



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	筋肉タンパク質と大豆タンパク質との相互作用
Author(s)	山本, 克博; YAMAMOTO, Katsuhiko; 深沢, 利行 他
Citation	北海道大学農学部邦文紀要, 9(1), 116-126
Issue Date	1973-12-15
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/11860
Type	departmental bulletin paper
File Information	9(1)_p116-126.pdf



筋肉タンパク質と大豆タンパク質との相互作用

山本克博・深沢利行*・安井 勉**

酪農学園大学肉製品研究室

* 九州大学農学部畜産学科

** 北海道大学農学部畜産学科

(昭和48年6月21日受理)

The Interaction between the Muscle Protein and the Soybean Protein

Katsuhiko YAMAMOTO, Toshiyuki FUKAZAWA*
and Tsutomu YASUI**

Laboratory of Meat Research, The College of Dairy Agriculture, Ebetsu

* Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka

** Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo

序 論

大豆は日本あるいは中国では古くから食用に供されてきたが、世界的に見ると食用として利用されてきた地域は限られていた。近年、製油を目的として米国を中心に生産量が大幅に増加し、油を取った残りである脱脂大豆は主に家畜用飼料として利用されていた。しかしながら、人口の増加に伴って生じつつあるタンパク質資源の不足を解消すべく、タンパク質資源をより有効に利用しようとする考えから、優れた栄養価をもつ大豆タンパク質を食用化しようとする動きが生じてきた。

大豆タンパク質の新しい利用法は、従来の食品に添加剤あるいは増量剤として用いる方向と、大豆タンパク質自体から新しい食品を作り出すという方向の二つに大別される。大豆タンパク質の肉製品への利用は、米国においてソーセージの離水や脂肪分離を防止するという品質改良剤の性格をもって用いられ始め、その後増量剤としての役割も大きくなりつつある。初期の頃はもっぱら脱脂大豆粉が用いられたが、最近ではあらかじめ大豆タンパク質に変性を起こさせ、一定の型に成型して利用され始め、このような場合ソーセージへの添加量を粉末状のものに比べて増すことができるようになった。

肉製品に大豆タンパク質を添加する場合、肉製品が本来もつ保水性、結着性あるいはテクスチャー等をそこなく用いられることが好ましい。これまでの研究から肉製品におけるこれらの諸性質は筋肉タンパク質中

のミオシン A あるいはミオシン B に由来し、ミオシン A あるいはミオシン B が加熱処理を受けることにより、凝集体を形成し、その際に水や脂肪をとり込んで保水性や結着性という性質を示すと考えられている。一方、大豆タンパク質自体も保水性、結着性あるいはゲル形成能といった諸性質をもち、また、低温処理によって海綿状組織を形成することが知られている。

これまで筋肉タンパク質、大豆タンパク質について個別にはかなり研究が進められてきた。今後、肉製品への大豆タンパク質の利用は大いに高まるであろうが、その際、両タンパク質のもつ性質を知ることは勿論のこと、両タンパク質間で起る反応性を知ることは極めて重要なことである。

そこで今回、これら筋肉および大豆タンパク質間の相互作用機作についての実験を行ない、若干の知見が得られたのでここに報告する。

本実験を遂行するにあたり、終始有意義な助言あるいは助力をいただいた高橋興威助手、森田潤一郎助手に謝意を表す。

材料と方法

大豆タンパク質の調製

1) 酸沈澱タンパク質

酸沈澱タンパク質は、橋詰らの方法¹⁾によって調製した。

脱脂大豆粉に10倍量の水を加え、室温で30分間攪拌

し、遠心分離 (10,000 rpm, 20 min) で残渣を除く。得られた抽出液に 10% 塩酸を滴下攪拌しながら pH 4.5 に合せ、遠心分離 (5,000 rpm, 10 min) でタンパク質を沈澱させる。沈澱を水に懸濁し洗う。水洗を 2 度くり返し、沈澱を標準溶液 (0.4 M NaCl, 0.0325 M K_2HPO_4 , 0.0026 M KH_2PO_4 pH 7.6) に溶解して酸沈澱タンパク質とした。

2) 11S 成分

大豆タンパク質中の 11S 成分の調製は、WOLF ら²⁾と SAIO ら³⁾の方法を参考にした。

脱脂大豆粉に 10 倍量の水を加え、室温で 30 分間攪拌し、遠心分離 (10,000 rpm, 30 min) で残渣を除く。抽出液を ice-bath 中に一晚放置した後、遠心分離 (10,000 rpm, 30 min) により Cold Insoluble Fraction (CIF) を得る。CIF を水に溶解し、ろ過によって不溶物を除いた後、カルシウムを 2 mM となるように加える。遠心分離 (5,000 rpm, 15 min) によりカルシウム沈澱タンパク質を得る。これを標準溶液に溶解し、遠心分離 (5,000 rpm, 10 min) により不溶物を除去する。等量の水を加えて希釈してから 10% 塩酸を滴下攪拌しながら pH 4.5 に合せ、遠心分離 (5,000 rpm, 10 min) する。沈澱を水洗し、標準溶液 (0.01 M β -メカルカプトエタノールを含む) に溶解する。遠心分離 (17,000 rpm, 1 h) により不溶部分を除く。使用に際しては透析により β -メルカプトエタノールを除去して用いた。

筋肉タンパク質の調製

1) ミオシン A

ミオシン A はウサギ骨格筋より PERRY の方法⁴⁾によって調製し、最終的に 0.4 M NaCl に溶解した。

2) ミオシン B

ミオシン B はウサギ骨格筋より WEBER-EDSALL 溶液 (0.6 M KCl, 0.01 M Na_2CO_3 , 0.04 M $NaHCO_3$) で 24 時間抽出し、0.6 M KCl と 0.2 M KCl の間でイオン強度を上下させることにより精製し⁵⁾、最終的に 0.4 M NaCl に溶解した。

凍結乾燥

タンパク質濃度を 11S 成分とミオシン A は 5.0 mg/ml, 混合物は各々 5.0 mg/ml ずつ含むよう調整し、各々 10 ml ずつボトルに分注し、アセトン・ドライアイス混合物で急冷する。ボトルを真空ポンプに接続して脱気し、氷が完全に昇華し終った後ディープフリーザー (-25°C) 中に保存する。使用に際して 10 ml の脱イオン水を加え、良く攪拌し溶解させた。

