

令和元年6月10日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08007

研究課題名(和文) 筋肉内の遊離脂肪酸が味蕾細胞の味応答および霜降り肉の呈味性に及ぼす影響

研究課題名(英文) Effects of intramuscular free fatty acids on the response of taste buds and taste-traits of marbled beef

研究代表者

山之上 稔(Yamanoue, Minoru)

神戸大学・農学研究科・准教授

研究者番号：30182596

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：筋肉脂肪が多く霜降り肉として美味しさが知られる黒毛和種牛肉の呈味性と脂肪の関連性を、牛肉中の遊離脂肪酸(FFA)量から明らかにした。と畜後4で保存した黒毛和種牛肉汁中のFFA量は熟成中に増加するが、ホルスタイン種牛肉汁中のFFA量では顕著な増加を認めなかった。味覚センサ分析法で牛肉汁の呈味性へのFFAの影響を調べた結果、苦味雑味や旨味コク等の味要素は高値を示し、熟成中の筋肉FFA量の増加に伴いそれらの値は増加し、FFAの呈味要因としての可能性を示した。FFAが舌上の味蕾の味細胞を刺激することで牛肉の呈味性に影響する可能性を、マウス味細胞のCa<sup>2+</sup>イメージング法により検証を試みている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

学術的には、FFAが基本味として味細胞に作用するのか、あるいは甘味や旨味等の呈味物質と協同して呈味に影響する可能性も考えられ、味覚におけるFFAの受容機構解明において本研究の貢献が期待できると考えられる。一方社会的には、牛肉脂肪の脂肪酸組成は飼養方法で容易に改変できるため、牛肉の呈味へのFFAの影響を明らかにする本研究は優れた呈味性を示す牛肉の生産に指針を与えることができる。またFFAの質および量に基づく牛肉の呈味性評価法を確立できれば、例えば脂肪交雑の程度が同じ牛肉間の美味しさの違いの理由や高品質牛肉としての商品表示を可能にし、より良い牛肉の生産や開発につながるかと考えている。

研究成果の概要(英文)：Relationship between intramuscular fat and taste-traits of Japanese Black Wagyu beef which is well known as “marbling” and delicious beef was clarified in terms of the amounts of intramuscular free fatty acid (FFA). The amounts of FFA in beef broth prepared from Japanese Black Wagyu beef stored at 4 increased during postmortem aging, but not so in Holstein beef broth. As the results of estimation of taste-traits of broth sample by an electronic taste sensing system, some taste elements like acid bitterness showed high values and increased with postmortem time, indicating that increased FFA was possible to affect taste-traits of broth sample of Japanese Black Wagyu beef. Carrying out of Ca<sup>2+</sup>-imaging method are successively challenged in order to detect whether FFAs stimulate to taste cells prepared from mouse taste bud, and thereby possibly influence taste-traits of beef broth.

研究分野：畜産物利用

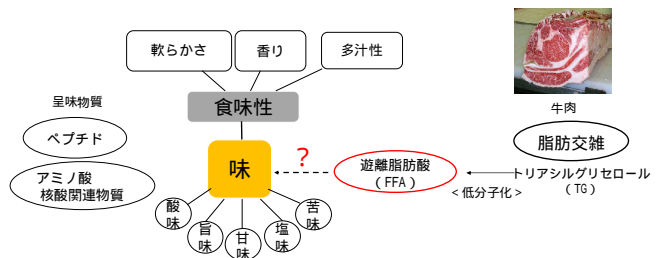
キーワード：牛肉の美味しさ 筋肉脂肪 遊離脂肪酸 味細胞 カルシウムイメージング 黒毛和種牛

