

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580380

研究課題名(和文)単離筋線維を対象とした極微量分析による食肉の旨味形成機構の解明

研究課題名(英文)Taste-forming mechanisms in single muscle fibers

研究代表者

千国 幸一(CHIKUNI, Koichi)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・畜産草地研究所畜産研究支援センター・専門員

研究者番号：40355061

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円、(間接経費) 1,110,000円

研究成果の概要(和文)：ウシおよびブタ筋肉に含まれる核酸関連物質を分析し、遅筋型筋肉は速筋型筋肉よりもイノシン酸含量が有意に低いことを明らかにした。また、と畜後の乳酸含量は遅筋型筋肉で少なく、そのため筋肉の最終pHに違いのあることを明らかにした。遅筋型筋肉は速筋型筋肉よりもと畜後のpHが高く維持されるため、ATP分解反応が促進し、イノシン酸含量が低くなったものと考えられた。一方、ブタ大腰筋より単離した筋線維について分析すると、筋線維型とイノシン酸含量に有意な関係が認められなかった。単一の筋肉内では貯蔵期間中にpHが平衡化し、結果としてイノシン酸を生成するATP分解反応に違いを生じさせなかったものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：To clarify the effects of muscle fiber type on the nucleotide content, the concentration of nucleotides were determined from bovine muscles, porcine muscles and porcine single muscle fibers. The concentration of inosine 5'-monophosphate (IMP) was significantly lower in the slow type muscles than that in the fast type muscles, and ultimate pH was higher in the slow type muscles. The results suggested that the higher pH condition accelerated ATP degradation process and then decreased the IMP concentration in the slow type muscles. The IMP concentration of an each single muscle fiber was determined in the fibers separated from porcine psoas major muscles. Although slow and fast type muscle fibers were separated from the same psoas major muscle, there was no significant difference in IMP concentration between the slow and fast muscle fibers. The equilibration of pH in a muscle post-mortem may explain the conflict of the results from muscles and single muscle fibers.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 畜産学・草地学

キーワード：食肉 筋線維型 旨味

1. 研究開始当初の背景

食肉の美味しさは柔らかさ等の物理的な性質と味・匂い等の化学的な性質を総合的に評価することで決定される。化学的な性質に影響する成分として脂肪が集中的に研究されてきたが、脂肪の増加による食肉の美味しさ向上は限界に達しており、消費者層で顕著となってきた健康志向からも今後は赤肉部分の美味しさを向上させることが食肉研究の主題となってくると考えられる。従来の研究から、赤肉部分で感じられる旨味成分の主役はアミノ酸と核酸関連物質、特にイノシン 5'-リン酸 (IMP)であることが明らかにされているが、IMPの量はと畜後の時間や温度環境によって大きく変動し、品種改良等のための安定した指標とすることには不向きである。

我々は味覚センサーで各種の牛筋肉を分析した研究から、筋線維型が異なれば食肉中の呈味成分の質・量に違いの生じる可能性のあることを初めて明らかにした。筋線維型の割合は遺伝的な支配を受けており、同一の筋肉部位であっても品種によって割合が異なっている。本研究でIMPの質・量が筋線維型によって影響されていることが明確になれば、筋線維型を指標とする品種の改良や飼養技術の改良で美味しい食肉を生産することが可能となる。

2. 研究の目的

我々はすでに、筋肉の筋線維型と味覚センサーの応答に関係があることを明らかにしている。しかしながら、食肉の主要な旨味成分であるIMPの含量と筋線維型の関係について含量や反応系の解析は行われておらず、筋線維型とIMPの関係は仮説にとどまっている。

本研究では、ウシとブタから各種の筋肉を分離し、IMPを含む核酸関連物質の変化を分析するとともに、と畜後のIMP生成反応を行う解糖系に関連する成分を分析することで違いを生じさせる反応機構を明らかにする。また、筋線維型の関与をより明確にするため、同一の筋肉から複数の筋線維を単離し、筋線維型を決定するとともに核酸関連物質を測定する。

3. 研究の方法

(1) ブタ肉の網羅的解析を行うため、と畜直後から0時間、4時間、24時間、7日で胸最長筋と中間広筋を採取し、貯蔵中に変動する水溶性代謝物質について、キャピラリー電気泳動-質量分析計 (CE-MS) による分析を行った。