溶解性

凍結あるいは加熱処理後のタンパク質溶液を遠心分離

(15,000 rpm, 30 min) し、上清部に残存するタンパク質量を測定し、全タンパク質量に対するパーセントで表わした。

ATPase 活性

ATPase 活性の測定は 25°C の恒温槽中で 0.5 M KCl, 5 mM $CaCl_2$, 20 mM Tris-maleate buffer pH 7.0, 1 mM ATP の存在下で行なった。一定時間反応させた反応混液に 10% トリクロール酢酸を加えて反応を停止させ、遊離した無機リン量を FISKE-SUBBAROW 法⁶⁾により測定した。

粘度

粘度は OSTWALD 型粘度計を用いて測定し、測定結果は比粘度 (η_{sp}) で表わした。

SH 含量

SH 基の測定は ELLMAN の方法⁷⁾で行なった。タンパク質溶液 2 ml に 0.2 M Tris-HCl buffer (pH 8.1) を 0.5 ml と 10 mM Phosphate buffer (pH 8.1) に溶かした 2 mM Dithionitrobenzoic acid (以下 DTNB と略す) 溶液 0.5 ml を加え攪拌し、20 分後に 412 nm の波長を用いて測定した。なお、DTNB 溶液は使用時に調製し、分子吸光係数は 11,400⁸⁾を用いた。

超遠心分析

超遠心沈降分析は日立の UCA-1 A 型を用い、55,430 rpm または 60,000 rpm, 20°C で行なった。

加熱操作

所定の濃度に調整したタンパク質溶液を 5 ml ずつ共栓付試験管に分注し、恒温槽中で 15 分間所定の温度に保った後 ice-bath に浸して冷却した。

濁度

加熱処理後氷冷した試料を室温に戻し、660 nm の吸光度を測定し濁度とした。タンパク質溶液により加熱処理以前の状態で濁度をもつ場合があるが、このような場合、加熱試料の濁度から差し引いて補正した。

電子顕微鏡

加熱処理後の試料を遠心分離 (40,000 rpm, 1 h) し、沈澱を標準溶液に懸濁する。タンパク質濃度を 0.2 mg/ml とし、HUXLEY の方法⁹⁾により 1% ウラニル酢酸を用いてネガティブ染色し、日立 11-B 型電子顕微鏡を用い加速電圧 75 kV で観察した。

結果

I. 低温下での相互作用

1) 凍結乾燥

表 1 は、ミオシン A と大豆タンパク質 11S 成分を各々

単独で凍結乾燥した場合と、重量比 1:1 の割合で混合したタンパク質溶液を凍結乾燥した場合における融解後の溶解性と残存 ATPase 活性を調べたものである。溶解性を見るとミオシン A は約 25% が凍結乾燥によって不溶化されるが、11S 成分は殆んどその影響を受けなかった。混合物の溶解性の変化はミオシン A に近かった。

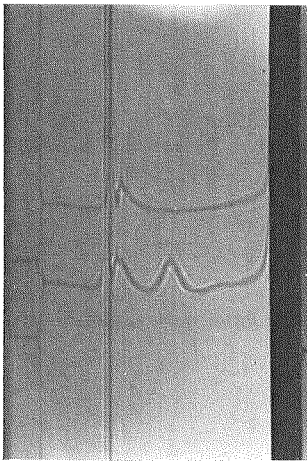
可溶部分のミオシン A ATPase 活性を見ると、処理以前の活性の約半分となり、可溶部分においても変性が起っていることを示している。11S 成分を添加してもミオシン A の ATPase 活性に影響を及ぼさなかった。

凍結乾燥後の混合物の可溶部分を分析用超遠心機にか

表1 ミオシン A と 11S 成分の凍結乾燥処理後における溶解性と可溶部分の ATPase 活性

	Solubility (%)	ATPase activity ($\mu\text{moles Pi}/\text{min}/\text{mg}$)	
		Native	
Myosin A	76.4	0.25	0.49
11 S	97.8	—	—
Mixture	80.0	0.24	0.48

溶媒は 0.5M KCl。ミオシン A と 11S 成分は 5.0 mg/ml、混合物は 10.0 mg/ml (1:w/w) とし、10 ml ずつ凍結乾燥した。2 週間 -25°C で保存後、10 ml の水を加えて溶解させ、遠心分離 (15,000 rpm, 30 min) により不溶部分を除去し、上清部のタンパク質濃度と ATPase 活性を測定した。



第1図 ミオシン A と 11S 成分の凍結乾燥処理後における可溶部分の超遠心沈降パターン
0.5M KCl, 60,000 rpm に達して 45 分
上側: ミオシン A (5.0 mg/ml)
下側: ミオシン A+11S 成分 (1:1 w/w) (10.0 mg/ml)

けて沈降パターンを見ると第1図のようになり、ミオシン A と 11S 成分のピークは別個に行動し、前述した ATPase 活性の測定結果を考え合わせると、凍結乾燥という条件ではミオシン A と 11S 成分は一見反応しないと考えても良いようである。しかし、溶解性に関する限り、混合物のそれはミオシン A と良く似ているという点は興味深い。

2) -25°C で凍結し -5°C で熟成

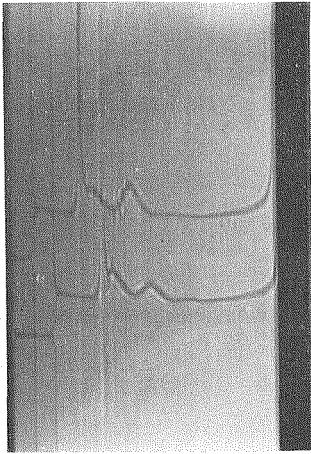
両タンパク質の濃度を 5.0 mg/ml、混合物では各々 5.0 mg/ml ずつ含むように調整し、 -25°C で 2 時間凍結した後 -5°C で 5 日間熟成させ、室温で解凍し遠心分離後得られた上清の溶解性、粘度、SH 含量を表 2 に示してある。

