

学 位 論 文 題 名

熟成に伴う食肉の軟化に関する研究

－筋原線維性巨大蛋白質分子の断片化機構－

学位論文内容の要旨

本論文は総頁数145頁の和文論文で、図61、表3および引用文献108を含み、他に4篇の参考論文が添えられている。

動物性蛋白質の重要な供給源である食肉は家畜の骨格筋であり、家畜のと殺後、死後硬直を起こすが、その後の熟成期間に軟化すると共に風味が改善されて食味が向上する。熟成に伴う食肉の軟化は骨格筋の主体をなす筋原線維の構造変化、即ち、①Z線の脆弱化および②硬直結合の脆弱化によるものであり、これらの構造変化が Ca^{2+} の特異的作用により誘起されることが既に明らかにされている。本論文は、筋原線維を構成する巨大蛋白質であるネブリン（分子量約80万）およびコネクチン（分子量約280万）の変化を詳細に検討することにより、熟成に伴う食肉の軟化への関与を明らかにし、“食肉の軟化のカルシウム学説”をより明確にすることを目的とした。

(1) 食肉の熟成に伴うネブリン分子の断片化機構

家畜のと殺後、骨格筋を4℃で貯蔵すると、時間経過に伴いネブリン分子の断片化が起こり、ネブリンが消失することが観察された。この現象の誘因を Ca^{2+} に求め、ネブリンの消失に及ぼす Ca^{2+} の影響について検討した。筋原線維を30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のロイペプチン存在下、即ち、混在する蛋白質分解酵素の作用を完全に阻害した条件下で0.1 mMの Ca^{2+} を含む溶液に懸濁すると、食肉の熟成の場合と同様に、ネブリンが消失することを確認した。更に、ネブリン分子は200, 180, 40, 33および23 kDaの分子断片に分割され、180 kDa以外の分子断片のいずれもが筋原線維から遊離することを明らかにした。ネブリン分子の断片化は10 μM 以上の Ca^{2+} で起こり、0.1 mMの Ca^{2+} でその効果が最大となる顕著な Ca^{2+} 濃度依存性を示した。この Ca^{2+} の特異的な作用機構を明らかにするため、 Ca^{2+} 感受性蛍光試薬Quin 2を用いてネブリンの Ca^{2+} 結合能の有無を調べたところ、ネブリンは Ca^{2+} 結合蛋白質であり、200, 40および23 kDaの分子断片に Ca^{2+} が結合することが明らかになった。熟成中の食肉においては、筋小胞体から Ca^{2+} が漏出するためにサイトゾルの Ca^{2+} 濃度が0.2 mM(生体時の約2,000倍)に

まで達することが知られている。従って、食肉の熟成に伴うネブリンの消失は非酵素的な Ca^{2+} の特異的作用、即ち、 Ca^{2+} が過剰に結合することによってネブリン分子が断片化されることによると結論した。

生筋においては、ネブリン 1 分子は筋原線維の Z 線から細いフィラメントの先端までの約 $1.1\ \mu\text{m}$ の長さを有する極く細いフィラメント状の蛋白質である。本論文では間接免疫蛍光法および免疫電子顕微鏡法により、Z 線近傍の長さ $0.11\ \mu\text{m}$ の領域は $40\ \text{kDa}$ 分子断片 2 モルから、それに続く、 $0.59\ \mu\text{m}$ の領域は $33\ \text{kDa}$ 分子断片の 11 モルの繰り返しから、次の $0.19\ \mu\text{m}$ は $180\ \text{kDa}$ 分子断片 1 モルから、そして細いフィラメントの先端部の $0.21\ \mu\text{m}$ は $200\ \text{kDa}$ 分子断片 1 モルからなることが明らかになった。これらの分子断片はいずれもアクチンとの結合能を有していることが確認されたので、ネブリン 1 分子は細いフィラメントの全長の互ってアクチンと側面結合していることが強く示唆された。更に、 $33\ \text{kDa}$ の分子断片 1 モルには 7 モルのアクチンとの結合部位が存在していると考えられることから、ネブリン 2 分子が細いフィラメントを構成するアクチン上に結合することによって細いフィラメントの構造を安定化するというネブリンの筋原線維内存在様式に関するモデルを提起した。食肉の熟成に伴いネブリン分子が断片化されて細いフィラメントから遊離することは、細いフィラメントの構造の不安定化および筋原線維構造の脆弱化を招くと考えられるので、このことが熟成に伴う食肉の軟化の要因になっていると結論した。

