

食肉タンパク質のゲルろ過法について

三上 正幸・門 雅信・三浦 弘之

(受理: 1985年5月30日)

Gel filtration of meat proteins from bovine *M. longissimus thoracis*

Masayuki MIKAMI, Masanobu KADO and Hiroyuki MIURA

摘 要

Sodium dodecyl sulphate (SDS) を含む緩衝液で食肉タンパク質の分別を行った。SDS はタンパク質の溶解性を増すと同時にタンパク質に結合して、SDS-タンパク質複合体を形成するが、緩衝液の濃度を高めることはタンパク質に結合する SDS 含量が減少し、タンパク質のゲルろ過による分別に有効であった。この場合、緩衝液の種類、濃度、SDS 含量および温度などが分別において大きく作用するが、0.3 M NaCl, 0.1% SDS および 0.5 mM 2-メルカプトエタノールを含む 0.025 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) の使用は肉タンパク質の分別に良好であった。

充填ゲルはトヨパール HW-55 Superfine (S), HW-60 Superfine (S) および HW-65 Fine の組合せにより、全肉タンパク質は各タンパク質およびペプチド、アミノ酸画分までが、HW-55 S および HW-60 S の組合せにより、筋漿タンパク質も同様に良く分離された。

緒 言

筋肉の約20%はタンパク質で、筋漿タンパク質、筋原繊維タンパク質および肉基質タンパク質に大別される。これらのタンパク質は更に多くのタンパク質成分に分別され、それぞれのタンパク質成分については数多くの研究がみられる¹⁻⁶⁾。食肉の場合には屠殺後、一般に熟成期間があり、これら各タンパク質成分は時間の経過と共に変化するので、タンパク質全体を同時に研究することも必要である。その目的のために SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) 法が良く用いられている⁷⁻¹⁰⁾。しかしゲルろ過法においては SDS-PAGE 法では観察できない比較的分子量の小さなペプチド、アミノ酸などの変化を知ることができ、また肉タンパク質各成分の分別にも応用できる。

SDS を含む緩衝液を使用したゲルろ過で、Fish ら¹¹⁾ はタンパク質の正確な分子量の測定を行って

る。SDS は種々のタンパク質などに一定の割合で結合し、緩衝液への溶解性を増すことによりゲルろ過ができるが、その分別範囲は SDS-タンパク質複合体の大きさによる。前報¹²⁾において1.5万ダルトンのミオンライトチェーン (MLC) から20万ダルトンのミオンヘビーチェーン (MHC) まで含まれる肉タンパク質の分別にゲルろ過法を応用した。即ち、トヨパール HW-55 Fine, HW-60 Fine および HW-65 Fine を用いて、全肉タンパク質、筋原繊維タンパク質および筋漿タンパク質についてのゲルろ過法を報告したが、タンパク質画分の分別は未だ不十分な点もあった。

近年極微粒子のシリカゲルを充填した小さなカラムで、高圧液送法による高速液体クロマトグラフィー (HPLC) が進歩し、タンパク質およびペプチドのゲルろ過法にも応用できるようになった¹³⁻¹⁶⁾。

そこで本実験では肉タンパク質について分析時間の短い HPLC を用いて緩衝液や SDS の濃度などいく

つかの条件を変え、分別性の良い緩衝液を検討した。また充填ゲルについてはトヨパール HW 系およびセファクリル系などを用い、それぞれの組合せについても同様に検討した。

材料および方法

1. 試料の調製

肉試料は前報¹²⁾と同様に調製し、全肉タンパク質と筋漿タンパク質の2種類を用いた。透析試料の場合は、0.2% SDS, 2mM 2-メルカプトエタノールを含む 0.025 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) で2昼夜透析を行いペプチド、アミノ酸画分を除去した。

2. カラムクロマトグラフィーの条件

1). 緩衝液の選定: これには分析時間の短い高速液体クロマトグラフィー (東洋曹達, HLC-803 D) を用いた。カラムはガードカラム SW (7.5×75mm) を取付けた後に, TSK gel G 2000 SW (7.5×600mm) および TSK gel G 3000 SW (7.5×600mm) を連結して使用した。ピークの検出には 222.5nm の吸光度で測定した。緩衝液は 0.2mM 2-メルカプトエタノール, 0.2% SDS を含む 0.025 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) を基準緩衝液として次の6つの事項, 即ち ① Tris-HCl 緩衝液濃度, ② SDS 濃度, ③ 2-メルカプトエタノール濃度, ④ EDTA 濃度, ⑤ NaCl 濃度, ⑥ 緩衝液の種類について検討し, 流速は 1ml/min で, 分析時の室温は 22~26°C で行った。