表2 ミオシン A と 11S 成分の -25°C 凍結、 -5°C 保存処理後における溶解性、粘度、SH 基の変化

	Solubility (%)	Viscosity (η_{sp})		SH Groups (moles/ 10^5 g)	
		Native		Native	
Myosin A	90.0	0.56	0.53	—	—
11 S	75.0	0.02	0.01	0.6	1.1
Mixture	90.0	0.55	0.54	—	—

溶媒: 0.4M NaCl, 35 mM リン酸緩衝液 pH 7.6
タンパク質濃度: ミオシン A と 11S 成分は 5.0 mg/ml、混合物は 10.0 mg/ml (1:1 w/w) -25°C で 2 時間凍結し、 -5°C で 5 日間保存後、室温で解凍、遠心分離 (15,000 rpm, 30 min) で不溶部分を除去し、上清部をとり測定に供した。

11S 成分の溶解性は HASHIZUME らの値¹⁰⁾ に比べて高いが、これは熟成時の温度条件が厳密でなかったためかもしれない。HASHIZUME らによって 11S 成分の低温での不溶化は S-S 結合の形成によるものとされているが、可溶部分でも SH 量の減少が見られ、不溶化に到らないまでも S-S 結合形成が行なわれていると思われる。ミオシン A の溶解性は 90% で凍結乾燥に比べて高い値を示し、混合物の溶解性もミオシン A と同様の値を示した。11S 成分の粘度変化は、測定時のタンパク質濃度が 2.0 mg/ml と希薄なため明確ではないが、増加しているものと思われる。これは S-S 結合形成による分子構造の変化に由来するものであろう。ミオシン A と 11S 成分の混合物では、溶解性および粘度はともにミオシン A 単独のものと類似し、相互作用はないものと思われる。また、超遠心の沈降パターンで見ると第2図のようになり、これからも相互作用はないと思われる。し



第2図 ミオシン A と 11S 成分の -25°C 凍結 -5°C 保存処理後における超遠心沈降パターン
 0.4 M NaCl, 35 m M リン酸緩衝液 pH 7.6
 55,430 rpm に達してから 36 分
 上側: ミオシン A + 11S 成分 (1:2 w/w)
 5.0 mg/ml
 下側: ミオシン A + 11S 成分 (1:1 w/w)
 5.0 mg/ml

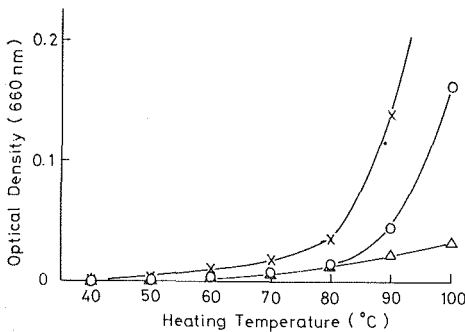
かし、この場合にも混合物の溶解性はミオシン A のそれに類似するということが注目される。

II. 高温下での相互作用

1) 大豆タンパク質の熱変性

(i) 酸沈澱タンパク質

凝集体形成の度合を示す指標として濁度を用い、酸沈澱タンパク質の加熱温度による濁度の変化を第3図に示

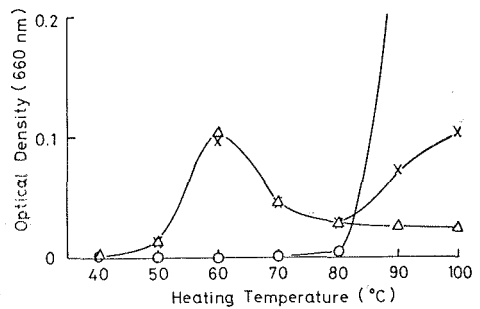


第3図 大豆酸沈澱タンパク質の加熱による濁度変化
 0.4 M NaCl, 35 m M リン酸緩衝液 pH 7.6
 タンパク質濃度 2.0 mg/ml, 各温度で 15 分間保持
 ○: コントロール
 ×: 0.01 M β -メルカプトエタノール添加
 △: 2 m M NEM 添加

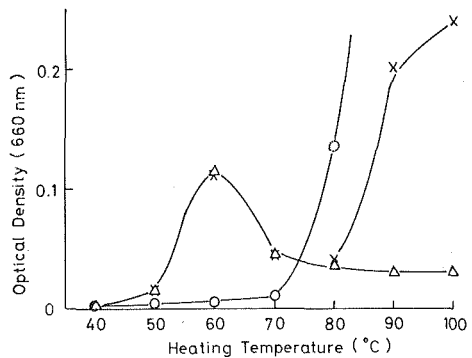
した。酸沈澱タンパク質は 50°C より除々に濁度を増し、 $80\sim 100^{\circ}\text{C}$ にかけて顕著な変化が認められた。凝集体形成に際して、SH 基の関与を調べるために β -メルカプトエタノールと N-ethylmaleimide (以下 NEM と略す) を加えてみると、 β -メルカプトエタノールは凝集体形成を促進し、 100°C では肉眼的に認めらる程の大きな凝集体を形成したが、一方、NEM を加えたものは凝集体形成が抑制され、 $90\sim 100^{\circ}\text{C}$ にかけてその抑制作用が顕著であった。

(ii) 11S 成分

11S 成分の濁度変化は第4図で示されるように、 70°C を越えると凝集体形成が始まり、 80°C 以上でその変化は急激であった。 $90\sim 100^{\circ}\text{C}$ では肉眼的に認めうる大きな凝集体が観察された。酸沈澱タンパク質の場合と同様に SH 基の関与を調べるために、 β -メルカプトエタノール (第5図) と NEM (第6図) を用いると、 β -メルカプトエタノール添加のものは凝集体形成が促進され、 70°C を越



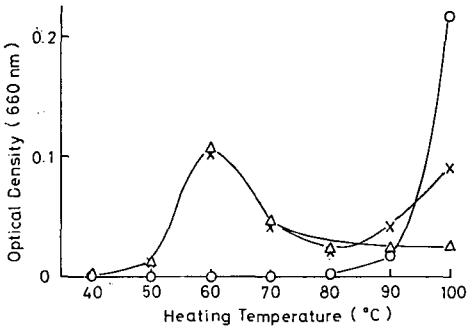
第4図 ミオシン A と 11S 成分の加熱による濁度変化
 タンパク質濃度: ミオシン A と 11S 成分は各々 2.0 mg/ml, 混合物は 4.0 mg/ml (1:1 w/w)
 ○: 11S 成分 △: ミオシン A ×: 混合物



