

タマネギプロテアーゼの濃縮結晶化と活性測定

～タマネギは肉を柔らかくするか～

北海道札幌藻岩高校 科学部

3年 鈴木 凌嘉 木村 あおい
東出 陸来 松田 佑利子
2年 大谷 優実 佐藤 歩未



1.はじめに

一般に、肉とタマネギと一緒に調理すると肉が柔らかくなると言われている。そこで私たちは、このことについて実際に柔らかくなるのか、またそこに科学的根拠はあるのかを疑問に思い、今回の実験を行った。すると、タマネギに含まれる酵素が肉の柔らかさに関わっていることが分かったので報告する。

2.実験方法

(1)肉の柔らかさの測定

肉を2cm角に切り分けサンプルとし、これを蒸留水の入ったビーカーに入れ沸騰させた。

沸騰して五分後から一定時間ごとに取り出し、それを自作測定器にセットしおもりを乗せて最初の位置からどれだけ縮むかを測定した。このとき縮んだ長さが長いほど肉は柔らかいものとした。

(2)タマネギ液の濃縮

タマネギのしぼり汁を電気泳動したところ、バンドが確認できなかった。これはタンパク質の濃度が薄いことが原因であると考え、タマネギ液を濃縮するという方法をとることにした。

タマネギのみじん切りをジューサーでぎざみ、ガーゼでこした。

そして、出来た液をさらに吸引ろ過した。これを半透膜のチューブに流し込み、塩化カルシウムの入った容器に並べ一定時間冷蔵庫で放置した。浸透圧の差により水分が半透膜を通して外に出ることを利用し、タマネギ液を濃縮した。ある程度濃縮された時点で遠心分離をし、上澄み液をさらに濃縮した。これを濃縮タマネギ液として実験で扱った。

(3)ゼラチン寒天による酵素活性測定

自作調製したゼラチン寒天(ゼラチン2%、寒天0.05%)をシャーレに流し込む。熱したパスツールピペットの上端で穴を開けてサンプルを滴下し、反応させた。サンプルを蒸留水で洗い流し、電気泳動用のCBB染色液で染色し、その後脱色した。それを解析ソフトImageJで、色の濃さを示すグレイ値を測定した。

(4)タマネギ液の結晶の活性測定

濃縮したタマネギ液と析出した結晶を(3)と同じ方法でゼラチン寒天と反応させ、活性の大きさを比較した。

3.結果及び考察

(1)肉の柔らかさの測定

まず、タマネギと肉と一緒に煮ることで本当に肉が柔らかくなるのかを調べた。煮た肉におもりを乗せていき、「縮んだ長さの大きさ」を柔らかさとした。

右のグラフの縦軸は縮んだ長さ、横軸はおもりの重さを表している。反応時間は沸騰まで40分、沸騰から10分(図1)

タマネギと肉と一緒に煮たものは、グラフの通り肉のみを煮たものより柔らかくなった。

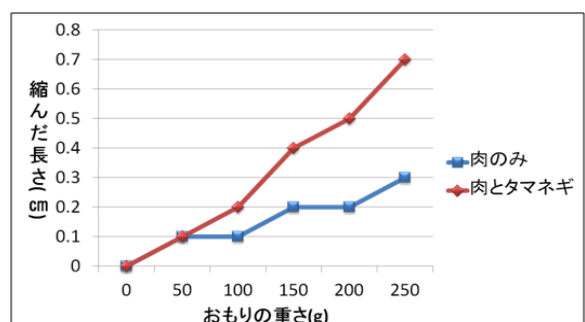


図1: 肉の柔らかさの測定

(2) タマネギ液の濃縮

グラフの縦軸はグレイ値を表し、数値が高いほど色が濃いことを示す。(図2)

青色のグラフは活性測定を行った寒天の色の濃い部分、緑色は薄い部分を表している。

タマネギ液を4時間濃縮したものは、高い活性を示した。しかし、2日間濃縮したものは、濃縮度が上がったにもかかわらず活性が下がる傾向が見られた。これは時間が経つことで、MMP 自体が分解したためだと考えられる。

そしてさらに濃縮を続けると、高い活性を示す粗結晶が析出した。(図3)

この濃縮タマネギ液、及び結晶を電気泳動したがバンドは確認できなかった。

(3) ゼラチン寒天による酵素活性測定

4時間及び2日間濃縮したタマネギ液を用い、活性測定を行なった。(図4)

