

助成番号 0913

## 食肉の熟成に及ぼすミネラル塩の影響のプロテオーム解析

石川 伸一<sup>1</sup>, 大畑 素子<sup>2</sup>, 有原 圭三<sup>2</sup>, 伊藤 良<sup>2</sup><sup>1</sup>宮城大学食産業学部フードビジネス学科, <sup>2</sup>北里大学獣医学部動物資源科学科

**概要** 食肉は熟成に伴いテクスチャー、味、香りが向上し、これにはカテプシンなどのプロテアーゼや  $\text{Ca}^{2+}$  などのミネラルなどが関与していることがわかっている。牛肉の熟成では、トロポニン T の開裂など筋原繊維タンパク質に変化が起こることが知られているが、筋漿タンパク質の変化については未だ解明されていないことが多い。本研究では、牛肉の真空パック熟成中におけるタンパク質の変化と牛肉ホモジネートの貯蔵中の変化を網羅的な解析法であるプロテオミクス手法を用いて比較検討することを目的とした。さらに、牛肉ホモジネートの貯蔵実験を牛肉の熟成モデルとして使用し、熟成に及ぼす各種プロテアーゼおよびミネラルの影響について調べた。

牛肉の熟成実験では、と殺後の日本短角種の大腿二頭筋を真空パックし、一定期間 4°C で熟成した。牛肉ホモジネートの貯蔵実験では、肉片を Tris-HCl (pH 7.4) バッファー中でホモジナイズし、4°C で貯蔵した。熟成および貯蔵後、試料からタンパク質を抽出し、SDS-PAGE および二次元電気泳動 (2D-PAGE) に供した。ウェスタンブロッティングによりグリセルアルデヒド 3-リン酸脱水素酵素 (GAPDH) の検出を行った。牛肉ホモジネート試料にプロテアーゼインヒビター 8 種およびミネラル 4 種をそれぞれ添加後、上記同様のホモジネート貯蔵試験を行い、SDS-PAGE およびウェスタンブロッティングを行った。

牛肉熟成および牛肉ホモジネートの SDS-PAGE および 2D-PAGE の結果、分子量 38 kDa、等電点 7.8-9.5 の可溶性タンパク質が時間の経過とともに両実験区において特異的に減少することが明らかとなった。ウェスタンブロッティングの結果、牛肉熟成および牛肉ホモジネートの貯蔵中において分解するタンパク質は GAPDH であることが示された。これらの結果から牛肉ホモジネート試料中の変化は、実際に牛肉中で起こり得る反応であることが示唆された。この牛肉ホモジネート実験を牛肉モデルとして使用し、牛肉ホモジネート試料にプロテアーゼインヒビターおよびミネラルをそれぞれ添加し、GAPDH の分解程度を調べることで、それらが関与する熟成メカニズムの解明を行った。その結果、プロテアーゼインヒビターである Pepstatin A、Calpain inhibitor II、TLCK 添加した区では GAPDH の分解が抑制された。これらはカテプシン D、カルパイン II、セリンプロテアーゼの阻害剤であることから、これらのプロテアーゼが熟成におけるタンパク質の分解に関与している可能性が示唆された。ミネラルの添加試験では、NaCl、 $\text{MgCl}_2$  および  $\text{CaCl}_2$  は GAPDH の分解が促進し、KCl は分解を抑制することが明らかとなった。今後、熟成マーカーとして GAPDH を用いることで、熟成期間の最適化などを計ることができると考えられる。

## 1. 研究の背景と目的

食肉の美味しさを決定する大きな要因の一つとして「熟成」がある。熟成過程は死後に硬直した筋肉を軟らかく、すなわち解硬するのが第一の目的だが、解硬と同時に食肉の味や風味などが向上することが明らかとなっている<sup>1-3)</sup>。牛肉の熟成の場合、硬直が 80% 解けるのに 4°C の保存で

