

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 25 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580330

研究課題名（和文）食肉軟化に関わるコネクチンドメインの微生物発現と精製、および機能

研究課題名（英文） Expression, purification and function of recombinant connectin domains involved in meat tenderization during postmortem aging.

研究代表者

山之上 稔 (YAMANOUE MINORU)

神戸大学・大学院農学研究科・准教授

研究者番号：30182596

研究成果の概要（和文）：本研究は、熟成中の食肉軟化を誘起するパラトロポミオシンとサルコメア A-I 接合部のコネクチンとの結合・解離機構の解明のために、A-I 接合部領域のコネクチン断片を遺伝子工学的手法で作製し、両タンパク質の結合を調べている。一方で食肉の熟成中にサルコメア Z 線近傍のコネクチンが断片になり、筋漿中に遊離し増加するが、コネクチン断片増加と食肉軟化の関連性を明らかにするために、微生物中に発現させ精製した組換えコネクチン断片を抗原に、抗コネクチン断片抗体を作製している。

研究成果の概要（英文）：A myofibrillar protein, paratropomyosin weakens the rigor linkages between actin and myosin, and contributes to meat tenderization. Paratropomyosin was found at the A-I junction of myofibrils in living muscle and in muscle immediately postmortem. In chicken breast muscle paratropomyosin binds to connectin when examining binding of paratropomyosin at the A-I junction. In the present study, we produced all recombinant domains that constituted the connectin fragment at the junction and examined binding of paratropomyosin to each domain on PVDF membrane in order to clarify more precise binding site in connectin molecule. On the other hand, polyclonal and monoclonal antibodies produced against the connectin 20-kDa fragment, which was located in The Z-disk region and increased in chicken sarcoplasm with postmortem aging, were characterized in order to utilize for estimating meat aging.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
総計	3,900,000	1,170,000	5,070,000

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、熟成、コネクチン、パラトロポミオシン、遺伝子クローニング、  
遺伝子発現

## 1. 研究開始当初の背景

食肉の軟らかさは消費者が重視する肉質であるが、一般的に食肉は家畜の死後一定時間熟成されて提供される。その間に様々な物理的および化学的变化を受け、死後に形成された硬直結合が解除し食肉の軟化が起き、また風味が向上し、肉質が良くなる。従って熟成中に起こる食肉軟化に関する研究は重要である。

熟成中に起こる食肉軟化の機構を明らかにする研究において、アクチン-ミオシン間の硬直結合をパラトロポミオシンがぜい弱にすることがはじめて報告され (Takahashi, et al., 1985; Takahashi, et al., 1987)、ぜい弱化の結果、死後硬直時に短縮したサルコメア長が静止長へ復元することが示された (Yamanoue and Takahashi, 1988)。生筋および死直後のサルコメアではA-I 接合部に局在するパラトロポミオシンは、熟成中に Ca イオンにより遊離して細いフィラメント上に移行することが明らかにされた (Hattori and Takahashi, 1988; Hattori, et al., 2003)。その後、鶏、豚および牛の食肉で同様のことが報告され (Takahashi et al., 1995)、死後硬直解除におけるパラトロポミオシンの関与は、畜種にかかわらず認められることが示された。

一方、Ca イオンによる A-I 接合部からのパラトロポミオシン遊離の機構について解明が進められ、A-I 接合部でパラトロポミオシンはコネクチンに結合することが示された (Yamanoue et al., 1998; Fei, et al., 1999)。さらにパラトロポミオシン結合領域を構成する5個のコネクチンドメインが明らかにされている (Yamanoue et al., 2003)。

また食肉の熟成中に筋原線維のZ線がぜい弱になり、Z線で筋原線維が小片になり易くなる現象がある (Takahashi et al., 1967; Fukazawa et al., 1969)。熟成中の食肉の軟らかさと筋原線維小片化の程度には関連性が認められる (Moller et al., 1973)。近年の研究で、熟成中に筋原線維のZ線近傍でコネクチン変化し、筋原線維の小片化が起こり易くなることが示唆されている (C. Boyer-Berri and M. L. Greaser, 1998)。しかしながら、この筋原線維小片化に影響すると考えられるZ線近傍のコネクチン断片化の詳細は明らかにされていない。これまで、熟成中の食肉の筋原線維Z線近傍でコネクチンが一部断片化し、筋漿に溶離し増加することが見出されている。

## 2. 研究の目的

コネクチンはサルコメアのZ線からM線に至る分子量約300万の長大なタンパク質で

あり (Maruyama, 1994)、主としてImmunoglobulinタイプとFibronectin3タイプの両ドメインの規則的繰返し配置で構成されている (Labeit and Kolmerer, 1995)。従って筋肉試料から直接A-I接合部領域およびZ線近傍で断片化するコネクチン構成ドメインのみを調製するのは非常に困難と考えられる。熟成中の食肉軟化に関連するコネクチンの変化を、大腸菌に発現させ精製した組換えコネクチン断片利用して明らかにすることを本研究の目的とする。

