

ショウガ焼きを柔らかくするには

北海道札幌藻岩高等学校 科学部

佐々木 喜教、松山 周平、石坂 将輝、飯田 和男、五十嵐 なつみ
伊藤 将貴、大沼 絵理、尾形 拓哉、武田 光平、土田 健斗
石川 圭祐、斧 壮一朗、相良 和希、鈴木 友斗、高田 茉奈美
当摩 悠希、藤谷 大輔、増野 香織、村井 洋生、吉田 賢生



1 はじめに

ショウガの料理の中で、豚肉のショウガ焼きが有名である。ショウガに漬けることによって、豚肉が柔らかくなると言われている。また、肉の柔らかさは筋の多さによって決まり、筋のほとんどがタンパク質であることが知られている。これらのことから、ショウガにはタンパク質を分解する酵素が含まれているのではないかと考えた。そこで、私たちはショウガが豚肉に対して、どのように働いているのかを調べたので報告する。

2 実験方法

①ショウガ焼きの柔らかさの測定

①使用器具および試薬

豚肉(ロース)、ショウガ、アクリル板、ガラス容器、シャーレ、キッチンペーパー、ホットプレート、おもり、おろし器、乳鉢

②実験手順

(i)豚肉の準備

豚肉の脂身を切り落とし、赤身部分を4cm四方に切り分けた。

(ii)ショウガ液の調製

ショウガの皮をむき、おろし器ですりおろしたショウガを、乳鉢でさらにすりつぶした。得られた液体をショウガ液とした。ショウガ液は、約630gのショウガから約400mL得られた。そのうち約200mLを対照実験に用いるために、10分間煮沸した。

(iii)ショウガ液への漬け込み

ショウガ液約35mLを入れたシャーレの中に、豚肉が重ならないように2枚ずつ入れて、冷蔵庫に一晩保存した。

(iv)ショウガ焼きの作製

シャーレから取り出した豚肉を水で洗い流し、余分な水分をキッチンペーパーで吸い取った。800Wで熱したホットプレートで片面30秒、計1分間加熱した。

(v)柔らかさの測定

一定容積のガラス容器内にアクリル板を敷き、加熱した豚肉を10枚重ねた。その上におもりを乗せ、沈み具合を測定した。なお対照実験として、10分間煮沸したショウガ液に漬けた豚肉と同様の実験を行った。

②肉汁寒天の作製

①使用器具および試薬

0.25M トリス-HCl(pH6.8)、豚肉(ロース赤身)、0.2M PMSF(7-ヒドロキシフェニルメチルキヌリン)、寒天、三角フラスコ、シャーレ、インキュベーター、パスツールピペット、フードプロセッサー

②実験手順

0.25M トリス-HCl(pH6.8)、豚肉、0.2M PMSFをフードプロセッサーに1分間かけて混合液にした。水が入った三角フラスコに寒天を加え、ガスバーナーで熱した。寒天が人肌の温度まで冷めたら、混合液を加えシャーレに流し込み固めた。ただし、全量に対して、質量が寒天1%、0.25M トリス-HCl(pH6.8)50%、豚肉30%、0.2M PMSF1%になるように調整した。パスツールピペットの上端を使って、肉汁寒天に試料を流し込むための溝を作った。

電気泳動

(1)原理

タンパク質はアミノ酸が多数ペプチド結合した重合体で、構成するアミノ酸や立体構造の違いで正または負の電荷を持つことを利用してタンパク質を分離する。

(2)電気泳動

①使用器具および試薬

電気泳動装置(アトー)、30%アクリルアミド-ビスアクリルアミド溶液、10%SDS(トデシル硫酸ナトリウム)、蒸留水、TEMED(テトラメチルエチレンジアミン)、10%過硫酸アンモニウム、0.25M トリス-HCl(pH6.8)、0.75M トリス-HCl(pH8.8)、NATIVE 電気泳動用サンプルバッファー(表2)、SDS 電気泳動用サンプルバッファー(表2)、CBB(クマジンアリゾブルー)染色液(0.25% CBB、5.0%メタノール、7.5%酢酸)、CBB 脱色液(7.5%酢酸、25%メタノール)、分子量マーカー(バイオラット)

