

食肉の熟成に伴う細胞骨格タンパク質デスミンの変化に関する研究

学位論文内容の要旨

本論文は総頁数 104 頁の和文論文で、図 48 および引用文献 57 を含んでいる。

食肉の品質を評価する場合、軟らかさ、味、香り、色調および多汁性が基準となるが、軟らかさは消費者の嗜好性に大きく影響するため最も重要である。食肉の軟らかさは、筋原線維と筋肉内結合組織である筋内膜および筋周膜の性状に支配され、家畜の品種、年齢、性別および食肉の部位のように生体時に備わっている部分と、屠畜後に熟成することによって獲得される部分とから成り立っている。日常的に利用されている食肉は屠畜後、一定の熟成期間を経て食味が向上し、付加価値が与えられたものである。熟成は 3~5℃で行われ、牛肉では 2~3 週間、豚肉では 6~10 日、鶏肉では半日~1 日を必要とするが、これらの熟成期間に、食肉の硬さは当初の値の 50~60%に低下する。熟成中の食肉においては乳酸の蓄積によって pH が 5.5 付近まで低下し、ATP が消失するなどの非生理的環境となるために筋小胞体やミトコンドリアは Ca^{2+} を内部に取り込んでおく機能を失い、 Ca^{2+} が漏出するので筋漿の Ca^{2+} 濃度が上昇して最終的には生体時の骨格筋が弛緩している時の約 2,000 倍に相当する 0.2 mM に達する。このような条件下で、プロテアーゼによるタンパク質の加水分解が食肉の軟化の主因であると考えられていたが、カテプシン類については、牛肉を 30 日間熟成してもライソソームから漏出しないのでその可能性が否定され、m-カルパインは活性化に 1~5 mM の Ca^{2+} を要求するのでその関与も否定されている。現在では、50~70 μM の Ca^{2+} で活性化される μ -カルパインが可能性のある唯一のプロテアーゼとして考えられている。しかし、 μ -カルパインの至適条件は 25℃および pH 7.5 であり、熟成中の食肉の非生理的条件とは大きく異なるため、熟成に伴う食肉の軟化に μ -カルパインが寄与しているかどうかは疑問である。一方、食肉の軟化の原因として筋原線維構造の脆弱化すなわち Z 線の脆弱化、アクチン・ミオシン間に形成された硬直結合の脆弱化、ネブリンフィラメントの断片化およびコネクチンフィラメントの断片化があり、これらは全て 0.1 mM の Ca^{2+} によって非酵素的に誘起されるので、「食肉の軟化に関するカルシウム説」が提唱されている。細胞骨格タンパク質であるデスミンは骨格筋組織における生理的条件下で重合して直径 10 nm の中間径フィラメントを形成し、筋原線維の Z 線の周囲を取り巻き、隣り合う筋原線維を Z 線部分で連結するとともに筋原線維を細胞膜の内側につなぎ止め、筋線維内で筋原線維の位置を固定する役割を果たしている。著者は、食肉を熟成する過程でデスミン中間径フィラメントが生体時の構造を維持できなくなり、筋原線維同士および筋原線維と細胞膜の連結が脆弱になり、そのことが熟成に伴う食肉の軟化に寄与していると考えた。本研究では、熟成に伴う食肉の軟化機構を解明することを目的として、食肉の熟成に伴うデスミン中間径フィラメントの変化と、その変化がどのような機構によって引き起こされるのかについて追究した。さらに、熟成中の食肉の非生理的条件下における μ -カルパインの活性を調べ、 μ -カルパインがデスミンおよび筋原線維構造の脆

弱化に関与して、食肉の軟化をもたらしているのか否かについて追究した。

(1) デスミン中間径フィラメントの変化

熟成中の食肉から経時的に筋原線維を調製すると、熟成に伴いデスミンはZ線から消失し、デスミン中間径フィラメントが変化して筋原線維のZ線から遊離することが分かった。豚の大腿二頭筋から精製したデスミンを重合させ、中間径フィラメントを形成させて粘度を測定すると、プロテアーゼ阻害剤およびプロテインCキナーゼ阻害剤の存在下で Ca^{2+} の添加によって粘度は急激に低下し、0.1 mM Ca^{2+} およびpH 7.0で最大に起こった。電子顕微鏡で観察すると、中間径フィラメントを形成していたデスミンは、0.1 mMの Ca^{2+} を添加した後では粒子状になって分散しており、デスミン中間径フィラメントは Ca^{2+} の特異的作用によって脱重合し、筋原線維のZ線から遊離することが明らかになった。デスミンにはCa結合能が認められ、デスミン1モルあたり0.8モルの Ca^{2+} が結合した。従って、中間径フィラメントを形成しているデスミンに、モル比で1:1の Ca^{2+} が結合すると、中間径フィラメントが脱重合することが判明した。