はじめにA-I接合部領域のコネクチン構成ドメインを組換えコネクチンドメインとして大腸菌に発現させ、精製する。精製した各組換えコネクチンドメインとパラトロポミオシンとの結合を調べ、コネクチンの詳細なパラトロポミオシン結合部位を決定する。

また熟成中の筋原線維小片化に関連するコネクチン領域を組換えタンパク質として大腸菌に発現させ、精製する。精製組換えコネクチン断片を抗原に、Z線近傍に特異的に結合するモノクローナル抗体を作製しプローブとして利用することで、筋漿でのコネクチン断片の増加とZ線の脆弱化、すなわち筋原線維小片化との関連性を明らかにし、熟成中に筋原線維Z線近傍でコネクチンが断片化するメカニズムを解明する。

## 3. 研究の方法

① 鶏コネクチンの塩基配列から筋原線維のぜい弱化に関連するA-I接合部のコネクチンドメインおよびZ線近傍の20-kDa構成ドメインをコードするDNA領域増幅のためのPCRプライマーを設計した。鶏胸筋cDNAライブラリーを鋳型に、それらのDNA断片をPCRで増幅した。

② 増幅した各DNA断片の配列をDNAシーケンサーで確認後、発現ベクターに組込み宿主の大腸菌に導入した。発現誘導後の菌体を破碎し、破碎後の画分からカラムクロマトグラフィ法で組換えコネクチンドメインを精製した。

③ 精製組換えコネクチンドメインのN末端アミノ酸配列をプロテインシーケンサーで分析し、該当ドメインを確認後マウスに免疫し、抗体を産生させた。

④ 免疫マウス中に産生される抗体の有無をELISA法で検定する。抗体産生後に全採血し、抗血清を調製した。また脾臓細胞を摘出した。

⑤ 得られた脾臓細胞とミエローマ細胞を融合させ、ハイブリドーマ細胞を作製した。ハイブリドーマ細胞を培養し、Z線近傍の組換えコネクチンドメインに対する抗体を産生する細胞を、限界希釈法で単クローン化した。

⑥ A-I接合部およびZ線近傍の組換えコネク

チンドメインに対するそれぞれの抗血清および mAb の特性を調べた。すなわち両抗体の抗体価および特異性を ELISA 法およびウェスタンブロッティング法で検定した。また組換えコネクチンドメインと mAb の結合定数を ELISA 法で決定した。さらに組換えコネクチンドメインのプロテアーゼ分解物と抗体との結合を調べ、mAb が結合するエピトープ部位を明らかにした。

⑦ PVDF 膜に転写したパラトロポミオシンに対する組換えコネクチンドメインの結合を、抗体を用いるオーバーレイアッセイ法で検討した。

#### 4. 研究成果

(1) 先ず鶏胸筋から Total RNA を調製し、サルコメア A-I 接合部をコードするコネクチン cDNA を合成した。cDNA を鋳型に PCR 法で A-I 接合部の 4 種類の 4~5 連続ドメインコネクチン断片をコードする I44-I47、I47-I51、I64-I67 および I64-A1 DNA 断片を増幅した結果、電気泳動法で各質量サイズの泳動位置にバンドを認めた (図 1)。精製した DNA 断片を pGEX6p vector に挿入し、大腸菌 DH5 $\alpha$  株を形質転換後、vector に挿入した遺伝子の塩基配列を DNA シーケンサーで確認した結果、目的の DNA であることを確認した。

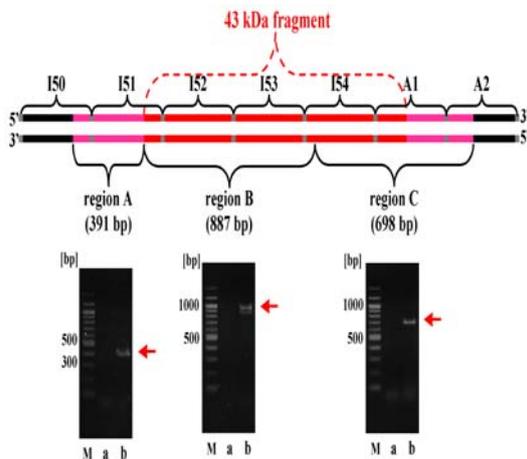


図 1 PCR によるコネクチン DNA 断片増幅

(2) 構築した発現プラスミドで大腸菌 Origami (DE3) 株を形質転換した。IPTG による発現誘導を SDS-PAGE で検討した結果、I44-I47 は約 65kDa に、I47-I51 および I64-I67 は約 75kDa に、I64-A1 は約 85kDa にバンドを確認した (図 2)。発現誘導後の大腸菌を超音波破碎後遠心分離し、上清にグルタチオンビーズを加えて洗浄後、SDS-PAGE に供した。その結果、精製した各 GST 融合組換えコネクチン断片のバンドを IPTG 発現誘導時と同じ位置に確認した。