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

霜降り牛肉の美味しさは衆目の一致するところである。美味しさに密接に関連する風味は、熟成中の牛肉に増加するペプチド、アミノ酸や核酸関連物質などの呈味物質に加えて、脂肪交雑として知られる筋肉内の脂肪が影響すると報告されている (Kim and Lee, Meat Sci, 2003; Okumura et al, J Anim Sci, 2007)。牛肉の脂肪含量および脂肪酸組成に関する研究は、Woodらの報告 (review, 2003) など多くの事例がある。また脂肪由来の牛肉の風味には筋肉内脂肪の量だけでなく脂肪の質、すなわち脂肪 (トリアシルグリセロール) を構成する脂肪酸、特に一価の不飽和脂肪酸であるオレイン酸の寄与が示されており (Westerling and Hedrick, J Anim Sci, 1979; Wood et al, Meat Sci, 2008) オレイン酸は脂肪の口溶けの良さや風味との関わりで牛肉の食味性に影響すると考えられている (Taniguchi et al, 2004)。また牛肉摂取と健康との関連から、飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸あるいは 6 と 3 の適正比率についての研究例も多い (Scollana et al, Meat Sci, review, 2006)。しかしながら、これらの研究は高品質の牛肉生産を目的に、生産時の筋肉内脂肪について調べられており、脂肪酸がトリアシルグリセロールの構成要素として捉えられている報告例がほとんどである。牛肉は長期間の熟成を経て加熱調理後に摂取されており、熟成および加熱で脂肪から遊離脂肪酸への低分子化が起きている可能性が考えられるが、この観点から牛肉賞味時の熟成に伴う筋肉内脂肪変化を呈味性と関連づけて明らかにした報告はほとんど見当たらない。

「霜降り」として知られる筋肉内脂肪の主体はトリアシルグリセロールであるが、それは味の認識において化学受容されることはなく、グリセロールにエステル結合していない低分子化した遊離脂肪酸の形で認識されると考えられる。近年、オレイン酸をはじめとする長鎖脂肪酸が旨味を促進し、苦味や酸味を抑制するという報告例 (Pittman et al, 2006) や、ラットおよびヒトの舌の味蕾に脂肪酸受容体が存在するという報告 (Matsumura et al, 2007; Galindo et al, 2012) がなされている。これら舌上の脂肪酸受容体の存在は、香りや多汁性、また口溶けで牛肉の美味しさに関わるとされる筋肉内脂肪が、低分子化を経て遊離脂肪酸の形で呈味という側面でも影響することを示唆している。しかし牛肉においては、熟成および加熱による遊離脂肪酸の量的・質的変動が呈味に寄与する可能性があるものの、牛肉の呈味に影響する直接的な証拠は未だ示されていない。



牛肉の筋肉内脂肪が呈味に及ぼす影響の仮想図

### 2. 研究の目的

霜降り肉として美味しさが知られている黒毛和種牛肉の呈味要因を、牛肉中の遊離脂肪酸との関連性から明らかにする。すなわち、先ずヒトが黒毛和種牛肉を咀嚼したとき口腔に広がる肉汁を調製し、牛肉摂取時までの熟成および加熱による肉汁中の遊離脂肪酸の量的・質的変化を明らかにする。また同条件における脂肪分解酵素リパーゼの活性を測定し、遊離脂肪酸変化の解明に資する。次に肉汁中の遊離脂肪酸変動と牛肉の呈味性変化との関連性を官能評価および機器分析で明確にする。一方で、マウス舌上の味蕾における遊離脂肪酸刺激による味細胞の味応答を調べることで、呈味性への遊離脂肪酸の直接的影響を明らかにする。これらの結果から、黒毛和種牛肉肉汁中の遊離脂肪酸の量的および質的変動と牛肉の呈味との関連性を示し、霜降り肉の優れた呈味の要因としての遊離脂肪酸の役割を明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

牛肉摂取時の呈味性と筋肉内遊離脂肪酸との関連を明らかにするために、呈味性に優れた黒毛和種牛肉と比較のためのホルスタイン種牛肉の第6と第7肋骨間ロース部を4で貯蔵し、経時的に採取した牛肉片を試料とした。低温で一定期間熟成した未加熱および加熱牛肉から肉汁を調製し、両牛肉の肉汁中のトリアシルグリセロールおよび遊離脂肪酸の変化を分析した。また牛肉中の呈味物質はグルタミン酸やイノシン酸および各種の有機酸が考えられるので、熟成および加熱による両牛肉肉汁中の既知の呈味物質変化を調べた。さらに味覚センサーを備えた味認識装置による機器分析および官能評価で肉汁の呈味性を客観的に分析した。それらの結果を踏まえて黒毛和種牛肉肉汁中の遊離脂肪酸が呈味性に及ぼす影響を解析した。