約 10 日かかることが知られている。熟成の進行による解硬の具体的な現象として、Z 線の脆弱化およびアクチンフィラメントとミオシンフィラメント間結合の弱化、タンパク質の分解、コネクチン網目構造の脆弱化などが知られている<sup>4-6)</sup>。

Z 線の脆弱化およびアクチンフィラメントとミオシンフィラ

メント間結合の弱化をもたらす因子として、 $\text{Ca}^{2+}$  およびプロテアーゼなどがある<sup>7-12)</sup>。筋線維を 0.1 mM  $\text{Ca}^{2+}$  溶液(食肉熟成中の筋線維内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度は 0.1~0.2 mM)に長時間浸しておく、それをホモジナイズして得られる筋線維の長さは短くなり、その切断箇所はすべて Z 線部分であることがわかっている。これは  $\text{Ca}^{2+}$  が Z 線の主成分の一つであるリン脂質に作用して遊離させ、その構造を脆弱化させると推定されている。また、 $\text{Ca}^{2+}$  がプロテアーゼの一種であるカテプシン L やカルパインを活性化し、Z 線を分解すると考えられている。さらに、熟成中にパラトロポモシンがアクチンフィラメントの両端部分からミオシンフィラメント上に移動し、両フィラメント間の結合を弱化させることが分かっている。これらの現象も  $\text{Ca}^{2+}$  が関与している。また、解硬要因には KCl 濃度依存性の Mg-ATPase 活性なども知られており、熟成過程はミネラル成分をはじめとしたさまざまな要因によって引き起こされていると考えられている。そのため、熟成によっておこる筋肉タンパク質変化の全体像や熟成に関わる因子については十分に明らかにされていないのが現状である。特に、熟成にともなう筋漿タンパク質の変化や風味等の関与においてはほとんど解明されていない。

また、熟成方法には、好氣的条件下で行うドライエージングと屠殺直後の肉を真空パックし、嫌気性条件下で行うウェットエイジングがある。熟成方法によって、プロテアーゼの作用が異なり、その結果、熟成プロセスやメカニズムが異なることが予想されるが<sup>13)</sup>、この点も未だ十分に明らかにされていないのが現状である。

本研究では、現在広く用いられている熟成方法である真空パック中で熟成したウェットエイジング牛肉中におけるタンパク質の変化と、実験的な熟成方法である牛肉ホモジネートの貯蔵中の変化を網羅的な解析法であるプロテオミクス手法を用いて比較検討することをひとつの目的とした。さらに、食肉中の「熟成マーカー」を探索し利用することで、ミネラルやプロテアーゼインヒビターが熟成に及ぼす影響を調べ、熟成メカニズムの一端を明らかにすることを本研究のもうひとつの目的とした。

## 2. 研究方法

### 2.1 牛肉の熟成実験

牛肉の熟成実験では、と畜後の日本短角牛種の大腿

二頭筋を真空パックし、4°Cで1、10、15、23、30日間熟成を行った。SDS-PAGEの分析には、可溶性タンパク質、不溶性タンパク質および全タンパク質を、二次元電気泳動(2D-PAGE)には可溶性タンパク質のみを使用した。

