

ポリアクリルアミド ゲル電気泳動によるブロイラー胸肉蛋白質の熟成と年令の影響について

北村陽子 松本照代

Polyacrylamide Gel Electrophoresis of The Breast Muscle
(Fresh and Aged) of Broilers of Different Age

Yoko KITAMURA and Teruyo MATSUMOTO

〔内容抄録〕

8.3% アクリルアミド ゲル電気泳動法及び SDS 含有の 8.5% アクリルアミド ゲル電気泳動法を用いて、2週令と21週令ブロイラーの胸肉より抽出した肉漿蛋白質の電気泳動を行なった。2週令試料のアクリルアミド ゲル電気泳動では、9日熟成後に0日より2本多い13本のバンドが得られた。SDS ゲル電気泳動においては、分子量 200,000~25,000 にわたり、2週令0日試料では12本のバンドが現われたが、9日熟成後に高分子成分が消失し、低分子成分が増加して11本のバンドとなった。又、21週令試料では14本のバンドであった。2週令試料と21週令試料とでは高分子成分が2週令試料に多く、21週令試料には低分子成分が多かった。熟成による変化は2週令試料についてはみられたが、21週令試料では少なかった。

緒 言

電子顕微鏡の発展に伴い、畜肉の筋肉構造がかなり解明されて来ている¹⁾。筋原繊維構成蛋白質及びその熟成中の変化については数多い報告がなされているが、まだ不明な点も多い^{2) 3) 4)}。熟成による低分子成分の増加は肉漿蛋白質が酸性プロテアーゼにより分解された結果である。我々はブロイラー胸肉の年令別、熟成別の遊離アミノ酸含量変化を報告した⁵⁾。今回、年令別ブロイラー胸肉の肉漿蛋白質の熟成による変化を電気泳動を用いて追求し、いささかの所見を得たので報告する。

実 験

試 料

本実験に使用した鶏は白色ロック×白色コーニッシュ、雌、2週令と21週令の2種である。これらは松本の報告⁵⁾と同条件のもとで飼育した。試料は頸部切断、放血後、胸部を開き胸肉を採取し、残部は100ppmクロロマイセチンを噴霧して0°Cに貯蔵した。試料採取期は0日、9日の2回とした。

実験1 アクリルアミド ゲル電気泳動法による分離及び染色・脱色

胸肉15gを0.05Mリン酸緩衝液pH7.6 20mlと共にワーリングブレンダーで抽出し、7,000R.P.Mで10分遠心分離し、上澄液を10倍希釈して試料溶液とした。

電気泳動の方法は Ornstein⁶⁾ と Davis⁷⁾ の手法を修正して行なった。今回は試料用ゲルを省略し、濃縮用ゲルと分離用ゲルの2層にし、試料溶液は40%ショ糖溶液と1:1の混合液にして濃縮用ゲルの上に1cmの高さに加えた。分離用ゲルは8.3%アクリルアミドゲルを用いた。電極槽緩衝液は0.2M グリシン緩衝液 pH8.3であった。ディスク電気泳動装置はミツミ科学産業KKのSJ-1060D型で、泳動用ガラス管は5×70mmのものを使用した。泳動はガラス管1本あたり5mA、1時間50分を行なった。ゲルは0.5%アミドブラック溶液中で2時間染色し、7%酢酸溶液にて脱色用ガラス管1本あたり7mA、45分脱色を行なった。脱色終了後のゲルは7%酢酸溶液中に保存した。

実験2 SDS ゲル電気泳動法による分離及び染色・脱色

Hay⁹⁾の方法に準じて試料溶液の作製を行なった。鶏胸肉30gを0.025Mショ糖、1mMEDTAを含んだ0.05M Tris緩衝液 pH7.6 30mlと共にワーリングブレンダーで抽出し、7,000 R.P.Mで10分遠心分離した。上澄液は更に1%SDSと0.5mM DTT存在下で40°C、30分間保温し、試料溶液を得た。

