

学位論文題名

食肉の熟成に伴う筋原線維 Z 線の脆弱化機構に関する研究

学位論文内容の要旨

本論文は総頁数90頁の和文論文で、図 40および引用文献70を含んでいる。

食肉の品質は、家畜および家禽の品種、年齢、性別、飼養条件、および屠畜後の熟成の良否などによって大きく左右されるが、食肉の品質を決定する要素の中で最も重要なものは軟らかさである。家畜や家禽の骨格筋を食肉として利用する場合、屠畜後、骨格筋は非生理的条件におかれることになり、骨格筋の主成分である筋線維内で起こる様々の生化学的変化を経ることによって、食肉の物性は生筋のそれとは大きく異なったものになる。すなわち、熟成することによって食肉は軟らかくなるとともに、風味の改善などの附加価値を獲得する。従って、良好な軟らかさの食肉を得るには、屠畜した後一定の熟成期間が必要である。熟成に伴う食肉の軟化は、筋原線維構造と筋肉内結合組織の脆弱化によってもたらされることが明らかにされている。筋原線維構造の脆弱化の中で、Z線の脆弱化は食肉の軟化に大きく寄与していると考えられている。Z線は骨格構造を成すZ-フィラメントとその間隙を充填する無定形物質から構成されている。Z-フィラメントは α -アクチニンで形成されており、無定形物質としてはリン脂質が存在し、食肉の熟成中にリン脂質の約30%が遊離することが明らかにされている。

食肉の熟成に伴うZ線の脆弱化は0.1 mM Ca^{2+} により最大に誘起されるが、Z線の微細構造とその構成成分、およびZ線の脆弱化に対する Ca^{2+} の作用機構の詳細については未だ解明されていない。本研究においては、食肉の熟成に伴うZ線の脆弱化機構を明らかにすることを目的として、Z線の構造、構成成分の同定、食肉の熟成に伴うそれらの変化、さらにZ線の脆弱化に対する Ca^{2+} の作用機構について追究した。

(1) 食肉の熟成に伴うZ線の構造変化

食肉の熟成に伴うZ線の構造変化に関するこれまでの研究は、単離した筋原線維の位相差顕微鏡による観察や食肉から作製した超薄切片の電子顕微鏡観察によって行われており、いずれの場合も人工産物の影響が払拭できなかった。そこで、熟成中の食肉におけるZ線の構造変化を正確に把握するために、試料を直接凍結して薄切片、そのまま観察する方法を用いた。屠畜直後および熟成後の牛肉および豚肉から凍結切片を作成し、微分干渉顕微鏡および位相差顕微鏡でZ線の構造を観察した。微分干渉顕微鏡による観察から屠畜直後の骨格筋では、サルコメアにおけるZ線部分が豊富な物質の存在によって高く隆起した構造物として認められたが、熟成に伴ってその高さが明らかに減少し、Z線から構成物質が失われることが新しい知見として得られた。位相差顕微鏡による観察においても熟成に伴いZ線が消失したことから、Z線を構成する物質が食肉の熟成に伴って遊離するためにZ線構造の脆弱化が惹き起こされることが明らかになった。

