

食肉の食感改良効果を有するリボヌクレオチド類の構造要件と作用機序の *in silico* 解析

日本獣医生命科学大学 応用生命科学部 食品科学科
小林 優多郎

1. 研究の目的と背景

食肉製品製造に使用されるピロリン酸塩やトリポリリン酸塩などの無機ポリリン酸塩は、アクトミオシン（筋原繊維の構成単位；アクチンとミオシンの複合体）をアクチンとミオシンに解離させることにより、食肉からのミオシンの抽出を高め、低塩濃度でも結着性や保水性の高い製品を製造することを可能にしていると言われて¹。これまでに、著者らは、真空調理により食肉が柔らかくなる原因を詳細に検討した結果、アクトミオシンがアクチンとミオシンに解離することが主な要因であることを報告した²。アクトミオシン解離に関与する食肉成分を探索したところ、筋形質の低分子画分、特にATP関連物質（ATP、AMP、イノシン酸）であることを発見した³。さらに、イノシン酸（IMP）によるアクトミオシン解離作用に関する実験の結果、（1）IMPはピロリン酸塩と同様な作用で食肉アクトミオシンを解離させること、（2）IMPの併用は、ピロリン酸による解離作用を増強すること、（3）IMP添加豚肉試料を加熱すると、保水性の改善、食感の改良が認められることを報告した⁴⁻⁶。また、AMPも、食肉アクトミオシンを解離させることで、保水性・食感を改善することが示されている⁷。このことから、IMPやAMPなどのリボヌクレオチド類は、アクトミオシンを解離させることで、ピロリン酸と同様な食感改良効果を持つことが示唆されてきた。しかしながら、その構造要件・作用機序は不明であった。ポリリン酸によるアクトミオシンの解離現象には、ポリリン酸がミオシンATPaseのATP結合部位に作用することが必要であると示唆されている⁸。本研究では、IMPやAMPなどの各種核酸を対象として、食肉アクトミオシンの解離作用における構造要件を推定すること、および、各種核酸とミオシンATPaseのATP結合部位との相互作用を計算科学的に解析することを目的とした。

2. 研究の方法

2-1. アクトミオシンの調製

市販の豚ロース肉を用いた。アクトミオシンは常法⁹によって調製した。ひき肉に6倍量のWeber-Edsall溶液（0.6 M KCl/0.04 M NaHCO₃/0.01 M Na₂CO₃）を加えて24時間抽出した。この混合物を遠心分離して上清を得て、それに純水を加えてKCl濃度を0.2 Mにした。希釈後に生じた沈殿を集めて、そのKCl濃度を0.6 Mにして

アクトミオシンを溶解させた。このような希釈法を3回繰り返してアクトミオシンを精製した。タンパク質濃度は、ウシ血清アルブミン（富士フィルム和光純薬社製）を標準タンパク質としたビウレット法により、求めた。

2-2. 各種核酸とアクトミオシンとの反応

アクトミオシン溶液（6 mg/ml）0.2 mlに反応液（0.6 M KCl, 30 mM Tris-HCl, 3 mM NaN₃, pH7.2）0.4 mlを添加し、氷上で10分間反応させた。反応液は、測定対象である核酸が試験濃度（終濃度）の1.5倍となるように調製した。試験濃度は、0, 2, 4, 8, 16, 32 mMとした。各種核酸は、Sigma Aldrich社、富士フィルム和光純薬社、ナカライテスク社より入手した。反応後、未反応のアクトミオシンを沈殿させるために、希釈液（20 mM Tris-HCl, 2 mM NaN₃, pH 7.2）1.2 mlを添加し、試験溶液のKCl濃度を0.2 Mとした。なお、アクトミオシンは0.2 M以下の塩濃度で沈殿することが知られている。その後、遠心処理（10000 rpm, 10分間）を行い、上清を回収した。また、試験溶液に含まれるミオシンおよびアクチンの全量を解析するために、上述のアクトミオシン溶液と反応液（核酸類を含まない）の混合液（WP群）を同様に調製して、遠心処理を行うことなく、上清を回収した。等量の（2×）サンプルバッファー（20%グリセリン, 4% SDS, 0.125 M Tris-HCl, 10% β-メルカプトエタノール, 0.01% ブロモフェノールブルー）と混合し、95℃で5分間加熱した。試料は-80℃で保存した。試料に含まれる遊離アクチンおよびミオシンはSDS-PAGE法により分析した。染色バンドの定量解析は、Image Studio Lite (version 5.2, LI-COR)を用いて行った。WPサンプルに由来するミオシンおよびアクチンのバンド面積値を100%として、各サンプルに含まれる遊離ミオシンおよびアクチンのバンド面積値を相対定量した。