一方で実験動物であるマウス舌上の味細胞を単離して味受容体への遊離脂肪酸刺激の直接的影響を明らかにすることを試みた。マウスの舌の上皮細胞を剥離し、味物質の受容に関わるタンパク質の抗体を用いて味蕾の存在を確認後、味蕾の一部から Total RNA を抽出し、RT-PCR 法で味受容体やガストデュエシン等の mRNA の発現を確認した。さらに上皮細胞の有郭乳頭から味細胞を単離することを行なった。さらに味細胞培養液に Ca<sup>2+</sup>指標薬を加え、各種呈味物質および遊離脂肪酸を添加し、Ca<sup>2+</sup>イメージを得ることを試みている。

### 4. 研究成果

牛肉の美味しさでは筋肉脂肪量が重要視されている。筋肉脂肪が多く霜降り肉として美味しさが知られている黒毛和種牛肉の呈味要因を、牛肉中の遊離脂肪酸との関連性から明らかにす

ることを目的としている。H28 年度は、牛肉の美味しさに関連する筋内脂肪が、熟成および加熱調理によりどのように変化するかを明らかにすることであった。ヒトが牛肉を咀嚼したとき口腔に広がる肉汁を調製し、喫食時までの影響要因として考えられる熟成および加熱による肉汁中の遊離脂肪酸の量的・質的变化を分析した。黒毛和種牛肉の第 6 から第 7 肋骨間ロース部を 4 で保存し、と畜後 7、14、および 28 日目にロース芯から筋肉片を採取し、試料とした。黒毛和種牛肉との比較のためにホルスタイン種牛肉を入手し、同様に分析した。また客観的な評価手法である味覚センサーを用いる味認識装置で各肉汁試料の呈味性を機器分析し、さらに肉汁の呈味性をパネルの嗜好型官能評価により調べた。肉汁中のトリアシルグリセロールおよび遊離脂肪酸を定量し、熟成および加熱による量的変動を調べた結果、黒毛和種牛肉から調製した肉汁中の遊離脂肪酸量は熟成により増加し、加熱処理はそれらの変動にそれほど影響しないことを明らかにした。また両脂質クラスの脂肪酸組成は異なることが明らかになった。一方、ホルスタイン種牛肉汁中の遊離脂肪酸量の熟成による顕著な増加は認められないことが判った。味覚センサー分析および官能評価による手法で、黒毛和種牛肉汁の旨味値はホルスタイン種牛肉汁より高値であることが明らかになった。またホルスタイン種牛肉汁の未加熱および加熱の両試料で味に深みを与える苦味雑味値が上昇した。味覚センサーによる肉汁の呈味性測定では肉汁の調製方法により各味要素の値が変わることが示され、前処理法の確立が必要なが示唆された。

H29 年度は、4 °C でと畜後 7、14、21 日間熟成させた黒毛和種およびホルスタイン種牛肉の肉汁およびタンパク質を除いた試料の呈味性の変化を味覚センサで分析した。また味覚センサ分析と官能評価に最適な試料調製方法として煮出し法を示し、さらにこの方法で調製した牛肉肉汁試料を用い、味覚センサ分析および官能評価による牛肉呈味性への FFA の影響を調べた。黒毛和種牛肉の加熱肉汁試料では、熟成日数の経過に伴い FFA 量が増加する傾向であった。筋肉内脂肪の多い黒毛和種牛肉肉汁中のイノシン酸や遊離アミノ酸などの呈味物質量はホルスタイン種牛肉肉汁より少ないにもかかわらず、熟成 21 日の黒毛和種牛肉肉汁の味覚センサ分析では、ホルスタイン種牛肉肉汁より苦味雑味値、渋味刺激値および旨味コク値は高値で、BMS No. が高くなるのに伴いそれらの値は増加することが示され、FFA の影響が考えられた。一方、同じ肉汁の官能評価では、旨味値、旨味コク値、および甘味値は高値であることが示された。

