

食肉に対する精製アクチニン処理の影響

西山 一朗 篠 政行

Effects of Purified Actinidin on Meat

Ichiro NISHIYAMA, Masayuki SHINO

1. 緒言

キウイフルーツの原種は、南中国中央地域を原産地とするサルナシ（チャイニーズ・グースベリー）である。これが1930年頃よりニュージーランドで品種改良が重ねられ、1953年になって初めて「キウイフルーツ」という名称で販売が開始されるようになった。わが国では十数年前よりミカンの転換作物として導入されたが、以後生産量が急増し、最近では生産過剰の傾向にある。そのため、生食以外の利用法として、ドライフルーツ、ワイン、ジャムなどへの加工が試みられている。

古くからキウイフルーツの果実にはタンパク質分解酵素が豊富に含まれていることが知られており、この酵素は1959年にArcus¹⁾によってアクチニンと名付けられた。アクチニンは、パパイン、プロメライン、フィシンや、ショウガプロテアーゼであるGP-I、GP-IIなどとアミノ酸配列に50%程度の相同性をもつシステインプロテアーゼであり、パパインスーパーファミリーとして位置付けられている²⁾。しかし、パパインが食品工業分野で広範に利用されているのに対し、キウイフルーツ果汁やアクチニン利用の試みに関しては、きわめて限られた報告しかないのが現状である³⁻⁵⁾。

本研究では、食肉軟化剤としてのアクチニンの有用性を検討するため、キウイフルーツ果汁よりアクチニンを精製し、その酵素学的性質を調べるとともに、食肉に対する効果を調査した。

2. 実験方法

実験材料

キウイフルーツは市販のニュージーランド産Hayward種の適熟果実を用いた。豚もも肉は非凍結品

を精肉店より購入し、直ちに実験に供した。

アクチニンの精製

キウイフルーツ果汁からのアクチニンの精製は、Blocklehurst *et al.*⁶⁾の方法に従って行った。すなわち硫酸沈殿法により得られたアクチニン画分から、Thiopropyl-Sepharose 6Bを用いたコバレントクロマトグラフィーにより、アクチニンを精製した。精製アクチニンは、0.1mmol/lジチオスレイトールを含む5 mmol/lトリス-HCl緩衝液 (pH7.5) に15 mg/mlの濃度で溶解し、使用時まで-85℃で凍結保存した。得られた酵素液のタンパク質濃度はLowry *et al.*⁷⁾の方法にて、また純度は以下に記すドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) 法により確認した。キウイフルーツ2個 (150 g) より、約60mgのアクチニンを、96%の純度で得ることができた。

プロテアーゼ活性の測定

アクチニンのプロテアーゼ活性は、Filippova *et al.*⁸⁾の方法を改変して測定した。すなわち合成基質であるN α -Benzoyl-DL-arginine *p*-nitroanilide (BANA, Sigma) およびL-Pyroglutamyl-L-phenylalanyl-L-leucine *p*-nitroanilide (PFLNA, Sigma) を用い、アルギニンあるいはロイシンのカルボキシル側の加水分解による*p*-ニトロアニリンの遊離を、波長405nmにおける吸光度として測定した。試験管に25mmol/l L-システインおよび25mmol/lエチレンジアミン四酢酸を含むクエン酸-NaOH緩衝液 (50 mmol/l, pH2.0~6.0) 0.8mlとアクチニン溶液 (1~3 mg/ml) 0.1mlを取り、25℃の恒温槽内に5分間保った後、これに0.1mlの5 mmol/l BANAあるいは

PFLNA (いずれもジメチルスルホキシド溶液) を加え混和した。一定時間25℃に保持した後、50%トリクロル酢酸溶液を0.1ml加え反応を停止し、遠心分離(5,000×g、3分間)により除タンパクした後、光学用マイクロセル(1 ml)中にて405nmの吸光度を測定した。ブランクとしては、アクチニジン溶液をクエン酸-NaOH緩衝液に置換して、同様の操作を行った。