### 2.2 牛肉ホモジネートの貯蔵実験

牛肉の貯蔵実験では、と畜後、4°Cで1日置いた牛肉をバッファー中でホモジナイズし、0、1、3、7、10日間、4°Cで貯蔵した。バッファーには、0.1 M Tris-HCl バッファー(pH 7.4) containing 0.05%  $\text{NaN}_3$ を使用した。溶液中のpHを調べる実験では、中性のバッファーのほかに酸性バッファーとして 0.1 M クエン酸バッファー(pH 5.6) containing 0.05%  $\text{NaN}_3$ を使用した。具体的には、マイクロチューブ内で50 mgの牛肉片と250  $\mu\text{l}$ のバッファーを合わせ、氷で冷やしながら1分間ホモジナイズした。熟成メカニズムを調べる実験では、バッファーにプロテアーゼインヒビターまたはミネラルをそれぞれ添加し、10日間の貯蔵実験を行った。本実験に用いたプロテアーゼインヒビター8種(Sigma社製)とそれらが作用するプロテアーゼおよび牛肉ホモジネート中の濃度を表1に示す。ミネラルは、NaCl(最終濃度50 mM, 500 mM)、KCl(5 mM, 50 mM)、 $\text{MgCl}_2$ (1 mM, 10 mM)および $\text{CaCl}_2$ (2.5 mM, 25 mM)をそれぞれ添加し、貯蔵中のタンパク質の分解に及ぼす影響について検討を行った。SDS-PAGE、2D-PAGEの分析にはどちらも可溶性タンパク質を使用した。

### 2.3 電気泳動

牛肉の熟成および牛肉ホモジネートの貯蔵実験の試料からタンパク質を抽出キット(Bio-Rad)を用いて抽出した。全タンパク質の調整はReadyPrepタンパク質抽出キット(Total Protein)を、可溶性タンパク質および不溶性タンパク質の調整にはReadyPrepタンパク質抽出キット(Soluble/Insoluble)を使用した。Lowry法によりタンパク質を定量後(RC DC プロテインアッセイ, Bio-Rad)、SDS-PAGEおよび2D-PAGEに供した。

SDS-PAGEには、10 - 20% グラジエントアクリルアミドゲル(Bio-Rad)を使用した。試料中のタンパク質は2-メルカプトエタノール含有Laemmliサンプルバッファー中で変性後、ゲルに10  $\mu\text{g}/\text{lane}$  アプライし、100 Vの電圧で80分間電気泳動を行った。泳動後のゲルは、固定後、Flamingo Fluorescent Gel Stain(Bio-Rad)により染色を行い、Chemi Doc XRS(Bio-Rad)によりタンパク質の検出を行った。

表1. 実験に用いたプロテアーゼインヒビターの種類

プロテアーゼインヒビター	作用するプロテアーゼ	ホモジネート中濃度(μM)
E-64	カテプシン B, H, L	1, 10
Pepstatin A	カテプシン D	1, 10
Calpain Inhibitor I	カルパイン I	1, 10
Calpain Inhibitor II	カルパイン II	1, 10
Lactacystin	プロテアソーム	1, 10
PMSF	セリンプロテアーゼ	100, 1000
TLCK	セリンプロテアーゼ	10, 100
TPCK	セリンプロテアーゼ	10, 100

2D-PAGEは、pH3-10の固定化pH勾配プレキャストゲル(IPG ReadyStrip 7cm, Bio-Rad)および10-20%のポリアクリルアミドゲル(Bio-Rad)を用いて電気泳動を行った。一次元目の等電点電気泳動は、プロティアン IEF セル(Bio-Rad)を用いて行い、条件は250Vで15分、4,000Vで20,000VHours泳動し、500Vで保持した。等電点電気泳動終了後、平衡化(SDS化、還元・アルキル化)し二次元目のSDS-PAGEに供した(200V, 定電圧で45分間)。2D-PAGE終了後、Flamingoにより染色し、PharosFX(Bio-Rad)よりゲルイメージを取り込んだ。2D-PAGEの各スポットの検出および解析は、画像解析ソフトPDQuest(Bio-Rad)により行った。

#### 2. 4 ウェスタンブロッティング

SDS-PAGEおよび2D-PAGE後、SNAP i.d. System(Millipore)を用いてタンパク質をPVDFメンブラン(イミュンブロットPVDFメンブラン, Bio-Rad)に転写した。ブロッティング、抗GAPDH抗体(HyTest, Ltd.)による免疫反応後、ECL Plus ウェスタンブロッティング検出システム(GEヘルスケア・ジャパン)を用い、化学発光法によりバンドを検出した。化学発光は、ChemiDoc XRSにより検出した。

