

メロンプロテアーゼの性質と 筋肉タンパク質に対する作用

石下 真人*・武田 浩 郁*・H. D. ZAKPAA**・鮫 島 邦 彦*

Isolation and Partial Characterization of Protease from Melon Fruit and Its Proteolytic Action against Myofibrillar Proteins

Makoto ISHIOROSHI, Hirofumi TAKEDA, Hilary D. ZAKPAA
and Kunihiko SAMEJIMA

(June, 1993)

緒 論

食肉の品質はさまざまな要因によって決定されるが、なかでも硬さはもっとも重要な因子の一つである。肉の硬さは主に二つの要因によって決定される⁸⁾。その一つは筋肉の結合組織の量と質によるもので、加齢とともに筋肉内の結合組織の主成分であるコラーゲン繊維が増加し、コラーゲン分子が側面架橋して筋肉の線維を包むように強固な網目構造を形成するため、肉は硬くなる。老齢家畜の肉が硬く商品価値が劣るのは、このような理由によるものである。もう一つの要因は、筋原線維の太いフィラメントと細いフィラメントを構成している、ミオシンとアクチンの結合の量である。と殺した家畜の筋肉は死後硬直を起こし硬くなる。これはミオシンとアクチンが強固に結合して、筋肉が収縮するためである。通常の筋肉はこの後、熟成という過程を経て筋原線維のZ線が脆弱化したり³⁾ ミオシンとアクチンとの結合が弱まって¹³⁾、柔らかくなり、食肉として利用される。しかし軟化の速度や程度は、家畜の種類、品種、性別、年齢、筋肉の部位、と畜やと体の取扱い方法などさまざまな要因によって異なる。

硬い肉を柔らかくするには、硬さの原因となるタンパク質をタンパク質分解酵素(プロテアーゼ)で分解する方法がある。食肉の軟化によく使用されるプロテアーゼとしては、パパイヤから調製されたパパインがある。パ

パインは基質特異性の広い、広範囲のpHや温度で安定な、活性の高い、強力なプロテアーゼである。しかしパインのこの性質が逆に欠点となり、タンパク質の過度の分解が生じ、軟化の程度が進みすぎることがある⁵⁾。それ故に、硬さの要因となるタンパク質を特異的に分解するような、食肉軟化剤として最適のプロテアーゼが開発されれば、老廃家畜のような商品価値の劣る肉の有効利用が可能になる。

新規食肉軟化剤の開発に関する最近の研究では、アスペルギルス属のプロテアーゼを用いた鈴木ら¹¹⁾、バチルス属のアルカリエラスターゼを用いた Takagi ら¹²⁾の報告がある。また我々はさまざまな果実のプロテアーゼを調べ、そのなかでキウイフルーツに含まれるプロテアーゼが有望であると報告している¹⁰⁾。さらに北海道産の果実に着目して調査を行った結果、メロンに強力なプロテアーゼが含まれることが判明した。

本研究では、メロンに含まれるプロテアーゼの抽出および分離方法を確立して、その性質を明らかにするとともに、食肉軟化剤としての可能性を検討するために、メロンプロテアーゼの筋原線維タンパク質に対する作用を調べた。

実験材料および方法

1. 実験材料と試薬

試料には、夕張市農業協同組合から提供を受けた夕張

* 食肉軟化剤としてのメロンプロテアーゼ 酪農学園大学・食品科学科 北海道江別市文京台緑町
Department of Food Science, Rakuno Gakuen University (Ebetsu, Hokkaido, Japan).

** ガーナ大学・食品科学科
Department of Food Science, University of Ghana (Legon, Accra, Ghana).

産および北海道内各地で生産された市販のメロンを使用した。タンパク質濃度を測定するためのプロテインアッセイ[®]は、バイオラッド社から購入した。その他の試薬は国産特級品を使用した。