2). ゲルカラムの選定: 全肉タンパク質試料および筋漿タンパク質試料それぞれについて充填ゲル, 連結方法およびカラムの長さを検討し, 最も分別性の良好なものを選定した。即ち ① TSK gel G 2000 SW と G 3000 SW を連結したもの, トヨパール HW (東洋曹達) は ② HW-55 Superfine (S), ③ HW-60 Superfine (S) および ④ HW-65 Fine (F) の3種類, セファクリル (ファルマシア) は ⑤ S-200 および ⑥ S-300 の2種類について検討した。

3). ゲルカラムの調製: トヨパール HW 系およびセファクリル系は直径 2.5cm で, 長さ 50cm または 95cm のカラムに充填した。新しい緩衝液による平衡化には流速 40~50 ml/hr で 4~7 日間要し, また試料の分析にあたっては前日からカラムを洗滌した。

4). 肉タンパク質試料のカラムクロマトグラフィー: HPLC における分析は透析によってペプチド, アミノ酸画分を除いた試料を用い, 全肉タンパク質試料の

場合は 10μl (タンパク質約 125μg), 筋漿タンパク質試料の場合は 35μl (タンパク質約 80μg) 使用した。トヨパール HW 系およびセファクリル系による分析では, 非透析試料の全肉タンパク質および筋漿タンパク質試料を用い, それぞれ 0.2ml (タンパク質約 5mg) および 0.4ml (タンパク質約 2mg) を使用した。

流速は HPLC では 1 ml/min, 通常法では 40~50 ml/hr で, 分析時の室温は 22~26°C で行った。

3. SDS-ゲル電気泳動 (PAGE) 法

電気泳動法は PORZIO and PEARSON¹⁷⁾ の方法に従い, 泳動条件は前報¹²⁾と同様に行った。

結果および考察

1. 緩衝液の選定

前報¹²⁾において使用したものとほぼ同様の 0.2% SDS, 0.2mM 2-メルカプトエタノールを含む 0.025 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) で分析した全肉タンパク質および筋漿タンパク質の高速液体クロマトグラムを Fig. 1 に示した。両者ともほぼ単一のピークを示すので, これを基準として緩衝液の分別性について検討した。

① Tris-HCl 緩衝液については, 0.025 M から 0.26 M まで濃度を変化させて検討したが, 全肉タンパク質では最も濃い 0.26 M の場合が最も分別性がすぐれ, 筋漿タンパク質においても同様の結果であった。② SDS 濃度は 0.05% から 0.5% まで添加して分析を行った。SDS はクラフト点 (ミセル形成が起る最低温度¹⁸⁾) を下回る温度で濃度が高い場合に一部が結晶するため, 低濃度でも分別性の良い 0.1% を採用した。但し分析時の室温は 20°C 以上に保った。③ 2-メルカプトエタノール濃度については 0 から 2mM まで添加して分析を行ったが, 高濃度では 222.5nm における吸収がみられるため, 分別性の良い 0.5mM を用いた。④ EDT 濃度については 0.05mM から 5mM まで添加して分析を行ったが, 分別性にほとんど変化がなく, むしろ濃度を上げると 222.5nm における吸収のためにベースの上昇がみられたので, 使用しなかった。⑤ NaCl を添加することによって Tris-HCl 緩衝液の塩濃度を減少させ, 分別性が失われなければ, 緩衝液の節約になる上, 作製の労力が軽減することができる。0.1% SDS, 0.5mM 2-メルカプトエタノールを含む 0.025 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) に NaCl 濃度を