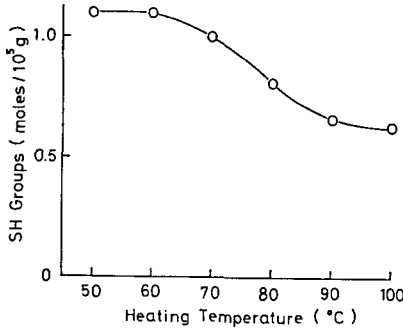
第5図 0.01 M β -メルカプトエタノール添加時のミオシン A と 11S 成分の加熱による濁度変化条件、シンボルは第4図と同様

えると急激な濁度変化が認められた。一方、NEM 添加のものは凝集体形成が抑制され、100°Cでも NEM 無添

加の場合に見られたような、大きな凝集体は形成されなかった。

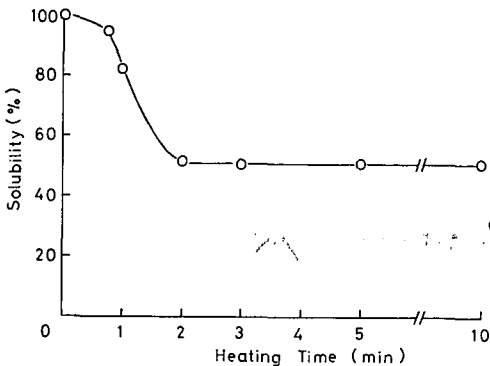


第6図 2 mM NEM 添加時のミオシン A と 11S 成分の加熱による濁度変化条件, シンボルは第4図と同様



第7図 11S 成分の加熱による SH 量の変化

タンパク質濃度を 5.0 mg/ml として各温度で 15 分間保持し、遠心分離 (15,000 rpm, 30 min) によって得られた上清部を測定に供した。



第8図 11S 成分の溶解性の変化

100°C で所定の時間加熱し、遠心分離 (15,000 rpm, 30 min) によって得られた上清部のタンパク質量を測定して未加熱時のタンパク質量 (5.0 mg/ml) に対するパーセントで示した。

第7図は加熱温度による SH 量の変化を示している。60°C 以上で SH 量の減少が始まり、90~100°C では約 50% にまで減少する。可溶部分の SH 量の変化が直接に不溶性凝集体形成に関係するかどうかは分らないが、11S 分子の構造が加熱によって loose になり、Free の SH 基が S-S 結合を形成するのであろう。