(2) 食肉の熟成に伴うコネクチン分子の断片化機構

本論文では、食肉の熟成の過程で α -コネクチンが化学量的に $2,100\ \text{kDa}$ の β -コネクチンと $1,200\ \text{kDa}$ のサブフラグメントに開裂すること、および調製した筋原線維を $0.1\ \text{mM}$ の Ca^{2+} で非酵素的に処理した場合にも同様の開裂が起こることを見出し、この変化は $10\ \mu\text{M}$ 以上の Ca^{2+} で起こり、 $0.1\ \text{mM}$ の Ca^{2+} でその効果が最大となる顕著な Ca^{2+} 濃度依存性を示すことを明らかにした。 ^{45}Ca を用いたオートラジオグラフィーの結果から α -コネクチンは Ca^{2+} 結合能を有することが既に報告されているので、食肉の熟成に伴い筋小胞体からサイトゾルへ漏出した Ca^{2+} が α -コネクチンに過剰に結合すると β -コネクチンとサブフラグメントに開裂すると考えられる。

生筋において α -コネクチンは、筋原線維の太いフィラメントと Z 線をつなぐ約 $1.2\ \mu\text{m}$ の長さを有するフィラメント状の弾性蛋白質であり、コネクチンフィラメントの弾性は I 帯領域に存在することが知られている。また、食肉の熟成中に生成される $1,200\ \text{kDa}$ サブフラグメントは、Z 線から長さ約 $0.28\ \mu\text{m}$ の I 帯領域に局在することが明らかにされている。従って、

コネクチンフィラメントが β -コネクチンと1,200 kDa サブフラグメントに開裂することは、コネクチンの弾性が失われることを意味しており、熟成時間の経過と共に食肉が可塑性になることと良く一致する。これらの事実に基づき、食肉の熟成に伴ってコネクチンフィラメントが β -コネクチンと、1,200 kDa サブフラグメントに開裂することは食肉の軟化要因になっていると結論した。

本論文で得られた研究成果は、これまでに明らかにされているZ線および硬直結合の脆弱化に加えて、ネブリン分子の断片化およびコネクチンフィラメントの開裂もまた熟成に伴う食肉の軟化要因となっていることを明らかにした。またこれらの筋原線維構造の脆弱化がいずれも0.1 mM Ca^{2+} によって非酵素的に誘起されることを証明し、“食肉軟化のカルシウム学説”に有力な根拠を提供している。

学位論文審査の要旨

主 査	教 授	高 橋 興 威
副 査	教 授	齋 藤 善 一
副 査	教 授	朝 日 田 康 司
副 査	助 教 授	服 部 昭 仁

本論文は総頁数145頁の和文論文で、図61、表3および引用文献108を含み、他に4篇の参考論文が添えられている。

動物性蛋白質の重要な供給源である食肉は家畜の骨格筋であり、家畜のと殺後、死後硬直を起こすが、その後の熟成期間に軟化すると共に風味が改善されて食味が向上する。熟成に伴う食肉の軟化は骨格筋の主体をなす筋原線維の構造変化、即ち、Z線および硬直結合の脆弱化によるものであり、 Ca^{2+} の特異的作用により誘起されることが既に明らかにされている。本論文は、筋原線維を構成する巨大蛋白質であるネブリン（分子量80万）およびコネクチン（分子量280万）の変化を詳細に検討することにより、熟成に伴う食肉の軟化への関与を明らかにすることを目的としている。得られた結果の概要は以下の通りである。

