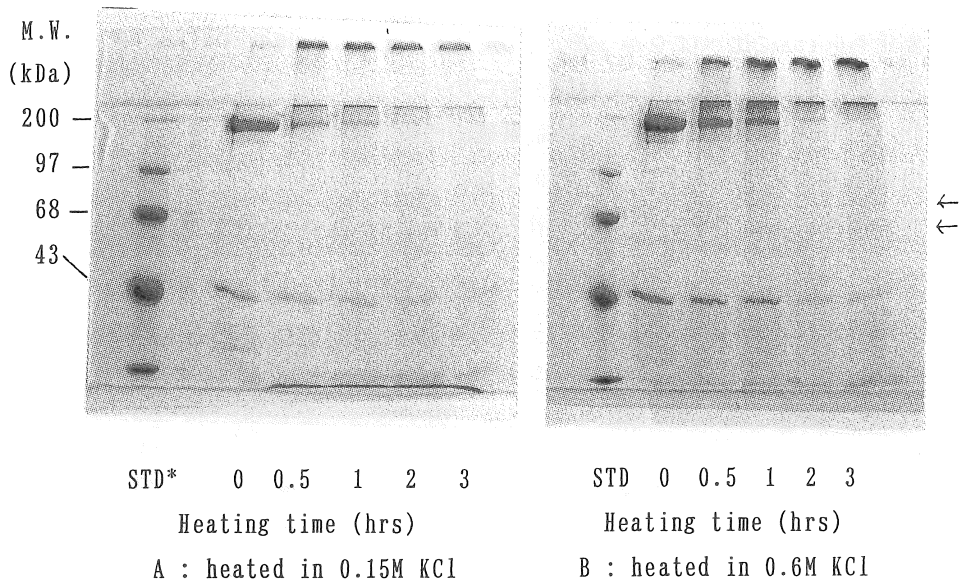


Fig.7 SDS-PAGE patterns of heated myosin
* Molecular weight standards

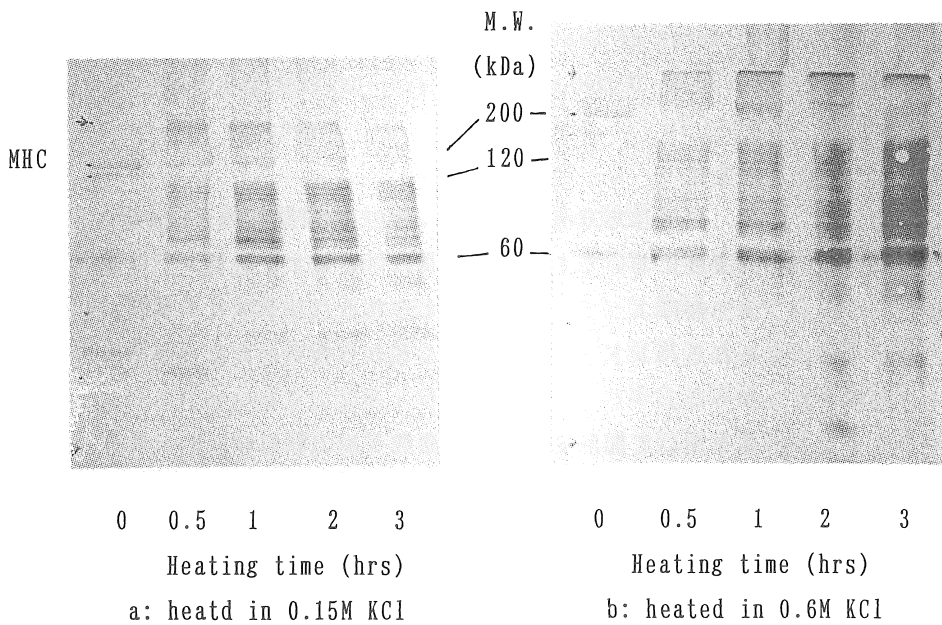


Fig.8 Western blot analysis of heated myosin

3. 4. 筋原繊維加熱におけるミオシンの分解

上述のように加熱によるミオシン分解が認められたので、筋原繊維の加熱においても同様に分解が起こっているかを確認するため、加熱筋原繊維のwestern blotを行った。0.15 M KCl中で加熱した時の結果をFig.9に、また、0.6M KClでの結果をFig.10に示した。左図はblotの比較のためにニトロセルロース膜への転写後アミドブラックで全転写タンパク質を染色したものである。Fig.9の右図に見られるように、筋原繊維を加熱した場合も、明らかにミオシン抗体との反応が見られ、ミオシンが一部分解していることが分かった。また、加熱時のKCl濃度はミオシンの分解に影響しており、0.6M(Fig.10)では0.15M(Fig.9)のバンドに加え、分子量170,000から100,000付近のバンドが明らかに観察され、経時的に170,000から100,000へと量的に移動しているのが観察された。以上の結果は、ミオシンは加熱時に凝固凝集するばかりでなく、一部分解する可能性があることを示唆していた。このことから、実際に肉を調理している時にもミオシンに一部分解が起こるのではないかと推測されるため、肉の煮熟時のミオシン分解について検討した。

