

## 筋肉タンパク質と大豆タンパク質との相互作用 (第2報) ミオシンBと7S成分との相互作用

山 本 克 博\*・梶 山 佳 秀\*・鮫 島 邦 彦\*

(肉製品製造学研究室)

### The Interaction between muscle protein and soybean protein (Part2) The interaction between myosin B and 7S protein

Katsuhiro YAMAMOTO\*, Yoshihide KAJIYAMA\*, and Kunihiko SAMEJIMA\*  
(April, 1977)

#### 緒 論

肉製品への植物タンパク質の添加は最近広く行なわれるようになり、中でも大豆タンパク質が最も多く利用されている。本来肉製品を構成する筋肉タンパク質とは全く異質の大豆タンパク質を混入させて肉製品を製造する場合、両タンパク質の間でどのような相互作用が起こるのかを知ることは、製品の品質改良を進めるうえで重要なこととなる。しかし、この方面の研究は実際的な応用面からの研究が多く、基礎的なタンパク質レベルでの研究は殆んどなされていない。著者らは先に筋肉タンパク質のミオシンAおよびミオシンBと大豆の11S成分との相互作用について報告した<sup>1)</sup>が、今回大豆のもう一つの主要な成分である7S成分とミオシンBとの相互作用について検討し若干の知見を得たので報告する。

#### 実験材料および方法

##### 大豆の7S成分タンパク質の調製

*n*-ヘキサンで脱脂した大豆粉に10倍量の水を加え室温で1時間攪拌し抽出した。遠心分離(10,000 rpm, 30 min)を行ない、得られた上清部を0℃で1晩放置した。遠心分離(10,000 rpm, 30 min)を行ない、上清部に塩化カルシウムを0.0125 Mとなるように加え攪拌した。遠心分離(5,000 rpm, 20 min)を行ない、得られた上清部に塩酸を滴下攪拌しながらpHを4.6に合わせ、更に遠心分離(5,000 rpm, 20 min)して酸沈澱タンパク質を得た。酸沈澱タンパク質に少量の水酸化ナトリウムを加えて中和し、最終的に0.4 M塩化

ナトリウム, 35 mM リン酸緩衝液 (pH7.6) に溶解させ, 遠心分離 (10,000 rpm, 30 min) して得られた上清部を 7 S 成分とした。

### ミオシン B の調製

ミオシン B はウサギの骨格筋から Szent-Györgyi の方法<sup>7)</sup>で調製し, 最終的に 7 S 成分の場合と同様の溶液に溶解させた。

### タンパク質量

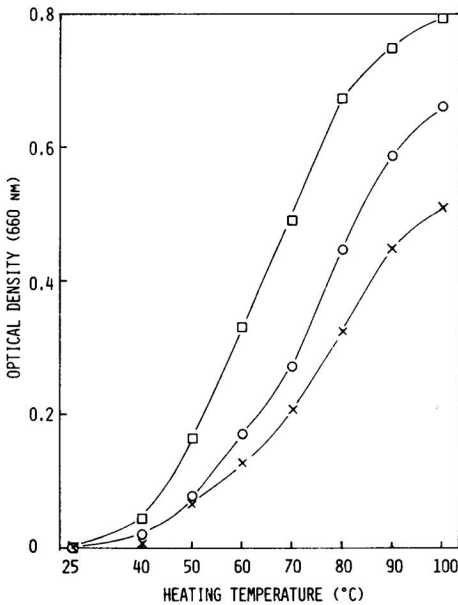
タンパク質濃度はあらかじめマイクロケルダール法による検量線作成の後, ビウレット法により測定した。

### 加熱操作

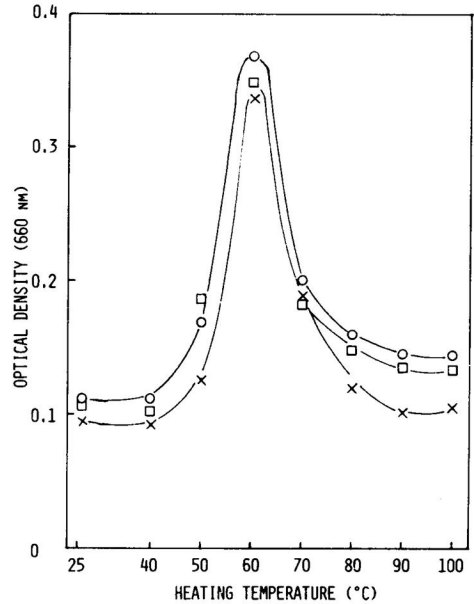
0.4 M 塩化ナトリウム, 35 mM リン酸緩衝液 (pH7.6) に溶解させたタンパク質を所定の濃度に調整し, 所定の温度の恒温槽中で 15 分間保持した後水冷した。試料を室温に戻した後 660 nm での吸光度を測定し, 凝集体形成の指標とした。凝集体形成に際しての S H 基の関与を調べるためには, NEM (N-Ethylmaleimide) および  $\beta$ -メルカプトエタノールをそれぞれ最終濃度 2 mM, 10 mM となるように試料に加えた。