(2) ウシでは、28ヶ月齢の黒毛和種より咬筋、半棘筋、胸最長筋、半腱様筋を採取して4日で貯蔵し、と畜後0時間、8時間、1日、3日、8日、14日の筋肉試料について、核酸関連物質、グリコーゲン、乳酸の分析を行った。核酸関連物質は5%過塩素酸溶液で抽出し、HPLCにて定量を行った。

(3) ブタでは、80kgおよび110kgのランドレース種ブタ各4頭から咬筋、横隔膜、半棘筋、胸最長筋、大腰筋、半腱様筋を採取し、貯蔵8日の試料について核酸関連物質、グリコーゲン、乳酸の分析を行った。

(4) 筋線維型を判定するため、抗ミオシン重鎖アイソフォーム抗体の作成を行った。ミオシン重鎖アイソフォームのアミノ酸配列の比較からアイソフォーム間で配列に違いのある

3ヶ所を選定し、各アイソフォームに対応するペプチドをマウスに免疫した。ペプチドに対する抗体生成の認められたマウスについてはモノクローナル抗体の作成を試みた。

(5)ブタの大腰筋を細切して高濃度の硫酸アンモニウム溶液につけ、実体顕微鏡下で筋線維の単離を行った。単離した筋線維を 0.5N KOH で溶解し、一部を筋線維型の判定に用いた。残りの溶液について核酸関連物質の抽出操作を行い、HPLC にて分析を実施した。

4. 研究成果

(1) ブタ胸最長筋と中間広筋における代謝物質の貯蔵中変動の主成分分析の結果から、親水性アミノ酸が中間広筋に、 α -アラニン関連物質が胸最長筋に多いこと、と畜から 7 日後では胸最長筋はアミノ酸、ジペプチド、ATP 分解産物に富み、中間広筋は含硫化合物とアミノ酸に富むことが明らかになった。

(2) ウシ筋肉のイノシン酸濃度(μ mole/g meat)はと畜後 8 日目で咬筋 0.13、半棘筋 0.69、胸最長筋 2.76、半腱様筋 3.08 と筋肉の種類によって違いがあり、速筋型筋肉である胸最長筋と半腱様筋では遅筋型筋線維の多い他の 2 筋肉よりも有意に高い含量であった。と畜後 14 日目の試料では全体的に含量が減少するものの、咬筋 0.16、半棘筋 0.14、胸最長筋 1.51、半腱様筋 1.72 と 8 日目の試料と同様の傾向であった。以上の結果は筋線維型構成が異なる速筋と遅筋で明らかにイノシン酸含量が異なることを示しており、筋線維型の違いがその主因となることを示唆していた。また、イノシン酸含量の経時的な変化を見ると、遅筋型筋肉である咬筋は他の筋肉と比べてイノシン酸の減少が速く、ヒポキサンチンへの分

解が促進されていた(図 1)。

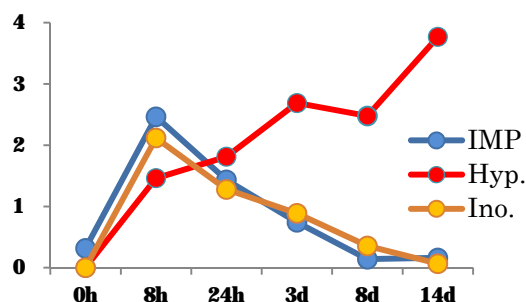


図 1. 咬筋の核酸関連物質含量

3 日目に測定した最終 pH は咬筋 6.05、半棘筋 5.75、胸最長筋 5.50、半腱様筋 5.59 と筋肉の種類によって違いがあり、遅筋型筋肉は速筋型筋肉よりも pH が高いことが明らかとなった。また乳酸含量は速筋型筋肉が遅筋型筋肉よりも高く、pH での結果と一致していた。

(3) ブタ筋肉のイノシン酸濃度(μ mole/g meat)は咬筋 2.28、横隔膜 2.07、半棘筋 3.28、胸最長筋 5.28、大腰筋 4.99、半腱様筋 4.83 と筋肉の種類によって違いがあり、速筋型筋肉は遅筋型筋肉よりも有意に高いイノシン酸含量を示した。生体重 80kg と 110kg の比較では有意な含量の違いは認められず、通常に市販されているブタ肉でも同様の傾向が見られるものと考えられた。ブタ筋肉の IMP 含量はウシ筋肉の IMP 含量と比べて高い値を示していたが、これは従来の報告と同様の結果であり、ブタ、ウシともに速筋と遅筋でイノシン酸含量が異なることが明らかとなった。ブタ筋肉の最終 pH は咬筋 5.99、横隔膜 5.80、半棘筋 5.83、胸最長筋 5.52、大腰筋 5.57、半腱様筋 5.54 であり、ウシと同様に遅筋型筋肉は速筋型筋肉よりも pH が高いことが明らかとなった。