2. 実験方法

2.1 プロテアーゼの抽出条件の検討と分画

メロンからプロテアーゼの効率的な抽出条件を確立するため、種々の溶媒で抽出を行い、その上清液と沈澱の活性を測定した。メロンの果肉重量に対して1/2容量の冷却した抽出溶媒を加え、ミキサーでホモジナイズした。4°Cで3時間攪拌後、約8,000×gで15分間遠心分離して上清と沈澱の活性を測定し、遠心分離前の全活性に対するそれぞれの活性の割合を算出した。沈澱の活性測定では、除いた上清と等容量の抽出溶媒を加え、ホモジナイズして使用した。活性測定のための反応は、各画分に等容量の0.4% カゼイン、40 mM 3-(N-Morpholino) propanesulfonic acid (MOPS, pH 7.0) を混合して、35°Cで行った。等容量の10% TCA の添加で反応を停止し、濾液の280 nmの吸光度を測定した。このようにして、上清液に最も高い活性が得られた抽出溶媒を使用して、メロンからプロテアーゼを抽出した。上清液に対して55% 飽和となるよう固形硫酸アンモニウムを加えて溶解し、生じた沈澱を約8,000×g、15分間の遠心分離により集めた。沈澱を少量の蒸留水に懸濁し、0.3 M NaCl に透析して硫酸アンモニウムを除いた後、以下の実験に用いた。

2.2 プロテアーゼの活性測定

メロンから抽出、分画したプロテアーゼの性質を明らかにするために、カゼインを基質として種々の温度、pH、NaCl 濃度で活性を測定し、至適条件ならびに安定性を調べた。反応液の組成は0.2% カゼイン、20 mM 緩衝液、酵素タンパク質に対する基質の比を1:50とした。反応を等容量の10% TCA の添加で停止し、濾液の280 nmの吸光度を測定した。活性は1分当り、粗酵素タンパク質1 mg 当りの吸光度の上昇率で表した。

2.3 ミオシンおよび筋原線維の調製

ミオシンと筋原線維は家兎骨格筋から Perry⁹⁾ ならびに Knight and Trinick⁶⁾ の方法でそれぞれ調製した。

2.4 タンパク質濃度の測定

分画したメロンプロテアーゼのタンパク質濃度はプロテインアッセイ[®]を用いて、ミオシンと筋原線維のタンパク質の濃度はビュレット法²⁾で測定した。標準には牛血清アルブミンを用いた。

2.5 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

メロンから分離したプロテアーゼによるミオシンなら

びに筋原線維タンパク質の分解過程は Laemmli の方法¹⁾に従って SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で調べた。プロテアーゼに対するミオシンならびに筋原線維のタンパク質の比を1:100として、NaCl 濃度(0.6 M, 0.15 M), 温度(35, 0°C), pH(6.0, 7.0)を変えて反応を行い、タンパク質分解の経時的变化を7.5~25% グラジエントゲルで分析した。

実験結果

1. プロテアーゼの抽出

食品への使用という本研究の目的から、プロテアーゼの抽出溶媒の選択には、安全性や抽出効率、価格などを考慮する必要がある。また特殊な試薬や緩衝液の使用も避けた。そこでまず水での抽出を試みたが、メロンプロテアーゼを水で抽出した場合、上清に抽出される活性は遠心分離前の全活性のわずか40%であった。さまざまな抽出溶媒を検討した結果、NaCl 濃度の上昇とともに上清のプロテアーゼ活性が高くなり、0.9 M 以上で約90%が抽出されることが判明した(Fig. 1)。すなわち、メロンの果肉の1/2量の0.9 M NaClを加えているので、このプロテアーゼはおよそ0.3 M 以上のNaClで溶

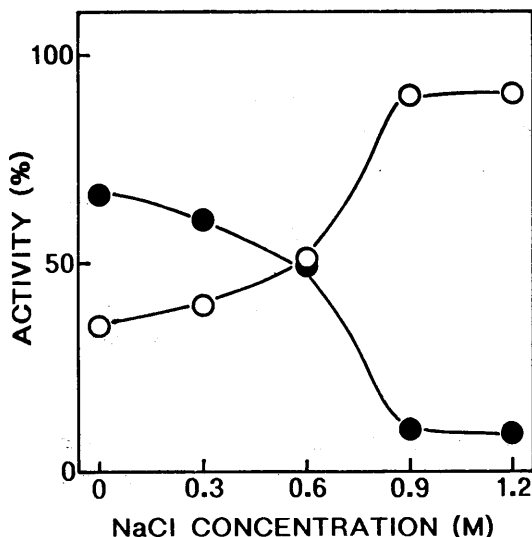


Fig. 1. Effect of NaCl concentration on the extractability of protease from melon fruits.

The melon pulp was homogenized with a half volume of various concentrations of NaCl and centrifuged. The activities of supernatants and precipitates were expressed as relative values of the total activity before centrifugation.