## 結果および考察

7 S 成分を単独で加熱した場合の濁度変化を Fig. 1 に示した。7 S 成分は加熱の温度を高めることにより濁度もそれに比例して上昇し, 100°C で最高に達した。7 S 成分では濁度の上昇は 50°C 以上から観察されたのであるが, 11 S 成分を加熱した場合<sup>8)</sup>は 90°C 以上にならないと濁度の上昇が見られない。11 S 成分では凝集体形成や会合に際して SH 基の関与が知られている<sup>11,6,8)</sup>ので, 7 S 成分での SH 基の関与を NEM あるいは  $\beta$ -メルカプトエタノールを添加して濁度変化を調べた。その結果, NEM の場合は凝集体形成が抑制され, 逆に  $\beta$ -メルカプトエタノールの場合は促進された。NEM 添加による凝集体形成の阻害は 7 S 成分の場合, 11 S 成分<sup>8)</sup>に比べてその程度が小さかった。この原因は両タンパク質の S H 含量の差に由来するものであろう。すなわち 7 S 成分の SH 基は 11 S 成分の約 14% しか含まれていない<sup>4)</sup>からである。NEM はタンパク質分子表面の遊離の SH 基と結合し, その結果タンパク質間の S-S 結合形成が阻害され凝集体が形成されにくくなったと考えられる。一方,  $\beta$ -メルカプトエタノールの場合は S-S 結合を解裂させる作用をもつので, タンパク質分子の構造が変化し, そのため S-S 結合以外の結合による凝集体形成が促進されるのではないかと考えられる。Catsimpoolas ら<sup>2)</sup>は 11 S 成分の凝集体形成に際し, イオン結合や疎水結合の寄与を示唆しており, 7 S 成分でも同様のことが起こっているものと思われる。7 S 成分も 11 S 成分も凝集体形成の際の NEM や  $\beta$ -メルカプトエタノールの作用



**Fig. 1** Effect of SH reagents on turbidity of 7S protein by heating  
○; control, ×; NEM, □; β-mercaptoethanol  
Protein concentration was 2 mg/ml.

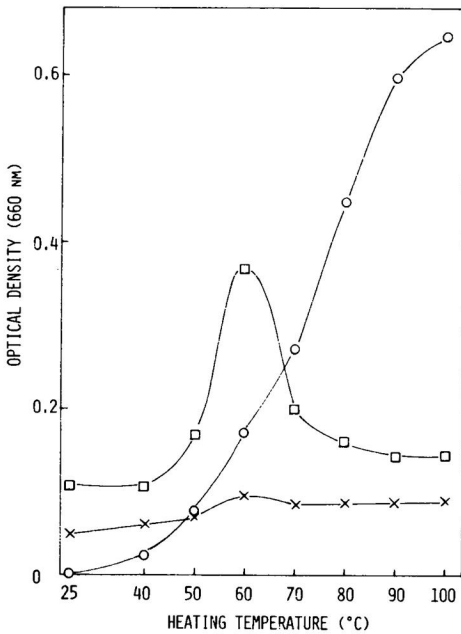


**Fig. 2** Effect of SH reagents on turbidity of myosin B by heating  
The protein concentration and symbols are the same as those in Fig. 1.

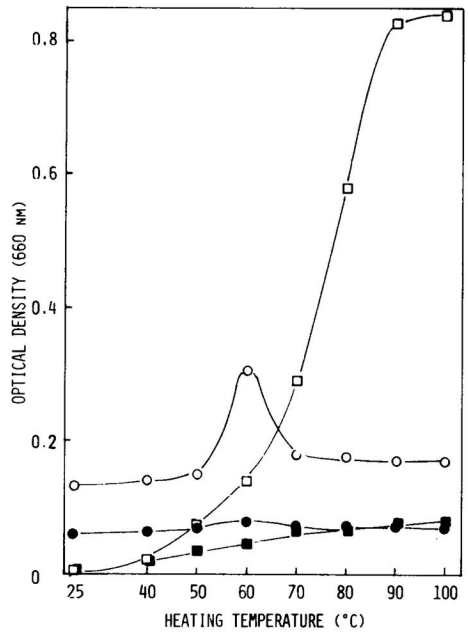
は同様であり、凝集体形成へのSH基の寄与が考えられたが、7S成分と11S成分とでは凝集体形成開始の温度に差が見られた。7S成分と11S成分の分子の立体構造は両者とも $\alpha$ -ヘリックスを殆んど含まないコンパクトな形をした分子であるが、それらを構成するサブユニットに差があることが知られており<sup>3)4)5)</sup>、温度に対する感受性の差はこれらサブユニットの差違に由来するものと思われる。