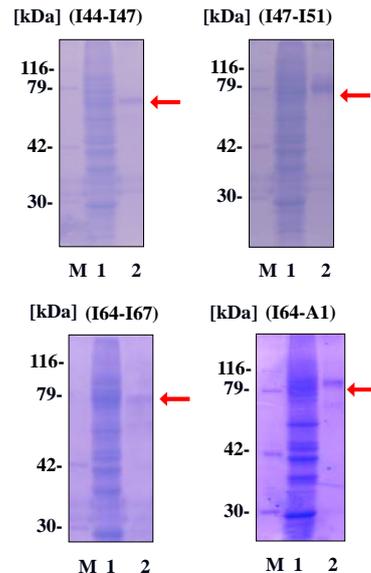


図 2 発現誘導後に精製した組換えコネクチン断片

(3) 精製組換えコネクチン断片と鶏肉から調製したパラトロポミオシンとの相互作用を調べることで、パラトロポミオシン結合部位の特定を試みた。I44-I48 および I64-A1 ドメインで構成される両コネクチン断片がパラトロポミオシンに結合する可能性が示唆されたが、明確ではなかった。次に各 GST 融合組換えコネクチン断片とパラトロポミオシンとの結合を GST pull down assay 法を用いて調べた結果、GST とパラトロポミオシン間に非特異的結合がみられ、GST の発色と組換え I64-I67 および I64-A1 ドメインの発色に多少の差異が認められた (図 3)。しかし明確ではないため、今後条件の検討が必要である。

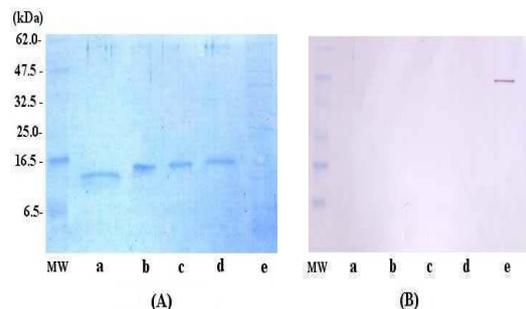


図 3 パラトロポミオシンと組換えコネクチン断片の結合

(4) 鶏サルコメア Z 線近傍のコネクチン領域である 20-kDa 断片の一部の 12-kDa 断片を、組換えコネクチン断片として大腸菌に発現させ、精製後ラットに免疫し、抗血清を調製した。抗コネクチン断片抗血清は組換えコネ

クチン断片のバンドに結合し、さらに熟成鶏肉から得られた筋漿中の 20-kDa に相当するバンドに特異的に結合することが、ウェスタンブロット法で明らかになった (図 4)。

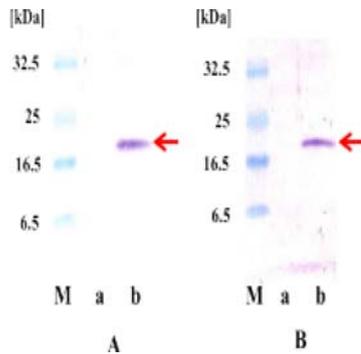


図 4 抗コネクチン断片抗血清による筋漿 20-kDa 断片の検出

(5) 組換えコネクチン 12-kDa 断片で免疫したマウス (Balb/c) から脾臓を摘出し、常法に従って脾臓細胞と腫瘍細胞 P3U1 からハイブリドーマ細胞を作製した。培養上清を ELISA 法で分析し、抗体産生細胞を限界希釈法で単クローン細胞にした後、培養上清中の抗体の特異性および筋漿中のコネクチン断片の増加をウェスタンブロット法で調べた。ELISA 法で抗体産生能を調べ、陽性を示す細胞の培養上清と熟成後の鶏筋漿との結合を調べた結果、1-3 C および 16-4 B4 の 2 種類の mAb を産生するハイブリドーマ細胞を得た。熟成中に経時的に調製した鶏筋漿と両 mAb との結合を調べた結果、いずれも熟成 48 時間から 20-kDa に相当するバンドが検出され始め、熟成に伴いバンド密度が濃くなった (図 5)。mAb のサブクラスは、1-3 C は IgG2b で、16-4 B4 は IgG3 であり、ともに  $\kappa$  軽鎖であった。