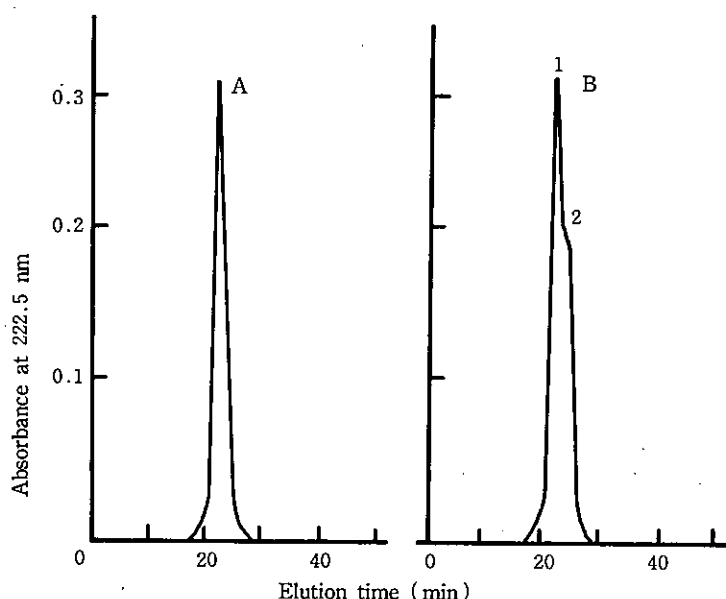


Fig. 1. Chromatograms of whole meat proteins (A) and sarcoplasmic proteins (B) obtained from bovine *M. longissimus thoracis*. Column; TSK gel G 2000 SW (7.5×600mm)+TSK gel G 3000 SW (7.5×600mm). sample; dialysed sample, buffer; 0.025 M Tris-HCl pH 7.4 containing 0.2% SDS and 0.2mM 2-mercaptoethanol.

0.2 M から 0.6 M まで添加して分析を行うと、NaCl 濃度が 0.3 M の場合、0.1% SDS、0.5 mM 2-メルカプトエタノールを含む 0.26 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) と同様の分別性を示した。しかしさらに塩濃度を上げたり、室温が 20°C 以下になると白濁するところから、20°C 以上で分析を行う必要があった。⑥ 緩衝液の種類に関する検討では、Tris-Gly 緩衝液の結果はあまり良好でなく、またリン酸緩衝液では SDS が白濁しやすく、分別性も良くなかった。

以上の結果に基き緩衝液は 0.1% SDS、0.5 mM 2-メルカプトエタノールおよび 0.3 M NaCl を含む 0.025 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) が肉タンパク質の分別に最も優れ、この緩衝液で分析した全肉タンパク質および筋漿タンパク質の高速液体クロマトグラムを Fig. 2 に示した。

2. ゲルカラムの選定

前報¹²⁾において 0.2% SDS、2 mM 2-メルカプトエタノールを含む 0.025 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) を用い、トヨパール HW 系カラムによって全肉タンパク質を 3 つのピークに分別したが、同様の緩衝液を用

いた TSK gel G 2000 SW および G 3000 SW の組合せによる高速液体クロマトグラムでは単一のピークであった (Fig. 1)。これを前述の 0.3 M NaCl を含む緩衝液で分析すると、全肉タンパク質は 3 つのピークに分別され、筋漿タンパク質も同様に単一ピークが 3 つに分別された (Fig. 2)。この事から分析時間は要するが、トヨパール HW 系の方が分別性は良いことが予測される。そこで 3 種類のトヨパール HW 系、2 種類のセファクリル系を用い、充填ゲルについて検討した。

全肉タンパク質の分析ではトヨパール HW-65 F は MHC のような高分子量の分別に有効であり、HW-60 S および 55 S は α -アクチニン以下の分子量のタンパク質およびペプチドの分別に有効であった。また HW-60 S は 50 cm カラムよりも 95 cm カラムの方が分別性は良好であった。セファクリル S-200 および S-300 はそれぞれ 2 万～4 万ダルトン以下の低分子のタンパク質の分別に対しては良いが、高分子側ではあまり良くなかった。GERMERSHAUSEN ら¹⁹⁾はトヨパール HW-55 F と HW-65 F の混合ゲルによる分析を