#### 3. 結果および考察

図1Aは、真空パック熟成中の牛肉の全タンパク質、可溶性タンパク質および不溶性タンパク質の変化をSDS-PAGEにより調べたものである。その結果、全タンパク質と可溶性タンパク質において、分子量約38kDaのタンパク質が特異的に減少することが明らかとなった。特に、可溶性タンパク質において約38kDaのバンドの減少が顕著にみられた。これまで食肉中の可溶性タンパク質の中で、分

子量は約38kDaに相当するタンパク質はグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素(以後、GAPDH)であるということが報告されていることから、抗GAPDH抗体を使用したウェスタンブロッティングを行った。図1Bにその結果を示す。図より時間の経過とともにGAPDHのバンドが減少していることから、GAPDHは、真空パック熟成(ウェットエージング)中に特に減少するタンパク質であることが明らかにされた。

次に、真空パック熟成の牛肉試料およびホモジネート貯蔵した試料中のタンパク質変化を二次元電気泳動で比較を行った。図2Aおよび2Bは、1日、15日間、真空パック熟成した牛肉試料中の可溶性タンパク質の電気泳動図を示し、図2Cおよび2Dは、0日、10日間、牛肉ホモジネートを貯蔵した牛肉可溶性タンパク質の電気泳動図を示す。これらの電気泳動図を比較した結果、真空パック熟成の牛肉試料とホモジネート貯蔵した試料ともに分子量約38kDa、等電点7.8-9.5のスポットの時間の経過とともに減少することが確認された。図1Bのウェスタンブロッティングの結果やこれまでに報告されている等電点値からも、両実験区で減少するスポットはともにGAPDHであることが予想され、実際、LC/MS/MSによる分析でもGAPDHであることが明らかとなった(データ未掲載)。そのため、今回用いた牛肉ホモジネートの貯蔵条件は、牛肉熟成と同様の反応が起こり、GAPDHを熟成マーカーとして用いることで牛肉熟成モデルとして使用できることが示唆された。牛肉そのものを使用する実験はいろいろ制限があるが、同様のタンパク質変化が確認された牛肉ホモジネート試料を用いることで、牛肉の熟成機構を調べることができると考えられた。

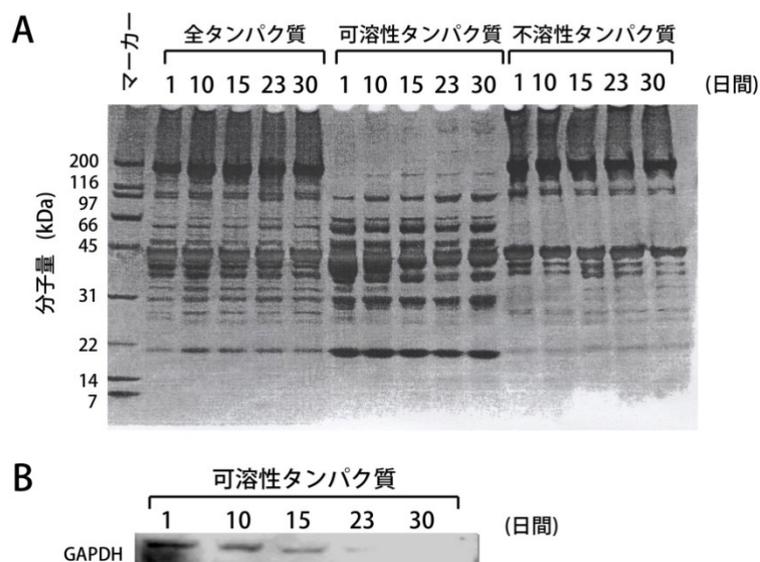


図1. 牛肉熟成中の全タンパク質、可溶性タンパク質および不溶性タンパク質のSDS-PAGE(A)および牛肉可溶性タンパク質の抗GAPDH抗体によるウェスタンブロットティング(B)