2-3. 核酸とミオシンの相互作用解析

アクトミオシンの立体構造情報は、Protein Data Bank (6C1D)より取得した。Discovery Studio Visualizer (BIOVIA)を用いて、ミオシンタンパク質の立体構造を抽出した。AutoDock Tools (version 1.5.6, doi: 10.1002/jcc.21256)を用いて、ミオシンのATP結合部位周辺にGrid Box（リガンドを配置する空間領域）を設定した。また、核酸の立体配座は、Spartan (version 7, Wavefunction, Inc.)を用いて作成し、半経験的分子軌

道法 (PM3 法) で構造最適化を行った。核酸とミオシンのドッキングシミュレーションは, AutoDock Vina (version 1.1.2, doi: 10.1002/jcc.21334) を用いて行った。本研究では, 核酸-ミオシン相互作用のパラメータとして, 核酸のミオシンに対する結合親和性エネルギー (kcal/mol) を選択した。

3. 研究内容

本研究では, 食肉加工品において最も使用されている豚肉を用いて, アクトミオシンを調製した。調製アクトミオシンに対して, リボヌクレオチド類 (IMP, AMP, GMP, XMP, UMP, CTP) またはその構成核酸類を添加することで, 遊離するミオシンおよびアクチン量を SDS-PAGE 法により分析した。さらに, 核酸-ミオシン相互作用を検討するために, ミオシン立体構造モデルを作製し, 核酸とのドッキングシミュレーションを行い, 核酸のミオシンに対する結合性を解析した。

4. 研究の実施経過

4-1. 各種核酸によるアクトミオシンからのミオシン・アクチン遊離率の評価

豚肉試料よりアクトミオシン溶液を調製して, 各種核酸の添加によるアクトミオシンからのミオシン・アクチン遊離率の測定を行った。測定に用いた核酸類 (図 1) は, リボヌクレオチド類 (IMP, AMP, GMP, XMP, UMP, CTP), リボヌクレオシド類 (Inosine, Adenosine, Guanosine, Xanthosine, Uridine, Cytosine), 核酸塩基類 (Hypoxanthine, Adenine, Guanine, Xanthine, Uracil, Cytidine) とした。

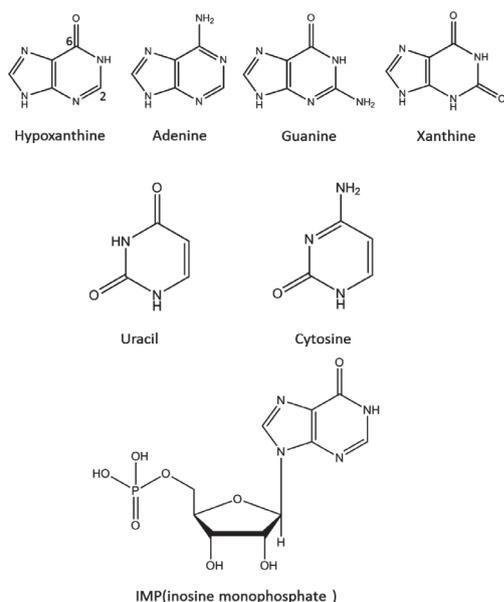


図 1 今回の研究で用いた核酸類の構造式 (一部)

まず, リボヌクレオチド類の添加による遊離ミオシン率の評価を SDS-PAGE 法により行った (図 2)。なお, 方法に示したように, 試験溶液 (WP) に含まれるミオシン全量に相当するバンド面積を 100% として, 各サンプルの遊離ミオシン率を相対定量した。IMP (図 3), AMP, GMP, XMP, UMP については, 濃度依存的に遊離ミオシン率が増加する傾向にあった。CMP については, 遊離ミオシンが認められなかった。