(2) デスミン分子の変化

0.1 mMの Ca^{2+} によって脱重合し、単分子となったデスミンの変化を調べるため、4℃で熟成した食肉から筋原線維を調製し、10% SDS-PAGEに供試してイムノブロッティングを行い、デスミン分子および生成した分子断片を検出した。食肉の熟成に伴いデスミン分子は46, 42, 40および38 kDaの分子断片に断片化し、その速度は鶏肉、豚肉および牛肉の順に速く、各食肉の熟成の速度と一致していた。また、調製した筋原線維をプロテアーゼ阻害剤の存在下で、0.1 mMの Ca^{2+} を含む溶液で処理すると、食肉を熟成した場合と同様にデスミン分子は断片化した。デスミン分子の断片化は Ca^{2+} 濃度およびpH依存性を示すが、温度依存性を全く示さないことから、デスミン中間径フィラメントの脱重合と同様、0.1 mM Ca^{2+} の特異的作用によるものであることが明らかになった。デスミン分子の断片化の速度は、中間径フィラメントの脱重合の速度に比べて非常に遅いことから、食肉の熟成の過程では始めにデスミン中間径フィラメントが脱重合した後、デスミン分子が断片化することが分かった。 Ca^{2+} が結合したデスミン分子は徐々に断片化すると考えられる。

(3) 非生理的条件における μ -カルパインの活性

豚の大腿二頭筋から精製した μ -カルパインを用い、カゼインあるいは筋原線維を基質とし、反応混液のpHを正確に測定して活性を調べると、25℃ではpH 5.5においても最大値の17%の活性を示したが、15℃以下およびpH 5.85以下では全く活性を示さず、食肉の熟成中の非生理的条件下では μ -カルパインは不活性であることが明らかになった。Koohmaraieらは5℃およびpH 5.5~5.8においても μ -カルパインは至適条件における最大値の24~28%の活性があると報告しており、この事が熟成に伴う食肉の軟化に対する μ -カルパインの寄与を主張する根拠になっている。彼らの結果と本研究の結果が大きく異なる原因を追究し、5 mg/mlのカゼインあるいは筋原線維の緩衝作用の方が50 mM bufferより強いために、反応混液のpHは0.3~0.4 unitも中性側へシフトすることを明らかにし、彼らはpHが中性側へかなりシフトした反応混液を用いたために誤った結果を得たと論じている。

以上のように、食肉の熟成の過程では μ -カルパインは不活性であり、デスミン中間径フィラメントの脱重合およびデスミン分子の断片化が0.1 mMの Ca^{2+} によって非酵素的に惹起される事実は、熟成に伴う筋原線維構造の脆弱化が0.1 mMの Ca^{2+} の特異的作用によるという「食肉の軟化に関するカルシウム説」を支持するものであると結論している。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 高 橋 興 威