②実験手順

(i)サンプルの調製

NATIVE 電気泳動用、SDS 電気泳動用のサンプルは試料にそれぞれ等量の NATIVE サンプルバッファー、SDS サンプルバッファーを加えて調製した。なお、SDS 電気泳動用のサンプルは変性させるために3分間煮沸し、直ちに氷冷した(表1)。

(ii)ゲルの作成

表2(分離ゲル)の割合で混合した溶液を泳動プレートに7割がた入れる。この時、少量の蒸留水をその上に重層させる。

試薬名	NATIVE	SDS
0.25M トリス-HCl(pH6.8)	25μL	25μL
2-メルカプトエタノール		5.0μL
SDS		2.0mg
グリセリン	5.0μL	5.0μL
プロモフェノールブルー	2.0ng	2.0ng
合計(蒸留水で体積を合わせる)	50μL	50μL

ゲルが固まったら重層した蒸留水を捨て、表2(濃縮ゲル)の割合で混合した溶液を分離ゲルの上に入れた。そこにサンプルをのせる溝を作るためにコームを差し込んで、ゲルが固まるのを待った。

分離ゲル(7.0%)	NATIVE	SDS
30%アクリルアミド溶液	3.5mL	3.5mL
蒸留水	3.95mL	3.8mL
0.75M トリス-HCl(pH8.8)	7.5mL	7.5mL
10%SDS		150μL
10%過硫酸アンモニウム	25μL	25μL
TEMED	12μL	12μL

	NATIVE	SDS
30%アクリルアミド溶液	0.75mL	0.75mL
蒸留水	2.975mL	2.9mL
0.25M トリス-HCl (pH6.8)	3.75mL	3.75mL
10%SDS		75μL
10%過硫酸アンモニウム	50μL	50μL
TEMED	6.0μL	6.0μL

(iii)電気泳動

(ii)で作成した泳動プレートを、泳動バッファーが入った装置にセット後、サンプルを添加して通電を開始した。サンプル内で最低分子量を持つプロモフェノールブルー(分子量670)がゲルの下端に来るまで泳動する。なお、NATIVE 電気泳動と SDS 電気泳動ではそれぞれ専用の泳動バッファーを用いた(表3)。

試薬名	NATIVE	SDS
トリス	3.03g	3.03g
SDS		1.00g
グリシン	14.4g	14.4g
合計(蒸留水で体積を合わせる)	1.00 L	1.00 L

(iv)染色

泳動プレートからゲルを取り出し、染色液に一晩、脱色液に約6時間浸けた。

(v)各バンドの定性と定量

泳動後のゲルをセロハン紙に挟み、乾燥させた。そのゲルの泳動像をスキャナーで取り込んだ。その画像を解析ソフト Image J を使ってタンパク質の量を測定した。

タンパク質のゲルからの抽出

(1)原理

電気泳動後に切り出したゲルを装置上部のプラスチックチューブに入れ、通電することによってタンパク質を下部のプラスチックチューブに泳動させる。なお、下のプラスチックチューブの底面には半透膜を取り付けているので、タンパク質以外の低分子物質は通り抜けるが、タンパク質は回収される。

(2) タンパク質抽出

① 使用器具および試薬

タンパク質抽出装置(自作、図1)、電源供給装置、NATIVE電気泳動用分離ゲル(表2)、NATIVE電気泳動バッファー(表3)、ピペット

② 実験手順

NATIVE電気泳動後に切り出したゲルをプラスチックチューブに入れ、同じ組成のゲルで固める(表2)。ゲルが固まったら、NATIVE電気泳動バッファーを入れた抽出装置にセットし、200Vの定電圧で泳動(抽出)を開始する。約1時間後、泳動を終了させ、回収されたタンパク質溶液を取り出した。

