

## 学 位 論 文 要 旨

氏 名

アブドラティフ マーギニ アーメド

題 目

脊椎動物の筋肉タンパク質のレオロジー特性および物理化学的、組織学的特性に及ぼすトランスグルタミナーゼの影響  
(Investigation of the Significant Effects of Transglutaminase on the Rheological, Physiochemical and Structural Properties of Vertebrate Muscle Proteins)

食肉製品の品質にとってテクスチャー特性は重要な要因の一つである。食肉製品のテクスチャー特性改善のためには食肉タンパク質分子間あるいは分子内への共有結合の導入が有効であると考えられており、タンパク質のグルタミン残基(Gln)とリシン残基(Lys)間を架橋結合する反応を触媒するトランスグルタミナーゼの利用はその手段の一つである。近年、微生物起源のトランスグルタミナーゼ(MTG)が食肉タンパク質のゲル化特性を改善するために使用されている。しかしながら、食肉の種類(牛肉、豚肉、鶏肉)や筋肉(骨格筋、心筋、平滑筋)の違いによるMTGの反応性の差異はまだ明らかにされていない。そこで本研究では、脊椎動物の筋肉タンパク質のレオロジー特性および物理化学的、組織学的特性に及ぼすMTGの影響について検討した。

まず、食肉のテクスチャー特性の改善効果を確認するため、牛肉、豚肉および鶏肉にMTGを添加し加熱ゲルを調製した。それらの加熱ゲルの破断強度を測定した結果、鶏肉、豚肉、牛肉の順にゲル強度が増加することを認め、MTG添加によりミオシン重鎖が架橋形成されることが、ゲル強度増加の要因であることを明らかにした。また、MTG添加により形成される $\epsilon(\gamma\text{-Glutamyl})\text{ lysine (GL)}$ 含量も、鶏肉、豚肉、牛肉の順に増加することを認め、ミオシン重鎖の架橋の程度と相関があることも明らかにした。さらに、加熱ゲルの走査型電子顕微鏡による微細構造の観察で、MTGの反応に伴い緻密な微細構造が観察されること、また、ゲルの表面疎水性が減少する傾向を認めたことから、MTG添加によりコンパクトな構造になることがテクスチャー特性に大きく関与することを明らかにした。次に、各種食肉から筋原線維を調製して実験を行った結果でも、加熱ゲル強度の値は前筋肉を用いた結果より低いものの、同様の傾向を得た。そこで、筋肉の構造タンパク質を溶液状にしたミオシンB(MB)を調製しMTG処理を行った結果、MBの加熱ゲル強度に及ぼすMTGの効果は、筋原線維と比較してさらに低い値を示した。MBにおいても、MTG添加により形成される $\epsilon(\gamma\text{-Glutamyl})\text{ lysine (GL)}$ 含量は、鶏肉、豚肉、牛肉の順に増加することを認め、ミオシン重鎖の架橋の程度と相関があることも確認した。さらに、骨格筋に比較して、平滑筋や心筋のMTGによるテクスチャー特性の改善効果が低いことを認め、それらは、MTG添加後の反応性や、ゲルの微細構造の相違によることを明らかにした。

以上のように、本研究の成果は、食肉の種類や筋肉の違いによるMTGの反応性の違いやその要因を明らかにし食肉製品のテクスチャー特性の改善に重要な知見を与えたことから、食肉産業の発展に大きく貢献することが期待される。

## 学 位 論 文 要 旨

氏 名

ABDULATEF MRHNI AHHMED

題 目

**Investigation of the Significant Effects of Transglutaminase on the Rheological, Physicochemical and Structural Properties of Vertebrate Muscle Proteins**  
 (脊椎動物の筋肉タンパク質のレオロジー特性および物理化学的、組織学的特性に及ぼすトランスグルタミナーゼの影響)

I examined in depth the processing of meat products, and focus on the use of biocatalysts as legitimate food additives, particularly microbial transglutaminase (MTG; EC 2.3.2.13). Treating meat with MTG is widely used to improve the gelation properties of proteins, avoiding some undesirable attributes such as stickiness, high viscosity and excessive meat adhesiveness. This study was designed to evaluate the major differences between the biceps femoris muscles of chicken, beef and porcine, and between skeletal, smooth and cardiac muscle in chicken. (a) To examine variations of the rheological, physicochemical and structural properties of vertebrate skeletal muscle (b) To identify the factors that influences the activity of MTG on meat proteins.