食肉のアクチニジン処理

豚もも肉を湿重量100mg (5 mm×10mm×2 mm程度)の小片とし、直径15mmのペトリ皿中に入れ、3 mg/mlアクチニジンを含む50mmol/lクエン酸-NaOH緩衝液(pH3.3あるいは6.0) 0.5mlを加えた。室温(25℃)下に2時間静置した後、モノヨード酢酸(終濃度5 mmol/l)を加え、3分間処理することにより、酵素反応を不可逆的に停止した。もも肉小片に付着した果汁をキムワイプで除き、電気泳動用試料緩衝液(125mmol/lトリス-HCl緩衝液、4 % SDS、10% 2-メルカプトエタノール、20%グリセロール、pH6.8) 2 mlを加え、直ちにソニケーター(タイテック、VP-5S)により30秒間の超音波破碎を行った。このホモジネートに対し、100℃ 3分間の湯煎を行った後、同試料緩衝液にて2倍に希釈し、電気泳動用試料として供した。無処理肉としては、同様の豚もも肉小片を25℃におき、また対照肉としては、アクチニジンを含まない50mmol/lクエン酸-NaOH緩衝液(pH3.3あるいは6.0)による同様の処理を行った後、上記の方法にて電気泳動用試料を作製した。

SDS-PAGE

食肉試料のタンパク質成分の分析は、ミニスラブ電気泳動装置を用い、Laemmli⁹⁾の方法に従って行った。上記の方法により作成した電気泳動用試料5 μlについて7.5%ポリアクリルアミドゲルを用い、定電流(20mA)で80分間泳動を行った。泳動後のゲルは、常法によりクマジーブリリアントブルーR-250染色ならびに脱色を施した。得られた泳動像を、CCDカメラ(アトーププリントグラフAE-6910型)で記録し、レーンアナライザーVer. 2.0(アトープ)によりミオシン重鎖およびアクチンの定量を行った。

アクチニジンの純度検定を行う場合には、12.5%のゲルを用い、上記と同様の方法により解析した。

走査電子顕微鏡 (SEM)

上記と同様の方法にてアクチニジン処理した食肉を、4 %ホルムアルデヒドを含む0.1mol/lリン酸緩衝液(pH7.4)に浸漬し、4℃で一晩固定した。試料をリン酸緩衝塩溶液で洗浄した後、S-3000N型SEM(日立)を用い、加速電圧10kV、試料室圧力(真空度)70Paにて観察を行った。このS-3000N型SEMは、可変圧力SEM(VP-SEM、Variable Pressure SEM)あるいは低真空SEM(LV-SEM、Low Vacuum SEM)と呼ばれるタイプであり、通常のSEMでは困難な低真空状態(1~270Pa)での観察が可能であるとともに、クールステージの装着により-20℃まで試料を冷却することができる。そのため食品などの含水試料を、金属コーティングなどの前処理することなく観察することが可能である。さらにまた、装置の操作やデータ処理はパソコンで行うことができるPC-SEM(Personal Computer-SEM)であり、鮮明な画像表示やデジタルズームなどのデジタル画像処理¹⁰⁾を活用できる仕様となっている。

3. 実験結果と考察

アクチニジンの酵素学的性質

パパインやブロメラインなどの活性測定には、アルギニンやリシンのカルボキシル基に発色試薬や蛍光試薬をエステル結合した人工基質が多用される。一方Filippova *et al.*⁸⁾は、これらの酵素活性測定のためには、BANAよりもPFLNAの方が、加水分解速度が数十倍も大きいことを報告している。アクチニジンに関しては、両基質の比較検討がなされていないため、まずそれぞれの人工基質を用いて、アクチニジン活性の測定を行った。

図1に示すように、いずれの基質を用いても、少なくとも30分間までは時間に比例して加水分解が進行したが、その速度はPFLNAを用いた方が、BANAよりも30倍も大きいことがわかった。そのため、以後の実験ではPFLNAを基質として用いることにした。