○, supernatant; ●, precipitate.

解する、塩溶性のタンパク質であると推定される。NaClであれば、食品への使用にはまったく問題はない。そこでこの抽出液から硫酸アンモニウムによる塩析でプロテアーゼを分画し、以下の実験に用いた。メロンの果肉1 kgからの粗プロテアーゼの収量は0.3~0.5 gであった。なお図には示していないが、この標品の電気泳動の結果から、プロテアーゼの分子量は約6万で、純度は10~20%程度と思われる。また産地の違いによる電気泳動のパターンには差は認められず、活性の強さにも明確な傾向はなかった。活性や収量はメロン個々の差による影響が大きく、これは収穫時期や熟度などの要因が関与しているのかもしれない。

2. プロテアーゼの性質

メロンプロテアーゼの活性のpH 7.0における温度依存性をFig. 2に示した。活性は温度が高くなるとともに著しく上昇し、75°Cで最大に達した。それ以上の温度では、活性は急激に低下した。Fig. 3は35°Cにおける活性のpH依存性を調べた結果である。活性はpHとともに上昇し、pH 10.5で最大になって、それ以上のpHでは低下した。

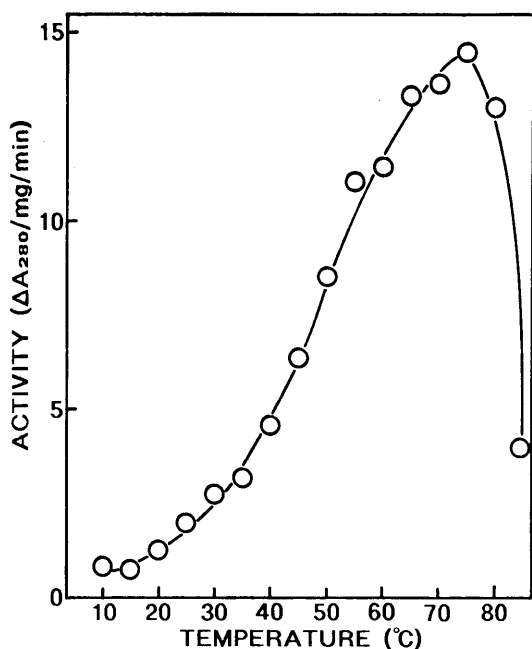


Fig. 2. Effect of temperature on the proteolytic activity of melon protease.

Reaction mixtures containing 80 μg/ml crude melon protease, 4 mg/ml casein, 0.15 M NaCl and 20 mM MOPS (pH 7.0) were incubated at various temperatures.

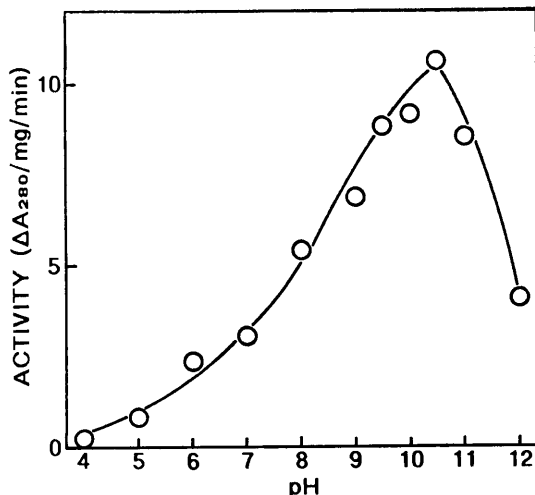


Fig. 3. Effect of pH on the proteolytic activity of melon protease.

Reaction mixtures containing 80 μg/ml crude melon protease, 4 mg/ml casein, 0.15 M NaCl and various pH of 20 mM buffers were incubated at 35°C. The buffers used were citrate (pH 4.0 and 5.0), phosphate (pH 6.0 and 7.0), MOPS (pH 7.0), Tris-HCl (pH 8.0 and 9.0), carbonate (pH 10.0 and 10.5) and NaHPO₄-NaOH (pH 11.0 and 12.0).