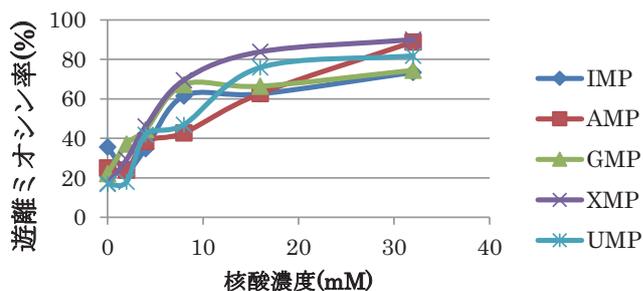


図 2 核酸類の添加による遊離ミオシン率

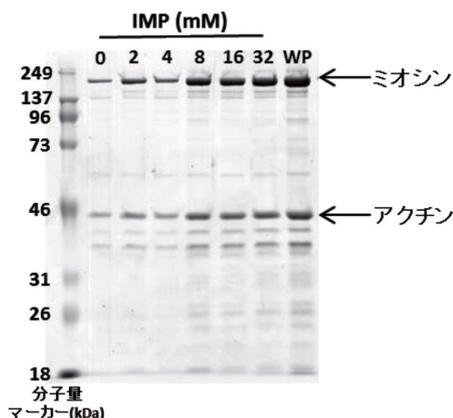


図 3 IMP を添加したアクトミオシン溶液の上清に含まれる遊離ミオシン・アクチンの SDS-PAGE 分析結果

続いて, リボヌクレオチド類の添加による遊離アクチン率の評価を行った (図 4)。IMP (図 3), AMP, GMP, XMP, UMP についても同様に, 濃度依存的に遊離アクチン率が増加する傾向にあった。CMP については, 遊離ミオシンが認められなかった。

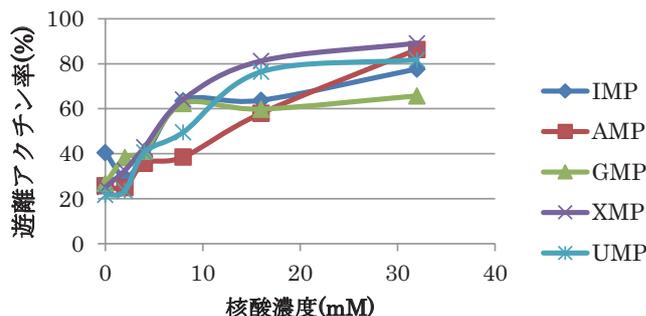


図 4 核酸類の添加による遊離アクチン率

そして、リボヌクレオシド類および塩基類については、試験濃度において、明らかな遊離ミオシン・アクチンが認められなかった。

以上のことから、核酸類による豚肉アクトミオシンの解離現象は、リボヌクレオチド骨格（核酸塩基+リボース+リン酸基）を持つ化合物の存在によって、起きることが明らかになった。一方、リボヌクレオチドの種類、すなわち、構成塩基の違いが豚肉アクトミオシンの解離効果に与える影響については、今回のSDS-PAGE法による実験では十分に解明できなかった。

4-2. 核酸とミオシンの相互作用解析

ポリリン酸によるアクトミオシンの解離現象には、ポリリン酸がミオシンATPaseにおけるATP結合部位に作用することが必要であると示唆されていることから、本研究では、核酸のミオシンに対する作用部位は、同様にATP結合部位であると仮定した。作製したミオシンモデルのATP結合部位に対する各種核酸のドッキングシミュレーションを実施した。そして、各リガンドのミオシンATP結合部位に対する結合親和性エネルギー (kcal/mol) を算出した (表1)。

結合親和性の値がより小さいほど、リガンド-ミオシン複合体がより安定的に存在できることを示す。そのため、リボヌクレオチド類 (-8.7~-7.8 kcal/mol) は、リボヌクレオシド類および核酸塩基類よりも、ミオシンと安定的な複合体を形成しやすいことが示唆された。なお、今回用いたミオシンモデルのX線構造解析データでは、ミオシンのATP結合部位にADPが結合した状態であった。

このADPと作製したミオシンモデルとのドッキングシミュレーションを同様に行った。その結果、結合親和性エネルギーは、 -9.3 ± 0.3 kcal/molとなり、今回のドッキングシミュレーションの計算条件は妥当であると考えられる。