アクチニジンの最適pHに関しては、文献によってpH 4あるいはpH 6と報告されている。アクチニジン活性のpH依存性について、PFLNAを基質として調べた結果を図2に示す。アクチニジン活性はpH 2および3では全く認められず、以後pH 3~6の範囲ではpHが高くなるにつれて活性が高くなり、pH 6

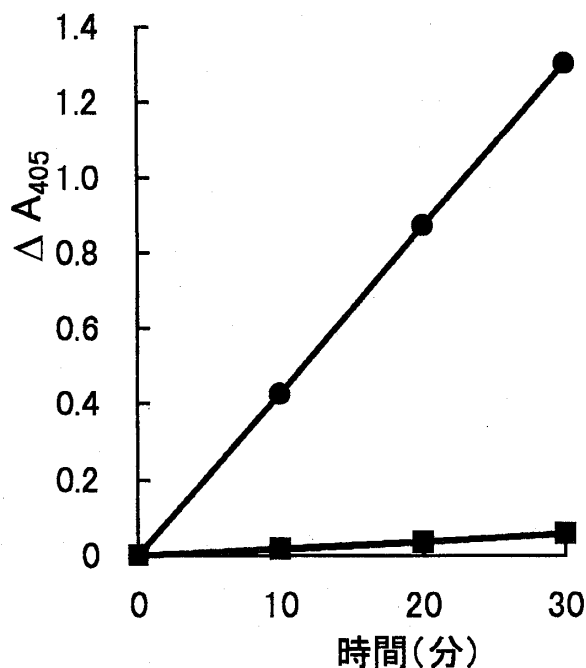


図1 アクチニジン活性の基質による相違

アクチニジンの活性を、酵素濃度0.1mg/ml、pH6.0、25℃の条件下で10分間ごとに30分間まで測定した。人工基質としては、N α -Benzoyl-DL-arginine *p*-nitroanilide (■)あるいはL-Pyroglutamyl-L-phenylalanyl-L-leucine *p*-nitroanilide (●)を0.5mg/mlの濃度で用い、波長405nmにおける吸光度変化により、酵素活性を表した。

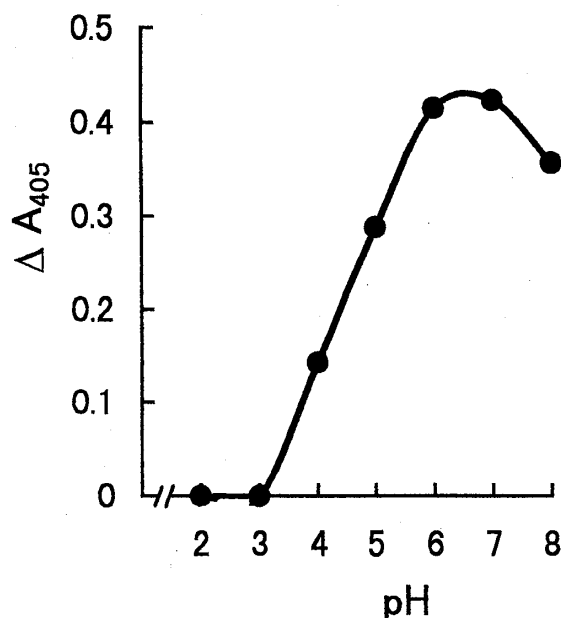


図2 アクチニジン活性のpH依存性

アクチニジン活性のpH依存性を、酵素濃度0.1mg/ml、25℃の条件下で測定した。基質としてはL-Pyroglutamyl-L-phenylalanyl-L-leucine *p*-nitroanilideを用い、10分間に生じる405nmの吸光度変化を酵素活性として表した。