副 査 教 授 島 崎 敬 一

副 査 助 教 授 服 部 昭 仁

学 位 論 文 題 名

食肉の熟成に伴う細胞骨格タンパク質デスミンの変化に関する研究

本論文は総頁数 104 頁の和文論文で、図 48 および引用文献 57 を含んでいる。

食肉の品質の中で消費者が最も重視するのは軟らかさである。屠畜後、食肉の熟成は 3~5℃で行われ、牛肉では 2~3 週間、豚肉では 6~10 日、鶏肉では半日~1 日を要するが、これらの熟成期間に、食肉の硬さは当初の値の 50~60%に低下する。熟成中の食肉においては、pH が 5.5 付近まで低下するなどの非生理的環境となるために、筋小胞体やミトコンドリアから Ca^{2+} が漏出するので細胞液の Ca^{2+} 濃度は、生体時の約 2,000 倍に相当する 0.2 mM に達する。このような条件下で、プロテアーゼによるタンパク質の加水分解が食肉の軟化の主因であると推定され、50~70 μM の Ca^{2+} で活性化される μ -カルパインの可能性が考えられている。しかし、 μ -カルパインの至適条件は 25℃および pH 7.5 であり、熟成に伴う食肉の軟化に μ -カルパインが寄与しているかどうかは疑問である。一方、熟成に伴う食肉の軟化の原因である筋原線維の諸構造の脆弱化は全て 0.1 mM の Ca^{2+} によって非酵素的に誘起されるので、「食肉の軟化に関するカルシウム説」が提唱されている。細胞骨格タンパク質であるデスミンは生体内では重合して直径 10 nm の中間径フィラメントを形成し、筋原線維の Z 線の周囲を取り巻き、隣り合う筋原線維を連結するとともに筋原線維を細胞膜の内側につなぎ止め、筋線維内で筋原線維の位置を固定する役割を果たしている。本論文は、熟成に伴う食肉の軟化機構を解明することを目的として、食肉の熟成に伴うデスミン中間径フィラメントの変化の機構について追究している。さらに、熟成中の食肉の非生理的条件において μ -カルパインが食肉の軟化をもたらしているのか否かについて追究している。得られた結果は以下の通りである。

(1) デスミン中間径フィラメントの変化

食肉の熟成に伴いデスミンは筋原線維の Z 線から消失し、デスミン中間径フィラメントが変化して Z 線から遊離することを見出した。精製したデスミンを重合させ、中間径フィラメントを形成させて粘度を測定すると、 Ca^{2+} の添加によって粘度は急激に低下し、0.1 mM Ca^{2+} で最大に起こった。電子顕微鏡観察により、デスミン中間径フィラメントは Ca^{2+} の特異的作用によって脱重合し、筋原線維の Z 線から遊離すること

が明らかになった。デスミンには Ca 結合能が認められ、中間径フィラメントを形成しているデスミン 1 モルに 1 モルの Ca^{2+} が結合すると、脱重合して食肉の軟化に寄与することを明らかにした。

(2) デスミン分子の変化

Ca^{2+} の結合によって脱重合し、単分子となったデスミンの変化をイムノブロット法で調べ、食肉の熟成に伴いデスミン分子は 46, 42, 40 および 38 kDa の分子断片に断片化すること、および調製した筋原線維をプロテアーゼ阻害剤の存在下で、0.1 mM の Ca^{2+} を含む溶液で処理した場合も同様に断片化することを見出した。デスミン分子の断片化は温度依存性を全く示さないことから、0.1 mM Ca^{2+} の特異的作用によることを明らかにした。断片化の速度は中間径フィラメントの脱重合の速度より非常に遅いことから、食肉の熟成の過程ではデスミン中間径フィラメントが脱重合した後、デスミン分子が断片化することが分かった。

(3) 非生理的条件における μ -カルパインの活性

骨格筋から精製した μ -カルパインについて、pH 7.0 のカゼインを基質として活性を調べ、15℃以下および pH 5.85 以下では全く活性を示さないので、食肉の熟成中の非生理的条件下では μ -カルパインは不活性であることを明らかにした。5℃および pH 5.5~5.8 においても μ -カルパインは至適条件における最大値の 24~28%の活性があるとの報告があり、熟成に伴う食肉の軟化に対する μ -カルパインの寄与を主張する根拠になっている。本研究の結果がこれと大きく異なる原因を究明し、5 mg/ml のカゼインの緩衝作用の方が 50 mM buffer より強いために、反応混液の pH は 0.3~0.4 unit も中性側へシフトすることを明らかにし、既報の結果は、pH が中性側へかなりシフトした反応混液を用いたために誤っていると論じている。

以上の結果に基づいて、食肉の熟成中に μ -カルパインは不活性であり、デスミン中間径フィラメントの脱重合およびデスミン分子の断片化が 0.1 mM の Ca^{2+} によって非酵素的に惹起される事実は、筋原線維構造の脆弱化が Ca^{2+} の特異的作用によるという「食肉の軟化に関するカルシウム説」を支持するものであると結論している。

以上の研究成果は熟成に伴う食肉の軟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、金輪 理佳子が博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認めた。