3. 5 加熱肉およびストック中のミオシン由来物質

肉を先に述べた方法により可溶化し電気泳動を行ったのち、そのゲルを用いてミオシン抗体とのwestern blotを行った。結果をFig.11に示した。

市販の熟成肉を用いているため、未加熱肉ではミオシン重鎖のバンド以外にも若干の反応バンドが見られるが、加熱により明らかに複数の抗体との反応バンドが見られた。これらの分解物質のバンドの分子量は170,000から60,000程度であり、この結果は筋原繊維タンパク質でのblotの分子量と概ね一致していた。これらのことから、やはり肉を加熱した場合、ミオシン分子に一部分解が起こっていると推定された。

また、この肉中で起こるミオシンの変化が肉のストックに影響しているか調べるため、ストックについてもミオシン抗体との反応を調べた。結果をFig.12に示した。加熱30分から2時間までミオシンとの反応バンドが見られ、従って、肉のストック中へもミオシンの分解物質は一部溶出していると考えられる。しかし加熱3時間、および6時間では反応バンドが見られなかった。本実験においてはストック中のあくは加熱終了後に濾紙で濾して除く方法を取ったが、あく中には凝集タンパク質が多く含まれるため、加熱過程で、これらの分解物質もあくに吸着され、加熱後期には検出されないのではないかと推定しているが、これについては今後あくについてミオシン抗体との反応を検討することが必要であると考ええる。

