

## 研究ノート

## ニワトリ骨格筋ミオシンの加熱ゲル形成能における 2 価金属の影響

金 辰保・前田 尚之・石下 真人・鮫島 邦彦  
酪農学園大学酪農学部, 江別市 069-8501

## Effect of heat-induced gelation of chicken muscle myosin by divalent metals

Jin-bo KIM, Naoyuki MAEDA, Makoto ISHIOROSHI, Kunihiro SAMEJIMA

Faculty of Dairy Science, Rakuno Gakuen University, Ebetsu-shi 069-8501

キーワード: ミオシン, 加熱ゲル化, 2 価金属, 架橋

Key words: myosin, heat-induced gelation, divalent metals, cross-linking

## 要 約

ニワトリ胸筋と脚筋ミオシンの加熱ゲル形成能に及ぼす 2 価金属の影響を調べ, さらにこれら 2 価金属で起こる分子間相互作用の違いを 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide (EDC) による架橋で検討した。ミオシンのゲル強度はいずれの 2 価金属を添加しても上昇したが, その程度ならびに最大の強度を与える 2 価金属濃度はそれぞれ異なっていた。またゲル強度の上昇は脚筋よりも胸筋ミオシンで大きかった。ミオシンはモノマーの状態 (0.5 M NaCl) では EDC の濃度に比例して架橋され, フィラメントを形成する塩濃度 (0.2 M) では, EDC の添加とともに架橋は急激に進行した。胸筋と脚筋でミオシンの架橋に差は認められなかった。塩化カルシウムは架橋に影響せず, 塩化鉄と塩化亜鉛では, 添加濃度の上昇とともに架橋形成が進行した。2 価金属によりミオシン分子に構造変化が生じ, ミオシン分子間の相互作用が強められ, その結果ゲル強度が上昇したと考えられる。しかし, 金属の種類による影響の程度は異なっていることが示唆された。

## 緒 言

食肉の加工特性の一つに結着性がある。結着性は, 特にソーセージのようなエマルジョンタイプの食肉製品において品質を左右する重要な因子である。ミオシンの加熱ゲル形成能はこの結着性の発現に主要な役割を果たしており, ミオシンの加熱ゲルに関しては多くの研究が行われている。ミオシンの加熱ゲル強度は

pH や塩濃度によって変化するが, 筋肉の部位 (種類) によって著しく異なることが報告されている (MORITA, 1987; SAMEJIMA, 1989)。これはミオシン異性体のゲル化能の違いによるものと考えられるが, 詳細は明らかではない。

一般にタンパク質のゲル化は, 分子間の凝集反応による三次元網目構造の形成によって起こる。ゲル化において 2 価金属の存在は, 豆腐におけるカルシウムのように直接ゲル化を引き起こしたり, ホエータンパク質 (KUHN, 1991) において報告されているような, ゲル強度を高める作用を有している。食肉タンパク質においても, 筋原線維の加熱ゲル強度 (XIONG, 1991) やソーセージの物性 (ISHIOROSHI, 1994) が 2 価金属の添加により高められることが報告されている。2 価金属がミオシンの加熱ゲル強度をどのようにして高めるかが判明すれば, 食肉製品の物性改善に大いに役立つと考えられるが, その機構は明らかではない。

本研究は食肉製品の物性の改善を目的として, ニワトリの胸筋と脚筋ミオシンの加熱ゲル形成能が 2 価金属の添加によってどのような影響を受けるのか, さらにゼロ長架橋剤 (EDC) を使用して加熱に伴う分子間凝集反応を検知し, これに対する 2 価金属の影響について調査した。

## 実験材料および方法

## 実験材料

ニワトリは酪農学園大学の実験鶏舎で飼育された白色レグホン種を使用し, 胸筋および脚筋からそれぞれミオシンを調製した。EDC は NACALAI 社より, PIPES と DTT は SIGMA 社より購入した。その他の試薬は特級品または電気泳動用を使用した。

ミオシンとミオシンサブフラグメントの調製

ミオシンとミオシンサブフラグメントは鶏胸筋および脚筋から PERRY *et al.* (1955) および WEEDS and POPE (1977) の方法によりそれぞれ調製した。