SDS ゲル電気泳動はWeber⁸⁾ と Hay⁹⁾の方法に基づいて行なった。分離用ゲルは8.5%アクリルアミドゲルを用い、アクリルアミドとビスアクリルアミドの重量比は45:1とした。ゲル組成は0.1Mリン酸緩衝液 pH7.0 7.5ml, 8.5%アクリルアミド溶液6.75ml, 1.5%過硫酸アンモニウム溶液0.75ml, TEMED 0.0225mlであった。電極槽緩衝液は0.1%SDSを含んだ50mMリン酸緩衝液 pH7.0を用いた。保温した試料溶液は4倍希釈し、60%グリセリンと1:1の割合で混ぜ、分離用ゲルの上へ20μl加えた。その際、混合液中に0.005%BPBを混入し、移動の指標とした。使用したディスク電気泳動装置は実験1と同じ型のものである。泳動はガラス管1本あたり5mA、1時間30分で完了した。ゲルは0.5%アミドブラック溶液中で2時間染色した後、7.5%酢酸と5%メタノールの混合液で実験1と同様、1時間脱色を行なった。ゲルは7.5%酢酸と5%メタノールの混合液中に保存した。

既知分子量蛋白質として ovalbumin (分子量 43,000), α-chymotrypsin (分子量 21,500), myoglobin (分子量 16,800) を用い、上記と同条件下で泳動を行ない、分子量の決定をした。

結果及び考察

実験1による2週令0日と9日熟成試料の電気泳動パターンを図1に示した。Thompson¹⁰⁾は試料溶液を試料用ゲルでかため、濃縮用ゲルの上端に乗せ、3層のゲルにより電気泳動を行なっているが、今回は試料溶液をゲル化せず40%ショ糖溶液と1:1の割合で混合したものを濃縮用ゲルの上に加え、2層のゲルで泳動を行なった。実験操作も容易であり、よりよい分離が得られたので以下これを用いた。実験1における2週令0日試料の肉漿蛋白質の電気泳動パターンは11本のaからmまでのバンドが認められた。強いバンドを示したのは、c, f, g, hの4本で、1番強いバンドはcであり、次はfであった。9日熟成後の電気泳動パターンは、cとf間にd, eの2本のバンドが増え、全体で13本のバンドを確認した。この傾向はAwad¹¹⁾の冷凍魚熟成の肉漿蛋白質電気泳動パターンと一致していた。13本のバンドのうちfが1番強いバンドであった。0日で1番強かったcは熟成により弱くなり、0日で弱かったfが逆に強くなった。9日熟成後のd, eの増加と考えあわせると、cの物質が熟成中に分解したものと思われる。又、0日試料のf, k間に存在した比較的強いg, hと弱いi, jの4本は、9日熟成後ともは弱いバンドとなった。更に0日試料のkはぼやけた巾広いバンドであったが、9日熟成後、強い太いバンドとなった。これらのことか

ら *g*, *h* の蛋白質が分解, 変化し下方へ移動したのではないかと考えられる。

実験1で肉漿蛋白質の分離を行なったが, 分離成分及び熟成分解生成物の分子量の決定は不可能である。そこで Weber⁸⁾ と Hay⁹⁾ が報告した SDS ゲル電気泳動法を用い, 成分の分子量の測定を行なった。図2は2週令及び21週令0日, 9日熟成後の胸肉肉漿蛋白質の SDS ゲル電気泳動パターンである。標準蛋白質, ovalbumin, α -chymotrypsin, myoglobin は試料溶液と同条件で泳動を行ない, これらの移動率と Hay⁹⁾ の報告より分離物の分子量を推定した。2週令0日試料の電気泳動パターンは *a'* から *o'* まで12本のバンドが確認された。そのうちの主なバンドは分子量120,000 付近の1本 (*d'*), 100,000~80,000 の細いバンド1本 (*e'*), 80,000~35,000 の太い4本 (*h'*, *k'*, *l'*, *m'*) が見られ, 更に30,000~25,000 の間に2本 (*n'*, *o'*) が認められた。2週令0日試料の分子量 200,000~120,000 の *a'*, *b'*, *c'* は9日熟成後には消失していた。2週令0日試料に見られなかった分子量30,000~25,000 の *p'*, *q'* は9日熟成後, 現われた。又, 2週令0日試料の分子量 100,000~80,000 の *e'* は強い細いバンドであったが, 9日熟成後に弱くなり, 逆に *g'* が強くなった。これは *e'* が分解して *g'* に移動したものであると思われる。21週令0日試料の電気泳動パターンには14本のバンドが確認された。これは2週令0日試料に存在した *a'*, *b'*, *c'* が21週令0日試料では消失し, 前者に存在しなかった *f'*, *i'*, *j'*, *p'*, *q'* が増加したためである。21週令試料の熟成による変化では, 0日に強かった *e'*, *j'* が9日熟成後には弱くなり, 弱かった *i'*, *g'* が強くなった。分子量30,000~25,000 の *p'*, *q'* が, 21週令試料では0日から存在し, 熟成により *p'* が下方へ移動した。