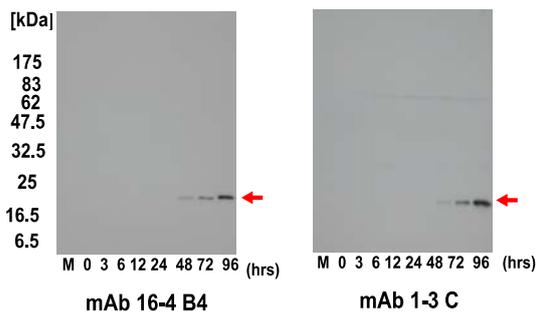


図 5 mAb による筋漿中のコネクチン 20-kDa 断片の検出

mAb の作製に用いた鶏組換えコネクチン 12-kDa 断片のアミノ酸配列を網羅するように、様々な長さの 7 種類のポリペプチドを GST 融合組換えタンパク質として発

現させた。各組換えタンパク質と両 mAb の結合を、ウェスタンブロット法による抗原マッピングによりエピトープ決定を試みた。mAb 16-4B4 は組換え 12-kDa 断片の N 末端近傍部に、mAb 1-3C は中心部のポリペプチドに結合し、両 mAb は異なるエピトープを識別した。熟成の進んだ鶏肉、豚肉および牛肉からの筋漿画分中に両 mAb で発色するバンドをそれぞれ認め、これらのエピトープは各畜種のコネクチンに共に存在することが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

① 山之上 稔, 熟成中の食肉軟化と筋原線維のコネクチンの変化およびパラトロポミンの関与, 食肉の科学, 査読無, 52(2), 143-150 (2011)

② M. Yamanoue, S. Ueda, K. Matsunaga, K. Onishi and N. Sioyama, Characterization of antibodies against the connectin/titin 20-kDa fragment increased in chicken sarcoplasm during postmortem aging, Proc. 57th ICoMST, 査読有, P072 in USB DISK (2011)

③ 上田修司・山之上 稔, 食肉の熟成と筋漿中の筋漿中のコネクチン断片増加, 食肉の科学, 査読無, 52(1), 120-123 (2011)

④ M. Yamanoue, T. Kubo, K. Matsunaga, S. Ueda and M. Takagi, Expression and antibody production of connectin fragment increased in sarcoplasm during postmortem aging of chicken muscle, Proc. 56th ICoMST, 査読有, Session C\_C0025 (2010)

⑤ 山之上 稔, 牛肉の軟らかさと熟成中に起こる筋原線維の変化, 関西畜産学会報, 査読無, 164 号, 29-35 (2009)

[学会発表] (計 7 件)

① 清水俊策・上田修司・桐村悠佑・本田和久・上増山 博・白井康仁・山之上 稔, 食肉の日齢評価に利用可能なタンパク質マーカーの探索, 第 115 回日本畜産学会大会要旨集 p. 248, 2012 年 3 月 29 日, 名古屋大学

② 上田修司・小川侑璃子・大西一政・山之上 稔, 鶏肉の熟成に伴う筋漿中のコネクチン 20-kDa 断片増加量と筋原線維小片化の関連, 第 115 回日本畜産学会大会要旨集 p. 248, 2012 年 3 月 29 日, 名古屋大学

③ 大下恵実・福田 崇・上田修司・山之上 稔, 鶏サルコメア A-I 接合部におけるコネクチンとトロポミオシンの結合検証について, 第 61

回関西畜産学会大会要旨集 p.15, 2011 年 9 月 13 日, 岡山大学

④施 恭平・橋本真季・塩山奈都子・上田修司・山之上 稔, 熟成に伴う豚肉筋漿中のタンパク質変化, 第 112 回日本畜産学会大会要旨集 p.120, 2010 年 3 月 29 日, 明治大学

⑤福田 崇・大下恵実・上田修司・山之上 稔, 鶏サルコメア A-I 接合部に及ぶコネクチン I 帯末端領域構成ドメインの微生物発現, 第 112 回日本畜産学会大会要旨集 p.118, 2010 年 3 月 29 日, 明治大学

⑥塩山奈都子・上田修司・山之上 稔, 鶏筋原線維 Z 線近傍でコネクチンに結合するモノクローナル抗体のエピトープ決定, 第 111 回日本畜産学会大会要旨集 p.87, 2009 年 9 月 28 日, 琉球大学

⑦施 恭平・橋本真季・上田修司・山之上 稔, 豚肉の熟成に伴う筋原線維 Z 線近傍コネクチンの変化, 第 59 回関西畜産学会大会要旨集 p.16, 2009 年 8 月 28 日, 鳥取大学

[その他]

ホームページ等

<http://www.ans.kobe-u.ac.jp/kenkyuuka/seimei/doubutusigen.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山之上 稔 (YAMANOUE MINORU)

神戸大学・大学院農学研究科・准教授

研究者番号 : 30182596

### (2) 連携研究者

上田修司 (UEDA SYUJI)

神戸大学・大学院農学研究科・助教

研究者番号 : 50379400