ゲル強度の測定

ミオシンの加熱ゲル強度は、YASUI *et al.* (1979) の帯型粘度計を用いて測定した。測定条件はタンパク質濃度 5.0 mg/ml, 0.2 M または 0.5 M NaCl, 20 mM PIPES (pH 6.0) および所定の濃度の 2 価金属 (CaCl<sub>2</sub>, FeCl<sub>2</sub> および ZnCl<sub>2</sub>) とし、65°C で 20 分間加熱後、ゲル強度を測定した。

ミオシンの架橋

ミオシンの架橋の条件は、タンパク質の濃度を 0.5 mg/ml とした以外は、吉田ら (1999) の方法に従って行い、SDS-PAGE ゲルから BIO-RAD GS-700 デンシトメーターによりタンパク質バンドを測定し、架橋されたミオシンの相対量を算出した。

結果および考察

ニワトリ胸筋および脚筋ミオシンの加熱ゲル強度に及ぼす 2 価金属の影響を図 1 から 3 に示した。ミオシンのゲル強度はいずれの 2 価金属を添加しても上昇したが、効果の程度ならびに最大強度における 2 価金属濃度はそれぞれ異なっていた。ゲル強度の上昇は FeCl<sub>2</sub> 添加で最も大きく、ZnCl<sub>2</sub> は非常に低い濃度で効果を示した。また、一般にゲル強度の上昇は脚筋よりも胸筋ミオシンで大きかった。MORTA *et al.*

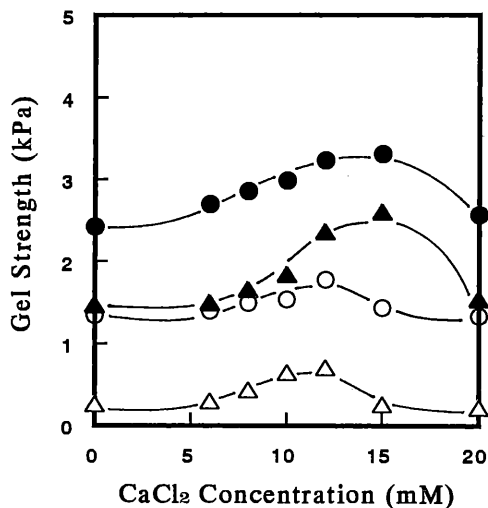


図 1 ニワトリ骨格筋ミオシンの加熱ゲル強度に及ぼす CaCl<sub>2</sub> の影響

所定の濃度の CaCl<sub>2</sub> を含むミオシン溶液 (5.0 mg/ml, 0.5 または 0.2 M KCl, pH 6.0) を 65°C 20 分間加熱後、ゲル強度を測定した。

(○) ; 胸筋 (0.5 M KCl), (●) ; 胸筋 (0.2 M KCl), (△) ; 脚筋 (0.5 M KCl), (▲) ; 脚筋 (0.2 M KCl)

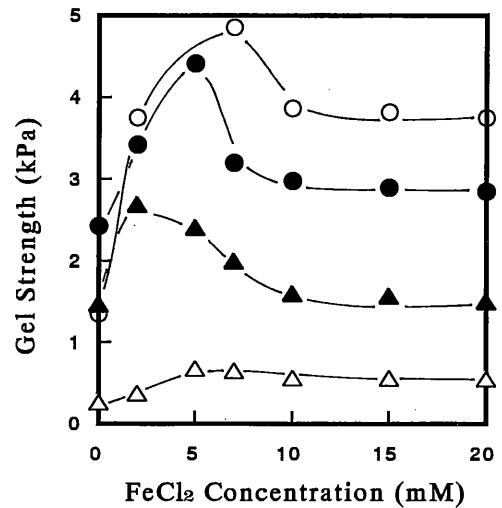


図 2 ニワトリ骨格筋ミオシンの加熱ゲル強度に及ぼす FeCl<sub>2</sub> の影響

所定の濃度の FeCl<sub>2</sub> を含むミオシン溶液 (5.0 mg/ml, 0.5 または 0.2 M KCl, pH 6.0) を 65°C 20 分間加熱後、ゲル強度を測定した。