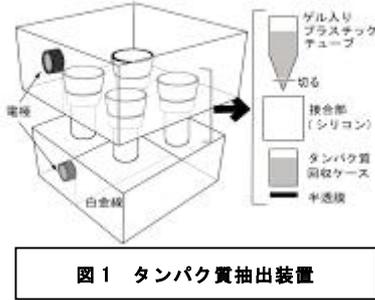


図1 タンパク質抽出装置

③ アクトミオシンの精製

① 使用器具および試薬

アクトミオシン抽出バッファー(0.3M KCl、0.1M KH_2PO_4 、0.05M K_2HPO_4 、0.1M EDTA(3k)、豚肉(ロース赤身)、フードプロセッサー、0.6M KCl、3.0M KCl、0.2M PMSF(7-メチルフェニルメチルホルムリド)、冷水(蒸留水)、ボルテックスミキサー

② 実験手順

アクトミオシン抽出バッファー100mL、豚肉(ロース)30g、0.2M PMSFをフードプロセッサーに1分間かけた混合液を、冷蔵庫で24時間冷やした。混合液から15mL取り出し、0.6M KCl 9mLを加え、3,000rpmで30分間遠心分離した。その後、上澄みを取り、20倍の体積の冷水を加えた。その後2時間冷やし、上澄みを捨て、沈殿物を9,000rpmで10分間遠心分離した。さらに上澄みを捨て沈殿物に3.0M KClを加えて溶かした。これを14,500rpmで60分間遠心分離し、上澄みを採取した。

その上澄みをSDS電気泳動し、分子量からアクチンとミオシンのバンドを特定した。それらのバンドを切り出し、自作のタンパク質抽出装置を用いて精製した。

④ 豚肉中のアクチン濃度の比較

① 使用器具および試薬

豚肉(ロース赤身)、シヨウガ、プラスチックチューブ、遠心分離器、ボルテックスミキサー、乳鉢、おろし器、0.25M トリス-HCl(pH6.8)、筋線維タンパク質抽出バッファー(0.25M トリス-HCl(pH6.8)、SDS20g、イミダゾール 0.68g、2メルカプトメタノール 10mL)、インキュベーター、冷蔵庫

② 実験手順

(i) 豚肉の準備

豚肉を5mm四方に切り、プラスチックチューブに入れ、質量を測定した。

(ii) シヨウガ液の調製

シヨウガの皮をむき、おろし器ですりおろしたシヨウガを、乳鉢でさらにすりつぶした。出てきた液体をプラスチックチューブに入れ、12,000rpmで5分間遠心分離した。得られた上澄みを、シヨウガ液とした。

(iii) シヨウガ液と豚肉の反応

豚肉の入ったプラスチックチューブにシヨウガ液を500 μ L加えてインキュベーター(室温として設定した22 $^{\circ}$ C)または冷蔵庫(4 $^{\circ}$ C)内で反応させた。

(iv) 水溶性タンパク質の除去

反応時間になったら、プラスチックチューブを取り出し、直ちに氷に浸けた。プラスチックチューブから肉を取り出し、附着したシヨウガ液を0.25M トリス-HCl(pH6.8)で洗い流した。その肉を0.25M トリス-HCl(pH6.8)1.0mLの入ったプラスチックチューブに入れてボルテックスミキサーで1分間攪拌したあと、12,000rpmで5分間遠心分離して上澄みを捨てた。

(v) 筋線維タンパク質の抽出

(iv)で得られた沈殿に筋線維タンパク質抽出バッファーを200 μ L加え、ボルテックスミキサーで1分間攪拌したあと、12,000rpmで5分間遠心分離し、上澄みを取った。その上澄みを3分間煮沸し、直ちに氷冷した。これをSDS電気泳動のサンプルとした。

(vi) アクチン濃度の比較

(v)で調製したサンプルをSDS電気泳動し、アクチンバンドの濃さを解析ソフトImageJを使って比較した。なお、マーカーとして精製したアクチンとミオシンを用いた。

3 実験結果

シヨウガ焼きの柔らかさの測定

シヨウガが豚肉を柔らかくするかを確かめるために、それぞれの豚肉におもりのをのせ、沈み具合を比較した。

その結果、生のシヨウガ液に漬けた豚肉の方が、煮沸したシヨウガ液に漬けた豚肉よりも、おもりの沈み具合の変異が大きかった(図2)。このことから、生のシヨウガ液に漬けた豚肉の方が柔らかいことが分かった。