第8図は、100°C で加熱した時の溶解性の変化を経時的に示している。加熱後 2 分で溶解性は 50% となり、それ以上加熱しても変化しなかった。

2) 筋肉タンパク質の熱変性

(i) ミオシン A

第4図で示されるように、ミオシン A は 50°C より凝集体形成が始まり、60°C で最高となり、60°C を越えると減少する傾向を示した。

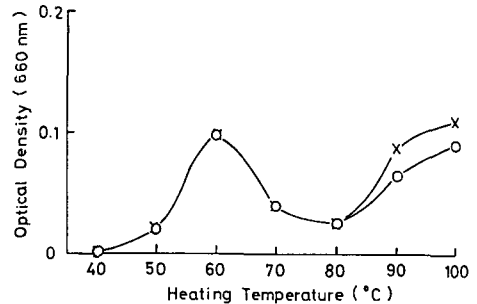
(ii) ミオシン B

第12, 13 図で示されるように、ミオシン A の場合と同様に 60°C で凝集体形成が最高となった。

3) 大豆タンパク質と筋肉タンパク質とが共存する場合の熱変性

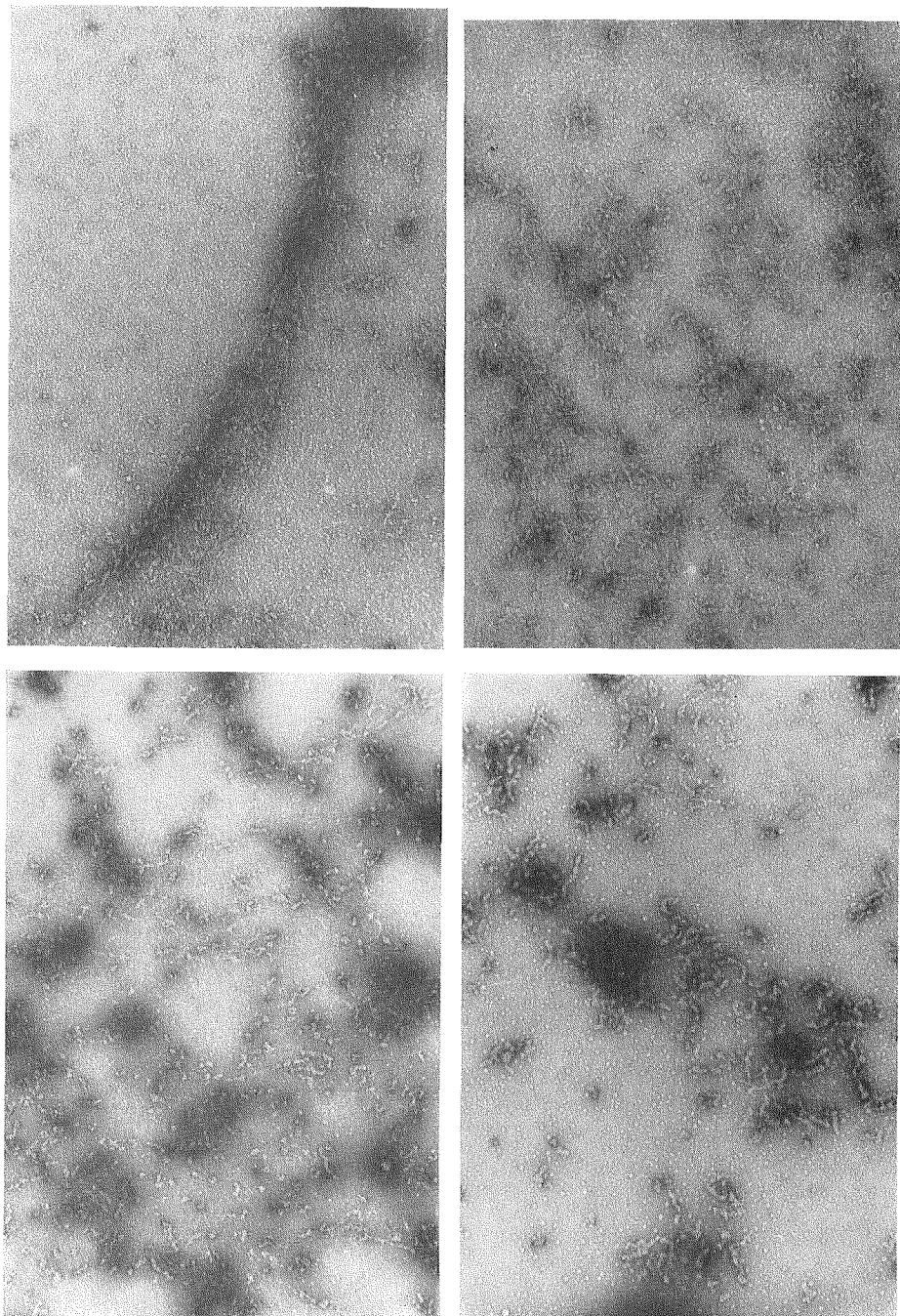
(i) ミオシン A-11S 成分

ミオシン A と 11S 成分を重量比で 1:1、タンパク質濃度は各々 2.0 mg/ml ずつ含むように調整した。凝集体形成の最適温度は、ミオシン A の場合は 60°C であり、一方、11S 成分は 90~100°C と両者で差があるが、混合物の濁度変化を見ると第4図に示される通り、50~80°C ではミオシン A 単独の場合と同様、80~100°C ではミ



第9図 ミオシン A と 11S 成分の SH 基を個別に Block した場合の混合物の加熱による濁度変化 2 mM NEM で SH 基を Block した後、透析により過剰の NEM を除き、各々 Native のタンパク質と混合して加熱した。加熱条件は第3図と同様。タンパク質濃度は 4.0 mg/ml (1:1 w/w)

○: 11S 成分+SH Blocked ミオシン A
×: SH Blocked 11S 成分+ミオシン A



第10図 ミオシンAとIIS成分の加熱処理後の凝集体の電子顕微鏡写真

ミオシンAとIIS成分は2.0 mg/ml, 混合物は4.0 mg/ml (1:1 w/w) とし, 100°Cで15分間加熱した後, 遠心分離 (40,000 rpm, 1h) で凝集体を沈澱させ, 沈澱を標準溶液に懸濁し, ホモジナイズしてからタンパク質濃度を0.2 mg/mlとし, ネガティブ染色法によって観察した。

(a), (b): IIS成分, (c): ミオシンA, (d): 混合物, 倍率はいずれも $\times 39,500$

オシシン A よりも大きな濁度変化を示したが、11S 成分で見られたような肉眼的に認めうる大きな凝集体は形成されず、全般的にミオシシン A の濁度変化と類似していた。

ミオシシン A-11S 成分混合物での凝集体形成に SH 基が関与するかどうか調べるため、 β -メルカプトエタノールを加えてみると、11S 成分の凝集体形成は促進され、70°C を越えると急激な濁度の上昇が認められたが、ミオシシン A では無添加のものと大差がなかった。混合物は、50~80°C の温度範囲ではミオシシン A 単独の濁度変化と同様であり、80~100°C では 11S 成分で見られたような急激な濁度上昇は見られず、また、大きな凝集体も形成されずミオシシン A の濁度変化に近いものとなっていた。

SH Block 試薬である NEM を加えると、11S 成分の凝集体形成は抑制され、無添加の場合に見られるような大きな凝集体は形成されなかった。一方、ミオシシン A の凝集体形成は NEM によって影響を受けず、混合物の濁度変化も無添加のものと同じであった。

ミオシシン A と 11S 成分とを個別に NEM を用いて SH 基を Block しておいてから過剰の NEM を透析によって除去し、各々 NEM 処理をしていない 11S 成分、ミオシシン A と反応させてみた。第 9 図に示されるように、この場合も 90~100°C においてわずかの差が見られるとはいえ、NEM 処理をしていない場合と差はなく、ミオシシン A-11S 成分混合物の 80~100°C における相互作用への SH 基の関与については否定的結果が得られた。

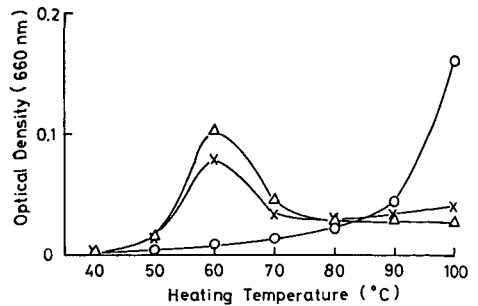
第 10 図はミオシシン A と 11S 成分および両者の混合物の加熱処理によって形成された凝集体を電子顕微鏡で観察したものである。混合物の凝集体の形はミオシシン A 単独のものに近い形を示していた。

(ii) ミオシシン A-酸沈澱タンパク質

ミオシシン A と酸沈澱タンパク質の濃度を 2.0 mg/ml、混合物の場合は各々 2.0 mg/ml ずつ含むように調整し、加熱実験に用いた。第 11 図に示されるように 50~80°C において混合物の濁度変化はミオシシン A 単独の場合を下回り、酸沈澱タンパク質はミオシシン A の凝集体形成に抑制的に作用していると考えられる。90~100°C にかけては混合物の濁度変化はミオシシン A 単独のものと類似し、ミオシシン A-11S 成分の場合と同様にミオシシン A が酸沈澱タンパク質の凝集体形成に抑制的に作用していると思われる。

(iii) ミオシシン B-11S 成分

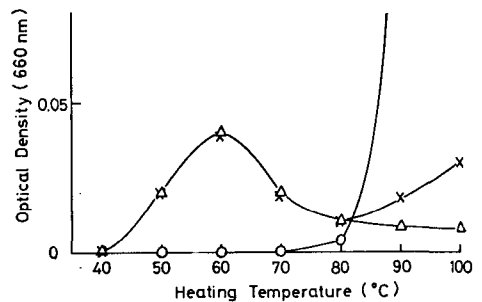
第 12 図で示される通り、ミオシシン A-11S 成分の場合と同じように 50~80°C においては、混合物の濁度変化はミオシシン B 単独のものと同様であり、80~100°C におい