IMPはHypoxanthineとリボースとリン酸各1分子ずつで構成される分子である。IMPの構成要素であるInosine (Hypoxanthine+リボース) とHypoxanthineの結合親和性を比較する (図5) と、IMPの結合親和性エネルギーは有意に ($p < 0.01$) 低い、すなわち、IMPはInosineまたはHypoxanthineよりもミオシンのATP結合部位に作用しやすいことが明らかになった。図6に、ミオシンATP結合部位におけるIMP、InosineまたはHypoxanthineの最安定配座を示した。IMPは、そのリン酸基がミオシンATPaseのATP結合部位と水素結合を形成することで、より低い結合親和性エネルギーを示すと予想された。

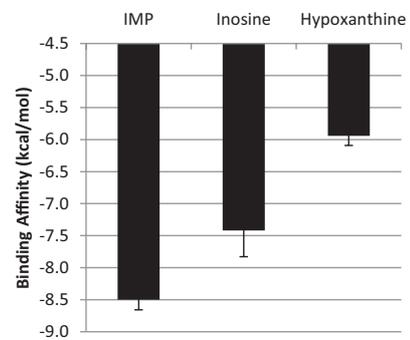


図5 IMP, Inosine, Hypoxanthine のミオシンに対する結合親和性エネルギー

表1 ミオシンモデルに対する各種核酸の結合親和性エネルギー (Binding Affinity) の一覧

	Binding Affinity	標準偏差		Binding Affinity	標準偏差		Binding Affinity	標準偏差
IMP	-8.5	0.2	Inosine	-7.4	0.4	Hypoxanthine	-5.9	0.2
AMP	-8.0	0.5	Adenosine	-7.4	0.4	Adenine	-5.9	0.3
GMP	-8.6	0.2	Guanosine	-7.9	0.5	Guanine	-6.3	0.1
XMP	-8.7	0.2	Xanthosine	-7.8	0.5	Xanthine	-6.4	0.1
UMP	-7.9	0.2	Uridine	-7.0	0.5	Uracil	-5.2	0.1
CMP	-7.8	0.1	Cytidine	-6.7	0.3	Cytosine	-5.1	0.1

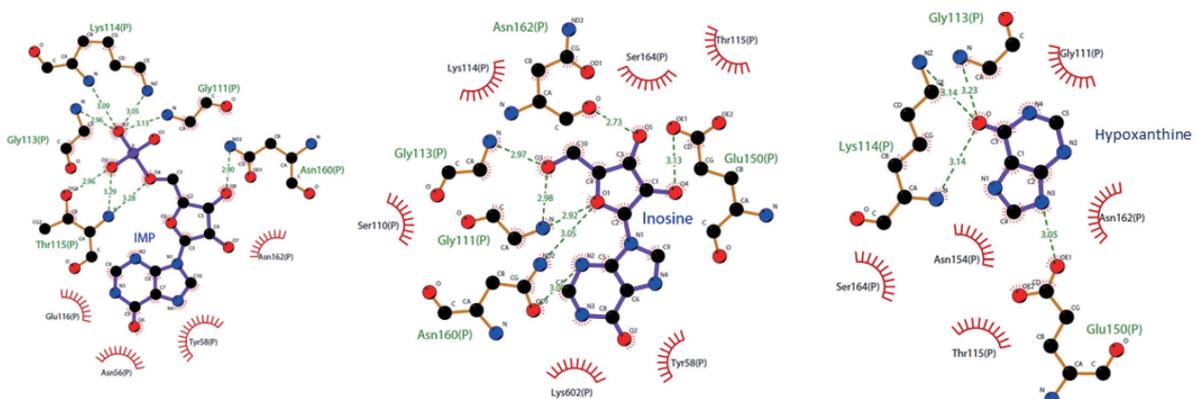


図6 ミオシン ATP 結合部位におけるIMP、Inosine またはHypoxanthine の最安定配座 (緑色の点線は2原子間に水素結合が生じる可能性を示す)

AMPの結合親和性エネルギー(図7)についても同様に、Adenosine(Adenine+リボース)よりも結合親和性エネルギーが低い傾向にあり、Adenineよりも有意に($p < 0.05$)低い値であった。他のリボヌクレオチド類にも同様な傾向が見られたことから、リボヌクレオチド骨格(核酸塩基+リボース+リン酸基)が、ミオシンのATP結合部位への結合に有利であることが推察された。