H30 年度は牛肉肉汁中の遊離脂肪酸が舌上の味蕾に存在する味細胞を刺激し牛肉の呈味性に影響する可能性を、リアルタイム Ca<sup>2+</sup>イメージング法 (Narukawa et al, Biosci Biotechnol Biochem, 2006) で直接的に検証することを目的とした。すなわち舌上の味を化学的に受容する味細胞におけるシグナル伝達系は、甘味、苦味および旨味の呈味物質が結合する各受容体と G タンパク質共役型受容体であるガストデューションを刺激する。従って、牛肉肉汁および筋内遊離脂肪酸の添加刺激から得られるガストデューションおよび PLC 2 を介する Ca<sup>2+</sup>応答を解析することで、味細胞の呈味シグナルに対する遊離脂肪酸の影響を直接的に明らかにする。先ず熟成初期 (と畜後 7 日目) の黒毛和種牛肉およびホルスタイン種牛肉から肉汁試料を調製した。パルミチン酸、ステアリン酸、およびオレイン酸をそれぞれ単独に、または混合して添加することで、肉汁試料の呈味性に与える影響を味覚センサ分析および官能評価法で調べた。その結果、筋内遊離脂肪酸量の少ないホルスタイン種牛肉肉汁で「甘味」値が増強されることが両方法で示され、また「こくみ」値が強まることが官能評価法で判り、脂肪酸の添加が牛肉肉汁の味の特性に影響することが示唆された。牛肉肉汁の味特性に対する遊離脂肪酸の直接的な影響を検証するために、モデル動物であるマウスの舌における Ca<sup>2+</sup>応答解析に用いる味細胞の確認と単離を行った。マウスの舌を切除し、有郭乳頭を含む上皮を実態顕微鏡下で Albrecht et al の方法 (Cell Tissue Res, 1984) で剥離し、PBS 中に 4 で保存した。抗ガストデューション抗体を用いて切除した舌のパラフィン切片を材料に免疫組織染色を行い、有郭乳頭中の味細胞を確認した。また抗 PLC 2 抗体による凍結切片の蛍光免疫染色法で同様に味細胞を確認した。さらに調製した有郭乳頭の一部から Total RNA を抽出し、RT-PCR 法でガストデューションおよび味覚受容体の各 mRNA の味蕾における発現を確認した。続いて Ca<sup>2+</sup>イメージング法に用いる味細胞の単離を試み、1 個の有郭乳頭から数個の味細胞を得ることに成功している。引き続き単離味細胞の数を増やし、脂肪酸添加による味細胞の応答実験に進める計画である。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 9 件)

- (1) S. Ueda, E. Iwamoto, Y. Kato, M. Shinohara, Y. Shirai and M. Yamanoue, Comparative metabolomics of Japanese Black cattle beef and other meats using gas chromatography-mass spectrometry, Biosci. Biotechnol. Biochem., 査読有, 83, 137-147, 2019
- (2) Y. Zhao, Y. Nakada, S. Ueda, Y. Shirai, S. Ichimura, Y. Yoshida, M. Habara, H. Ikezaki and M. Yamanoue, Effects of intramuscular FFAs on beef taste-traits analyzed by electronic taste sensing system and sensory evaluation, Proc. 64nd ICoMST, 査読有, 2018
- (3) 山之上 稔・趙 亜楠・中田悠介・上田修司・市村さやか・吉田由香・羽原正秋・池崎秀和, 黒毛和種牛肉の筋内遊離脂肪酸とおいしさ、および味認識装置による呈味生評価 (II), 平成 29 年度食肉に関する助成研究調査成果報告書 Vol.36, 査読無, 36, 74-79, 2018
- (4) 山之上 稔・趙 亜楠・西田昌弘・中田悠介・上田修司・羽原正秋・池崎秀和, 黒毛和種牛

肉の筋内遊離脂肪酸とおいしさ、および味認識装置による呈味性評価、平成 28 年度食肉に関する助成研究調査成果報告書 Vol.35, 査読無, 35, 61-66, 2017

(5) A. Naka, M. Maruyama, M. Nakama, S. Ueda and M. Yamanoue, Detection of the connectin/titin 20-kda fragment increased in chicken sarcoplasm during postmortem aging, Proc. the 17th AAAP Animal Science Congress, 査読有, 1119-1122, 2016

(6) Y. Zhao, M. Nishida, Y. Nakada, S. Ueda, I. Ihara, K. Toyoda and M. Yamanoue, Effects of intramuscular FFAs on taste-traits of Japanese Black Wagyu beef, Proc. 62nd ICoMST, 査読有, 0-05-1-4, 2016

(7) 山之上 稔・趙 亜楠・西田昌弘・上田修司・井原一高・豊田浄彦, 熟成による牛肉の脂肪および呈味性の変化, 食肉の科学, 査読無, 57, 142-144, 2016

〔学会発表〕(計 15 件)