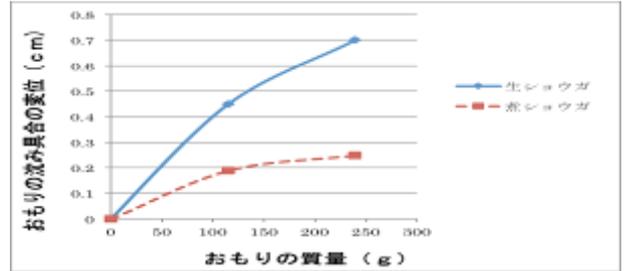


図2 豚肉のシヨウガ焼きの柔らかさの測定

生シヨウガ: シヨウガのおろし汁

煮シヨウガ: シヨウガのおろし汁を10分間煮沸

※シヨウガ液に冷蔵庫で一晩漬け込み、焼いた豚肉を10枚重ねたものにおもりのをのせて、おもりの沈み具合の要位を測定した。

シヨウガと肉汁寒天の反応

シヨウガ焼きが柔らかくなった原因を特定するために、シヨウガ液と肉汁寒天を37 $^{\circ}$ Cのインキュベーター内で一晩反応させた(図3)。なお、この実験に用いたシヨウガ液は、菌を取り除くために遠心分離し、上澄みを使用した。

その結果、水のみでは反応が見られなかったが、シヨウガ液と水を等量混ぜた溶液では反応が見られた。

さらに、シヨウガ液のみでは反応が強くなった。しかし、煮沸したシヨウガ液では反応が見られなかった。



図3 シヨウガ液と肉汁寒天との反応

水: 蒸留水(滅菌水)50 μ L
煮沸シヨウガ: 10分間煮沸シヨウガ液50 μ L
水+シヨウガ: 蒸留水25 μ L+シヨウガ液25 μ L
シヨウガ: シヨウガ液50 μ L

シヨウガプロテアーゼの精製

以上の実験結果から、シヨウガには豚肉のタンパク質を分解するタンパク質が含まれていると仮定した。そこで、私たちは以前に確立した方法を用いてシヨウガのタンパク質を調べた。

(1) シヨウガのタンパク質と肉汁寒天の反応

まず、未変性の状態でタンパク質を泳動できるNATIVE電気泳動で、シヨウガのタンパク質を泳動した(図4)。

シヨウガのタンパク質の中で豚肉のタンパク質を分解するタンパク質を特定するために、泳動後のゲルを肉汁寒天の上に静かに乗せて、一晩反応させた。すると、肉汁寒天の色が薄くなった部分が現れた(図4右)。

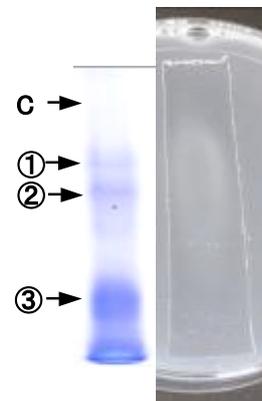


図4 シヨウガ NATIVE 電気泳動像と肉汁寒天との反応

左: シヨウガ NATIVE 電気泳動像

右: NATIVE 泳動後のゲルと肉汁寒天との反応(37 $^{\circ}$ C, 一晩)

(2) 豚肉タンパク質を分解するタンパク質の特定

NATIVE 電気泳動後のゲルを染色した結果、バンド①、バンド②、バンド③、が現れた(図4左)。

図4のバンド①、バンド②、バンド③、及び対照としてCの部分と接している肉汁寒天を切り出した。寒天中のタンパク質濃度を比較するために、SDS 電気泳動を行った。

その結果、バンド①に接している部分のタンパク質濃度が著しく低下していた(図5)。したがって、バンド①が目的のタンパク質であると分かった。

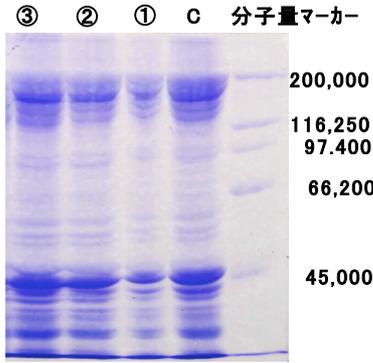


図5 肉汁寒天タンパク質の SDS 電気泳動像
 C: 図4の部分C下の肉汁タンパク質
 ①: 図4のバンド①下の肉汁タンパク質
 ③: 図4のバンド③下の肉汁タンパク質