(○) ; 胸筋 (0.5 M KCl), (●) ; 胸筋 (0.2 M KCl), (△) ; 脚筋 (0.5 M KCl), (▲) ; 脚筋 (0.2 M KCl)

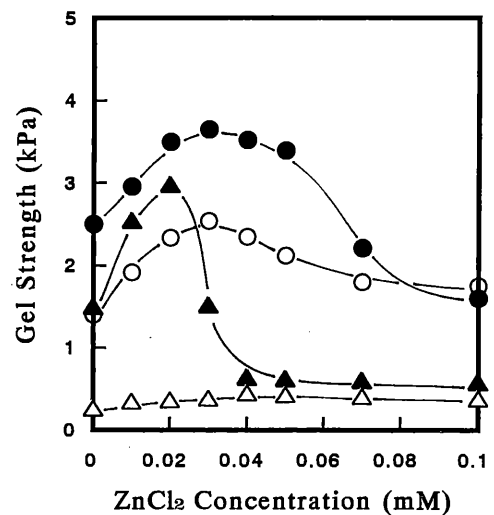


図 3 ニワトリ骨格筋ミオシンの加熱ゲル強度に及ぼす ZnCl<sub>2</sub> の影響

所定の濃度の ZnCl<sub>2</sub> を含むミオシン溶液 (5.0 mg/ml, 0.5 または 0.2 M KCl, pH 6.0) を 65°C 20 分間加熱後、ゲル強度を測定した。

(○) ; 胸筋 (0.5 M KCl), (●) ; 胸筋 (0.2 M KCl), (△) ; 脚筋 (0.5 M KCl), (▲) ; 脚筋 (0.2 M KCl)

(1989) の報告によれば、ニワトリ胸筋と脚筋ミオシンの加熱ゲル形成の性質はかなり異なっており、胸筋の加熱ゲル強度は脚筋よりも高いが、アクチンのゲル強度を高める効果は脚筋のみで認められる。このような違いはミオシン異性体由来のもと考えられ、ミオシン異性体の生化学的な特性の違いがゲル形成能にも反映されているのであろう。

タンパク質の加熱ゲル強度が塩化カルシウムの添加

によって高められることはホエータンパク質で報告されている (KUHN and FOGEDING, 1991). これに関して JEYARAJAH and ALLEN (1994) は, ホエータンパク質の成分である  $\beta$ -ラクトグロブリンがカルシウムと結合し, その結果として疎水性領域に構造変化が生じて, 蛍光スペクトルが変化することを報告している. ISHIOBOROSHI and SAMEJIMA (1994) もカルシウムによる同様の变化をウサギの骨格筋ミオシンで観察したと述べている. 筋肉タンパク質の加熱ゲル化に関して, XIONG and BREKKE (1991) はニワトリ筋原線維の加熱ゲル強度が塩化カルシウムおよび塩化マグネシウムの添加で上昇すると報告している. 彼らはこの原因としてタンパク質-タンパク質相互作用とタンパク質の抽出性の変化を挙げている. 本実験では精製したミオシンを使用しているので, タンパク質抽出性の変化が加熱ゲル強度の上昇と関係しているとは考えられない. カルシウムがミオシンに結合するという証拠は今のところないが, 2価金属でミオシン分子の疎水性領域に構造変化が生じ, ミオシン分子間の相互作用が生じて, その結果ゲル強度が上昇したと考えるのが妥当であろう.

胸筋と脚筋ミオシンの加熱ゲル形成能の違いとそれに及ぼす2価金属の影響について, EDCを使った分子間の架橋形成量を調べた. 図4は加熱前のミオシンを種々の濃度のEDCで処理し, SDS-PAGEで分析した