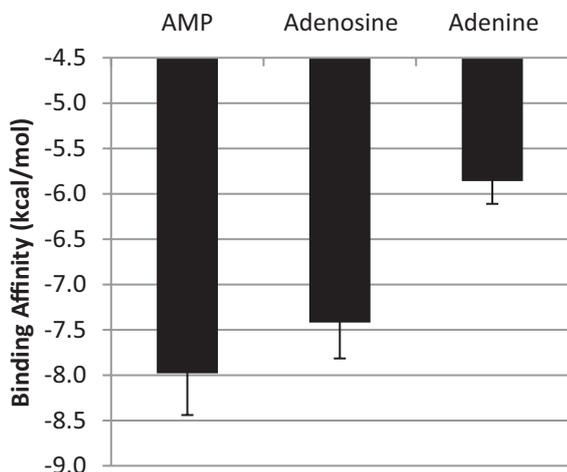


図7 AMP, Adenosine, Adenineのミオシンに対する結合親和性エネルギー

さらに、リボヌクレオチド類の核酸塩基の違いが結合親和性エネルギーに与える影響について検討した。図8に示すように、結合親和性エネルギーがより低いグループ(IMP, GMP, XMP)と高いグループ(AMP, UMP, CMP)の2つに分類できる。

UMPとCMPの構成塩基はピリミジン塩基であることから、プリン塩基骨格を持つIMP, GMP, XMP, (AMP)が、ミオシンのATP結合部位への結合に有利であることが推察された。そして、AMPは、その構成塩基Adenineの6位にアミン基(-NH₂)を持つが、IMP, GMP, XMPでは、それぞれの塩基骨格Hypoxanthine, Guanine, Xanthineの6位はケトン基(C=O)である。また、IMP, GMP, XMPは、それぞれの塩基骨格の2位に違いがある

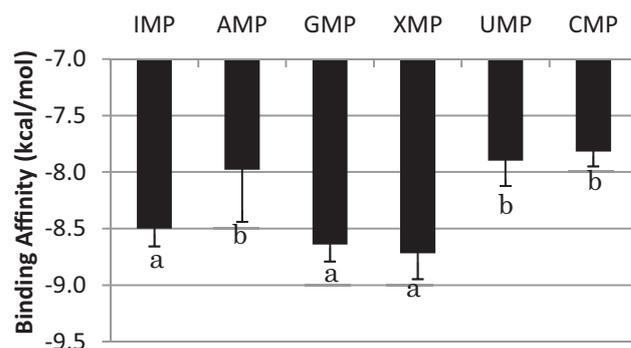
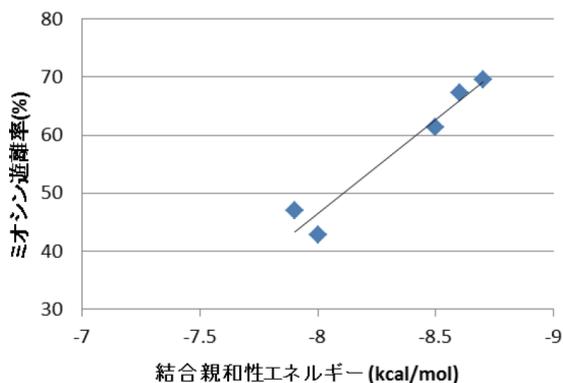


図8 ヌクレオチド類のミオシンに対する結合親和性エネルギー

(IMP: -H, GMP: アミン基, XMP: ケトン基)が、今回の結合親和性エネルギーの結果において、有意な差は認められなかった。これらのことから、リボヌクレオチド類によるミオシンのATP結合部位への結合性においては、プリン塩基骨格を持ち、その6位がケトンであるリボヌクレオチドが有利であることが示唆された。

計算科学的な手法を用いて、核酸とミオシンのATP結合部位との相互作用解析を行った結果、ミオシンとの結合に有利な化合物は、リボヌクレオチド骨格(核酸塩基+リボース+リン酸基)、かつ、その核酸塩基は6位がケトンであるプリン塩基を持つ化合物であることが推察された。

4-3. アクトミオシン解離作用とミオシンATP結合部位に対する結合親和性エネルギーの相関解析

核酸類によるアクトミオシン解離作用とミオシンATPaseのATP結合部位に対する結合親和性エネルギーの相関解析を行った。対象とする核酸類は、アクトミオシン解離作用が認められたIMP, AMP, GMP, XMP, UMPとして、各8mMにおけるミオシン遊離率(%)およびアクチン遊離率(%)を用いた。また、ミオシンATP結合部位に対する結合親和性エネルギー(kcal/mol)についても、IMP, AMP, GMP, XMP, UMPの値を用いた。図9に示すように、ミオシン遊離率(8mM)とミオシンATP結合部位に対する結合親和性エネルギーにおいては、