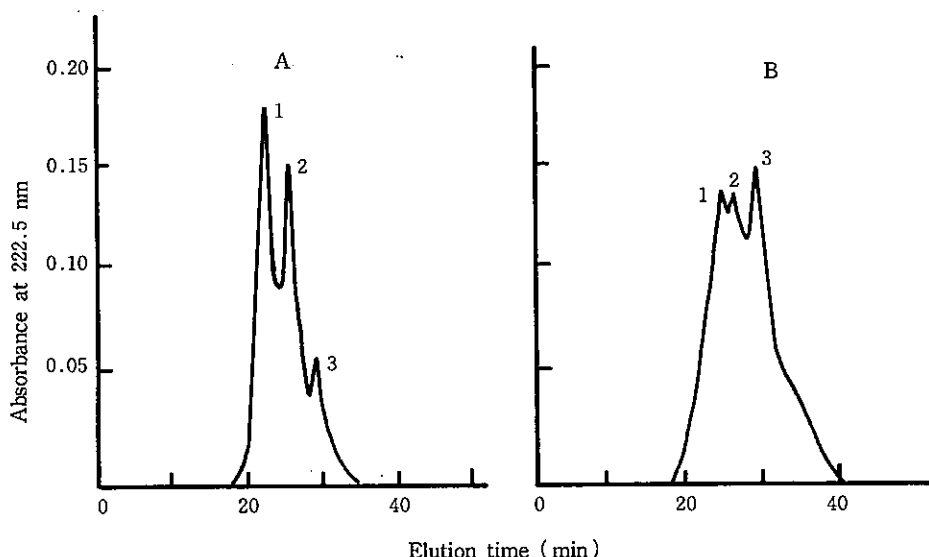


Fig. 2. Chromatograms of whole meat proteins (A) and sarcoplasmic proteins (B) obtained from bovine *M. longissimus thoracis*. Column and sample are same as in Fig. 1. Buffer; 0.025 M Tris-HCl pH 7.4 containing 0.1% SDS, 0.3 M NaCl and 0.5 mM 2-mercaptoethanol.

報告しているが、本実験ではトヨパールHW系の3種類を連結したものでゲルろ過を行い、そのクロマトグラムおよび SDS-PAGE パターンを Fig. 3 および 4 に示した。前報¹²⁾と比較すると溶出位置は少しずつ遅れてはいるが、各ピーク間は良く分離されていることが分かる。また各ピークの SDS-PAGE パターンからも分離が良好であることが認められた。

全肉タンパク質についてみると、ピーク 1 および 2 は MHC よりも大きな成分が存在し、分子量 50~100 万ダルトンである Titin あるいは Nebulin であろうと推察され、Lusby ら²⁰⁾の報告している溶出パターンとも類似している。ピーク 3 は主として MHC によって占められているが、巨大分子もわずかに存在した。前報¹²⁾では、 α -アクチニンが分子量がそれ以下のタンパク質と一緒にピークで溶出し、本実験においては、不完全なショルダーとして分別されたが、SDS-PAGE パターンにおいては比較的良く分離しているのが認められた。また α -アクチニン、アクチンなどと一緒に溶出される 2.5~1.5 万ダルトンのトロポニンおよび MLC は独立したピーク 7 として分別できた。

SCHREURS ら^{21, 22)}はセファクリル S-300 または S-400 を用いて、肉タンパク質のゲルろ過を行って

る。セファクリル S-300 では3つのピークであったが、S-400 では5つのタンパク質画分に分別されたと報告しており、SDS-PAGE パターンにおいても本研究と類似していた。この場合緩衝液の濃度はおおよそ 0.1 M 程度で、SDS 含量は 0.2% で良好であった。

本研究ではピーク 8~11 にペプチド、アミノ酸画分は小さな4つのピークとしてみられたが、ウサギ肉を用いた彼等²²⁾の場合は3つに分画され、巨大なピークが最後にみられた。これは試料およびその調製法の違いによるものかも知れない。

筋漿タンパク質の分別では、セファクリル S-300 と S-200 の組合せが比較的良好であったが、非透析試料においては、ペプチド画分の分別性は良くなかった。トヨパール HW-55S と HW-60S を連結して用いた。そのクロマトグラムおよび SDS-PAGE パターンを Fig. 5 および 6 に示した。TSK gel SW 系と比べてトヨパール HW 系の方が良好な分別性を示しており、ミオグロビンのピーク 3 が完全に分離されているのが分かる。筋漿タンパク質は水抽出液であるためタンパク質画分に較べて、相対的にペプチド、アミノ酸画分も多く (ピーク 4~9)、またピークの数も全肉タンパク質に較べて多かった。

