

食肉内へのパパインの浸透性に関する免疫組織化学的検討

西山 一朗 大田 忠親*

*東京農業大学 アイソトープセンター

Immunohistochemical Study on Permeation of Papain into Meat Tissue

Ichiro NISHIYAMA, Tadachika OOTA

Abstract

Permeation of papain into the pork tissue was immunohistochemically studied. Pork samples were soaked in 1% papain solution (pH 6.0) at 25°C for 0.5~4 h. The samples were rapidly frozen, sectioned in a cryostat, and stained with anti-papain and anti-type I collagen antisera to detect simultaneously papain permeation and histological changes in the pork tissue. Papain permeated very slowly into the pork with increasing incubation time. Although 4-h treatment with papain caused intense proteolysis and disruptive histological changes in the surface region of the pork tissue, papain was found to permeate only about 0.4 mm from the surface. The present results indicate that papain takes long time to permeate into the pork tissue and the long exposure to papain caused undesirable over-proteolysis in the surface region, suggesting a mushy texture.

1. 緒言

パパインやプロメラインなどの植物起源システインプロテアーゼは、アクチン、ミオシンなどの筋原線維タンパク質やコラーゲン等を加水分解するため、食肉軟化剤として用いられている^{1,2)}。また、キウイフルーツやショウガなどにもパパイン、プロメラインとアミノ酸配列に高い相同性をもつアクチニジン³⁾やGP-I⁴⁾、GP-II⁴⁾などのシステインプロテアーゼが含まれており、これらの搾汁もやはり、食肉軟化効果を示すことが報告されている⁵⁻⁹⁾。ただし、これらの酵素により食肉タンパク質が過度に加水分解されると、食感や食味に悪影響を及ぼすため、適度な軟らかさにするためには、処理時間や温度の厳密な制御を要するものと考えられる。また、食肉内への酵素の浸透性にも問題があるため、酵素液の食肉内注入操作と、タンブリングなどの機械的操作を併用しなければ、有効な食肉の軟化は困難であると、一般には信じられている。

しかし、堤等⁹⁾は豚肉片をキウイフルーツ果汁に浸漬しただけで、テクスチャー測定および官能検査による有為な豚肉軟化効果を生じることを報告している。果汁浸漬処理による同様の食肉軟化効果は、鮫島等⁶⁾および和辻等⁹⁾によっても報告されている。また最近では、これらのプロテアーゼを配合したから揚げ粉や、ステーキ・ソテー用食肉軟化剤が、取り扱いの簡単な家庭用および業務用調理補助剤として市販されている。しかし上記の報告では、プロテアーゼが実際にどの程度食肉内に浸透し、また食肉組織にどのような影響を及ぼすかについては、十分な調査が行われていない。その理由の一つとして、適切な実験方法の欠如があげられる。

本実験では、医学・生物学領域において、特定分子の組織内局在を調査するために汎用される免疫組織化学的手法を応用することにより、食肉組織内へのパパインの浸透性と食肉組織変化の同時観察を試みた。

2. 実験方法

(1) 実験材料

豚肉は市販のもも肉（非凍結品）を使用した。いずれの実験においても、脂を避けて赤身の部分を用いた。

(2) 食肉懸濁液のパパイン処理と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) 分析

豚もも肉100 mgを計り取り、眼科用ハサミで細切した後、1 mlの0.1 mol/lクエン酸緩衝液 (pH 6.0) を加えた。これを氷冷しながら超音波破碎機 (タイテック、VP-5S) による15秒間4回の処理を行い、食肉懸濁液を作製した。この懸濁液を25℃の恒温槽中に5分間保持した後、同様に25℃に保温した0.2%パパイン (Sigma) 水溶液1 mlを加え、混和した。さらに10あるいは20分間保温した後、酵素反応を停止するため、0.5 mol/lモノヨード酢酸 (Wako) 水溶液を5 μ l加え、1分後に2倍濃度の電気泳動用試料緩衝液 (0.1 mol/lトリス-塩酸緩衝液、4%ドデシル硫酸ナトリウム、4%2-メルカプトエタノール、40%グリセロール、0.002%ブROMOFENOLブルー、pH 6.8) 2 mlを加えた。直ちに100℃、3分間の湯煎処理を施し、放冷した後 SDS-PAGE 分析に供した。対照実験としては、パパイン水溶液の代わりに純水を加え、同様の操作を行った。