MTG showed a significant and positive effect on the whole meat, and the data support my hypothesis that the difference in the ability of MTG to catalyze the crosslinking of muscle proteins is muscle type-specific. The protein concentration of vertebrate muscles treated with MTG and extracted in Guba-Straub-ATP solution showed a significant decrease compared with the control samples. Yet, the variation in protein extractability among all meat types could lead to some considerations of the mechanisms and the high-affinity reaction between MTG and myosin heavy chain (MHC), the major protein in meat muscle as shown by SDS-PAGE analysis. The  $\epsilon(\gamma\text{-Glutamyl})\text{lysine}$  content after treatment with MTG was double that in control samples of all meat types (whole meat, myofibrillar proteins and myosin B "MB"). All samples also considerable showed a decrease in the surface hydrophobicity, which is due to the protein-protein interaction. Scanning electron microscope images suggested that the macrostructure of protein molecules in all meat types may vary greatly in size, configuration and complexity after treatment with MTG. Data of MB revealed that proteins in chicken are folded into a strand shape that tightly encases a considerable number of glutamine (Gln) and lysine (Lys) residues, whereas MTG substrate cannot couple Gln and Lys. The results also suggest that susceptibility of MTG substrates to MB is variable and is dependent on the number of residual amino acids in the proteins, which means the reaction site of MTG in MB is not the same among meat types. Scanning electron microscopic images and histological studies (HS) revealed different physical structures and frameworks of skeletal, smooth and cardiac muscles after treatment with MTG, which reflects differences in the reaction specificity of MTG with the different proteins. HS also revealed that MTG reactions with meat proteins are both exogenous and endogenous but heterogeneous. The fact that MTG reacts differently with proteins of different vertebrate muscles may be due to (a) variation in muscle physiology and morphogenesis (b) biological variables (substrates) (c) variety of biochemical properties such as the identity of amino acids, especially those with the ability to react with MTG, and the amount and distance between transferable amino acids, (d) the amount of MTG inhibitors such as collagenase, aminopeptidase and cystamine, which may exist in large amount in chicken then beef and pork.

Results lead to the suggestion that the functional properties of MTG make it a beneficial protein-binding agent, helping to improve the functionality of proteins in terms of the texture and gelation of meat products. Generally, the results of this research may considerably contribute to MTG applications in the meat industry, as the evidence suggests that MTG has the ability to function with all muscle types to increase the water retention and the texture of meat products taking in consideration the MTG volumes that must be used with each muscle type.

<b>学位論文審査結果の要旨</b>	
学位申請者 氏 名	ABDULATEF MRGHNI AHHMED
審査委員	主査 宮 崎 大学 教授          六車 三治男
	副査 宮 崎 大学 教授          太田 一良
	副査 鹿児島 大学 教授          青木 孝良
	副査 鹿児島 大学 教授          杉元 康志
	副査 佐 賀 大学 教授          柳田 晃良
審査協力者	
題 目	<p><b>Investigation of the Significant Effects of Transglutaminase on the Rheological, Physiochemical and Structural Properties of Vertebrate Muscle Proteins</b>            (脊椎動物の筋肉タンパク質のレオロジー特性および物理化学的、組織学的特性に及ぼすトランスグルタミナーゼの影響)</p>
<p>食肉製品の品質にとってテクスチャー特性は重要な要因の一つである。食肉製品のテクスチャー特性改善のためには食肉タンパク質分子間あるいは分子内への共有結合の導入が有効であると考えられており、タンパク質のグルタミン残基(Gln)とリシン残基(Lys)間を架橋結合する反応を触媒するトランスグルタミナーゼの利用はその手段の一つである。近年、微生物起源のトランスグルタミナーゼ(MTG)が食肉タンパク質のゲル化特性を改善するために使用されている。しかしながら、食肉の種類(牛肉、豚肉、鶏肉)や筋肉(骨格筋、心筋、平滑筋)の違いによるMTGの反応性の差異はまだ明らかにされていない。</p> <p>そこで本研究では、脊椎動物の筋肉タンパク質のレオロジー特性および物理化学的、組織学的特性に及ぼすMTGの影響について検討した。</p>	

まず、食肉のテクスチャー特性の改善効果を確認するため、牛肉、豚肉および鶏肉に MTG を添加し加熱ゲルを調製した。それらの加熱ゲルの破断強度を測定した結果、鶏肉、豚肉、牛肉の順にゲル強度が増加することを認め、MTG 添加によりミオシン重鎖が架橋形成されることが、ゲル強度増加の要因であることを明らかにした。また、MTG 添加により形成される  $\epsilon(\gamma\text{-Glutamyl})\text{ lysine}$  (GL) 含量も、鶏肉、豚肉、牛肉の順に増加することを認め、ミオシン重鎖の架橋の程度と相関があることも明らかにした。さらに、加熱ゲルの走査型電子顕微鏡による微細構造の観察で、MTG の反応に伴い緻密な微細構造が観察されること、また、ゲルの表面疎水性が減少する傾向を認めたことから、MTG 添加によりコンパクトな構造になることがテクスチャー特性に大きく関与することを明らかにした。

次に、各種食肉から筋原線維を調製して実験を行った結果でも、加熱ゲル強度の値は前筋肉を用いた結果より低いものの、同様の傾向を得た。そこで、筋肉の構造タンパク質を溶液状にしたミオシン B (MB) を調製し MTG 処理を行った結果、MB の加熱ゲル強度に及ぼす MTG の効果は、筋原線維と比較してさらに低い値を示した。MB においても、MTG 添加により形成される GL 含量は、鶏肉、豚肉、牛肉の順に増加することを認め、ミオシン重鎖の架橋の程度と相関があることも確認した。