第 11 図 ミオシシン A と大豆酸沈澱タンパク質の加熱による濁度変化

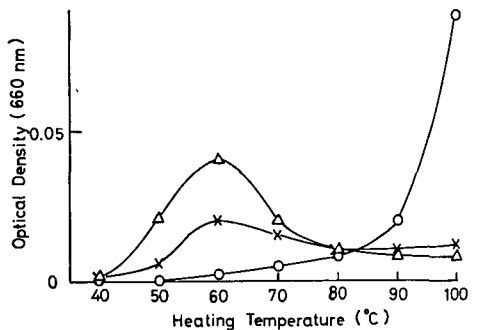
タンパク質濃度はミオシシン A と酸沈澱タンパク質は 2.0 mg/ml、混合物は 4.0 mg/ml (1:1 w/w)。溶媒、加熱時間は第 9 図と同様。

○: 酸沈澱タンパク質 △: ミオシシン A ×: 混合物



第 12 図 ミオシシン B と 11S 成分の加熱による濁度変化
加熱時の条件は第 9 図と同様。

○: 11S 成分 △: ミオシシン B ×: 混合物



第 13 図 ミオシシン B と酸沈澱タンパク質の加熱による濁度変化

タンパク質濃度: ミオシシン B と酸沈澱タンパク質は 1.0 mg/ml、混合物は 2.0 mg/ml (1:1 w/w)。各温度で 15 分間保持。0.4M NaCl, 35 mM リン酸緩衝液 pH 7.6。

○: 酸沈澱タンパク質 △: ミオシシン B ×: 混合物

てミオシン B は 11S 成分の凝集体形成を抑制する作用をもつと思われる。

(iv) ミオシン B-酸沈澱タンパク質

第 13 図で示される通り、40~80°C において混合物の濁度変化は個々のタンパク質の濁度の中間的な値を示し、酸沈澱タンパク質が、ミオシン A の場合と同様にミオシン B の凝集体形成に抑制的に作用していた。80~100°C における混合物の濁度変化は、ミオシン B 単独の場合と類似し、酸沈澱タンパク質の凝集体形成が抑制されていると考えられる。

考 察

大豆タンパク質を -20°C で凍結し、-5°C で保存すると大部分のタンパク質が不溶化し、海綿状の組織が形成される¹⁰⁾。凍結温度を -80°C に下げると不溶部分が減少し、また -5°C での保存が海綿状組織の形成に不可欠であり、この不溶化の本態が SH 基の酸化による S-S 結合形成によるものであることが明らかになってきた¹⁰⁾。表 2 で示された 11S 成分の溶解性が HASHIZUME らの値よりも高いのは、保存時の温度コントロールが厳密でなかったためと思われる。表 2 での粘度や SH 含量は沈澱を除去したあとの可溶部分のそれを示しており、不溶部分の形成を直接に示すデータとはいえないが、可溶部分の SH 含量の低下は S-S 結合の形成を意味し、不溶化につながるものと考えて良いだろう。粘度の増加は S-S 結合の形成による 11S 分子の会合によるものと思われる。この点に関して HASHIZUME らは、超遠心的に 15S のピークの出現を認めている¹⁰⁾。花房によると、ミオシン A やミオシン B を凍結融解させると ATPase 活性の低下がおこるが、この時、分子の解離・会合は起らず、また SH 基の変動もなく、分子内の 2 次・3 次構造の破壊が生じたものと考えている¹¹⁾。ミオシン A と 11S 成分とを共存させて低温処理した場合、ミオシン A と 11S 成分とが互いに反応して不溶化が促進されるといった現象は見られなかったが、これは結局、11S 成分の方は、-20°C で凍結し、-5°C で保存するという条件で分子間の相互作用を生ずるのであるが、一方ミオシン A は分子内の構造変化にとどまって分子間の相互作用を生じないという両タンパク質の低温下での行動の差異によるものであろう。

凍結乾燥の場合、凍結温度が -75°C (ドライアイス・アセトン) という低温であることと、脱水状態となるという点で上記の条件は異なっている。タンパク質の精製や保存の目的で凍結乾燥は広く用いられているが、この

時、変性をおこすタンパク質もあり、ミオシン A やミオシン B はその代表的な例であり、表 1 で示される通り、ミオシン A の溶解性は 76%、ATPase 活性は約 1/2 に減少する。一方、11S 成分は凍結乾燥によっても溶解性は 100% に近い。

凍結乾燥によるタンパク質の変性は、脱水自体がその原因と考えられている。すなわち、タンパク質分子の疎水結合近傍の非水化による疎水結合の破壊や水和水の除去による分子内水素結合の攪乱が生じ、その結果タンパク質の変性がおこると考えられている¹¹⁾。

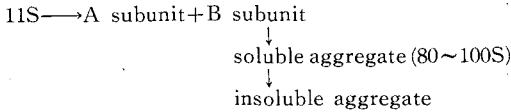
凍結乾燥と -25°C 凍結の場合の溶解性を見てみると、ミオシン A と 11S 成分では全く逆の傾向を示し、この両タンパク質の低温下における行動に差のあることが分かる。低温下において、ミオシン A と 11S 成分との相互作用が見られなかったのは、結局タンパク質間の低温下での性質の差異に由来するものと考えられる。すなわち、両タンパク質は上記の環境下でそれぞれ独自の挙動を示し、両タンパク質分子の相互間の作用は生じないものと思われる。しかし、これらの考察は、不溶部分を遠心分離した上清液について得られた結果からの推論であり、この画分については正当性をもつかもしれないが、表 1 および 2 から分るように、ミオシン A と 11S 成分の混合物の溶解性は常にミオシン単独の場合のそれと類似するという事実は重視しなければならないであろう。このことは、11S 成分の溶解性はミオシン A との共存下で、ミオシン A のそれに左右されることを意味するからである。もし、溶解性のデータが正しいとすれば、両タンパク質間に何らかの相互作用があるということになるのであるが、ここで用いられているタンパク質定量法の精度(可溶部分のタンパク質をミオシン A と 11S 成分とが等量溶け合っていると仮定し、ビウレット法によるタンパク質濃度 1 mg/ml あたりの吸光度を、両者の平均値をとり、混合物で得られた吸光度を割りつけてタンパク質量とした)から考えると、この問題については今後さらに検討を要する問題であらう。