以上の結果から, 実験1では2週令0日試料で示された11本のバンドは, 9日熟成後 *d*, *e* の2本が増して13本となった。これらのバンドはディスクのゲル上に適当な間隔をもって散在し, 熟成による変化が判定しやすい利点があった。SDS ゲル電気泳動による2週令0日試料の分離パターンは *a'* から *o'* まで12本, 分子量120,000~25,000にわたるバンドがみられた。バンドはゲルの中央に集まり, 筋原繊維蛋白質区分に比べ⁹⁾ 肉漿蛋白質区分は分子量が小さく且つ似かよった大きさの成分から成り立っていることがわかった。21週令0日試料は2週令0日試料より *f'*, *i'*, *j'* の3本のバンド, 分子量50,000前後の成分が増し, 更に *p'*, *q'* の低分子区分も含まれていた。分子量 200,000~120,000 の *a'*, *b'*, *c'* が2週令0日試料にみられ, 21週令0日試料にはみられなかった。これは Hay⁹⁾ の報告した鶏腿肉肉漿蛋白質の分離パターンといくつか類似点があり, 孵化後, 日の浅い2週令試料が赤肉, 白肉と分化が完了されていない為, 存在したものと考えられる。2週令, 21週令の週令の違いは *a'*, *b'*, *c'*, *f'*, *i'*, *j'*, *p'*, *q'* といったバンドで示す如く明らかな差がみられた。熟成による変化は2週令試料に著しくみられたのに対し, 21週令試料では大きな変化はみられなかった。これは2週令試料に, 関係酵素活性が強いためと思われる。

今後, 低分子区分の変化を明らかにするためSephadex, イオン交換樹脂分画を利用し, この差が測定出来る様な SDS ゲル電気泳

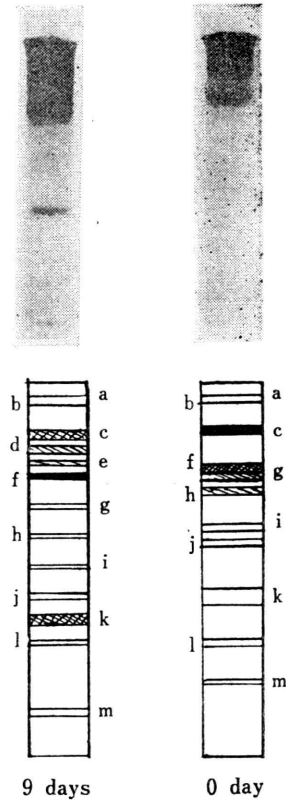


Fig. 1. Electrophoretograms of sarcoplasmic proteins extracted from 2 weeks broiler breast muscle aged 0 and 9 days.