タンパク質成分の SDS-PAGE 分析は、ミニスラブ電気泳動装置を用い、Laemmli¹⁰⁾の方法に従って行った。上記の方法により作製した電気泳動用試料5 μ lについて7.5%ポリアクリルアミドゲルを用い、定電流 (20 mA) 80分間の泳動を行った。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。

(3) 食肉のパパイン処理

豚もも肉を1 cm×1 cm×1.5 cmの小片とし、1%パパイン (Sigma) を含む50 mmol/lクエン酸緩衝液 (pH 6.0) 3 ml中に浸漬した。室温 (25℃) で0.5、1、2あるいは4時間処理した後、食肉片を取り出し、直ちにOCTコンパウンド (Miles) 中に包埋し、ドライアイス-アセトン中で急速凍結した。対照実験としては上記の食肉片を、酵素を

含まないクエン酸緩衝液3 ml中に浸漬し、同様の処理を施した。

(4) 免疫組織化学

各食肉試料につき、クリオスタットにて5 μ m厚の横断面および縦断面切片を作製した。室温下で30分間以上乾燥した後、4%パラホルムアルデヒドを含む0.1 mol/lリン酸緩衝液 (pH 7.4) により15分間の固定を行った。リン酸緩衝塩溶液 (PBS、pH 7.4) でよく洗浄した後、10 mg/ml牛血清アルブミン (Sigma、Fraction V) を含むPBSによる15分間の処理を行い、非特異的吸着をブロックした。次いで一次抗体としてヤギ抗パパイン抗体 (Polysciences、1:400) を含むPBSにより1時間処理した。非結合抗体をPBSでよく洗い流した後、二次抗体としてローダミン標識ロバ抗ヤギIgG (CHEMICON、1:200) を含むPBSにより、30分間処理した。PBSでよく洗浄した後、0.1%*p*-フェニレンジアミンを含むグリセロール-PBS (1:9)¹¹⁾で封入し、蛍光顕微鏡 (オリンパス、VANOX) による観察を行った。

パパインとI型コラーゲンの二重染色のためには、上記の一次抗体にウサギ抗ブタI型コラーゲン抗体 (LSL、1:1,000) を、また二次抗体にフルオレセイン標識ロバ抗ウサギIgG (ROCKLAND、1:75) を加え、同様の操作を行った。陰性対照実験としては、各々の一次抗体のみを除外した系において同様の染色操作を行い、特異蛍光が認められないことを確認した。

なお、上記の固定および染色操作は、すべて室温にて行った。

3. 実験結果と考察

(1) 食肉懸濁液に対するパパイン処理の影響

豚もも肉懸濁液を0.1%パパインで処理したときのタンパク質成分の変化を、Fig. 1に示す。酵素を含まない対照実験では、見かけの分子量210,000のミオシン重鎖と46,000のアクチンが、主要なバンドとして認められた (Fig. 1、レーン1)。これに対し、室温下に10分間のパパイン処理を施したものは、すでにミオシン重鎖やアクチンなどの主要なバンドが完全に消失し、またその他のバンドについても消失あるいは著しい減少が認められた (Fig. 1、