大豆タンパク質の熱変性に関しては、これまで多くの報告がある。

大豆の水抽出タンパク質溶液を加熱して、超遠心沈降パターンを見てみると¹²⁾、70°C 附近より分子の会合が生じ、80°C ではすみやかに沈降する会合成分が現われ、定速 (56,000 rpm) 到達時には 2S と 7S の 2 成分になる。また、斎尾らは¹³⁾、水抽出タンパク質、酸沈澱タンパク質、カルシウム沈澱タンパク質を加熱した時の成分変化をセファデックスによるゲルろ過によって調べ、いずれ

の場合も70°C以上で分子の会合を認め、前述の超遠心の結果と符合するものと考えている。

WOLFらは11S成分の加熱変性のメカニズムを次のように考えている¹⁴⁾。



すなわち、11S成分は3~4SのAサブユニットとBサブユニットに分かれ、Bサブユニットのみが不溶化する。第8図で示されるように、11Sを100°Cで加熱すると、2分後には50%が不溶化し、それ以上加熱時間を長くしても溶解性に変化は見られない。この可溶部分がWOLFの言うAサブユニットに相当するものである。

SAIOらは精製した11S成分を用いて50, 70, 100°Cで加熱した時の加熱時間によるSH量の変化を調べている¹⁵⁾。それによると50°C加熱ではSH量に変化は見られないが、70°C加熱では加熱後約3分、100°C加熱では約30秒後にSH量が最高値に達する。SAIOらの100°C加熱でのSH量変化の結果と第8図に示した溶解性の低下がSH量の増加点からわずかの時間遅れておこり、このことから不溶化の原因の一つとしてS-S結合の形成が示唆される。さらに、凝集体形成へのSH基の関与を調べるためにβ-メルカプトエタノールとNEMを用いてみると、β-メルカプトエタノールは凝集体形成を促進し、一方NEMは凝集体形成を抑制した。β-メルカプトエタノールは還元によってS-S結合を切断し、NEMはSH基をBlockすることにより、両者ともS-S結合の形成を妨げるという作用を持ち、両者の作用が対称的に表われるのは一見矛盾するようであるが、この原因は、β-メルカプトエタノールを加えると分子内S-S結合が切断され、そのため分子構造がlooseになり、S-S結合以外の結合が形成され易くなるためである。一方NEMを加えた場合は、NEMはFreeのSH基のみと反応すると考えられるから、11S成分自体の分子構造はβ-メルカプトエタノールを加えた場合よりもNativeな状態に近く、そのためS-S結合以外の結合ができにくいであろう。CATSIMPOOLASらは、0.014~0.059%という希薄な11S成分溶液の熱変性を調べ、低イオン強度、β-メルカプトエタノール、pH4~6というような各種の条件下で凝集体形成が促進されることを観察し、その原因はイオン結合や疎水結合の形成によるものと推測している¹⁶⁾。11S成分の凝集体形成に関してS-S結合のみで考えることは困難であり、イオン結合や疎水結合などの

結合が共に関与していると考えた方が良いであろう。結局、11S成分の加熱による凝集体形成は2つの段階から成ると考えられる。すなわち、①11S分子のlooseningとそれにとまらぬFree SH基の露出、②S-S結合およびその他の非共有結合の形成、である。ここで、β-メルカプトエタノールは①の段階を促進するので、11S分子はControlの場合よりも不安定化して凝集体形成温度はより低温側にずれる。一方、NEMはFree SH基をBlockするので①および②の段階でFree SH基の露出とそれにつづくS-S結合形成を妨げ、分子はより安定化され、熱による構造変化と非共有結合の形成に由来する凝集体形成メカニズムだけが働くので、凝集体形成温度はより高温側にずれると考えると良く説明できるであろう。

ミオシンAとミオシンBの濁度変化は、本実験条件下では60°Cを最高点とし、その傾向は同じであるが、大豆タンパク質の場合、11S成分と酸沈澱タンパク質とは若干その傾向が異なっている。すなわち、11S成分は80°C以上で凝集体形成が急であるが、酸沈澱タンパク質は凝集体形成が50°C附近より徐々に起こり、90~100°Cにおいても11S成分で見られるような急激な変化は見られない。このような大豆タンパク質側の性質の差により、筋肉タンパク質と大豆タンパク質とを共存させて加熱した場合の濁度の変化は、筋肉タンパク質-11S成分系と筋肉タンパク質-酸沈澱タンパク質系の2種類に分けられる。第4, 12図に示されるように、筋肉タンパク質-11S成分において、50~80°Cでは混合物の濁度変化はミオシンAあるいはミオシンB単独の場合の濁度変化と殆んど等しく、90~100°Cでは混合物の濁度はミオシンAあるいはミオシンBに近く、11S成分単独で見られるような大きな凝集体の形成が見られなくなる。一方、筋肉タンパク質-酸沈澱タンパク質においては、第11, 13図に示されるように、50~70°Cでは混合物の濁度変化はミオシンAあるいはミオシンB単独のものを下回り、酸沈澱タンパク質がミオシンAあるいはミオシンBの凝集体形成に際して抑制的に作用していると考えられる。90~100°Cでの混合物の濁度変化は、ミオシンAあるいはミオシンBに非常に近いものになっている。この両者の差を考えてみると、酸沈澱タンパク質は11S成分の他にほぼ等量の7S成分と少量の2S, 15S成分を含み、結局11S成分以外の成分、おそらく7S成分がミオシンAあるいはミオシンBと何らかの反応をして、凝集体形成が抑制されると考えられる。酸沈澱タンパク質自体の濁度変化も7S成分が存在するために11S成分とは異