(3) タンパク質の抽出と SDS 電気泳動

バンド①のゲルを切り出し、自作の抽出装置を用いてタンパク質を抽出した。

抽出したタンパク質が目的のタンパク質であるのかを確かめるために、SDS 電気泳動を行った。

電気泳動の結果から、縦軸に \log_{10} 分子量、横軸に移動度を取り、表計算ソフト Excel を使って近似直線を求め、分子量を計算した。その結果、バンドの分子量は、29,124 であることが分かった(図6)。



図6 抽出後の SDS 電気泳動像
 右: 分子量マーカー
 左: 抽出後のサンプル

豚肉中のアクチン濃度の比較

豚肉に含まれている筋線維タンパク質の濃度がショウガ液と反応して変化したかどうかを確かめるために、SDS 電気泳動を行った(図7)。なお、反応は室温として設定した 22℃、または、冷蔵庫(4℃)内で行った。

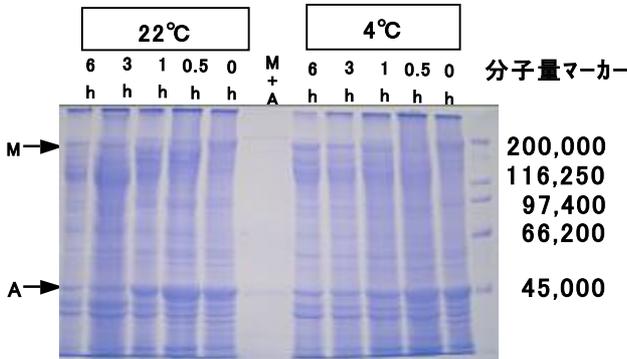


図7 ショウガ液と反応後の豚肉筋線維タンパク質 SDS 電気泳動像
 右: 4℃で反応、左: 22℃で反応
 M: 豚肉ミオシン、A: 豚肉アクチン

参考文献によると、筋線維タンパク質の大部分を占めているのは、アクチンとミオシンの複合体であるアクトミオシンである。SDS 電気泳動を行うと、そのアクトミオシンは、アクチンとミオシンに分かれる。しかし、ミオシンは分子量が大きい一部が分解され、バンドがぼやけてしまうことが知られている。そこで、正確な変化を調べることができるアクチンの濃度を比較した。

その結果、4℃、22℃のアクチンの量は時間が経つにつれて少なくなっていることが分かった。

また、図7のアクチンの量を Image J を使用して解析したところ、22℃よりも 4℃の方がアクチンの量の減り方が大きいことが分かった(図8)。

4 考察

ショウガが豚肉を柔らかくするかを確かめたところ、図2の結果よりショウガには豚肉を柔らかくする作用があることが分かった。またショウガ液を煮沸するとこの作用が失われることから、一般に熱を加えると失活しやすい性質を持つタンパク質の一種による作用である可能性が示された。

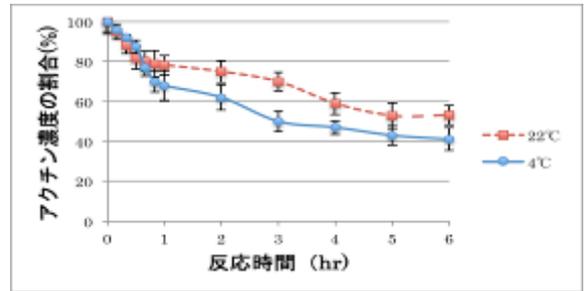


図8 ショウガ液との反応による豚肉アクチンの濃度変化
 ショウガ液と豚肉を 22℃と 4℃で、それぞれ 0分、10分、20分、30分、40分、50分、1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間反応させた後に、筋線維タンパク質を抽出して SDS 電気泳動を行った。各値は、解析ソフト ImageJ で読み取った 0 分のアクチンバンドの面積を 100%として割合で表した。