(2) Z線の構成成分

食肉の熟成に伴うZ線の脆弱化は、骨格構造を形成するZ-フィラメントとその間隙を埋める無定形物質のいずれかの消失に起因するものと考えられる。従って、先ず第1にZ-フィラメントを形成している α -アクチニンが関与しているか否かを明らかにするために、牛肉および豚肉の熟成に伴う α -アクチニン含量の変化をSDS-PAGEとイムノブロットングにより調べると、プロテアーゼによる α -アクチニンの加水分解も α -アクチニン含量の変化も全く認められなかった。このことから熟成に伴うZ線の脆弱化は、無定形物質の減少によるものであることが分かった。次に、無定形物質がどのような成分により構成されているのかについて検討した。屠畜直後の骨格筋から調製した筋原線維を脂質を可溶化する界面活性剤であるTriton X-100で処理すると、微分干渉顕微鏡像では、Z線部分の隆起が低下し、豊富に存在していた物質が減少することが観察され、位相差顕微鏡像ではZ線が殆ど観察されなくなった。この結果は食肉の熟成に伴うZ線の構造変化と一致し、Triton X-100で可溶化される物質が食肉の熟成中にZ線から遊離することを示している。Z線に存在する脂質成分を同定するために、筋原線維から調製したI-Z-I brushを材料として脂質を抽出し、薄層クロマトグラフィーおよび薄層自動検出装置によって調べたところ、Z線の無定形物質は極性脂質および中性脂質で構成されており、脂質の組成はリン脂質が60.4%、トリアシルグリセロールが26.6%、コレステロールが6.8%および遊離脂肪酸が4.7%であった。さらに、リン脂質を分画してその構成を調べると、ホスファチジルコリンが41.6%、ホスファチジルエタノールアミンが37.8%、リゾホスファチジルエタノールアミンが6.8%、ホスファチジルイノシトールが6.7%、ホスファチジルセリンが3.4%、リゾホスファチジルコリンが3.0%およびスフィンゴミエリンが1.8%であった。各種家畜のZ線を構成する脂質含量と α -アクチニン含量を合計すると、いずれの畜種の骨格筋においても筋原線維タンパク質100gあたり5~7gになり、ほぼ一定であった。この数値は干渉顕微鏡により調べられた既報の結果、即ち筋原線維に占めるZ線構成物質の割合は約6%という値と非常に良く一致した。次に、Z線の無定形物質である脂質のどの成分が食肉の熟成に伴いZ線から遊離するのかを検討すると、Z線から遊離する脂質成分は中性脂質ではなく、極性脂質であることが判明し、食肉の熟成に伴うZ線の脆弱化はZ線部分からの極性脂質すなわちリン脂質が遊離するために惹き起こされることが明らかになった。

(3) Z線を構成する脂質成分に及ぼす Ca^{2+} の影響

*In vitro*で、屠畜直後の鶏、豚および牛の骨格筋から調製した筋原線維を Ca^{2+} を含む溶液で処理して Ca^{2+} 濃度、pHおよび温度依存性を調べると、Z線の脆弱化の程度とリン脂質の遊離量はよく対応し、食肉の熟成条件ともよく一致することが明らかになった。 ^{45}Ca を用いたオートラジオグラフィーによりZ線の脂質は0.1 mM Ca^{2+} の存在下で、Caに結合した。標準脂質を用いて調べた結果、 Ca^{2+} と結合する脂質は主としてリン脂質であり、負の電荷を持つホスファチジルセリンやホスファチジルイノシトールのCa結合能は高く、正と負の電荷を持つホスファチジルエタノールアミンやスフィンゴミエリンのCa結合能は低いことが分かった。以上の結果から、食肉の熟成に伴うZ線の脆弱化は屠畜後の非生理的条件下で0.2 mMに上昇した Ca^{2+} がリン脂質と結合し、 Ca^{2+} ・リン脂質複合体を形成して可溶性になり、Z線から遊離することによって惹起されると結論した。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 高 橋 興 威
副 査 教 授 島 崎 敬 一
副 査 助 教 授 服 部 昭 仁

学 位 論 文 題 名

食肉の熟成に伴う筋原線維Z線の脆弱化機構に関する研究

本論文は総頁数90頁の和文論文で、図40および引用文献70を含んでいる。

食肉の品質を決定する要素の中で、軟らかさは最も重要である。食肉は熟成することによって軟化するとともに、風味が改善され食味が向上する。熟成に伴う食肉の軟化は、筋原線維構造と筋肉内結合組織の脆弱化によってもたらされる。筋原線維構造の中で、Z線の脆弱化は食肉の軟化に大きく寄与していると考えられている。Z線は骨格構造を成すZ-フィラメントとその間隙を充填する無定形物質から構成されており、Z-フィラメントは α -アクチニンで形成されていること、および無定形物質としてはリン脂質が存在していることが報告されている。食肉の熟成に伴うZ線の脆弱化は0.1 mM Ca^{2+} により誘起される。本論文は、Z線の構造と構成成分、およびZ線の脆弱化に対する Ca^{2+} の作用について追究し、食肉の熟成に伴うZ線の脆弱化機構を明らかにすることを目的としている。得られた結果は以下の通りである。