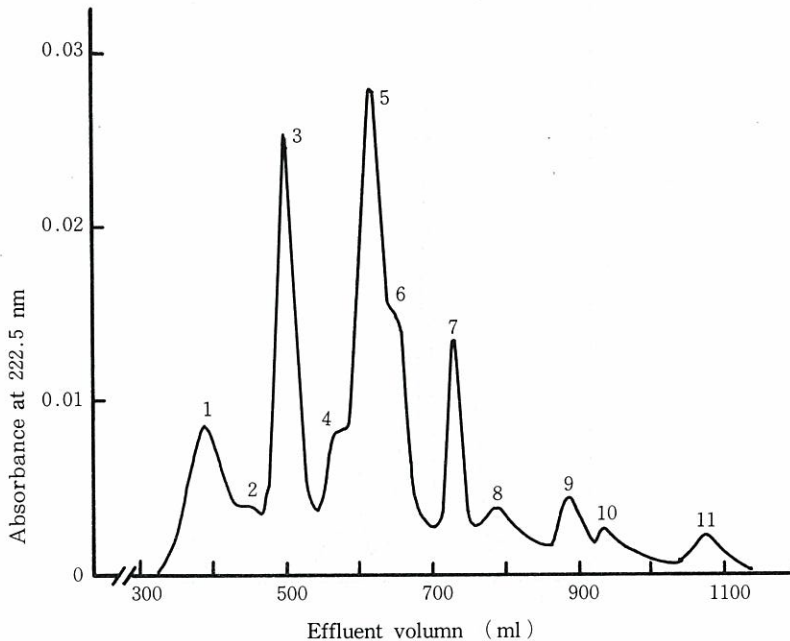


Fig. 3. Chromatogram of whole meat proteins obtained from bovine *M. longissimus thoracis*, Column; Toyopearl HW-55 S (2.5×50cm)+HW-60 S (2.5×95cm)+HW-65 F (2.5×50cm), buffer; same as in Fig. 2. Peaks 8-11 are peptides and amino acids etc.

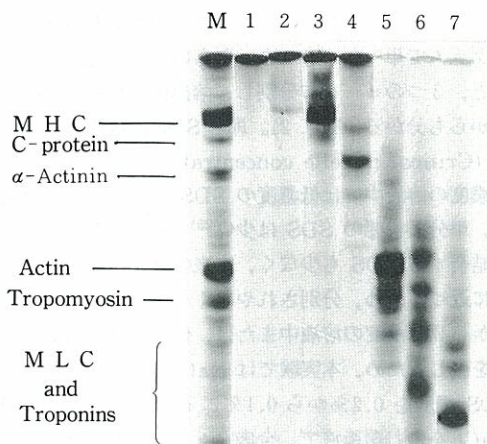


Fig. 4. SDS-PAGE pattern of each fraction of whole meat proteins in Fig. 3. M; whole meat proteins, 1-7; peak number. Peaks 8-11 are peptides and amino acids etc.

DAVIS and ANDERSON¹²⁾は豚肉の水抽出物について、SDSを含まず、0.15 M NaClを含む0.01 M リン酸緩衝液 (pH 6.8) で HPLC を用いて分析している。この場合タンパク質画分は5つに分別されており、試料を加熱するとタンパク質は不溶化するため、ピーク数は減少することを報告している。従って不溶化した試料においては、SDSを含む緩衝液では可溶化でき、分析できる。しかし本実験で用いた筋漿タンパク質では、HPLC およびトヨパール HW 系においては3つの画分であった。

SDS を用いた緩衝液でタンパク質を分析する時、SDS は強力な変性剤であると同時に疎水性タンパク質の溶解にも利用される。肉タンパク質において、ミオシンはヘビーチェーン (MHC) とライトチェーン (MLC) に分解されるが、他の成分はそのまま存在し、SDS と結合して複合体を形成している。これらのタンパク質に結合する SDS は、塩濃度が高いと少なく、低い場合は多い^{23, 24)}。