次に、ショウガ焼きが柔らかくなった原因を特定するためにショウガと肉汁寒天を使って、豚肉のタンパク質に対するショウガの反応を調べた。ショウガの濃度が高くなると、反応した部分が大きくなったことから、ショウガには豚肉のタンパク質を分解する物質が含まれていることが分かった(図3)。一般に豚肉の柔らかさは筋の割合によって決まる。筋の成分のほとんどはタンパク質である。したがって、ショウガ焼きが柔らかくなった原因は、ショウガが豚肉のタンパク質を分解しているためであると考えた。さらに、煮沸したショウガ液では反応が見られなかったため、その物質はタンパク質である可能性が示された。

次に、豚肉のタンパク質を分解する物質がショウガのタンパク質であると仮定して、ショウガからのタンパク質の精製を試みた。まず、ショウガのタンパク質を NATIVE 電気泳動させ、タンパク質を分解するタンパク質のバンドを特定するために、泳動後のゲルと肉汁寒天を反応させたが、すぐには反応を確認できなかった。試行錯誤の結果、電気泳動に用いているゲルの pH が 8.8 と高いことが原因であると分かった。そこで、この実験に用いる肉汁寒天の pH を 8.8 に調整したところ実験は成功して、目的のタンパク質がショウガ中に含まれることが明らかになった(図4)。さらに、図5の結果から豚肉のタンパク質を分解するタンパク質のバンドの位置が特定できた。そのショウガのタンパク質を自作の抽出装置を用いて精製し、SDS 電気泳動したところ、バンドが 1 本現れた。そのバンドの分子量を計算すると、分子量は 29,124 であることが分かった。これは参考文献にあるショウガプロテアーゼの分子量とほぼ一致したので、このタンパク質はショウガプロテアーゼであると考えた。

これらの実験から豚肉が柔らかくなったのは、ショウガに含まれているショウガプロテアーゼが、豚肉のタンパク質を分解したためであると考えた(図3)。

豚肉の柔らかさは筋線維タンパク質の濃度によって決まる。そこで、豚肉の筋線維タンパク質を構成するアクチンの濃度を比較したところ、ショウガ液に漬けておく時間が長ければ長いほどアクチンの濃度が低くなった(図8)。また、温度によるアクチン濃度への影響を調べたところ、室温として設定した 22℃よりも冷蔵庫 4℃の方がアクチン濃度の減少が大きかった(図8)。当初私たちは、反応のしやすさから 4℃より 22℃で漬けた豚肉の方が、ショウガプロテアーゼの活性により、アクチン濃度が大きく減少すると考えた。しかし結果では、4℃の方がアクチン濃度の減少が大きかった。この理由について参考文献で調べてみると、生体内で働く酵素には、その活性を調節する別のタンパク質が存在することが多いと記されていた。したがって、ショウガには、自身のタンパク質の分解を妨げるショウガプロテアーゼの阻害剤が存在し、4℃よりも 22℃で活性が高まったことが原因であると考えた。つまり、4℃に漬けたんだ方が、豚肉のアクチン濃度が減少したのは、22℃でショウガプロテアーゼの阻害剤の働きが高まったので、ショウガプロテアーゼの働きが弱まったからだと考えた。

以上の考察から、この研究のテーマである「ショウガ焼きを柔らかくするには」、ショウガプロテアーゼの阻害剤の働きを抑える低温で、豚肉をショウガ液に長時間漬けておくことが有効であると結論づけた。

5 謝辞

本研究実施に伴い、実験機器及び実験室を貸していただいた、北海道大学低温科学研究所 准教授 落合正則先生に感謝を申し上げる。

この度は、奨励賞というとても名誉ある賞を頂きありがとうございました。普段の取組みの成果が評価されてとても嬉しいです。来年度も頑張りたいと思います。