結果である. EDCはタンパク質分子間の接触した部位にあるアミノ基とカルボキシル基との間にアミド結合を形成して, タンパク質を架橋する. アミノ基とカルボキシル基は静電的に相互作用していると考えられ, これらを直接共有結合で結び, それ自身は架橋の中に残らないため, EDCの分子量はSDS-PAGEパターンに影響を与えない (MORNET, 1981; 山田, 1991). 図4から明らかなようにEDCの濃度が上昇するとともに, ミオシン重鎖のバンドが薄くなっている. これはミオシンが架橋によって凝集し, ゲルの上段に認められたり, ゲルに入らなくなったことを示す. この電気泳動図から, デンシトメーターによりミオシン重鎖の量を測定し, 架橋されたミオシンの相対値を算出して, それぞれのEDC濃度に対してプロットした (図5). 架橋のパターンはNaCl濃度の違いで大きく異なっていた. すなわち, ミオシン分子がモノマーの状態 (0.5 M NaCl) ではEDCの濃度に比例してミオシンは架橋され, フィラメントを形成する塩濃度 (0.2 M) では, EDCの添加とともに架橋は急激に進行した. ミオシン分子の状態 (モノマーとフィラメント) に静電的相互作用が大きく関与していることがわかる. ミオシンのサブフラグメント (S-1 と Rod) で同様の実験を0.5 M NaClで行ったところ, S-1は全く架橋されず, Rodのみが架橋された. また, S-1とRodを混合するとRodのバンドだけが減少し, S-1は変化しなかった (図6).

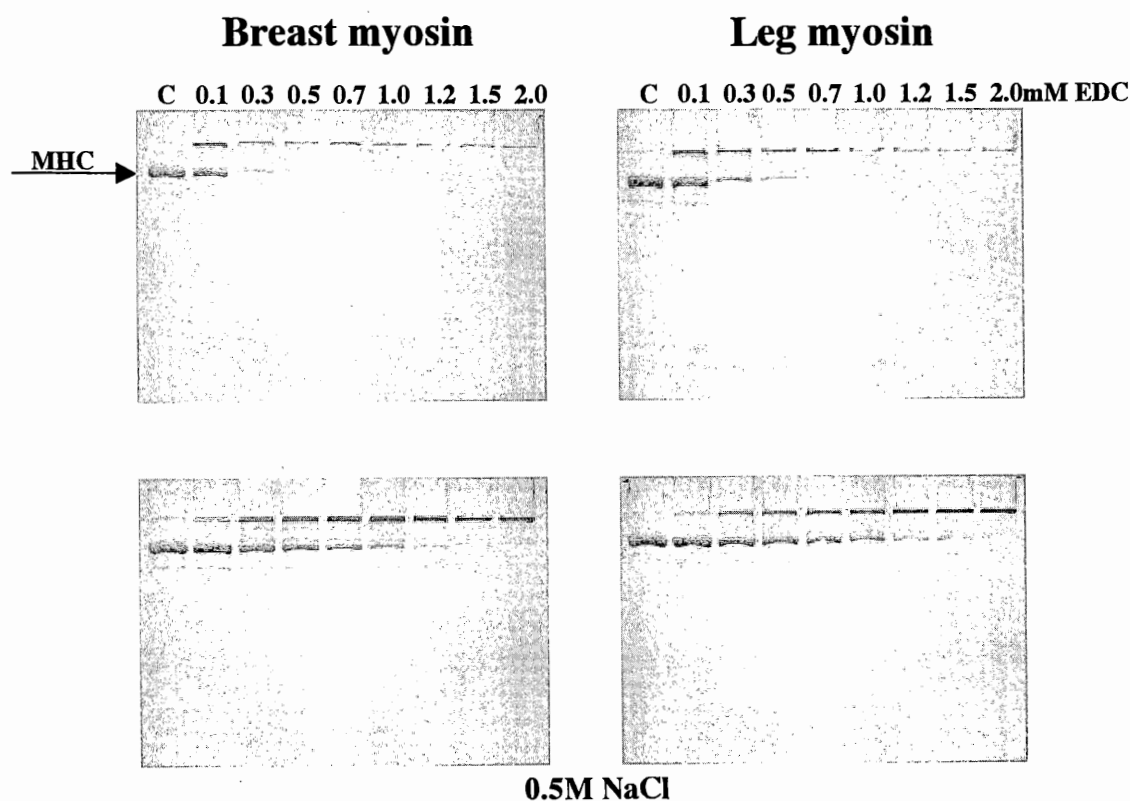


図4 EDCにより架橋したニワトリ骨格筋ミオシンのSDS-PAGE図  
ゲルの上の数字はEDCの濃度を示す.