左はタマネギ液を滴下して1時間反応させた写真、右は2時間反応させた写真である。なお、CBB 染色液で染まった濃さはタンパク質の量を表している。

私達は、MMP が働くとゼラチンが分解され色が薄くなると考えていたが、染色したゼラチン寒天は、写真の通りタマネギ液を滴下した溝の周囲だけが濃く染まっていた。また、2時間反応させたゼラチン寒天では、濃く染まった部分の内側に色が薄くなっている部分も確認された。

画像解析ソフト Image J を用いて、電気泳動用ゲルと同様に、染色された色の濃さを 256 段階に分け、測定してグラフ化した。(図5)

グラフの緑色の部分はゼラチン寒天の背景、紫色は濃く染まっている部分、青色は色が薄くなった部分を示している。

グラフの紫色の部分で、濃度が直線的に上昇している。これは、この酵素がタンパク質を端から順に分解するのではなく、特定の amino 酸配列をランダムに切断するものであるためだと考察した。(図6)

もし端から順に分解していくのであれば、濃度が上がることなく、一度に薄くなると考えられる。

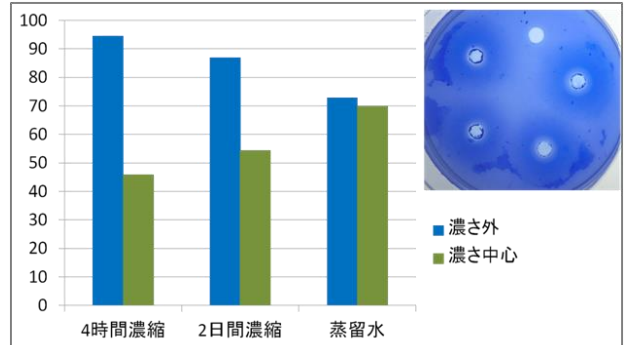


図2: 濃縮タマネギ液の活性測定

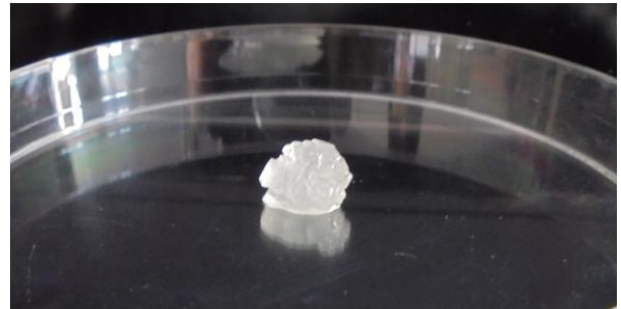


図3: タマネギ液から析出したタンパク質の結晶

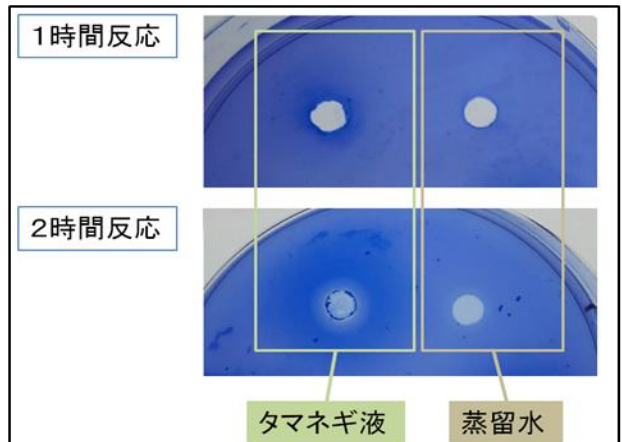


図4: タマネギ液の活性測定

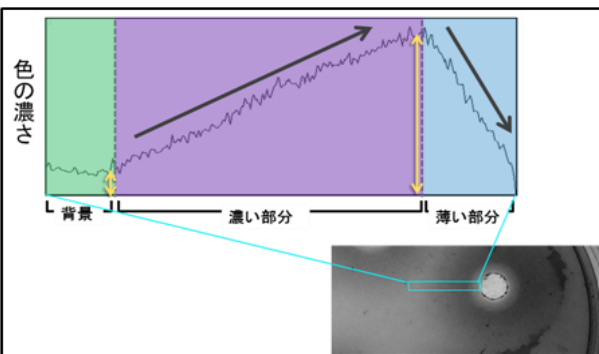


図5: MMP 活性測定グラフ

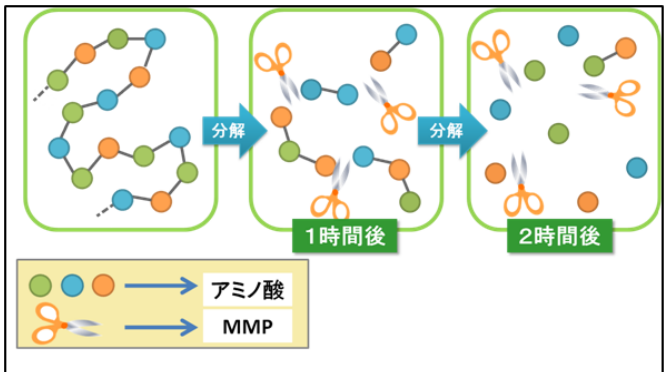
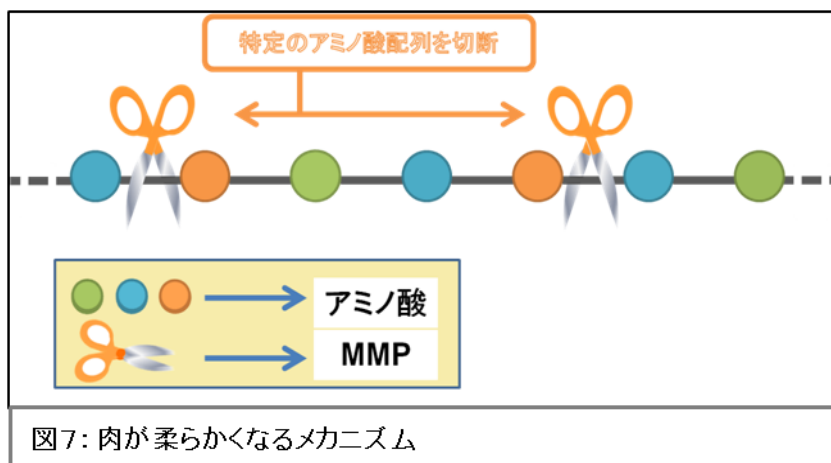


図6: MMPのはたらき方

4.結論

タマネギに含まれるタンパク質分解酵素 MMP が、コラーゲンでできた肉のすじを分解し柔らかくすると結論付けた。(図7) MMP 活性を調べるために用いたゼラチン寒天と CBB 染色液の組み合わせは有効であった。半透膜チューブによる濃縮によって MMP を含む粗結晶を得ることが出来た。