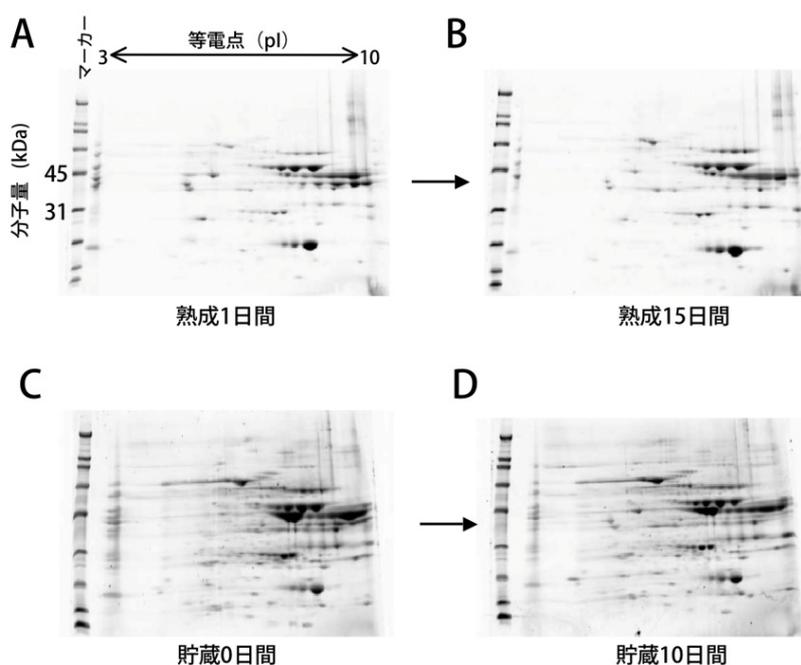


図2. 牛肉熟成(A, B)と牛肉ホモジネート貯蔵(C, D)の2D-PAGEによる比較

食肉は熟成中に pH が酸性に傾くことから、牛肉ホモジネートの貯蔵中におけるタンパク質の変化に及ぼす pH の影響について調べた。図3Aには酸性のクエン酸バッファー(pH 5.6)および中性のトリス塩酸バッファー(pH 7.4)中で貯蔵した SDS-PAGE の結果を、図3Bには抗GAPDH抗体を用いたウェスタンブロットティングの結果をそれぞれ示す。これらの結果から、特に、中性条件において、

GAPDH がより減少することが明らかとなった。食肉が酸性化する前に、中性に至適 pH をもつプロテアーゼが熟成中に作用していることが示唆された。

次に、牛肉熟成モデルとしてこの牛肉ホモジネートの貯蔵試験を使用し、熟成におけるプロテアーゼとミネラルの影響について調べた。まず、牛肉にバッファーとともにプロテアーゼインヒビター 8 種をそれぞれ添加し、ホモジナ