ミオシンBの加熱による濁度変化は7S成分の場合とは異なり、60°Cでピークとなる変化が観察され、またSH試薬の影響は殆んどなかった (Fig. 2)。ミオシンBはミオシンAとアクチンから成っているが、ミオシンA単独の加熱による濁度変化<sup>8)</sup>もミオシンBと同様であり、凝集体形成へのアクチンの寄与は殆んどないと考えられる。

このように凝集体形成の最適温度が7S成分では90~100°C、一方ミオシンBでは60°Cと両者では差のあることが分かったが、次に両者を共存させた場合の濁度変化を調べた。Fig. 3は両者を重量比1:1で混合して加熱した場合の濁度変化を示している。混合物の



**Fig. 3** Changes in turbidity of the mixture of two proteins by heating  
 □; myosin B (2 mg/ml), ○; 7S protein (2 mg/ml),  
 ×; myosin B (1 mg/ml), +7S protein (1 mg/ml)

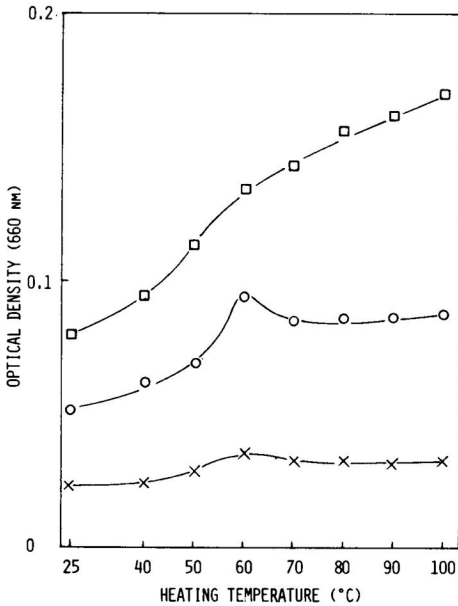


**Fig. 4** Effect of the ratio of two proteins in the mixture on turbidity  
 ○; myosin B (4 mg/ml), □; 7S protein (4 mg/ml),  
 ●; myosin B (3 mg/ml), +7S protein (1 mg/ml),  
 ■; myosin B (1 mg/ml), +7S protein (3 mg/ml)

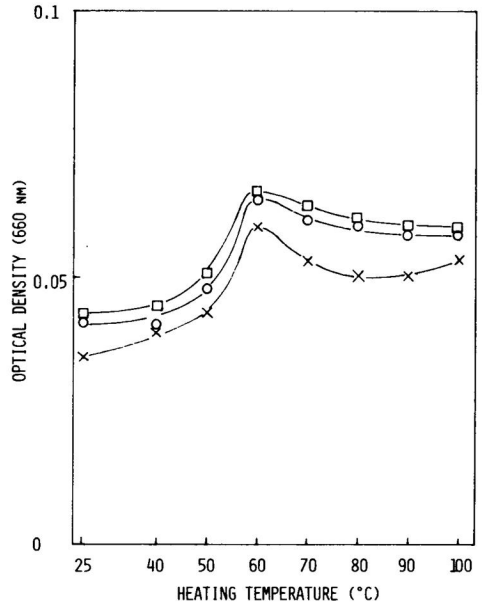
濁度変化はミオシンB単独の場合と似た傾向を示したが、60°Cでの濁度はミオシンB単独の場合よりもかなり低かった。両タンパク質間に相互作用がないとすると混合物の濁度は両者の和となると考えられるが、本実験ではそのような結果は得られず、両タンパク質間に何らかの反応が生じたものと考えられた。

Fig. 4は7S成分とミオシンBとを3:1あるいは1:3の割合で混合して加熱した場合の濁度変化を示している。ミオシンBの割合が高い場合は60°Cに濁度の最大値を示したが、全体に濁度の値は小さかった。一方7S成分が多い場合は温度の上昇に伴って濁度も徐々に増加し100°Cで最大値に達した。混合物の濁度はいずれの場合も7S成分あるいはミオシンB単独での濁度の値を下回っており、凝集体形成時の相互作用が示唆された。

Fig. 5は両タンパク質の混合比を1:1として全体のタンパク質濃度を変化させて加熱した時の濁度変化を示している。タンパク質濃度2および4 mg/mlの場合はともに60



**Fig. 5** Effect of protein concentration of the mixture on turbidity  
7S protein and myosin B were mixed at the weight ratio of 1 : 1. Total protein concentration was 2mg/ml (×), 4mg/ml (○), and 8mg/ml (□), respectively.