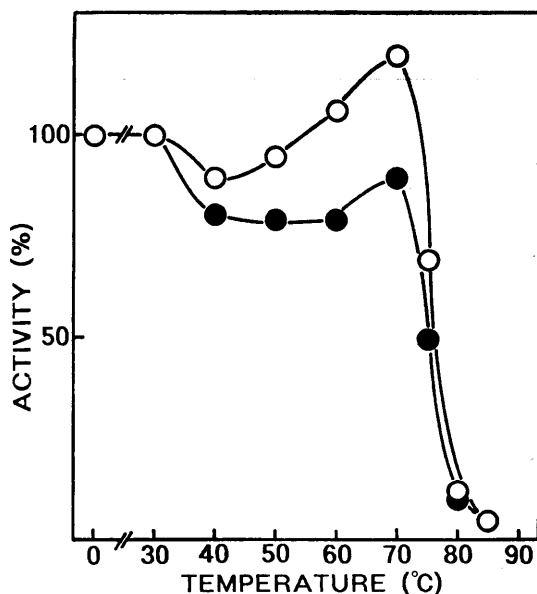


Fig. 4. Effect of temperature on the stability of melon protease.

Crude melon protease (3 mg/ml) in 20 mM MOPS (pH 7.0, ○) or carbonate (pH 10.5, ●) was preincubated at various temperatures for 30 min, and the remaining activity was then measured at pH 7.0 and 35°C. The other conditions were the same as in Fig. 2.

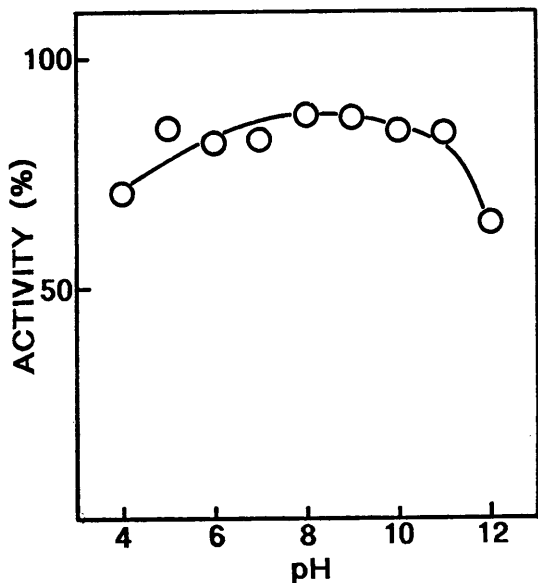


Fig. 5. Effect of pH on the stability of melon protease.

Crude melon protease (3 mg/ml) in various pH of buffers was preincubated at 35°C for 20 hr, and the remaining activity was then measured at pH 7.0 and 35°C. The other conditions were the same as in Fig. 3.

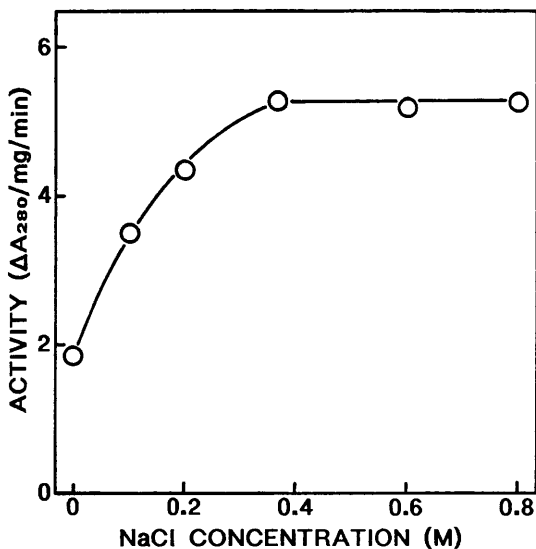


Fig. 6. Effect of NaCl concentration on the proteolytic activity of melon protease.

Reaction mixtures containing 80 μg/ml crude melon protease, 4 mg/ml casein, 20 mM MOPS (pH 7.0) and various concentrations of NaCl were incubated at 35°C.