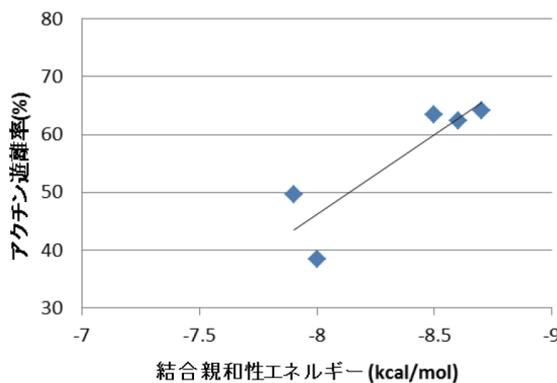


図9 アクトミオシン解離作用とミオシンに対する結合親和性エネルギーの相関解析

相関式：(ミオシン遊離率) = $-32.2 \times$ (結合親和性エネルギー) -211 , 相関係数： -0.973

となった。同様に、アクチン遊離率 (8 mM) においては、相関式：(アクチン遊離率) = $-27.4 \times$ (結合親和性エネルギー) -173 , 相関係数： -0.885 と算出された。

5. 研究から得た結論・考察

本研究では、核酸類による豚肉アクトミオシンの解離現象は、リボヌクレオチド骨格(核酸塩基+リボース+リン酸基)を持つ化合物の存在によって、起きることを見出した。核酸類の作用部位をミオシンATPaseのATP結合部位と仮定した、AutoDock Vinaによるドッキングシミュレーションの結果、ミオシンとの結合に有利な化合物は、リボヌクレオチド骨格、かつ、その核酸塩基は6位がケトンであるプリン塩基を持つ化合物であることを示した。さらに、核酸類による豚肉アクトミオシン解離効果の測定値(SDS-PAGE法)と核酸-ミオシン間の結合親和性エネルギー値(ドッキングシミュレーション解析)の相関解析を行った結果、高い相関係数が得られた。これらのことから、食感の改良効果を有するリボヌクレオチド類による食肉アクトミオシンの解離効果の発現には、当該リボヌクレオチドがミオシンATPaseのATP結合部位に作用することが必要である可能性が初めて示された。さらに、ミオシンATPaseのATP結合部位への作用には、リボヌクレオチド骨格、かつ、その核酸塩基は6位がケトンであるプリン塩基を持つ化合物が有利である可能性も示された。

6. 残された問題、今後の課題

今回の実験では、豚肉アクトミオシンを用いて、リボヌクレオチド類によるアクトミオシン解離現象をSDS-PAGE法により評価することが可能であったが、リボヌクレオチドの種類、すなわち、構成塩基の違いがアクトミオシン解離作用に与える影響の評価は不十分であった。実験条件のさらなる検討を行い、構成塩基の違いが当該作用に与える影響を明らかにする予定である。また、AutoDock Vinaによる今回のドッキングシミュレーションにおいては、水分子の存在や塩濃度が核酸類のミオシンに対する結合性に与える影響を考慮していないため、実際の水溶液状態を想定した実験モデルの作製が必要になる。

7. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、研究助成を賜りました公益財団法人東洋食品研究所ならびに関係の皆様は厚く御礼申し上げます。

8. 参考文献

- 1 山本克博, 肉の機能と科学, 朝倉書店, 134-160 (2015)
- 2 Okitani, A. *et al.*, *Meat Sci.*, **81**, 446-450 (2009)
- 3 Okitani, A. *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **72**, 2005-2011 (2008)
- 4 Nakamura, Y. *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **76**, 1214-1218 (2012)
- 5 Nakamura, Y. *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **76**, 1611-1615 (2012)
- 6 Nakamura, Y. *et al.*, *Anim. Sci. J.*, **85**, 595-601 (2014)
- 7 Wang, D. *et al.*, *J. Sci. Food Agric.*, **96**, 1467-1473 (2016)
- 8 Frye, J. J. *et al.*, *Biochemistry*, **49**, 4897-4907 (2010)
- 9 Szent-Györgi, A., Myosin, actin and actomyosin-myosin B., "Chemistry of Muscular Contraction", Academic Press, New York, 146-152 (1951)