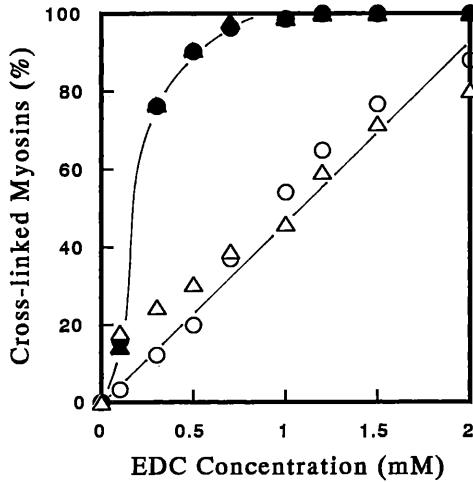


図5 ニワトリ骨格筋ミオシンの架橋に及ぼすEDC濃度の影響

図4のSDS-PAGE図よりミオシン重鎖バンドの量を測定し、架橋されたミオシンの量を算出した。

(○)；胸筋(0.5 M KCl)，(●)；胸筋(0.2 M KCl)，(△)；脚筋(0.5 M KCl)，(▲)；脚筋(0.2 M KCl)

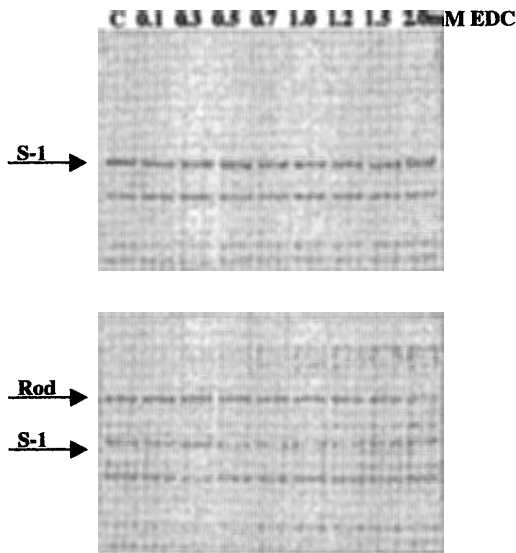


図6 EDCにより架橋した胸筋ミオシンサブフラグメントのSDS-PAGE図

S-1 (上図) およびS-1とRodを1:1 (重量比) で混合し(上図)、架橋は0.5 M NaClで行った。ゲル上の数字はEDCの濃度を示す。

0.2 M NaClでもS-1は架橋されなかった。これらの結果は、ミオシンの架橋は尾部間でのみ起こっており、頭部間はもちろん頭部と尾部間の間にも架橋は起こらないことを示す。しかも、胸筋と脚筋ではこれらのミオシンの架橋形成能に差は認められなかった。したがって、胸筋と脚筋ミオシンの加熱ゲル形成能の違いは静電的相互作用が関係していないと考えられる。

次いで、0.3 mM EDC存在下、2価金属を添加してミオシン(0.5 M NaCl)の架橋形成に及ぼす金属の違

いによる影響を調べた。図には示さなかったが、塩化カルシウムは架橋に影響せず、カルシウム濃度が上昇してもミオシン重鎖のバンドは全く減少しなかった。塩化鉄と亜鉛では、添加濃度の上昇とともに架橋は進行した(図7)。したがって、これらの2価金属はミオシンの静電的相互作用に影響していることが予想され、ゲル強度を高める効果がカルシウムとは異なる機構で生じていると考えられる。また鉄と亜鉛でもそれぞれの濃度と架橋の程度にはかなりの違いがある。この原因を明らかにする手懸りは今のところないが、一つの可能性としてこれら金属のイオン半径の違いが考えられる。本実験で使用した金属の中でFeのイオン半径は最も短く(0.5~0.6Å)、次いでZn(0.7~0.8Å)、Ca(1.3Å)の順である。2価金属は先に述べたタンパク質の構造変化とともに、イオン半径の違いがミオシンの加熱ゲル強度に対する効果やEDCによる架橋に影響しているかもしれない。このようにカルシウムと他の2価金属あるいは3者間で、ミオシン分子の構造に対する影響は異なり、それが架橋やゲル強度の上昇効果に関係していることが示唆された。