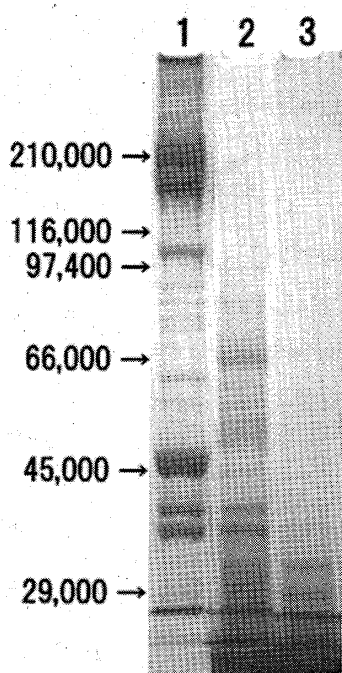


Fig. 1. Effects of papain-treatment on the protein components in pork

Pork homogenate was treated with 0.1% papain in 50 mmol/l citrate buffer (pH 6.0) at 25°C for 10 min (lane 2) or 20 min (lane 3). Aliquots of the samples were subjected to SDS-PAGE on 7.5% polyacrylamide gel. As a no-enzyme control, pork homogenate was incubated in the citrate buffer alone for 20 min (lane 1). Molecular weights of marker proteins are indicated.

レーン2)。この結果は、食肉タンパク質の顕著な加水分解が生じたことを示している。また処理時間20分間では、さらに加水分解が進行し、主として分子量30,000以下の領域にスメア状のバンドを認めるのみとなった (Fig. 1、レーン3)。この結果から、懸濁液の状態では0.1%という低濃度のパパインによるわずか10~20分間の処理により、食肉タンパク質の顕著な加水分解が、非選択的に生じることが確認された。なお今回の実験で用いた pH 6.0 の条件は、パパインの最適 pH に相当すると考えられる¹²⁾。

次に、食肉片に対するパパイン処理の影響について検討を加えたが、一般に組織構築を保持している食肉中のタンパク質の方が、懸濁液の状態よりも、パパインによる加水分解を受けにくいと考えられるため、食肉片に対する作用を調べる以下の実験では、パパイン濃度を10倍とし、また処理時間も延長した。

(2) 食肉組織内におけるパパインの免疫反応性

食肉片を1%パパイン水溶液中に浸漬したときの、食肉組織中におけるパパインの免疫反応性を Fig. 2 に示す。浸漬時間30分間では、パパイン免疫反応性は食肉表面から0.1~0.15 mm 程度の深さまで認められた (Fig. 2c, d)。この値は、横断面切片においても縦断面切片においてもほぼ同様であった。表層部において、最も強い免疫反応が認められ、内部に向かって蛍光強度が減弱することが確かめられた。この結果より、食肉表面から浸透したパパインは、30分間で最大0.15 mm 程度の深さまで達することが示唆された。浸漬時間1時間の試料についても、浸漬30分間の試料とほぼ同様の結果が得られた (Fig. 2e, f) が、一部では0.2 mm 程度の深さまで免疫反応が見られた。浸漬時間2時間では、パパイン免疫反応性は、表面から0.2~0.3 mm の深さまで認められた (Fig. 2g, h)。また、同時に表層部において、筋細胞間隙の増加が観察された (Fig. 2g)。この結果より、食肉をパパイン水溶液に浸漬する方法では、2時間処理してもパパインはわずかに0.3 mm 程度しか浸透しないにもかかわらず、表層部ではすでに顕微鏡レベルでも明らかな組織変化を来することが示された。この組織変化とパパインの浸透とを同時に観察するために、次にパパインとI型コラーゲンの二重染色を試みた。

(3) パパインの浸透性と食肉組織の変化

間接蛍光二重染色法によって、パパインおよびI型コラーゲンの免疫反応性を同時に観察した結果を Fig. 3 に示す。パパイン処理を施していない対照肉においては、筋内膜および筋周膜に沿って強いI型コラーゲン免疫反応性が認められた (Fig. 3b)。また、パパイン免疫反応性は全く認められないことを確認した (Fig. 3a)。

室温下で2時間のパパイン処理を行ったものでは、パパインの浸透した表層領域において、コラーゲン線維の局在に明らかな変化が生じていることが確認された (Fig. 3c, d)。表層部の筋内膜に破断が生じ、筋細胞間の結合が脆弱化していることが示唆された。一方4時間のパパイン処理では、パパインの浸透した領域において、さらに著しい組織変化が認められた (Fig. 3e, f)。筋内膜を構成するコラーゲン線維がほぐれ、所々に断裂が認められ、また筋細