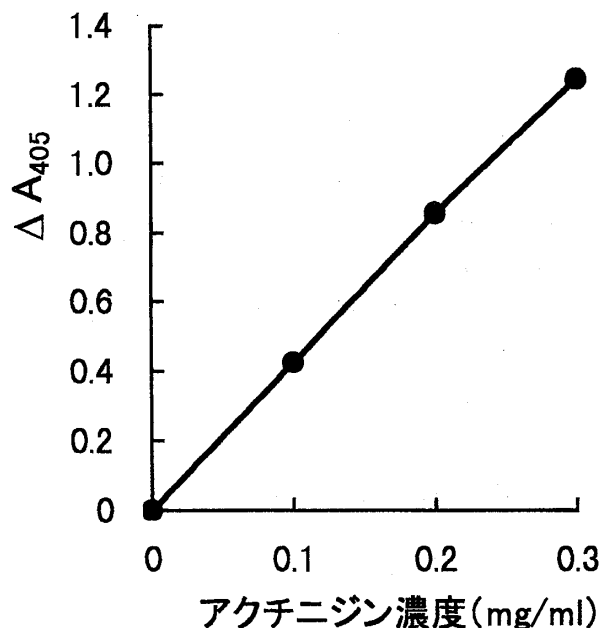


図3 アクチニジン濃度と加水分解速度

アクチニジンの濃度を0.1、0.2および0.3mg/mlとして、25℃ 10分間の加水分解速度を測定した。基質としてはL-Pyroglutamyl-L-phenylalanyl-L-leucine *p*-nitroanilideを用い、405nmにおける吸光度変化を酵素活性として表した。

～7で最大活性を示した。この最適pHは、Benzoyl-L-arginine ethyl esterを用いたMcDowall¹⁾の報告と一致している。一方、ゼラチン¹⁾や筋原線維タンパク質(西山等、発表準備中)を基質として測定したときのアクチニジンの最適pHは4.0付近であることが示されている。この最適pHの相違は、基質の違いによるものと考えられる。

アクチニジン濃度と加水分解速度との関係を図3に示す。調べた範囲(0～0.3mg/ml)では、酵素濃度と加水分解速度とが比例することが確認された。

アクチニジン処理の豚肉への影響

アクチニジン処理が豚肉タンパク質成分に及ぼす影響を、SDS-PAGEにより調べた結果を図4に示す。キウイフルーツ果汁のpHを模したpH3.3で、室温2時間の酵素処理を行った場合には、ミオシン重鎖やアクチンを含むほぼすべてのバンドにおいて、明らかな減弱が認められた(図4、レーン4)。この結果から、食肉タンパク質の非特異的加水分解が起きていることが示された。主要な筋原線維タンパク質であるミオシン重鎖とアクチンについて、デンストメトリーによる定量を行ったところ、いずれも約50%が分解されていることが確かめられた。この分解率