なった濁度変化を示すのであろう。

もし、筋肉タンパク質と大豆タンパク質とが何らの反応もしないとするなら、混合物の濁度は両者の和となって表われるであろう。相互作用があるのなら両者の和からはずれが生ずるのであろう。このように考えると、筋肉タンパク質-11S成分では80~100°Cにおいて、また、筋肉タンパク質-酸沈澱タンパク質では50~100°Cにおいて相互作用が起っていると考えられる。この相互作用がどのような結合様式によるものなのか、ミオシン A-11S成分で β -メルカプトエタノールやNEMを添加して濁度変化を見てみると第5, 6図に示されるように、いずれの試薬も混合物の濁度変化には影響を及ぼさなかった。筋肉タンパク質と大豆タンパク質間の相互作用がS-S結合の形成によるものと仮定すると、これらの試薬の添加は混合物の濁度上昇をもたらすと考えられるが、そのような濁度上昇は見られなかった。また第9図で示したように、ミオシン A と 11S成分を個別にSH基をBlockし、透析によって過剰のNEMを除いた後、Nativeのタンパク質と混ぜて加熱しても同様の結果が得られた。このようなことから、筋肉タンパク質と大豆タンパク質との相互作用へのS-S結合の寄与は否定的である。

ミオシン A-11S成分混合物の100°C加熱時の電子顕微鏡写真を見てみると、混合物の形はミオシン A 単独の場合の凝集体に似ている。これはミオシン A を核としてその周囲に11S成分が結合しているためと思われる。WOLFらの説¹⁴⁾に従い、11S成分が加熱によってAサブユニットとBサブユニットに分かれるとすると、ミオシン A の11S成分への凝集体形成抑制作用は、ミオシン A と Bサブユニットとの反応と考えられる。すなわち、ミオシン A と 11S成分の混合物を加熱すると11Sはサブユニットに分れるが、ミオシン A が存在するため、Bサブユニット同志の会合が起らず、Bサブユニットがミオシン A 分子の周囲に結合するのであろう。しかも、ミオシン A 分子へのBサブユニットの会合点がBサブユニット同志の会合点と同じであるために、ミオシン A 周囲のBサブユニット間での結合が起らず、そのために大きな凝集体の形成が見られなくなるのではないだろうか。

要 約

1) ミオシン A と大豆タンパク質 11S成分を共存させて、凍結乾燥や-25°C凍結という低温処理をしても相互作用は見られないような結果が得られたが、両タンパク質の混合物の溶解性は、ミオシン A のそれと類似す

るようになることが認められた。

2) 大豆酸沈澱タンパク質は11S成分に比べて凝集体形成開始の温度が低く、高温域でも11S成分に見られるような大きな凝集体を形成しない。

3) ミオシン A, ミオシン B は 11S成分と酸沈澱タンパク質の凝集体形成を抑制する。

4) 大豆酸沈澱タンパク質はミオシン A とミオシン B の凝集体形成を抑制する。

5) 大豆タンパク質の凝集体形成にはS-S結合が寄与するが、ミオシン A やミオシン B という筋肉タンパク質ではS-S結合の寄与は見られず、大豆タンパク質・筋肉タンパク質の相互作用もS-S結合によらない。

文 献

- 1) 橋詰 和宗・北進一郎・渡辺 篤二：日本食品工業学会誌 16, 10 (1969).
- 2) W. J. WOLF and D. R. BRIGGS: Arch. Biochem. Biophys. 85, 186 (1959).
- 3) K. SAIO, T. MATSUO and T. WATANABE: Agr. Biol. Chem. 34, 1851 (1970).
- 4) S. V. PERRY: "Methods in Enzymology", S. P. COLOWICK and N. O. KAPLAN eds., Vol. 3, p. 582, Academic Press, New York (1957).
- 5) A. SZENT-CYÖRGYI: "Chemistry of Muscular Contraction", 2nd ed., Academic Press, New York (1951).
- 6) C. H. FISKE and Y. SUBBAROW: J. Biol. Chem. 66, 375 (1925).
- 7) G. L. ELLMAN: Arch. Biochem. Biophys. 82, 70 (1959).
- 8) J. F. ROBYT, R. J. ACKERMAN and C. G. CHITTENDEN: Arch. Biochem. Biophys. 147, 262 (1972).
- 9) H. E. HUXLEY: J. Mol. Biol. 7, 281 (1963).
- 10) K. HASHIZUME, K. KAKIUCHI, E. KOYAMA and T. WATANABE: Agr. Biol. Chem. 35, 449 (1971).
- 11) 花房尚史：凍結・乾燥と細胞障害，梶井外喜男編，東大出版会，p. 1 (1970).
- 12) 渡辺篤二・中山 修：農化 36, 890 (1962).
- 13) 齋尾恭子・若林 昭・渡辺篤二：農化 42, 90 (1968).
- 14) W. J. WOLF and T. TAMURA: Cereal Chem. 46, 331 (1969).
- 15) K. SAIO, M. KAJIKAWA and T. WATANABE: Agr. Biol. Chem. 35, 890 (1971).
- 16) N. CATSIMPOOLAS, S. K. FUNK and E. W. MEYER: Cereal Chem. 47, 331 (1970).

Summary

1) The mixture of myosin A and soybean 11S component was treated under low temperature, *i. e.*, freeze-drying and freezing at -25°C . It seemed that there was no interaction between myosin A and 11S component. However, it was recognized that the solubility of mixture after the treatment was similar to that of myosin A treated under the same conditions.

2) Judging from turbidimetric measurements, at higher temperatures above 0°C soybean acid precipitated protein started aggregating from 50°C , while 11S component aggregated above 80°C . At temperatures from $90\sim 100^{\circ}\text{C}$ 11S component formed visible coagulants, but that was not the case with the acid precipitated protein.

3) Myosin A and myosin B inhibited the aggregation of the soybean 11S component and the acid precipitated protein.

4) The soybean acid precipitated protein inhibited the aggregation of myosin A and myosin B.

5) From the experimental results obtained by using-SH blocking reagents such as N-ethylmaleimide and β -mercaptoethanol, it has been thought that the aggregation of soybean proteins was attributed to the formation of disulfide bond(s) among molecules, that the aggregation of muscle myofibrillar proteins such as myosin A and B had nothing to do with oxidation or exchange of thiol groups, and that the interaction observed between the soybean proteins and the muscle proteins occurred through the reaction other than the formation of disulfide bonding among protein molecules.