前報において使用した緩衝液は、0.025 M であるため多量の SDS が肉タンパク質各成分に結合していた

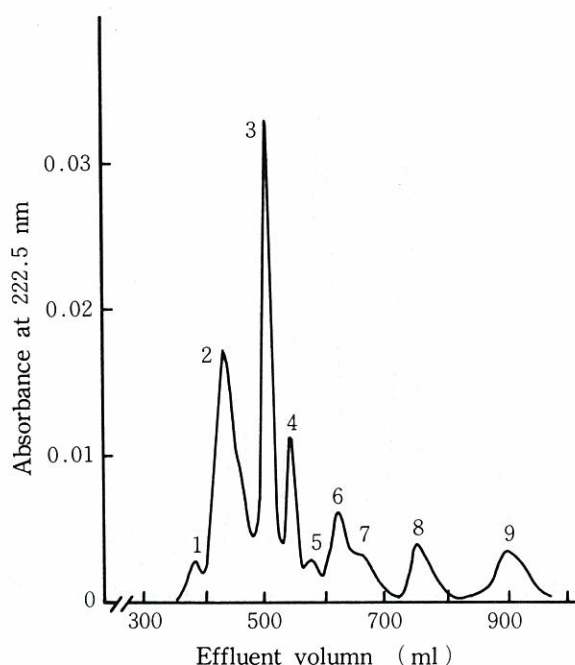


Fig. 5. Chromatogram of sarcoplasmic proteins obtained from bovine *M. longissimus thoracis*. Column; Toyopearl HW-55S (2.5×50cm)+HW-65S (2.5×95cm), buffer; same as in Fig. 2. Peaks 4-9 are peptide and amino acids etc.

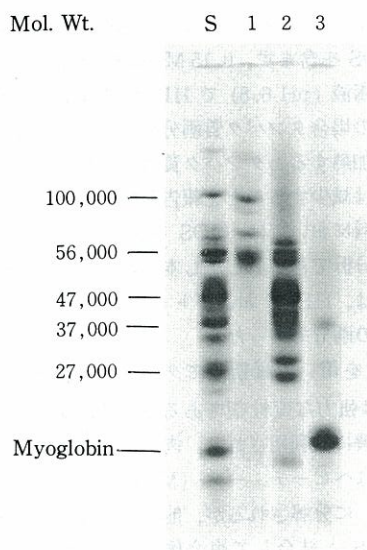


Fig. 6. SDS-PAGE pattern of each fraction of sarcoplasmic proteins in Fig. 5. S; sarcoplasmic proteins, 1-3; peak number. Peaks 4-9 are peptides and amino acids etc.

と考えられる。これは肉タンパク質の高速液体クロマトグラムで単一ピークであったものが、高塩濃度になると、3つのピークに分別し、溶出位置が遅くなることから分かる (Fig. 2)。即ち SDS の臨界ミセル濃度 (Critical micelle concentration, cmc) は、高塩濃度の溶液中では低濃度の SDS でもミセルを形成し、単分子状態の SDS は少い²⁵⁾。従ってタンパク質に結合する SDS も少なく、本来のタンパク質の分子量に近づくため、分別されやすくなると考えられる。しかし高塩濃度の溶液中または、低温では SDS の白濁を生じるため、本実験では NaCl を 0.3 M 添加し、SDS 濃度を 0.2% から 0.1% に下げた。この 0.3 M NaCl を含む緩衝液で、全肉タンパク質および筋漿タンパク質を分別したが (Fig. 3 および 5)、前報¹²⁾のそれと較べてかなり改良されたのが認められた。

JONKER ら²⁶⁾も Urtoro-gel AcA 44 を用い、0.2% SDS を含むリン酸緩衝液で肉製品のゲルろ過法を報告している。この場合肉製品の品質についてアクチンを主体に分析している。試料を分析前にある程度分画しているため、比較的良く分析されていた。末変性

肉タンパク質については SDS を含まない緩衝液でも分別は可能であるが、加熱変性した肉製品などにおいては、SDS を含む緩衝液を用いることにより分析でき、応用範囲も広いと考えられる。

以上のように SDS を含む緩衝液を用いる時その濃度、温度および SDS 含量などを注意することにより、タンパク質のゲルろ過法において良い分別性を得ることができた。