5.今後の課題

今回、電気泳動によってタンパク質を確認することが出来なかった。そこで、溶かした結晶を NATIVE 電気泳動した後、そのゲルをゼラチン寒天と反応させ、活性のある部分からタンパク質を抽出する。これを SDS 電気泳動にかけ、目的の酵素の分子量を決めていきたい。

タマネギ液を市販の融雪剤の塩化カルシウムを使用して濃縮する追実験を行った。すると今まで MMP と考えていた酵素とは異なり「アミノ酸配列を端から順に分解していく」タイプの酵素活性が見られた。この新しい酵素と MMP と考えていた酵素をそれぞれ濃縮仕分ける条件を見つけて確立させたい。

また、析出した結晶を少量の純水に溶かし、それを再び濃縮するという方法を用いて、より純度の高い結晶を作ることに取り組んでいる。

6.参考文献

- (1)『トコトンやさしいタンパク質の本』東京工業大学 大学院生命理工学研究科 編、日刊工業新聞社
- (2)『タンパク質ものがたり』蛋白質研究奨励会 編、化学同人
- (3)『化学』井口洋夫、木下實 編、実教出版
- (4)『タンパク質実験ノート下』岡田雅人、宮崎香 編、羊土社
- (5)『アクトミオシゲルの調製』高松真実子、山形大学工学部応用生命システム工学科羽鳥研究室ホームページ
- (6)『ショウガ焼きがより柔らかくなるメカニズム』北海道札幌藻岩高等学校科学部、第 51 回全道高等学校理科研究発表大会研究抄録、2012

7. 受賞にあたって

この度は日本化学会北海道支部奨励賞という名誉ある賞を頂くことができ、心から嬉しく思っております。今後もこの受賞を励みにして、より一層充実した研究活動を行えるよう、部員一同頑張っていきたいと思っております。

今回の実験では、活性測定をする際に使用した、ゼラチン寒天のゼラチンと寒天の濃度の調製にとっても苦労しました。寒天の濃度が薄すぎると染色した時に上手く結果が得られないことがあったため、ゼラチン寒天の濃度を少しずつ変えながら実験を繰り返し、適切な濃度を決定しました。

この様な試行錯誤の日々が受賞によって報われて本当に良かったです。

ご指導くださいました顧問の若月先生をはじめ、この研究を支えてくれた先生方に深く感謝申し上げます。