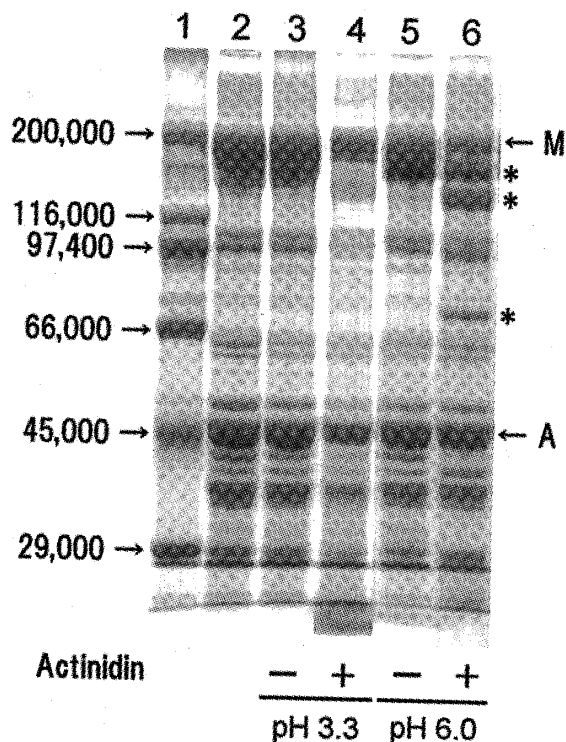


図4 豚肉タンパク質成分に対するアクチニジン処理の影響

豚肉小片をpH3.3あるいはpH6.0の条件下でアクチニジン処理 (3 mg/ml) したときのタンパク質成分の変化につき、SDS-PAGE法により解析した。キウイフルーツ果汁と同程度のpH3.3で処理を行った場合には、ミオシン重鎖 (M) やアクチン (A) をはじめ、ほとんどすべてのタンパク質が加水分解された (レーン4をレーン3と比較)。一方pH6.0の条件では、ミオシン重鎖は顕著に加水分解されたが、アクチンおよびその他のタンパク質は、ほとんど分解されなかった (レーン6をレーン5と比較)。

レーン1は分子量マーカータンパク質を、またレーン2は無処理肉のタンパク質成分を示す。

は、キウイフルーツ果汁を用いた実験の結果¹²⁾と同程度であった。筋タンパク質の分解に伴う分解産物の新たなバンドの出現は認められなかったが、分子量29,000以下の低分子領域に、スミア状の染色が見られた。この結果からpH3.3の条件では、アクチニジン処理により、各種の食肉タンパク質が非特異的に、また多くの部位で非限定的に加水分解され、低分子量のペプチドを生じるものと考えられた。

一方pH6.0で酵素処理を行った場合には、主としてミオシン重鎖が特異的に加水分解され、その結果として分子量約170,000、140,000および74,000の分解産物が生じることが示唆された (図4、レーン6*印)。このとき、もうひとつの主要な筋原線維タンパク質であるアクチンは、ほとんど加水分解されな

った (図4、レーン6)。デンストメトリーの結果より、ミオシン重鎖の分解率は約65%であるのに対し、アクチンの分解率はわずかに5%以下であることが示された。また、ミオシン重鎖やアクチン以外のタンパク質についても、アクチニジン処理による大きな変化は認められなかった。なお、アクチニジンによる処理時間を4時間まで延長した場合にも、やはりアクチンの分解率は5%以下であった (データは示していない)。以上の結果よりpH6.0の条件では、1) アクチニジン処理によって、ミオシン重鎖特異的な加水分解が生じること、および2) その加水分解がミオシン重鎖分子内の限られた部位で限定的に起きるため、ミオシン重鎖は分子量74,000~170,000の大きな断片になること、が示された。

従来、食肉軟化剤として用いられてきたパパインやブロメラインは、食肉タンパク質を強力に加水分解するが、その作用はいずれのpH条件においても非特異的かつ非限定的である (西山、発表準備中)。したがって過度の酵素処理は食肉組織を破壊し、テクスチャや味、栄養を損なう結果となる。しかもこれらの酵素は食肉内への浸透性に乏しい¹³⁾ため、食肉表面から作用させた場合、処理時間が短ければ表面のごくわずかな部分にしか作用が及ばず、一方処理時間を長くすれば、表面から食肉組織が破壊されるという、根本的な問題点を抱えている。

本実験の結果から、pH6.0の条件下で食肉のアクチニジン処理を行うことにより、ミオシン重鎖の限定的な加水分解が可能であることが示された。この結果は、アクチニジンを食肉軟化剤として適切に使用した場合、特殊な反応停止剤を用いることなく、食肉タンパク質を適度に加水分解することができる可能性を示している。この特性は、これまで食肉軟化剤として使用されてきたパパインやブロメラインにはない優れた性質だと考えられる。そこで、pH6.0でアクチニジン処理を施したときの食肉の形態変化について、走査電子顕微鏡による検討を行った。図5C、Dに示すように、アクチニジン処理を行った食肉の筋細胞表面には、横紋がはっきりと観察された。これはおそらくコラーゲンの分解によって、筋内膜が除去されたためと考えられる。この推測は、アクチニジンがコラゲナーゼ活性を示すという鮫島等³⁾の報告によっても支持される。またこの結果より、ミオシン重鎖が限定的加水分解を受けても、筋