(1) 食肉の熟成に伴うZ線の構造変化

食肉の熟成に伴うZ線の構造変化に関する既往の研究では、試料作成の過程で生ずる人工産物の影響が払拭できなかった。この点を解決するために、屠畜直後および熟成後の牛肉および豚肉から凍結切片を作成し、光学顕微鏡により観察した。微分干渉顕微鏡観察によって、屠畜直後にはZ線部分が豊富な物質の存在によって高く隆起しているが、熟成に伴ってその高さが顕著に減少し、Z線から構成物質が失われることを見出した。位相差顕微鏡による観察においても熟成に伴いZ線が消失することから、Z線を構成する物質が食肉の熟成に伴って遊離するためにZ線構造の脆弱化が起こることを明示している。

(2) Z線の構成成分

食肉の熟成に伴うZ線の脆弱化について生化学的に追究し、SDS-PAGEとイムノブロッティングにより α -アクチニンの含量は食肉の熟成中に全く変化しな

いことを見出し、熟成に伴うZ線の脆弱化は無定形物質の減少によるものであることを明らかにした。筋原線維をTriton X-100で処理すると、微分干渉顕微鏡像ではZ線部分の隆起が低下し、位相差顕微鏡像ではZ線が殆ど観察されなくなることから、脂質がZ線から遊離することを見出した。Z線に存在する脂質を同定するために、筋原線維から調製したI-Z-I brushを材料として脂質を抽出し、薄層クロマトグラフィーおよび薄層自動検出装置によって調べ、Z線の無定形物質はリン脂質および中性脂質で構成されており、リン脂質が61%、トリアシルグリセロールが27%、コレステロールが7%および遊離脂肪酸が5%であることを明らかにした。さらに、リン脂質を分画して調べ、ホスファチジルコリンが42%、ホスファチジルエタノールアミンが38%、リゾホスファチジルエタノールアミンが7%、ホスファチジルイノシトールが7%、ホスファチジルセリンが3%、リゾホスファチジルコリンが3%およびスフィンゴミエリンが2%であることを明らかにした。Z線を構成する脂質含量と α -アクチニン含量を合計すると、いずれの畜種の骨格筋においても筋原線維のタンパク質100 gあたり5~7gであった。食肉の熟成に伴いリン脂質が遊離するのに対し、中性脂質は遊離しないことを見出し、食肉の熟成に伴うZ線の脆弱化はリン脂質が遊離するために起こると結論している。

(3) Z線を構成する脂質成分に及ぼす Ca^{2+} の影響

牛、豚および鶏の骨格筋から調製した筋原線維を Ca^{2+} を含む溶液で処理して Ca^{2+} 濃度、pHおよび温度依存性を調べ、Z線の脆弱化の程度とリン脂質の遊離量がよく対応することを明らかにした。 ^{45}Ca を用いて調べた結果、主としてリン脂質が Ca^{2+} と結合し、負の電荷を有するホスファチジルセリンやホスファチジルイノシトールのCa結合能は高く、正と負の両電荷を持つホスファチジルエタノールアミンやスフィンゴミエリンのCa結合能は低いことを見出した。以上の結果を総合して、食肉の熟成に伴うZ線の脆弱化は屠畜後の非生理的条件下で Ca^{2+} がリン脂質と結合し、 Ca^{2+} ・リン脂質複合体を形成して可溶性になり、Z線から遊離することによって惹起されると結論している。

以上の成果は食肉の熟成に伴うZ線の脆弱化機構を多面的かつ詳細に追究して多くの新知見を見出したものであり、学術上応用上貢献するところが大きく、高く評価される。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 島田謙一郎は博士(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。