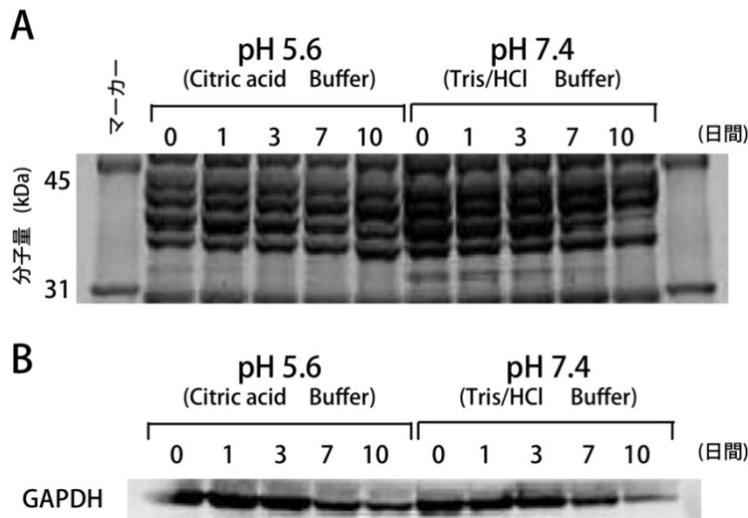


図3. 牛肉ホモジネート貯蔵中におけるタンパク質の変化に及ぼす pH の影響。A: SDS-PAGE、B: 抗 GAPDH 抗体によるウェスタンブロットニング。

イズ後、貯蔵を行った。10 日後、可溶性タンパク質を抽出し、SDS-PAGE およびウェスタンブロットニングを行った結果を図 4 A および図 4 B に示す。プロテアーゼインヒビター無添加区では、0 日間貯蔵と比較して 10 日間貯蔵により GAPDH のバンドがかなり薄くなり、熟成が進んでいることがわかる。プロテアーゼインヒビター添加区では、無添加区(10 日間貯蔵)よりもバンドが濃いほど、その阻害しているタンパク質が熟成に関与していることを意味する。結果より、より高濃度のインヒビターの添加で、GAPDH の分解が抑制されているものは、Pepstatin A、Calpain inhibitor II、TLCK であった。これらはカテプシン D、カルパイン II、セリンプロテアーゼの阻害剤であることから、これらのプロテアーゼが熟成によるタンパク質の分解に関与している可能性が示唆された。しかし、濃度依存性に GAPDH を分解抑制しているものは TLCK のみであり、今後より詳細な検討が必要である。

図5 A および 5 B は、プロテアーゼインヒビターの実験と同様に、牛肉ホモジネートに各種ミネラルをそれぞれ添加した時の GAPDH の分解の程度を SDS-PAGE およびウェ

スタンブロットニングにより調べたものである。その結果、NaCl、MgCl<sub>2</sub> および CaCl<sub>2</sub> を添加した区では GAPDH の分解が促進され、KCl を加えた区では逆に分解が抑制されることが明らかとなった。Ca<sup>2+</sup> は、カルパインを始めとするプロテアーゼを活性化することが知られているが、その他のミネラルがプロテアーゼへ及ぼす影響等については十分に明らかにされていないのが現状である。今回食肉に添加したミネラルが、食肉で生化学的な影響により熟成に関わるのか、それともミネラル添加による保水性の変化などの物理的な要因によるものなのか等を検討する必要があると考えられる。

今後、本研究室で明らかにした GAPDH を熟成マーカーとして用いることで、熟成期間の最適化などを計ることができると考えられる。また、熟成方法の改良や食肉製品の品質向上の評価にもこのマーカーを利用することができると思われる。特に、熟成前に適切なミネラルを適切な量用いることで熟成をコントロールし、より高品質、高機能の製品の開発にも繋がることが期待される。