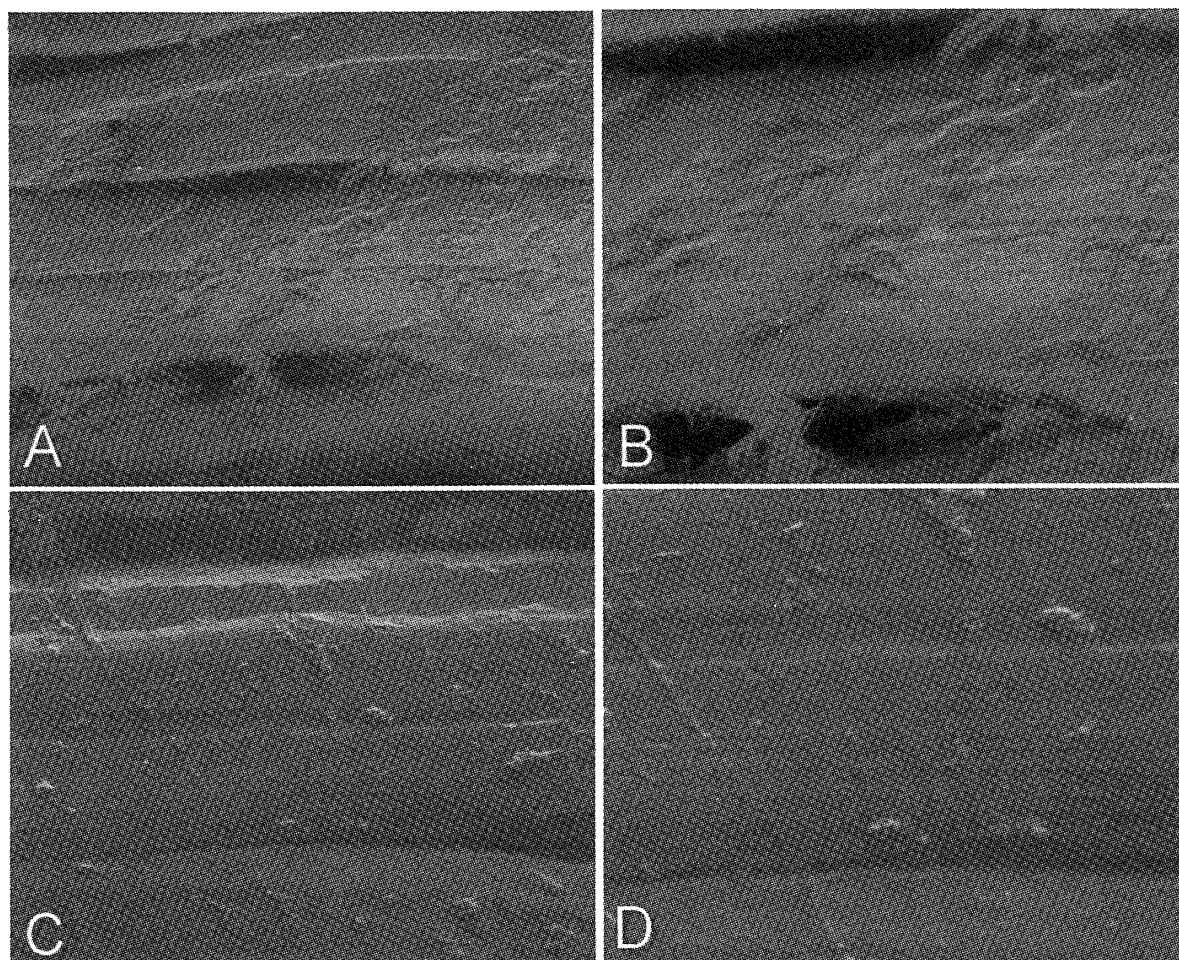


図5 豚肉組織に対するアクチニジン処理の影響

豚肉小片をpH6.0の条件下でアクチニジン（3 mg/ml）処理したときの食肉表面の組織変化を、走査電子顕微鏡により調査した。アクチニジンを含まない緩衝液のみで処理した対照肉では、食肉表面の筋細胞がコラーゲンを主成分とする筋内膜に覆われている様子が観察された(A、B)。一方アクチニジン処理を施した場合には、筋内膜は分解・除去されているが、横紋構造は保持されている様子が観察された。(C、D)。