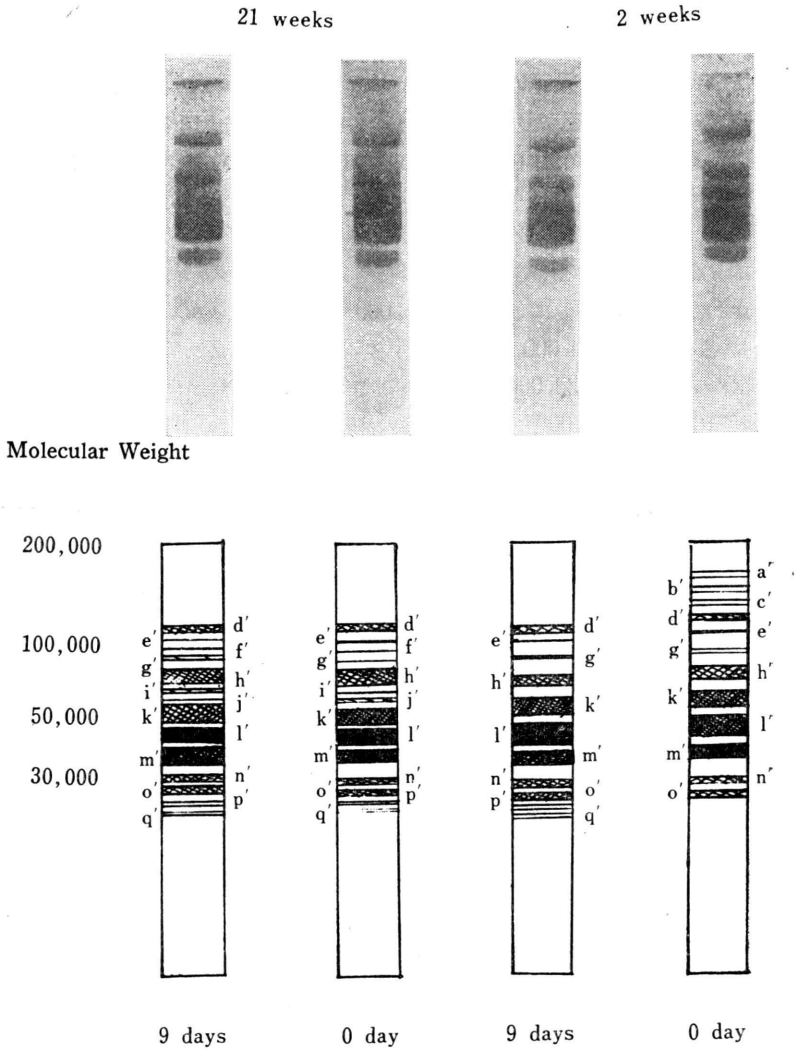


Fig. 2. SDS-gel electrophoresis of sarcoplasmic proteins extracted from 2 weeks and 21 weeks broiler breast muscle aged 0 and 9 days.

動条件の検討を行なう。

要 約

1. アクリルアミド ゲル電気泳動では、2週令試料は熟成によりバンドが11本から13本に増加した。
2. SDS ゲル電気泳動により、2週令0日試料には12本のバンドが得られ、熟成後、高分子成分 a', b', c' が消失し、低分子成分 p', q' が増加した。
3. 21週令0日と9日熟成後試料は14本のバンドを示し、熟成による大きな変化はみられなかった。

北村・松本：ポリアクリルアミド ゲル電気泳動によるブロイラー胸肉蛋白質の熟成と年令の影響について

4. 21週令 0日試料では a', b', c' が存在せず, f', i', j', p', q' が存在した。逆に 2 週令 0日試料には a', b', c' が存在し, f', i', j', p', q' がみられなかった。

文 献

- 1) M. H. Stromer, D. E. Goll, R. B. Youg, R. M. Robson and F. C. Parrish, Jr. : J. Anim. Sci., **38**, 1111 (1974)
- 2) J. D. Hay, R. W. Currie and F. H. Wolfe : J. Food Sci., **38**, 696 (1973)
- 3) K. Morimoto and W. F. Harrington : J. Biol. Chem., **247**, 3052 (1972)
- 4) M. Maruyama : J. Biochem., **69**, 369 (1971)
- 5) 松本照代, 北村陽子 : 東京家政大学研究紀要, **14**, 127 (1974)
- 6) L. Ornstein : Ann. New York Acad. Sci., **121**, 321 (1964)
- 7) B. J. Davis : Ann. New York Acad. Sci., **131**, 404 (1964)
- 8) K. Weber and M. Osborn : J. Biol. Chem., **244**, 4406 (1969)
- 9) J. D. Hay, R. W. Currie and F. H. Wolfe : J. Food Sci., **38**, 987 (1973)
- 10) R. R. Thompson : J. A. O. A. C., **50**, 282 (1967)
- 11) A. Awad, W. D. Powrie and O. Fennema : J. Food Sci., **34**, 1 (1969)

注

SDS	sodium dodecylsulfate
EDTA	ethylen diamine tetraacetate
Tris	hydroxy methylaminomethane
DTT	dithiothreitol
TEMED	N. N. N', N'-tetramethylenediamine
BPB	bromophenol blue