さらに温度安定性を pH 7.0 と 10.5 で調べ、その結果を Fig. 4 に示した。プロテアーゼ活性は 30°C 以上の加熱でやや低下したが、70°C までの温度で再び上昇して、それ以上では急激に低下した。つぎに pH 安定性の結果を Fig. 5 に示した。35°C、20 時間の加熱においても、pH 6~10 の範囲ではおよそ 90% の活性が残存していた。これらの結果から、このプロテアーゼは非常に高い温度と pH に活性の至適条件を持つとともに、きわめて安定性の高い酵素であることがわかった。

Fig. 6 は pH 7.0、35°C における、メロンプロテアーゼの活性に及ぼす NaCl 濃度の影響を示した。活性は NaCl 濃度の上昇により高くなり、0.4 M NaCl ではおよそ 2.5 倍に達し、それ以上では変化しなかった。このプロテアーゼは 0~0.4 M NaCl の範囲で塩濃度依存性を示して、ほぼ直線的に活性が上昇した。

3. プロテアーゼによるミオシンの分解

Fig. 7 は 35°C で pH (6.0, 7.0) と塩濃度 (0.6 M, 0.15 M NaCl) を変えてメロンプロテアーゼで処理した場合の、ミオシンの分解過程を電気泳動で調べた結果である。pH 7.0、0.6 M NaCl の条件 (図、左上) ではミオシン重鎖の分解は非常に速く、反応 2 分後には重鎖のバンドはすでに消失し、多数の分解産物のバンドが出現した。その後の 60 分までの間に高分子量の分解産物がさらに分解を受けるが、変化は小さかった。ミオシン軽鎖はわずかながら減少したが、その速度は重鎖と比較すると非常に遅かった。pH を 6.0 にすると (図、右上)、分解速度が遅くなると同時に重鎖の分解の様子も異なっていた。分解産物の分布は少なくなり、最終的に 2 カ所 (矢印) に分解産物が蓄積した。軽鎖についてみると、pH 7.0 よりむしろ分解が速かった。pH 7.0 で NaCl 濃度を 0.15 M にすると (図、左下)、分解過程は 0.6 M の場合とはまったく異なっていた。重鎖の分解速度は非常に遅くなり、分子量約 10 万の位置に分解産物が蓄積した。それよりも分子量の小さいバンドもわずかながら出現した。軽鎖では LC 1 が分解され、すぐ下にその産物のバンドが現われた。しかし他の軽鎖は分解されなかった。同じ塩濃度で pH 6.0 にすると (図、右下)、重鎖と軽鎖の分解過程にほとんど変化はなく、分解速度がやや遅くなった。

4. プロテアーゼによる筋原線維タンパク質の分解

実際の食肉に近い塩濃度と pH (0.15 M NaCl, pH 6.0) で筋原線維をメロンプロテアーゼで処理し、分解過程の電気泳動図を Fig. 8 に示した。5°C で分解した場合をみると、筋原線維の主要成分であるミオシンの重鎖は二段階の分解を受け、主に分子量約 10 万の位置に分解産物