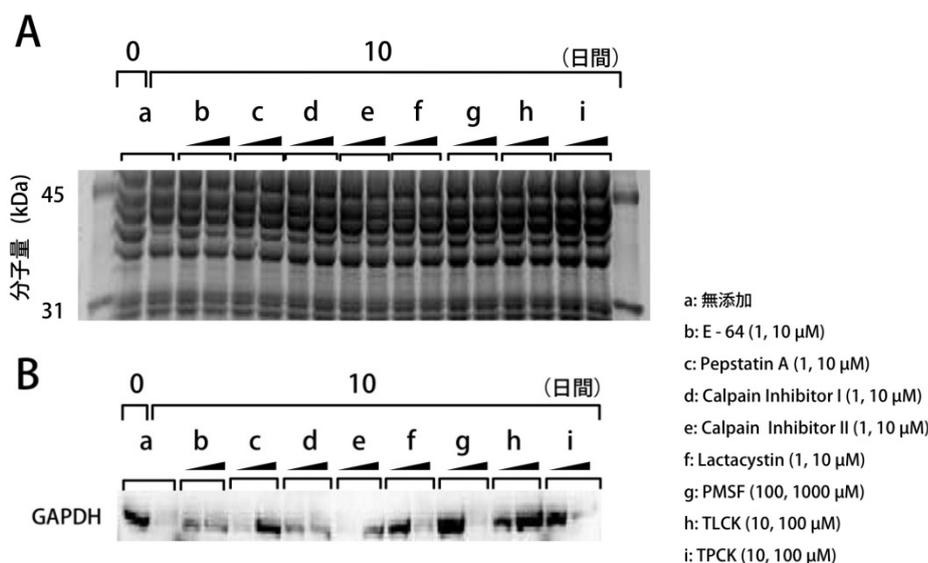


図4. 牛肉ホモジネート貯蔵中におけるタンパク質の変化に及ぼすプロテアーゼインヒビター添加の影響。A: SDS-PAGE、B: 抗 GAPDH 抗体によるウェスタンブロットティング。

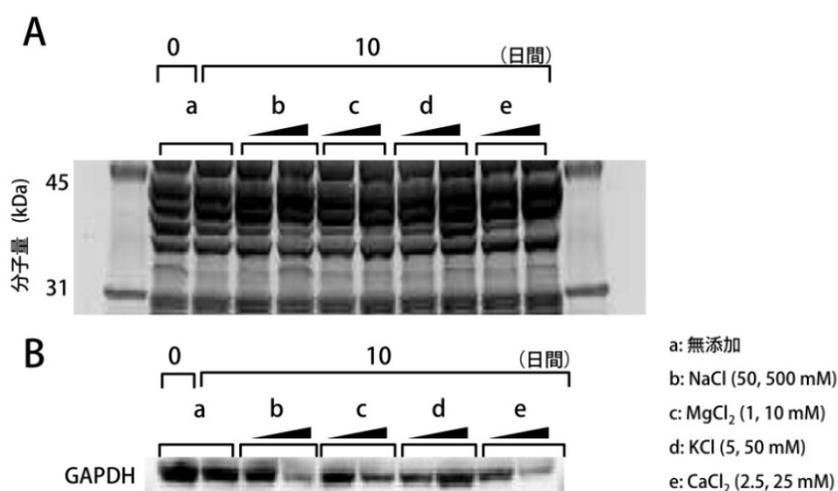


図5. 牛肉ホモジネート貯蔵中におけるタンパク質の変化に及ぼすミネラル添加の影響。A: SDS-PAGE、B: 抗 GAPDH 抗体によるウェスタンブロットティング。

### 参考文献

1. 沖谷明紘編, 食肉の科学, 朝倉書店 (1995).
2. Nishimura T, Rhue MR, Okitani A, Kato H. Components contributing to the improvement of meat taste during storage. *Agric Biol Technol* 52: 2323-2330 (1988).
3. Spanier AM, Flores M, Toldrá F, Aristoy MC, Bett KL, Bystricky P, Bland JM. Meat flavor: contribution of proteins and peptides to the flavor of beef. *Adv Exp Med Biol* 542: 33-49 (2004).
4. Smith GC, Culp GR, Carpenter ZL. Postmortem aging of beef carcasses. *J Food Sci* 43: 823-826 (1978).
5. Uytterhaegen L, Claeys E, Demeyer D. Effects of exogenous protease effectors on beef tenderness development and myofibrillar degradation and solubility. *J Anim Sci* 72: 1209-1223 (1994).
6. Ouali A. Proteolytic and physicochemical mechanisms involved in meat texture development. *Biochimie* 74: 251-265 (1992).