尚 TSK gel SW 系のシリカゲルは pH 7.0 以上における使用では寿命を縮める原因になるので注意しなければならない。

References

- 1) D. DHERMY, O. BOURNIER and P. BOIVIN, (1978). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 85; 906-915.
- 2) S. S. MARGOSSIAN, A. K. BHAN and H. S. SLAYTER, (1983). *J. Biol. Chem.*, 258; 13359-13369.
- 3) J. J. BECHET, N. BACHOUCHI, C. JANMOT and A. D'ALBIS, (1982). *Biochim. Biophys. Acta*, 703; 54-61.
- 4) K. YAMAMOTO and C. MOOS, (1983). *J. Biol. Chem.*, 258; 8395-8401.
- 5) R. KOBAYASHI, M. TAWATA, M. L. MACE, JR., W. A. BRADLEY and J. B. FIELD, (1982). *Biochim. Biophys. Acta*, 702; 220-232.
- 6) S. M. MOZERSKY, K. M. VALENTINE, R. E. GUGGER and M. TUNICK, (1981). *J. Chromatogr.*, 207; 395-402.
- 7) P. J. BECHTEL and F. C. PARRISH, JR., (1983). *J. Food Sci.*, 48; 294-295, 297.
- 8) 三上正幸, 三浦弘之, 白幡彦郎, (1983). *日畜会報*, 54; 671-678.
- 9) P. J. BECHTEL and F. C. PARRISH, JR., (1983). *J. Food Sci.*, 48; 294-295, 297.
- 10) R. H. LOCKER and D. J. C. WILD, (1984). *Meat Sci.*, 11; 89-108.
- 11) W. W. FISH, J. A. REYNOLDS and C. TANFORD, (1970). *J. Biol. Chem.*, 245; 5166-5168.
- 12) 三上正幸, 福谷克哉, 三浦弘之, (1984). *帯広畜大研報*, 14; 111-118.
- 13) 笹川 立, 千谷晃一, (1982). *蛋白質・核酸・酵素*, 27; 1056-1068.
- 14) C. E. DAVIS and J. B. ANDERSON, (1984). *J. Food Sci.*, 49; 598-602.
- 15) A. P. TOSTE, (1980). *J. Chromatogr.*, 197; 207-216.
- 16) S. WATABE, K. HASHIMOTO and T. TAKAMATSU, (1983). *J. Chromatogr.*, 260; 210-215.
- 17) M. A. PORZIO and A. M. PEARSON, (1977). *Biochim. Biophys. Acta*, 490; 27-34.
- 18) 辻井 薫, 高木俊夫, (1974). *蛋白質・核酸・酵素*, 19; 705-716.
- 19) J. GERMERSHAUSEN and R. BOSTEDOR, R. LIU and J. D. KARKAS, (1983). *J. Chromatogr.*, 270; 383-386.
- 20) M. L. LUSBY, J. F. RIDPATH, F. C. PARRISH, JR., and R. M. ROBSON, (1983). *J. Food Sci.*, 48; 1787-1790, 1975.
- 21) V. V. A. M. SCHREURS, H. A. BOEKHOLT and R. E. KOOPMANSCHAP, (1981). *Acta, Biol. Med. Germ.*, 40; 1239-1241.
- 22) V. V. A. M. SCHREURS, H. A. BOEKHOLT and R. E. KOOPMANSCHAP, (1983). *J. Chromatogr.*, 245; 203-210.
- 23) T. IMAMURA, K. KONISHI, M. YOKOYAMA and K. KONISHI, (1979). *J. Biochem.*, 86; 639-642.
- 24) T. TAKAGI, K. TAKEDA and T. OKUNO, (1981). *J. Chromatogr.*, 208; 201-208.
- 25) 星 猛, 堀尾武一, (1980). *巨大粒子のゲルパーミションクロマトグラフィー*, 喜多見書房, p. 117-126.
- 26) M. A. JONKER, J. M. P. DEN HARTOG and P. S. VAN ROON, (1982). *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 175; 406-409.

Summary

Proteins are well desolved in aqueous solution of sodium dodecyl sulfate (SDS), combine with SDS and from SDS-protein complex. In high concentration of buffer solution, the amount of SDS which combines with proteins decreases, and this fact is effective for gel

filtration of meat proteins.

Using the buffer solution containing SDS, we must notice the following; kinds and concentration of buffer, SDS concentration and temperature. The use of Tris-HCl buffer pH 7.4 containing 0.1% SDS, 0.3 M NaCl and 0.5 mM 2-mercaptoethanol could effectively fractionate meat proteins on gel filtration. Whole meat proteins were fractionated into 7 protein peaks and 3 peptide, amino acid peaks on the combined column of Toyopearl HW-55 Superfine (S), HW-60 Superfine (S) and HW-65' Fine. Sarcoplasmic proteins were fractionated into 3 protein peaks and 8 peptide, amino acid peaks on the combined column of Toyopearl HW-55S and HW-60S.