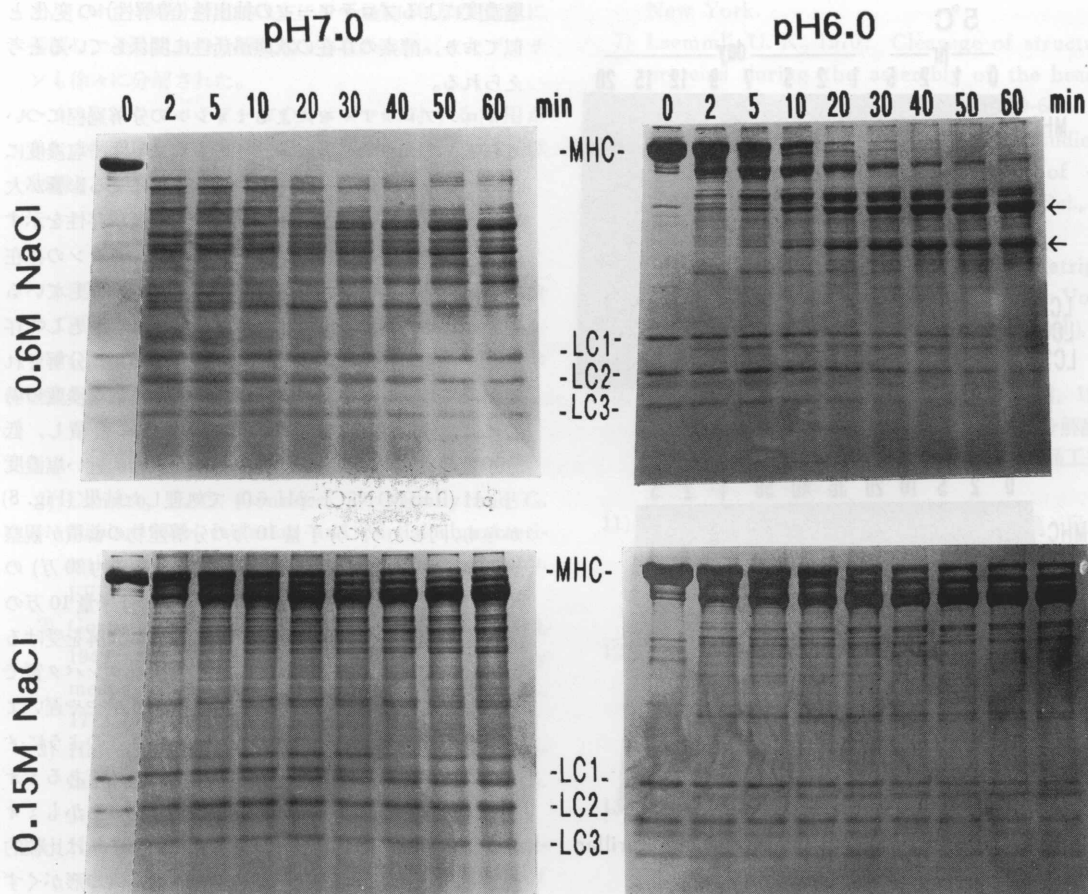


Fig. 7. Time course of hydrolysis of myosin by melon protease.

Myosin (5 mg/ml) was incubated with crude melon protease (50 μ g/ml) in 0.6 M or 0.15 M NaCl at pH 7.0 or 6.0 and 35°C. After an appropriate interval, an aliquot was withdrawn and the reaction was stopped by the addition of 10% SDS and heating at 100°C for 5 min. Arrows indicate two main digestion products of myosin heavy chain. MHC, myosin heavy chain; LC 1, LC 2 and LC 3, myosin light chain 1, 2 and 3, respectively.

が蓄積した。処理時間を長くしてもこの分解産物がさらに分解されることはなかった。アクチンはミオシン重鎖よりも分解速度が遅いようであるが、徐々に分解された。処理温度を 35°C にして同様の実験を行ったが、分解速度が異なるだけで、分解過程には大きな差はなかった。筋原線維におけるミオシンの分解を、同じ条件のミオシン単独で行った Fig. 7 の結果 (右下) と比較すると、分解過程は類似していた。

考 察

メロンのプロテアーゼに関しては、すでにいくつかの報告がある^{1,4,14,15}。しかし抽出溶媒について詳しく検討

されておらず、塩濃度の上昇によりプロテアーゼの抽出効果が高まる (Fig. 1) ことは、本研究で初めて明らかにされた。実験結果には示していないが、メロンから水で抽出した抽出液の濁りを除くために、酢酸セルロース膜や珪藻土を用いて濾過を行うと、濾液にはまったく活性が失われてしまった。同様の操作を 0.9 M NaCl の抽出液で行うと、濾液の活性はほとんど失われなかった。したがって、このプロテアーゼは塩溶性であり、水で抽出した場合、遠心分離では沈澱しないが溶解しておらず、濾過で除去されたと考えられる。ただしこの性質がプロテアーゼ自身によるものなのか、あるいは共存する不純物の影響なのかは不明である。いずれにせよメロンから

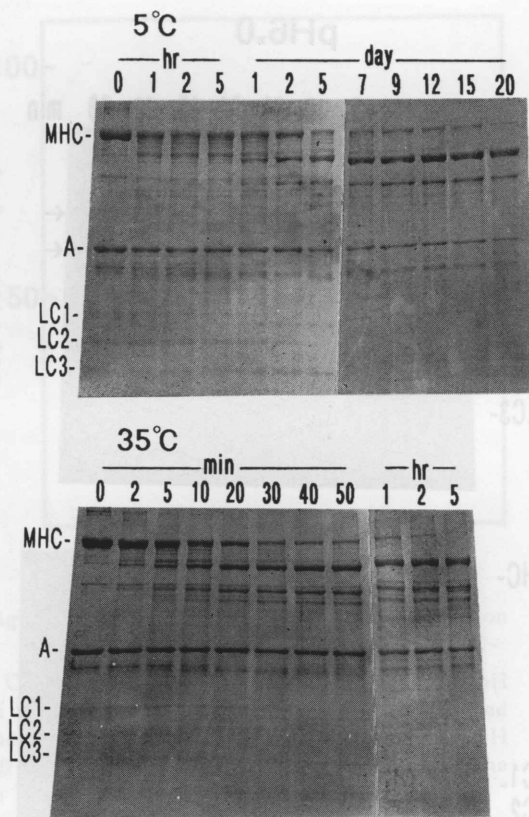


Fig. 8. Time course of hydrolysis of myofibrillar proteins by melon protease.