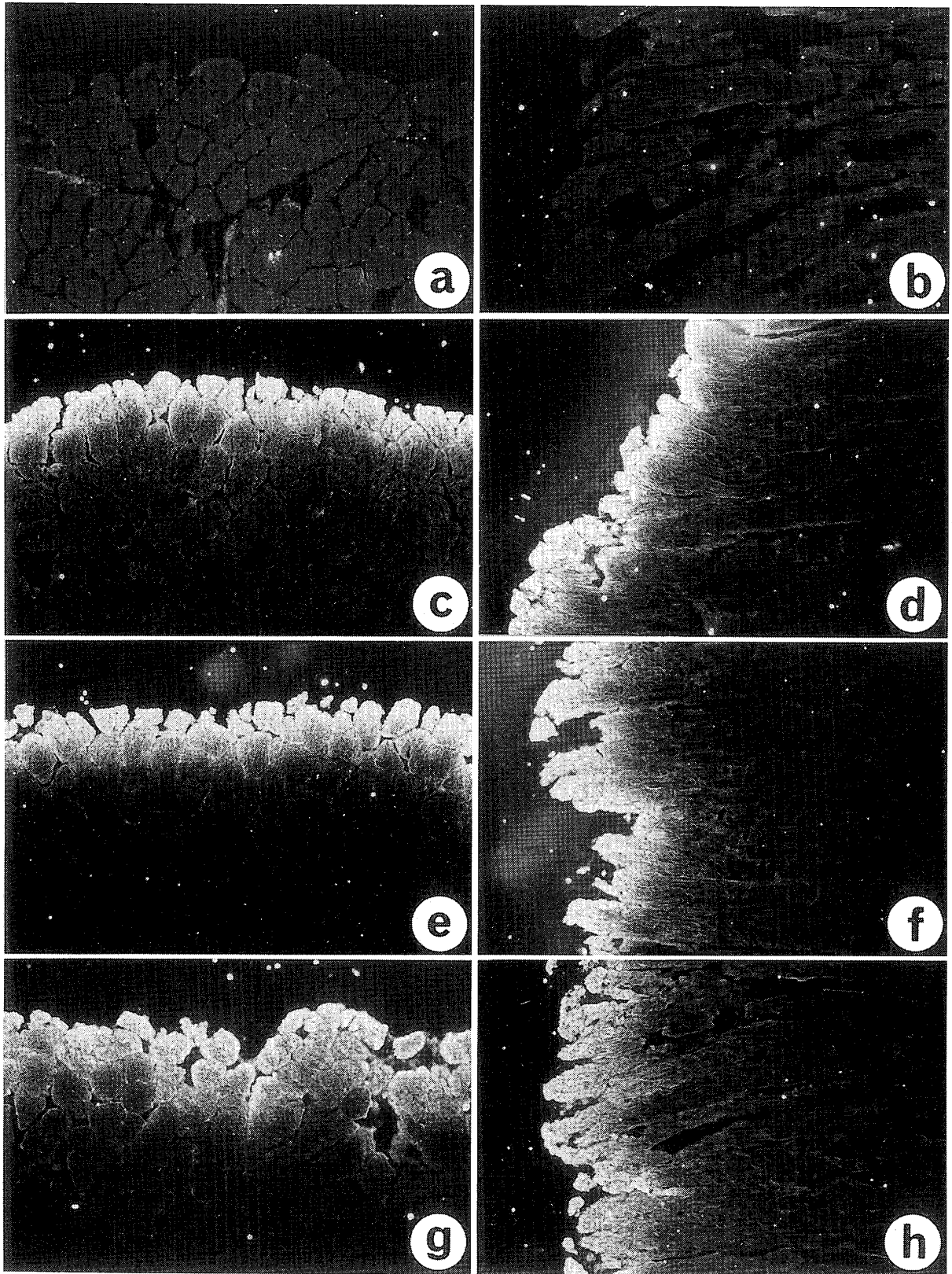


Fig. 2. Indirect immunofluorescence analysis of papain permeation into pork tissue
Pork samples were soaked in 1 % papain in 50 mmol/l citrate buffer (pH 6.0) at 25 °C for 30 min (c, d), 1 h (e, f) or 2 h (g, h). Control pork samples were soaked in the citrate buffer without papain for 4 h (a, b). Transverse (a, c, e, g) and longitudinal (b, d, f, h) sections of the specimens were examined by indirect immunofluorescence procedures using anti-papain antiserum. $\times 50$.