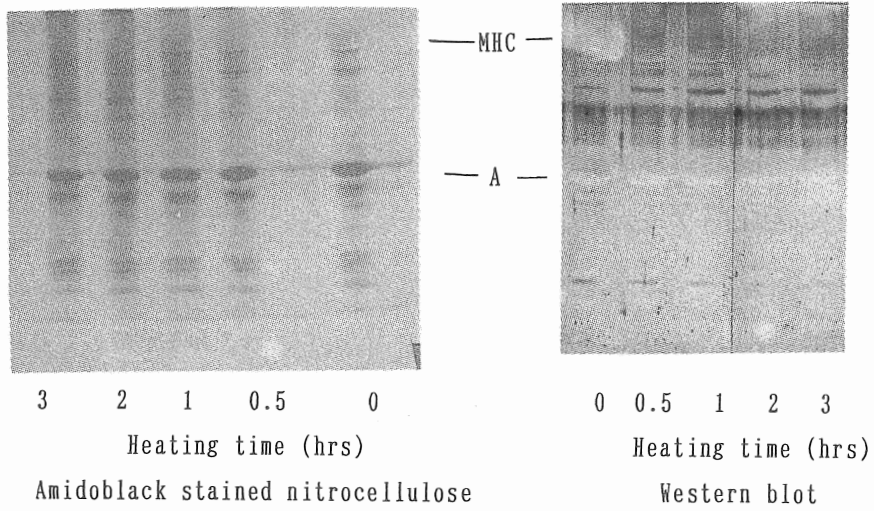


Fig.9 Western blot analysis of myofibril heated in 0.15M KCl

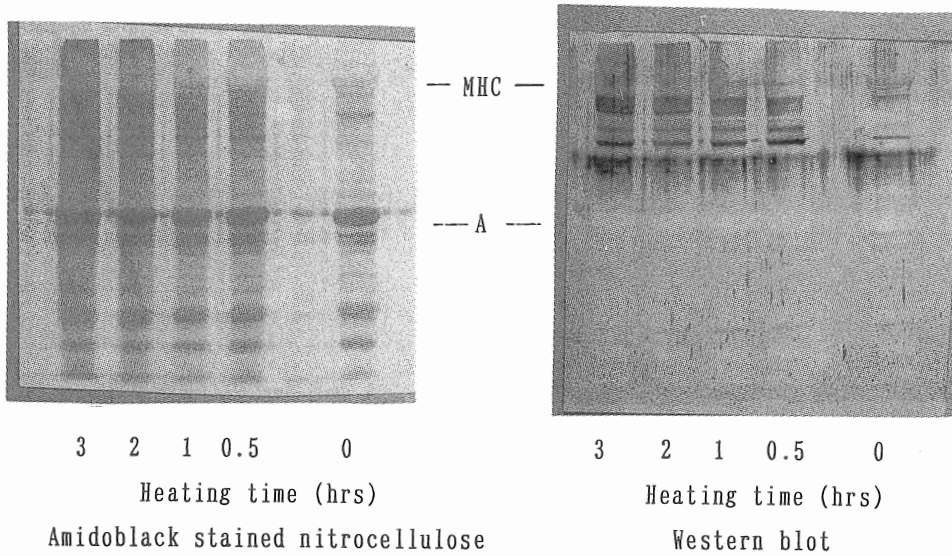


Fig.10 Western blot analysis of myofibril heated in 0.6M KCl

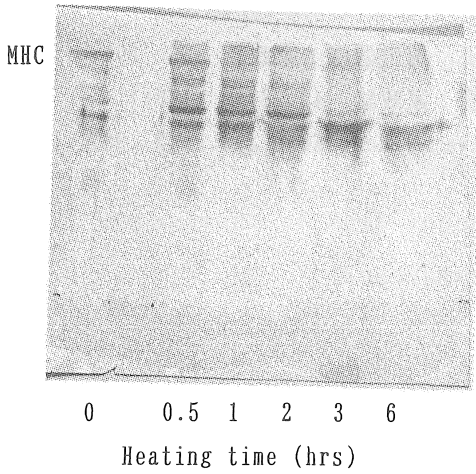


Fig.11 Western blot analysis of the proteins in boiled meat

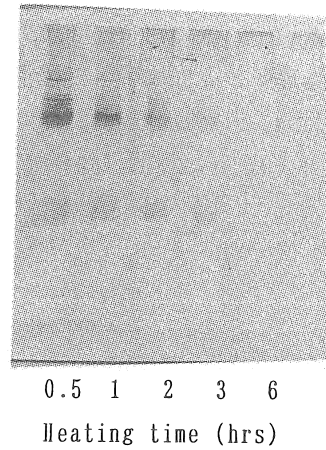


Fig.12 Western blot analysis of the proteins in soup stock

4. 考察および今後の課題

肉を煮熟加熱した時の筋原繊維タンパク質およびミオシンについてその加熱変化をSDS-PAGEおよびwestern blot法を用いて調べた。その結果、肉中のミオシン分子は加熱により分解しており、また一部はストックへ溶出していることが認められた。この変化は筋原繊維のみを加熱した場合、またはミオシンそのものを加熱した場合にも認められ、肉を水中で長時間加熱するとコラーゲンのゼラチン化ばかりでなく構造タンパク質である筋原繊維タンパク質にも分解が起こっていることを示していた。煮熟肉での軟化はコラーゲンのゼラチン化によると考えられているが、このミオシンの分解が肉の軟化にどの程度貢献するか検討するところまで本研究においては時間の都合で着手できなかった。

また、塩濃度を上げて筋原繊維タンパク質を加熱した場合、ミオシンの分解は幾分促進される傾向にあり、従って肉の軟化にミオシンの分解が影響する場合、塩の添加は軟化を早め、加熱調理時間を短縮できると考えられる。本実験においては、肉煮熟時の塩添加の影響まで検討することができなかったが、今後、この点についても検討する。

5. 参考文献

- 1) 田島真理子, 三橋富子, 妻鹿絢子, 矢野淳子, 荒川信彦: 家政誌 35 161 (1984)
- 2) 田島真理子, 妻鹿絢子, 三橋富子, 荒川信彦: 家政誌 42 877 (1991)
- 3) M.Tajima, T.Mitsubishi, A.Mega, N.Arakawa: J.Home Econ.Jpn. 42 967 (1991)
- 4) Laemmler: Nature 227 681 (1971)

The degradation of myosin in meat by boiling
and the effect of salt on it

Mariko Tajima

Department of Home Economics, Faculty of Education
Kagoshima University

Summary

Some changes in myofibrillar proteins, especially myosin, of meat during boiling were investigated by use of SDS polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and western blot analysis using an antibody against myosin. Of the major bands of myofibrillar proteins, that of myosin heavy chain disappeared first from the SDS-PAGE patterns of the boiled meat. When the purified myofibrillar proteins in 0.15M KCl solution were heated at 100 C, the myosin heavy chain band disappeared from the SDS-PAGE patterns gradually with increasing heating time, and a 72,000-dalton band was observed after heating for 1 hour. In 0.6M KCl solution, the 72,000-dalton band appeared after heating for 30 minutes. When the purified myosin in 0.15M or 0.6M KCl was heated at 100 C, the western blot analysis based on the reaction with anti-myosin showed that myosin heavy chain was degraded into components ranging in molecular weight of 120,000-60,000 daltons. These degraded components of myosin heavy chain were also observed in western blots of the heated myofibril, the boiled meat and the soup stock.