1. 食肉の熟成に伴うネブリン分子の断片化機構

家畜のと殺後、骨格筋を4℃で貯蔵すると、時間経過に伴いネブリン分子の断片化が起こり、

ネブリンが消失することを観察し、 Ca^{2+} の影響について検討した。筋原線維を0.1 mMの Ca^{2+} を含む溶液で処理すると、食肉の熟成の場合と同様に、ネブリンが消失することを確認し、ネブリン分子が200, 180, 40, 33および23 kDaの分子断片に分割されて、筋原線維から遊離することを明らかにした。ネブリン分子の断片化は10 μM 以上の Ca^{2+} で起こり、0.1 mMの Ca^{2+} でその効果が最大となる顕著な Ca^{2+} 濃度依存性を示すが、ネブリンは Ca^{2+} 結合蛋白質であり、200, 40および23 kDaの分子断片に Ca^{2+} が結合することを見出した。熟成中の食肉においては、筋小胞体から Ca^{2+} が漏出するためにサイトゾルの Ca^{2+} 濃度は0.2 mM（生体時の約2,000倍）に達することが知られている。従って、食肉の熟成に伴うネブリンの消失は非酵素的な Ca^{2+} の特異的作用、即ち、 Ca^{2+} が過剰に結合することによってネブリン分子が断片化されることによると結論している。ネブリン1分子は筋原線維のZ線から細いフィラメントの先端までの約1.1 μm の長さを有する極く細いフィラメント状の蛋白質であるが、各分子断片の局在を追及し、Z線近傍の長さ0.11 μm は40 kDa分子断片から、それに続く、0.59 μm は33 kDa分子断片から、次の0.19 μm は180 kDa分子断片から、そして細いフィラメントの先端部の0.21 μm は200 kDa分子断片からなることを明らかにし、これらの分子断片はいずれもアクチンとの結合能を有しているので、ネブリン1分子は細いフィラメントの全長の互ってアクチンと側面結合していることを示唆している。このことから、ネブリン2分子が細いフィラメントを構成するアクチン上に結合することによって細いフィラメントの構造を安定化しているというネブリンの筋原線維内存在様式に関するモデルを提起している。食肉の熟成に伴いネブリン分子が断片化されて細いフィラメントから遊離することは、細いフィラメント構造の不安定化および筋原線維構造の脆弱化を招くと考え、このことが熟成に伴う食肉の軟化要因になっていると結論している。

2. 食肉の熟成に伴うコネクチン分子の断片化機構

食肉の熟成過程で α -コネクチンが化学量論的に2,100 kDaの β -コネクチンと1,200 kDaのサブフラグメントに開裂すること、および調製した筋原線維を0.1 mMの Ca^{2+} で非酵素的に処理した場合にも同様の開裂が起こることを見出した。 α -コネクチンは Ca^{2+} 結合能を有することが既に報告されているので、食肉の熟成に伴い筋小胞体からサイトゾルへ漏出した Ca^{2+} が α -コネクチンに過剰に結合すると β -コネクチンとサブフラグメントに開裂すると推定している。 α -コネクチンは、筋原線維の太いフィラメントとZ線をつなぐ約1.2 μm の長さを有するフィラメント状の弾性蛋白質である。従って、コネクチンフィラメントの β -コネクチンと1,200 kDaサブフラグメントへの開裂は、熟成時間の経過と共に食肉が可塑性に

なることと良く一致する。これらの事実に基づき、食肉の熟成に伴うコネクチンフィラメントの開裂は食肉の軟化要因になっていると結論している。

本論文で得られた研究成果は、Z線および硬直結合の脆弱化に加えて、ネブリン分子の断片化およびコネクチンフィラメントの開裂もまた熟成に伴う食肉の軟化要因となっていることを明らかにしている。又、これらの筋原線維構造の脆弱化がいずれも0.1 mM Ca^{2+} によって非酵素的に誘起されることを証明し、“食肉軟化のカルシウム学説”に有力な根拠を提供している。

よって審査員一同は、最終試験の結果と合わせて、本論文の提出者 辰巳隆一は博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格があるものと認定した。