7. Kemp CM, Sensky PL, Bardsley RG, Buttery PJ, Parr T. Tenderness - an enzymatic view. *Meat Sci* 84: 248-256 (2010).
8. Sentandreu MA, Coulis G, Ouali A. Role of muscle endopeptidases and their inhibitors in meat tenderness. *Trends Food Sci Technol* 13: 400-421 (2002).
9. Houbak MB, Ertbjerg P, Therkildsen M. *In vitro* study to evaluate the degradation of bovine muscle proteins *post-mortem* by proteasome and  $\mu$ -calpain. *Meat Sci* 79: 77-85 (2008).
10. Koohmaraie M. The role of Ca(2+)-dependent proteases (calpains) in post mortem proteolysis and meat tenderness. *Biochimie* 74: 239-245 (1992).
11. Sekikawa M, Yamamoto M, Fukusima M, Simada K, Ishikawa T, Mikami M. Effect of proteasome inhibitor on sarcoplasmic protein of bovin skeletal muscle during storage. *Food Chem* 73: 17-21 (2001).
12. Bouley J, Chambon C, Picard B. Mapping of bovine skeletal muscle proteins using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics* 4: 1811-1824 (2004).
13. Survey of conditioning indicators for pork loins: changes in myofibrils, proteins and peptides during postmortem conditioning of vacuum-packed pork loins for 30 days. *Meat Sci* 4667-473 (2003).

No. 0913

## Proteomic Analysis of Bovine Skeletal Muscle: Changes in Soluble Proteins with Minerals during Storage

Shin-ichi Ishikawa<sup>1</sup>, Motoko Ohata<sup>2</sup>, Keizo Arihara<sup>2</sup>, Makoto Itoh<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Food Management, School of Food, Agricultural and Environmental Sciences,  
Miyagi University

<sup>2</sup>Department of Animal Science, School of Veterinary Medicine, Kitasato University

### Summary

It is well-known that meat quality is improved during postmortem aging, which results in increase in its tenderness, and in the improvement of its taste and aroma. Although their influence on the texture and taste of the meat is still not clear, it is well documented that fragmentation of myofibrils takes place during aging of meat. Troponin T is well-known as one of the myofibrillar proteins to be easily degraded during postmortem aging of meat. However the profile of soluble protein changes during storage has not been fully understood. The intracellular proteolytic system of muscle cells is considered to play an important role in improving the texture and taste of meat. The proteases such as cathepsins and calpain and minerals such as calcium are responsible for protein degradation in muscle tissue. This study was performed to examine the changes in total, soluble and insoluble proteins of bovine skeletal muscle during meat aging conditioning of vacuum-packed beef. Bovine meat samples were taken from the biceps femoris muscle after slaughter. The meat samples were stored at 4°C for 1, 10, 15, 23, and 30 days. We tested the technique of proteomic analysis using SDS-PAGE, two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE) and Western blotting analysis. The results of 2D-PAGE patterns showed that the spots (MW 38 kDa, Ip 7.8 - 9.5) were gradually decreased in soluble fraction of beef meat for 10 days, and completely decreased after 15 days of storage. The SDS-PAGE profile and Western blotting analysis showed that the band (38 kDa) was identified as glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). Moreover, bovine muscle was buffered, homogenized and stored (10 d) for SDS-PAGE and Western blotting analysis. The degradation of GAPDH was observed not only in meat during aging but also in the homogenate of meat during storage. These results suggested the system using the homogenate of meat could be useful for the model of meat aging. To investigate the mechanism of meat aging, we next examined that effect of protease inhibitors and minerals on soluble proteins of beef during storage. The results showed that Pepstatin A, Calpain inhibitor II and TLCK inhibited the degradation of GAPDH at high concentrations, suggesting that cathepsin D, calpain II and serine protease might be related to the its degradation during storage. Moreover, the SDS-PAGE profile and Western blotting analysis suggested that NaCl, MgCl<sub>2</sub> and CaCl<sub>2</sub> promote the GAPDH degradation, whereas that KCl inhibited the degradation. By analyzing the complete proteome of foods, specific markers can be found to predict the quality of the end-product.