Myofibril (5 mg/ml) was incubated with crude melon protease (50 μ g/ml) in 0.15 M NaCl at pH 6.0 and 4°C (upper gel) or 35°C (lower gel). After an appropriate interval, an aliquot was withdrawn and the reaction was stopped by the addition of 10% SDS and heating at 100°C for 5 min. MHC, myosin heavy chain; A, actin; LC1, LC 2 and LC 3, myosin light chain 1, 2 and 3, respectively.

プロテアーゼを効率的に抽出するには、一定以上の濃度の塩が必要であることが判明した。

抽出したプロテアーゼを硫酸アンモニウムによって分離し、カゼインを基質として性質を調べた。Figs. 2~5に示すように、メロンプロテアーゼは非常に高い温度とpHに至適条件を持ち、しかもきわめて安定性の高い酵素であることが判明した。本実験に使用したプロテアーゼは十分に精製されたものではないが、この性質はすでに報告されたメロンプロテアーゼの結果^{1,4,14})とほぼ一致する。さらにこのプロテアーゼの活性は塩濃度依存性を示し、NaClの濃度が0.4 M付近まで直線的に上昇して、その後ほぼ一定になった (Fig. 6)。この傾向は Fig. 1の

塩濃度によるプロテアーゼの抽出性 (溶解性) の変化と似ており、酵素の存在の状態が活性に関係していると考えられる。

メロンプロテアーゼによるミオシンの分解過程についてみると (Fig. 7), 分解の速度や過程は pH や塩濃度によって異なり、同じ pH でも塩濃度の差による影響が大きい。メロンプロテアーゼの活性は塩濃度依存性を示すので、この結果は当然のことであるが、ミオシンの存在状態 (モノマーまたはフィラメント) とも関係していると思われる。高塩濃度ではミオシンはモノマーとして存在し、ミオシン重鎖は広範囲の分子量の断片に分解されるが、ミオシンがフィラメントを形成する低塩濃度の場合には、分解産物は分子量約10万の位置に蓄積し、低分子量のバンドは少ない。筋原線維を食肉に近い塩濃度と pH (0.15 M NaCl, pH 6.0) で処理した結果 (Fig. 8) から、同じように分子量10万の分解産物の蓄積が観察された。このことは、ミオシン重鎖 (分子量約20万) の中央付近に切断箇所があることを示す。分子量10万の分解産物は、処理時間を長くしても、さらに分解を受けることはなかった。もう一つの主要筋原線維タンパク質であるアクチンは、ミオシンよりも分解速度がやや遅いようであるが、徐々に分解された (Fig. 8)。このようにメロンプロテアーゼは食肉の硬さの要因の一つであるミオシンとアクチンを分解することがわかった。しかもミオシンは確実に分解されるが、分解断片の分子量は比較的大きく、パパインを使用した時のような、肉の形がくずれほどの過度の分解⁵⁾は起こらないと思われる。

メロンプロテアーゼを食肉軟化剤として使用するには、硬さのもう一つの要因であるコラーゲンに対する作用、さらに実際に食肉を処理した場合、どの程度柔らかくなるのかなど、調査すべき課題は残されているが、本プロテアーゼは食肉の軟化剤として、有望な酵素であるという結論に達した。

要 約

メロンプロテアーゼの抽出方法を確立し、性質を調べるとともに、筋原線維タンパク質に対する作用から食肉軟化剤としての可能性を検討した。

1) メロンの果肉から最終濃度0.3 MでNaClプロテアーゼを抽出し、硫酸アンモニウムにより分画した。

2) メロンプロテアーゼは75°C, pH 10.5に至適条件を持つきめて活性の高い、しかも安定性の高い酵素であった。

3) 食肉の環境に近い0.15 M NaCl, pH 6.0条件でミオシンおよび筋原線維をこのプロテアーゼで処理する

と、ミオシンの分解産物は主に分子量約10万の位置に蓄積し、それ以上の分解は起こらなかった。またアクチンも徐々に分解された。

4) メロンプロテアーゼのミオシンに対する作用から、本酵素はパパインの欠点を克服する、新しい食肉軟化剤として有望であろう。

謝 辞

本実験に使用したメロンの一部は夕張市農業協同組合のご厚意により提供して頂いた。ここに感謝の意を表します。なお本研究は1992年度酪農学園大学共同研究の助成を受けて行われたことを付記する。