さらに、骨格筋に比較して、平滑筋や心筋の MTG によるテクスチャー特性の改善効果が低いことを認め、それらは、MTG 添加後の反応性や、ゲルの微細構造の相違によることを明らかにした。

以上のように、本研究の成果は、食肉の種類や筋肉の違いによる MTG の反応性の違いやその要因を明らかにし食肉製品のテクスチャー特性の改善に重要な知見を与えたことから、食肉産業の発展に大きく貢献するものと高く評価できる。よって、本論文は博士（農学）の学位論文として十分に価値あるものと判断した。

最終試験結果の要旨	
学位申請者 氏名	ABDULATEF MRGHNI AHHMED
審査委員	主査 宮崎 大学 教授 六車 三治男
	副査 宮崎 大学 教授 太田 一良
	副査 鹿児島 大学 教授 青木 孝良
	副査 鹿児島 大学 教授 杉元 康志
	副査 佐賀 大学 教授 柳田 晃良
審査協力者	
実施年月日	平成21年1月7日
試験方法 (該当のものを○で囲むこと。) <input checked="" type="radio"/> 口答 <input type="radio"/> 筆答	
<p>主査及び副査は、平成21年1月7日の公開審査会において学位申請者に対して、学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について試問を行った。具体的には別紙のような質疑応答がなされ、いずれも満足できる回答を得ることができた。</p> <p>以上の結果から、審査委員会は申請者が博士（農学）の学位を受けるに必要な十分の学力ならびに識見を有すると認めた。</p>	

学位申請者  
氏 名

ABDULATEF MRGHNI AHHMED

- 【質問1】本実験でのクッキングロスと保水性との関係を述べて下さい。
- 【回答1】MTGを添加した試料の加熱前後での重量変化によりクッキングロスを求めました。従いまして、クッキングロスは少ない程、保水性が良いこととなります。
- 【質問2】MTGを作用させるとG-L結合によりアイソペプチドが形成されるが、食品として摂取した場合、消化されますか？
- 【回答2】われわれの腸内に存在する微生物の酵素によりアイソペプチドは分解されることから問題はないと考えています。また、G-L含量を測定する際に使用した生体内にある酵素によっても分解されることを確認しています。
- 【質問3】MTGと反応する筋肉タンパク質は主としてミオシンのようですが、その他のタンパク質はどうですか？
- 【回答3】ご質問のようにMTGと最も反応するのはミオシンで、その他にも反応する成分はあります。しかし、一般にアクチンは反応しないと言われていますが電気泳動の結果からアクチンもMTGと反応する傾向が認められたため、今後検討をしたいと考えています。
- 【質問4】MTG反応後はミオシンBの表面疎水性が低下していますが、それらを酵素分解した場合の表面疎水性は変化しますか？
- 【回答4】MTGの反応によりミオシンBの構造がコンパクトになり表面疎水性が低下したものと考えられます。それらを消化酵素で分解すると表面疎水性は上昇することを確認しています。
- 【質問5】骨格筋、平滑筋および心筋を用いた実験でMTGの反応性が異なりますが、その原因はミオシンとの反応性だけにより決定されるのでしょうか？
- 【回答5】ミオシンの反応性が一番大きい要因と思いますが、その他に形態学的な差異や含まれるMTG阻害物質の違いも影響していると考えられます。
- 【質問6】MTGはすでに各種食品産業で使用されているそうですが、そのコストはどうですか？
- 【回答6】生体内に存在するTGはカルシウム依存性でありコントロールが難しくまた、値段も高いようです。しかし、MTGはカルシウム非依存性でコントロールしやすく、また、リーズナブルなコストです。
- 【質問7】先ほどもMTGの阻害剤の話がありましたが、どのような阻害剤が同定されていますか？
- 【回答7】MTGの阻害剤としてはコラゲナーゼ、シスタミン、各種アミノペプチダーゼ等が報告されています。

【質問 8】 MTG の使用は、時には不安定であるとの事ですがどのような事ですか？

【回答 8】 MTG は非常に強力な酵素であり、微量で作用することから、使用料、pH, 反応温度や反応時間等に注意を払う必要があるからです。

【質問 9】 MTG が反応する際の基質となるタンパク質同士のアミノ酸配列が重要な要因となると思いますが、如何ですか？

【回答 9】 ご質問の通り、タンパク質のアミノ酸配列は非常に重要で、反応するグルタミン残基とリシン残基のアミノ酸配列上の位置と含量が大切な要因になると考えられます。

【質問 10】 MTG 反応後の製品の味はいかがですか？

【回答 10】 残念ながら宗教上の理由で試食はしていません。しかし、MTG の作用と同様の反応をした「かまぼこ」はよく食べますが非常に美味しいです。大豆や小麦等の植物タンパク質同士を MTG で反応させた製品を作製し、試食してみたいと思っています。