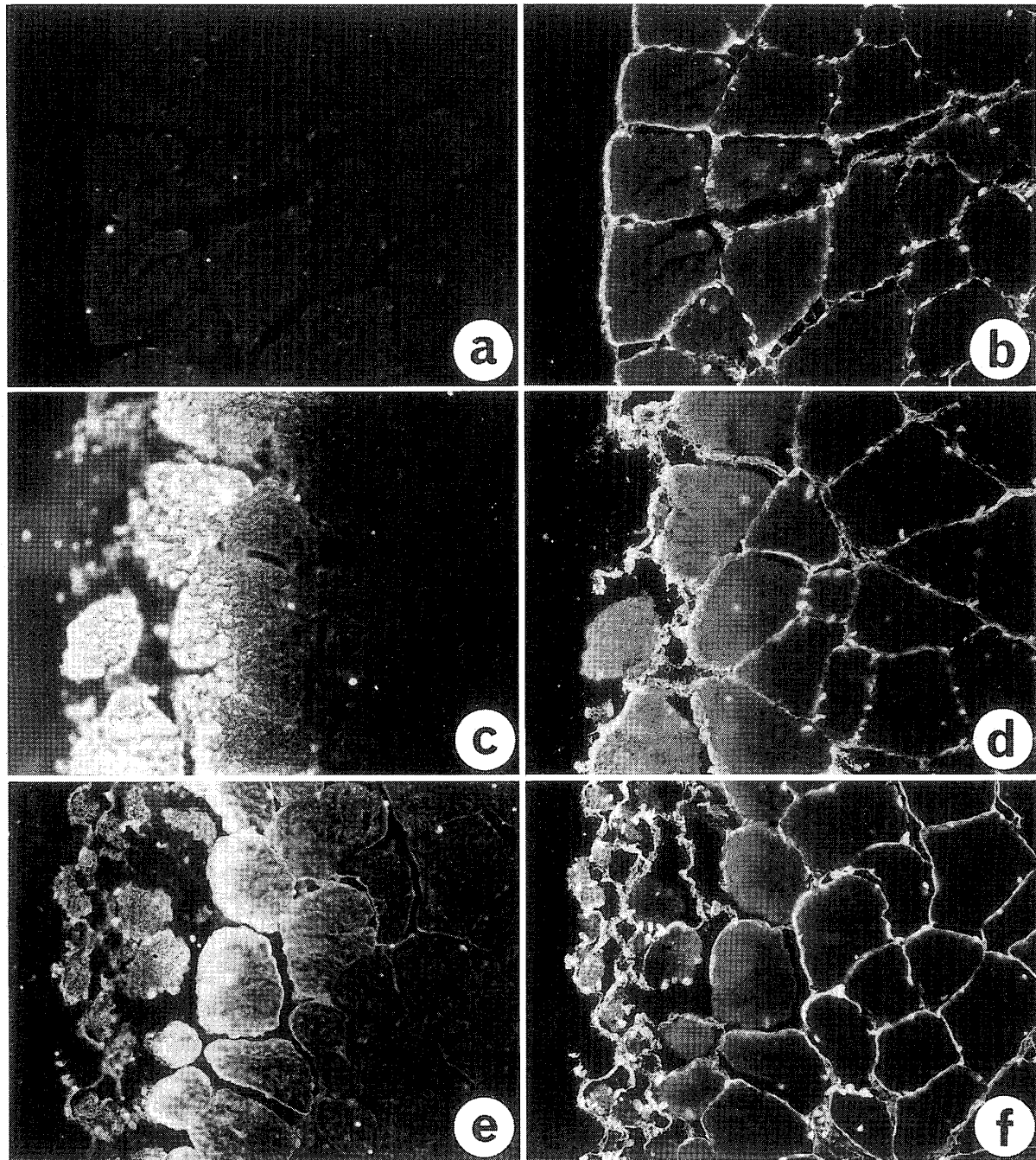


Fig. 3. Immunodetection of papain and type I collagen in papain-treated pork tissue
 Pork samples were soaked in 1 % papain in 50 mmol/l citrate buffer (pH 6.0) at 25 °C for 2 h (c, d) or 4 h (e, f). Control pork samples were soaked in the citrate buffer without papain for 4h (a, b). Transverse sections of the specimens were examined by double immunofluorescence procedures using anti-papain (a, c, e) and anti-type I collagen (b, d, f) antisera. The procedures have enabled simultaneous detection of papain- and type I collagen-immunoreactivities in the same field $\times 100$.

胞の細胞質も消失している像が観察された。このことから、パパインが浸透した表層領域において、コラーゲンおよび筋原線維タンパク質の著しい加水分解が生じているものと考えられた。表層部の組織が破壊されているため、正確に測定することは困難で

あるが、もとの表面から0.4 mm程度の深さまでパパインが浸透しているものと推測された。この結果より、処理時間を延長することにより、パパインの浸透は若干進行するものの、それに伴い表層部における食肉組織の顕著な破壊を生じることが示された。