(1) 上田修司・井上亜希子・山之上 稔, 黒毛和種の筋肉に生じる微小な脂肪細胞分布に関する研究, 第 60 回日本食肉研究会 60 周年記念大会, 2019

(2) Y. Zhao, Y. Di, S. Ueda, Y. Shirai, M. Habara, H. Ikezaki and M. Yamanoue, Effects of adding FFAs on beef taste-traits analyzed by electronic taste sensing system and sensory evaluation, 日本畜産学会第 125 回大会, 2019

(3) 市村さやか・高橋真佐郎・吉田由香・猪口由美・小川晃弘・山之上 稔・服部昭仁, 長期熟成に伴う牛肉の食味性の変化と呈味性成分との関係, 日本畜産学会第 125 回大会, 2019

(4) Y. Zhao, Y. Nakada, S. Ueda, Y. Shirai, S. Ichimura, Y. Yoshida, M. Habara, H. Ikezaki and M. Yamanoue, Effects of intramuscular FFAs on beef taste-traits analyzed by electronic taste sensing system and sensory evaluation, The 64th ICoMST, 2018

(5) 趙 亜楠・中田悠介・上田修司・白井康仁・市村さやか・吉田由香・羽原正秋・池崎秀和・山之上 稔, 味覚センサ分析および官能評価による牛肉呈味性への筋内脂肪の影響, 第 59 回日本食肉研究会大会, 2018

(6) 趙 亜楠・中田悠介・上田修司・白井康仁・市村さやか・吉田由香・羽原正秋・池崎秀和・山之上 稔, 熟成中の牛肉の筋内脂肪変化に影響される呈味性の味覚センサおよび官能評価による分析(第 2 報), 日本畜産学会第 124 回大会, 2018

(7) 中田悠介・趙 亜楠・上田修司・鈴木杏子・岡 恵理子・高岡素子・羽原正秋・池崎秀和・山之上 稔, 熟成および加熱牛肉の呈味物質変化と味覚センサによる呈味性分析, 日本畜産学会第 123 回大会, 2017

(8) 趙 亜楠・中田悠介・上田修司・白井康仁・羽原正秋・池崎秀和・山之上 稔, 熟成中の牛肉における筋内脂肪変化に影響される呈味性の味覚センサおよび官能評価による分析, 日本畜産学会第 123 回大会, 2017

(9) 上田修司・岩本英治・白井康仁・山之上 稔, 質量分析計による黒毛和種牛肉の栄養成分のノンターゲット分析による検討, 日本畜産学会第 123 回大会, 2017

(10) 趙 亜楠・西田昌弘・中田悠介・上田修司・羽原正秋・池崎秀和・山之上 稔, 種々の牛肉サンプルの味覚センサーおよび官能評価による呈味性分析, 日本畜産学会第 122 回大会, 2017

(11) 上田修司・岩本英治・吉田和利・篠原正和・中田悠介・高杉瑠美・岩本英樹・野村郁代・小川隆文・白井康仁・山之上 稔, 黒毛和種牛肉の赤身部位の各種分析技術の検討, 日本畜産学会第 122 回大会, 2017

(12) 中田悠介・趙 亜楠・西田昌弘・井上朋香・上田修司・岡恵理子・高岡素子・山之上 稔, 熟成による黒毛和種およびホルスタイン種牛肉汁中の呈味物質の変化, 第 66 回関西畜産学会大会, 2016

(13) Y. Zhao, M. Nishida, Y. Nakada, S. Ueda, M. Habara, H. Ikezaki and M. Yamanoue, Beef taste-traits assessed by an electronic taste sensing system, The 17th AAAP Animal Science Congress, 2017

(14) Y. Zhao, M. Nishida, Y. Nakada, S. Ueda, I. Ihara, K. Toyoda and M. Yamanoue, Effects of intramuscular FFAs on taste-traits of Japanese black wagyu beef, The 62nd ICoMST, 2016

〔図書〕(計 2 件)

(1) 山之上 稔, シーエムシー出版, おいしさの科学とビジネス展開の最前線, 2017, 308-313.

(2) 山之上 稔, 朝倉書店, ポストハーベスト工学事典, 2019, 222-225.

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年：  
国内外の別：

取得状況（計 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：上田 修司，高岡 素子，羽原 正秋，池崎 秀和

ローマ字氏名：Ueda Syuji, Takaoka Motoko, Habara Masaaki, Ikezaki Hidekazu

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。