A、C：×270、B、D：×540

原線維の基本構造は保持されていることが示唆された。一方アクチニジン処理をしていない食肉では、筋細胞表面はコラーゲン線維に覆われており、横紋ははっきりとは観察されなかった(図5 A、B)。

食肉の硬さは、アクチンとミオシンを主とする筋原線維タンパク質に由来する硬さと、コラーゲンを主とする結合組織に起因する硬さによって決定される¹⁴⁾。キウイフルーツに含まれるアクチニジンは、コラーゲンを加水分解するばかりではなく、pHをコントロールすることにより、食肉組織に大きな損傷を与えることなく、ミオシン重鎖を限定的に加水分解することが明らかになった。このことからアクチニジンは、従来にはない特性を備えた食肉軟化剤とし

て有効利用できる可能性が示唆された。種々のpH条件下でアクチニジン処理を行ったときの食肉のテクスチャ変化については、今後の検討課題である。

4. 要約

キウイフルーツ果汁からコバレントクロマトグラフィーにより、アクチニジンを96%の純度で精製した。食肉を精製アクチニジンによって処理したところ、pH3.3では食肉タンパク質が非特異的かつ非選択的に加水分解されたのに対し、pH6.0ではミオシン重鎖の選択的加水分解が生じた。食肉組織を走査電子顕微鏡で観察したところ、pH6.0の条件下でアクチニジン処理を行ったとき、筋原線維の基本構造は保持されたまま、筋内膜が分解除去されることが

示唆された。以上の結果からアクチニジンは、従来使用されてきたパパインやブロメラインなどの食肉軟化酵素にはない、優れた特性をもつものと考えられる。

アクチニジン活性のpH依存性の測定にご協力をいただきました、生活科食物栄養専攻の昆野美智さん、白取知佳さん、ならびに走査電子顕微鏡写真の撮影にあたり、設備をお借りするとともに、懇切なご指導をいただきました工学院大学工学部の於保栄作先生ならびに市瀬紀彦先生に感謝いたします。

引用文献

- 1) Arcus, A.C. : *Biochim. Biophys. Acta*, **33**, 242-244 (1959)
- 2) Choi, K.H. and Laursen, R.A. : *Eur. J. Biochem.*, **267**, 1516-1526 (2000)
- 3) 鮫島邦彦, 崔 一信, 石下真人, 早川忠照: 日食工誌, **38**, 817-821 (1991)
- 4) 曾田 功, 金子美穂, 佐藤隆英, 中川弘毅, 小倉長雄: 日食工誌, **34**, 36-41 (1987)
- 5) 堤 ちはる, 三好恵子, 谷 武子, 仙北谷至乃, 殿塚婦美子, 永弘悦子, 河野聡子, 吉中哲子: 家政誌, **45**, 603-607 (1994)
- 6) Brocklehurst, K. *et al.* : *Biochem. J.*, **197**, 739-746 (1981)
- 7) Lowry, O.H. *et al.* : *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951)
- 8) Filippova, I.Y. *et al.* : *Anal. Biochem.*, **143**, 293-297 (1984)
- 9) Laemmli, U.K. : *Nature*, **227**, 689-685 (1970)
- 10) Oho, E. *Advances in Imaging and Electron Physics* (Ed. by Hawkes, P.W.), Vol.105, pp77-140 (1999) (Academic Press)
- 11) McDowall, M.A. : *Eur. J. Biochem.*, **14**, 214-221 (1970)
- 12) 西山一郎: 家政誌, **51**, 621-626 (2000)
- 13) 西山一郎: 駒沢女子短期大学研究紀要, **33**, 33-39 (2000)
- 14) 沖谷明紘, 松石昌典, 西村敏英: 調理科学, **25**, 314-326 (1992)