パパインの浸透性を調べる方法としては、あらかじめパパイン分子自体をフルオレセインイソチオシアネートなどの蛍光色素で標識して、その標識パパイン水溶液中に食肉を浸漬する方法も考えられる¹³⁾。しかしこの方法では、パパイン分子の分子量や電荷、立体構造などの物理化学的性質に変化を来すうえ、タンパク質分解活性などの酵素学的性質も変化する可能性がある。そのため、標識パパインの挙動が本来のパパインの挙動とは異なる可能性を否定できない。また、市販の食肉軟化剤やから揚げ粉のように、すでに商品に配合済みのパパインの挙動を調査することも、極めて困難である。これに対して、本実験で用いた免疫組織化学的手法では、パパイン分子に化学的修飾を加えることなく浸透させ、その後検出することができる。そのため、上記のような難点を克服することができ、パパイン分子の浸透性をより正しく評価できる方法である。しかも、酵素の浸透性と食肉組織変化とを、同一試料において同時に観察できるという点においても、大変優れた方法であると考えられる。

本実験の結果から示されたように、食肉タンパク質を懸濁液としてパパイン処理を施した場合、低濃度のパパインにより、筋構成タンパク質の有効かつ速やかな加水分解が生じるのに対し、浸漬その他の方法により、酵素を食肉表面から作用させた場合には、その有効性に大きな問題点があるものと考えられる。すなわち、パパインは食肉内への浸透性に乏しく、表層部のごく一部にしか到達し得ない。また、浸透を促進するために長時間浸漬すると、表層部において過度の加水分解を来し、組織破壊をもたらす。そのため、かえって食肉本来のテクスチャーや栄養素の損失などを招く危険性が大きいものと推察される。今後は酵素液の濃度、温度、pH等の条件を変えることにより、酵素の浸透性を高めるとともに、表層部での過度の組織破壊を抑えるような処理条件を検討したい。そのためには、テクスチャー測定、官能試験に加えて、本実験で用いた免疫組織化学的手法が有効な判定手段のひとつとなるものと考えられる。

本実験では、パパインについてのみ調査を行ったが、酵素の種類によって、食肉タンパク質に対する選択性が異なる可能性も考えられる。実際に、キウイフルーツに含まれるアクチニジンは、アクチンよりもミオシン重鎖に対する選択性が高く、またミオ

シン重鎖を特定の部位で限定的に加水分解することが示されている^{6,8,14)}。このアクチニジンを軟化剤として用いた場合には、食肉表層部での望ましくない過度の組織破壊を軽減できる可能性が考えられる。この点について検討を加えるため、現在、キウイフルーツ果実より精製したアクチニジンを抗原として、抗アクチニジン抗血清を作製し¹⁵⁾、調査中である。