**Fig. 6** Effect of SH reagents on the formation of coagulation by heating of the mixture of 7S protein and myosin B  
7S protein was treated with 2 mM NEM or 10 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, then myosin B was added. Protein concentration was 2mg/ml. ○; control, ×; NEM, □;  $\beta$ -mercaptoethanol

°Cに最大値をもつミオシン型の濁度変化を示したが、8 mg/ml の場合は 100°Cに最大値をもつ 7 S 型の濁度変化を示した。このようなタンパク質濃度の違いによる濁度変化の差違がなぜ見られたのかは本実験では明らかではなかった。

7 S の凝集体形成には SH 基が関与していることが Fig.1より分かったので、混合物の凝集体形成時の SH 基の関与を検討した (Fig. 6)。SH 試薬の有無にかかわらず濁度の最大値は 60°Cで観察された。

以上の結果、7 S タンパク質とミオシン B とを混合させた場合、その濁度変化はミオシン B 単独の場合と同様の結果を示すことが分かったが、これは 7 S タンパク質を取り囲むようにしてミオシン B が結合し、更に外側のミオシン B 間で相互作用が起こって全体としてミオシン B 型の濁度変化が見られたものと思われた。

## 要 約

7 S 成分は加熱温度の上昇にともなって濁度の増加を示し 100°C で最大値に達した。一方ミオシン B は 60°C において濁度の最大値を示した。凝集体形成に際して 7 S 成分の場合は SH 基の関与が見られたが、ミオシン B では否定的であった。

両タンパク質の混合物の濁度変化はミオシン B 単独の場合と類似した傾向を示したが、濁度変化の度合はミオシン B 単独の場合と比べて小さく、両者の間に相互作用が起こっているものと考えられた。また両タンパク質による凝集体形成には SH 基の関与は否定的であった。

## 謝 辞

本論文をまとめるにあたり御校閲をいただいた北海道大学安井勉教授ならびにアブサー・ウル・ハスナイン氏に謝意を表する。

## 文 献

- 1) Briggs, D. R. and W. J. Wolf, 1957. Studies on the cold-insoluble fraction of the water extractable soybean proteins. *Arch. Biochem. Biophys.*, **72** : 127–144.
- 2) Catsimpoalas, N., S. K. Funk, and E. W. Meyer, 1970. Thermal aggregation of glycinin subunits. *Cereal Chem.*, **47** : 331–344.
- 3) Catsimpoalas, N., D. A. Rogers, S. J. Circle, and E. W. Meyer, 1967. Purification and structural studies of the 11 S component of soybean proteins. *Cereal Chem.*, **44** : 631–637.
- 4) 福島男児・越山育則, 1967. 大豆グロブリンの 7 S および 11 S 成分. *食品工業*, 8 月号, 104–118.
- 5) Koshiyama, I., 1971. Some aspects of subunit structure of a 7S protein in soybean globulins. *Agr. Biol. Chem.*, **35** : 385–392.
- 6) Saio, K., M. Kajikawa, and T. Watanabe, 1971. Food processing characteristics of soybean proteins. *Agr. Biol. Chem.*, **35** : 890–898.
- 7) Szent-Györgyi, A., 1951. "Chemistry of Muscular Contraction", 2nd ed., pp. 151, Academic Press, New York.
- 5) 山本克博・深沢利行・安井勉 1973. 筋肉タンパク質と大豆タンパク質との相互作用. *北海道大学農学部邦文紀要*, **9** : 116–126.

### Summary

Upon heating, the turbidity of the solution of the soybean 7S component was found to increase with the elevation of temperature. From studies on the effect of NEM and  $\beta$ -mercaptoethanol on heat-coagulation of the 7S component, it was considered that SH group(s) of this protein play some role in this phenomenon. On the other hand, the maximum turbidity due to heating of myosin B solution appeared at 60°C and its SH group(s) did not appear to participate in the changes in turbidity.

When the proteins were mixed and heated, changes in the turbidity of solution showed the same tendency as that of myosin B alone, with the difference that the turbidity changes were of a lesser extent than those of myosin B. This indicates that there may exist some sort of interaction between 7S protein and myosin B. It was recognized, in this case, that SH group(s) of both proteins do not contribute to the coagulation phenomenon upon heating.