(4)ミオシン重鎖アイソフォーム識別抗体を作成するために、3ヶ所のアミノ酸配列に対応する6種類のペプチドでマウスの免疫を行った。その結果、ミオシン分子尾部の配列に相当するペプチドから2a型および2x型の配列に対し、反応強度の異なる血清を得ることができた。この血清に該当するマウスでモノクローナル抗体の作成を試みたが作成することができず、本研究では筋線維型の判定に血清をそのまま用いることとした。また、2b型の判定にはすでに作成済みの抗血清を用いた。

(5)市販されているブタ大腰筋(ヒレ肉)より単離筋線維を作成した。いくつかのタンパク質変性条件を検討した結果、線維方向に沿って細切した筋肉片を高濃度硫酸アンモニウム溶液中で処理することにより、実体顕微鏡下で長さ1-3cmの筋線維を単離することができた。得られた筋線維を少量の0.5N KOHで完全に溶解し、その後の筋線維型判定と核酸関連物質分析の試料とした。合計80本の筋線維を分離して分析を行ったが、免疫反応が不明確なもの、核酸関連物質の含量が少なすぎるものもかなり存在していた。その中で明確な筋線維型を示した筋線維はslow型3本、2a型3本、2x型3本、2b型7本であった。しかしながら、これらに含まれる核酸関連物質の量に筋線維型間の違いは認められず、筋肉での分析とは異なった結果となった(表1)。

表1. 単離筋線維の核酸関連物質含量 (p mole/ 10mm)

筋線維型	IMP	Ino.	Hyp.
slow (n=3)	18.1 ± 5.8 *	4.2 ± 3.7	5.3 ± 4.8
2a (n=3)	25.3 ± 11.5	7.5 ± 3.0	2.6 ± 2.9
2x (n=3)	26.1 ± 22.7	2.4 ± 3.6	1.2 ± 1.5
2b (n=7)	25.9 ± 15.8	12.3 ± 10.9	3.7 ± 3.8

* mean ± SD

(6)筋肉では筋肉型とIMP含量の間に明確な関係が認められたにもかかわらず、単離筋線維間では有意な含量の違いが認められなかった。その原因の一つにはpHがあるのではないかと考えられた。ブタ筋肉でpHとヒポキサンチン(Hyp.)の関係を見ると、pHが高くなることでIMPの分解が促進されているものと推察される(図1,2)。

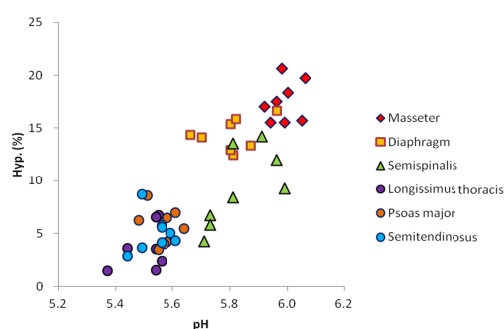


図2. ブタ筋肉のpHとヒポキサンチン含量

この関係はウシ肉でも同様で、乳酸含量が少なく、pHの高い筋肉でIMPは少なくなっていた。一方、試験に用いた単離筋線維はブタ大腰筋から作成されており、貯蔵期間中における乳酸の筋肉内移動によって均質なpH環境下に置かれたのではないかと推察される。以上のことから、筋肉内のIMP含量は筋肉を構成する筋線維の型によって変化し、その効果はと畜後のpHの違いによる部分が大きいと考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計1件)

千国幸一、佐々木啓介、本山三知代、中島郁世、尾嶋孝一、大江美香、室谷進、ブタ筋肉中のイノシン酸含量におよぼす筋肉型の影響、日本養豚学会誌、査読有、50巻、2013、8-14

[学会発表] (計 1 件)

千国幸一、佐々木啓介、柴田昌宏、松本和典、大江美香、室谷進、ウシの筋肉部位によるイノシン酸含量の違い、日本畜産学会第 115 回大会、2012 年 3 月 28 日、名古屋大学 東山キャンパス

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

千国 幸一 (CHIKUNI, Koichi)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・畜産草地研究所畜産研究支援センター・専門員

研究者番号：40355061

(2) 研究分担者

室谷 進 (MUROYA, Susumu)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・畜産草地研究所畜産物研究領域・上席研究員

研究者番号：50355062