4. 要 約

食肉をパパイン溶液に浸漬したときのパパインの浸透性と食肉組織変化について、抗パパイン抗体および抗I型コラーゲン抗体を用いた免疫組織化学的検討を試みた。豚肉片を1%パパイン溶液中に2時間浸漬したとき、パパインは食肉表面から0.3 mm程度しか浸透しなかったが、表層部ではすでに食肉組織の変化が認められた。処理時間4時間では、パパインの浸透がわずかに進行したものの、表層部においては、食肉タンパク質の過度の加水分解による顕著な組織破壊が観察された。すなわち、パパインが豚肉内に浸透するためには長時間を要すること、ならびに、パパインに長時間暴露すると、食肉表層部において望ましくない過度のタンパク質分解を引き起こすことが示された。この結果は、食肉をプロテアーゼ溶液やプロテアーゼを含む果汁などに浸漬するだけで食肉軟化効果を生じるとする、これまでの報告や概念に疑問を投げかけるものである。パパイン等のプロテアーゼを食肉軟化剤として用いるためには、使用条件を再検討する必要があるものと考えられる。

引用文献

- 1) Bowie, H. M. and Billington, M. J.: Determination of Papain in Raw Meat by Immunoassay, *Meat Sci.*, **34**, 39-47 (1993)
- 2) 下村道子, 橋本慶子 (編): 調理科学講座 4 植物性食品, 朝倉書店, 東京, 145 (1993)
- 3) Carne, A., and Moore, C. H.: The Amino Acid Sequence of the Tryptic Peptides from Actinidin, a Proteolytic Enzyme from the Fruit of *Actinidia chinensis*, *Biochem. J.*, **173**, 73-83 (1978)
- 4) Choi, K. H. and Laursen, R. A.: Amino-Acid Sequence and Glycan Structures of Cystein

Proteases with Proline Specificity from Ginger Rhizome *Zingiber officinale*, *Eur. J. Biochem.*, **267**, 1516-1526 (2000)

- 5) Lee, Y. B., Sehnert, D. J. and Ashmore C. R. : Tenderization of Meat with Ginger Rhizome Protease, *J. Food Sci.*, **51**, 1558-1559 (1986)
- 6) 鮫島邦彦, 崔 一信, 石下真人, 早川忠照 : アクチニジン (キウイフルーツタンパク質分解酵素) による筋肉構成タンパク質の分解, *日食工誌*, **38**, 817-821 (1991)
- 7) Thompson, E. H., Wolf, J. D. and Allen, C. E. : Ginger Rhizome : A New Source of Proteolytic Enzyme, *J. Food Sci.*, **38**, 652-655 (1973)
- 8) 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 : キウイフルーツの豚肉軟化効果について, *家政誌*, **45**, 603-607 (1994)
- 9) 和辻敏子, 宮本悌次郎 : キウイフルーツの牛肉軟化効果について, *調理科学*, **18**, 128-132 (1985)
- 10) Laemmli, U. K. : Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 689-685 (1970)
- 11) Johnson, G. D. and Nogueira Araujo, G. M. de C. : A Simple Method of Reducing the Fading of Immunofluorescence during Microscopy, *J. Immunol. Methods*, **43**, 349-350 (1981)
- 12) Filippova, I. Y., Lysogorskaya, E. N., Oksenoit, E. S., Rudenskaya, G. N. and Stepanov, V. M. : L-Pyroglutamyl-L-Phenylalanyl-L-Leucine-*p*-Nitroanilide — A Chromogenic Substrate for Thiol Proteinase Assay, *Anal. Biochem.*, **143**, 293-297 (1984)
- 13) 西山一郎 : 食肉軟化酵素配合から揚げ粉が豚肉タンパク質成分に及ぼす影響, 駒沢女子短期大学「研究紀要」, **33**, 33-39 (2000)
- 14) 西山一郎 : 精製アクチニジンによる筋原線維タンパク質分解作用の pH 依存性, *家政誌* **52**, 1083-1089 (2001)
- 15) 西山一郎, 大田忠親 : キウイフルーツ果汁のアクチニジン濃度およびプロテアーゼ活性の品種