文 献

- 1) Curotto, E. G. González, S. O'Reilly and G. Tapia, 1989: Isolation and partial characterization of protease from *Cucurbita ficifolia*. FEBS Lett., **243**: 363-365.
- 2) Gornall, A. G., J. Bardawill and M. M. David, 1948: Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. J. Biol. Chem., **177**: 751-758.
- 3) Hattori, A. and K. Takahashi, 1982: Calcium-induced weakening of skeletal muscle Z-disks. J. Biochem., **92**: 381-390.
- 4) Kaneda, M., A. Sobue, S. Eida and M. Tomimaga, 1986: Isolation and characterization of proteases from the sarcocarp of snake-gourd fruit. J. Biochem., **99**: 569-577.
- 5) Kang, C. K. and E. E. Rice, 1970: Degradation of various meat fractions by tenderizing enzymes. J. Food Sci., **35**: 563-565.
- 6) Knight, P. J. and J. A. Trinick, 1982: Preparation of myofibrils, In Method in Enzymology Vol. 85, part B. (Frederiksen, D. W. and L. W. Cunningham, ed.), pp. 9-12, Academic Press, New York.
- 7) Laemmli, U. K., 1970: Cleavage of structured proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, **227**: 680-685.
- 8) Marsh, B. B. and N. G. Leet, 1966: Studies in meat tenderness. III. The effects of cold shortening on tenderness. J. Food Sci., **31**: 450-459.
- 9) Perry, S. V., 1955: Myosin adenosinetriphosphatase, In Methods in Enzymology Vol. 2. (Colowick, S. P. and N. O. Kaplan, ed.), pp. 582-588, Academic Press, New York.
- 10) 鮫島邦彦・崔 一信・石下真人・早川忠昭, 1991: 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. 日本食品工業学会誌; **38**: 817-821.
- 11) 鈴木敦士・嶋倉明彦・三木貴司・清水雅範・兒山源太郎・斉藤 信・池内義英, 1990: 屠殺前の蛋白質分解酵素の注射による鶏肉の軟化. 日本食品工業学会誌; **37**: 104-110.
- 12) Takagi, H., M. Kondou, T. Hisatuka, S. Nakamori, Y. C. Tsai and M. Yamasaki, 1992: Effects of an alkaline elastase from alkalophilic *Bacillus* strain on the tenderization of beef meat. J. Agric. Food Chem., **40**: 2364-2368.
- 13) Takahashi, K., F. Nakamura and A. Inoue, 1981: Postmortem changes in the actin-myosin interaction of rabbit skeletal muscle. J. Biochem., **89**: 321-324.
- 14) Yamagata, H., S. Ueno and T. Iwasaki, 1989: Isolation and characterization of a possible native cucumisin from developing melon fruits and its limited autolysis to cucumisin. Agric. Biol. Chem., **53**: 1009-1017.
- 15) Uchikoba, T., Horita, H. and Kaneda, M., 1990: Proteases from the sarcocarp of yellow snake-gourd. Phytochem., **29**: 1879-1881.

Summary

Crude protease was extracted at a final concentration of about 0.3 M NaCl from melon fruits harvested in Hokkaido and isolated by 55% saturation of ammonium sulfate. The proteolytic activity of the melon protease had an optimum temperature of 75°C and pH of 10.5, and was stable at a wide range of temperatures and pH levels. Under conditions similar to meat (0.15 M NaCl and pH 6.0), myosin heavy chain (MW=200,000) was split by melon protease into fragments of molecular weight 100,000 and smaller. The MW 100,000 fragment was not hydrolyzed with a prolonged digestion period. The digestion rate of action was slower than that of myosin under the same conditions. Melon protease

hydrolyzed myosin and actin, myofibrillar proteins which are significant factors of meat toughness, without causing extensive degradation of myosin. These findings suggest that melon protease is promising as a meat tenderizer.