ミオシンのゲル化には疎水性相互作用の関与が示唆されていたが、EDCの利用により静電的相互作用を検出できることが判明した。今後は、加熱によりこの相互作用がどのように変化するか、胸筋および脚筋ミオシンで違いがあるのか、さらにこれに2価金属がどのように影響するのかについて調べ、筋肉部位によるミオシンの加熱ゲル形成能の違いや2価金属の効果の原因を追求したい。

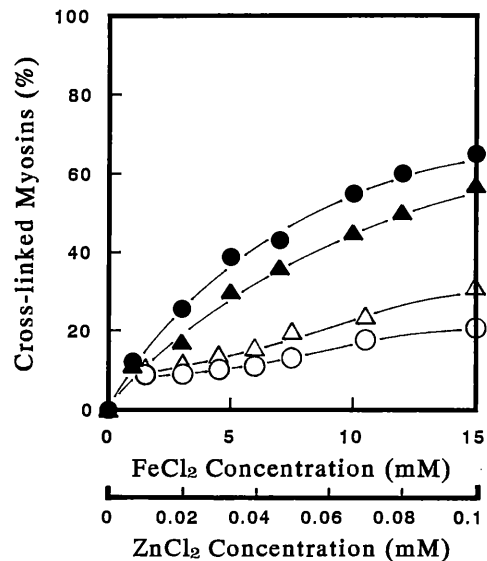


図7 ミオシンの架橋に及ぼす2価金属の影響

ミオシン(0.5 M KCl)は0.3 mM EDCで架橋した。

(○)；胸筋(ZnCl<sub>2</sub>)，(●)；胸筋(FeCl<sub>2</sub>)，(△)；脚筋(ZnCl<sub>2</sub>)，(▲)；脚筋(FeCl<sub>2</sub>)

## 文 献

- ISHIOROSHI, M. and K. SAMEJIMA (1994) Reduction of sodium salt in sausages by divalent metal salts and egg shell powder. *Anim. Sci. Technol.*, **65**: 716-719.
- JEYARAJAH, S. and J. C. ALLEN (1994) Calcium binding and salt-induced structural changes of native and preheated  $\beta$ -lactoglobulin. *J. Agric. Chem.*, **42**: 80-85.
- KUHN, P. R. and E. A. FOEGEDING (1991) Mineral salt effects on whey protein gelation. *J. Agric. Food Chem.*, **39**: 1013-1016.
- MORITA, J., I-S. CHOE, K. YAMAMOTO, K. SAMEJIMA and T. YASUI (1987) Heat-induced gelation of myosin leg and breast muscles of chicken. *Agric. Biol. Chem.*, **51**: 2895-2900.
- MORNET, D., R. BERTRAND, P. PANTEL, E. AUDEMAED and P. KASSAB (1981) Structure of the actin-myosin interface. *Nature*, **292**: 301-306.
- PERRY, S. V. (1955) In "Methods in Enzymology," ed. Colowick, S. P. and Kaplan, N. O. Vol. 3, p. 582. Academic Press, New York.
- SAMEJIMA, K., K. KUWAYAMA, K. YAMAMOTO, A. ASGHAR and T. YASUI (1989) Influence of reconstituted dark and light chicken muscle myosin filaments on the morphology and strength of heat-induced gels. *J. Food Sci.*, **54**: 1158-1162.
- WEEDS, A. G and POPE, B (1977) Studies on the chymotryptic digestion of myosin. Effect of divalent cations on proteolytic susceptibility. *J. Mol Bio.*, **111**: 129-157.
- YASUI, T. M., M. ISHIOROSHI, H. NAKANO and K. SAMEJIMA (1979) Changes in shear modulus, ultrastructure and spin-spin relaxation times of water associated with heat-induced gelation of myosin. *J. Food Sci.*, **44**: 1201-1211.
- XIONG, Y. L and C. J. BREKKE (1991) Gelation properties of chicken myofibrils treated with calcium and magnesium chlorides. *J. Muscle Foods*, **2**: 21-36.
- 山田秀徳, 井元泰治 (1991) 新生化学実験講座 1. タンパク質Ⅳ. 第1版, 215-218. 東京化学同人, 東京.
- 吉田育子, 石下真人, 鮫島邦彦 (1999) ニワトリ砂嚢筋の加熱ゲル形成能. *日畜会報*, **70**: J 198-J 204.

