

学位論文全文に代わる要約 Extended Summary in Lieu of Dissertation

氏名： 中辻 伸嘉
Name

学位論文題目： コラーゲン代謝関連遺伝子発現量を指標とした
Title of Dissertation マダイ肉の物性評価に関する研究

学位論文要約：
Dissertation Summary

マダイ (*Pagrus major*) は我が国の主要な養殖海産魚種である。一般的に刺身として食されることが多く、肉の歯ごたえ (物性) は重要な肉質評価の指標となる。魚肉の物性には筋肉中のコラーゲンが関与することが知られており、コラーゲン含量を分析することは肉質評価の重要な項目の1つである。しかし、同分析は抽出操作が煩雑のため手間がかかること、試料の必要量 (1-10 g 以上) が多いことや筋肉組織内での結合組織の局在性によりばらつきが生じやすいこと等の問題点がある。そこで本研究では、コラーゲン代謝関連因子の遺伝子発現量に着目し、簡便かつ少量の試料で肉質評価が可能な新たな肉質評価手法の可能性について検証した。

コラーゲン代謝関連因子として Prolyl 4-hydroxylase (P4H) はコラーゲン合成に関与しコラーゲンに特異的構成アミノ酸であるヒドロキシプロリンを生合成する。一方、コラーゲン分解酵素として Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9)、内因性の MMPs 阻害因子として Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) が知られている。また、定量 PCR (qPCR) を用い上記の遺伝子発現量を測定する際、十分な質の RNA を必要とする。しかし、現場養殖魚を対象とするとサンプリングの際、迅速に RNA 抽出を行えず、操作中に同分子は分解する可能性がある。そのため、魚体筋肉 RNA の分解動態を評価する必要がある。マダイ肉の物性に関する既報から、季節間、養殖業者間で異なることが明らかになっている。加えて、天然マダイは刺身にした際の独特な肉の物性が特徴的であり、養殖魚より天然魚で肉の物性は優れていることが報告されている。これらの差異にはコラーゲン合成及び分解 (P4H, MMP-9 及び TIMP-2) の筋肉コラーゲン代謝が関与していることが想定されるが、詳細に関しては不明である。そのため、養殖及び天然マダイの肉の物性及び筋肉コラーゲン含量とコラーゲン代謝関連因子の遺伝子発現量との関連性について調べる必要がある。

初めに、現場養殖マダイにおいても、遺伝子発現量を指標とした評価系に必要な質の RNA を容易に確保できるのか検証するために、氷蔵したマダイの筋肉 RNA の安定性を調べた。その結果、氷蔵した死後 0 及び 5 日の筋肉 RNA の RNA Integrity Number (RIN) は 8.0 以上であった。この値は qPCR 分析に推奨されている RIN 値より高く、RNA が安定であることを示した。一方、死後 10 日の RIN 値は 4.3 まで減少し、RNA が分解していることが示された。特定の遺伝子発現量 (TIMP-2 及び β -actin) に関しても、上記同様に死後 5 日まで安定であったが、死後 10 日で減少し、RNA の分解が示された。このことから死後数日 (5 日以内) 経過したマダイを対象としても qPCR に供する質の RNA を抽出することができるが示された。

次に、養殖マダイを対象として肉の物性、筋肉コラーゲン含量及び同分子代謝関連遺伝子発現量を養殖業者及び季節間で比較し、それらの関連性について検討した。養殖業者 A (RA) の肉の破断強度及び筋肉コラーゲン含量は養殖業者 B (RB) のそれらと比べて有意に高い値を示した。RA ではコラーゲン分解酵素である MMP-9 遺伝子発現量は RB と比べて有意に低い値を示した。一方、コラーゲン合成に関与する P4H α (I) 及び MMP 阻害因子である TIMP-2 遺伝子発現量においては RA で高くなるとの想定に反して、RA で RB と比べて有意に低い値を示した。季節間比較に関しても成熟期と非成熟期の比較において破断強度

(様式 5) (Style5)

及び筋肉コラーゲン含量とコラーゲン代謝関連因子群の発現様式の関連性は上記とほぼ同様の傾向がみられた。次に、各コラーゲン代謝関連遺伝子発現量の発現様式がほぼ同様の傾向を示したため、各コラーゲン代謝関連因子の遺伝子発現量の関連性をみると、いずれの解析においても正の相関関係がみられ、3 因子の遺伝子発現量間の発現様式が同様の傾向であることが示された。この事実からマダイ生体内で各コラーゲン代謝関連因子の遺伝子発現量は同調的に発現していることが示唆された。すなわち、合成量が多いときは分解量も多く、合成量が少ないときは分解量も少ないことが想定される。このことから肉の破断強度及び筋肉コラーゲン含量の高かったマダイ筋肉ではコラーゲン分解系（負の効果）の MMP-9 の遺伝子発現量が抑制されていると同時に正の効果を与えるはずの P4H α (I)及び TIMP-2 の発現量も抑制されていることが示された。

最後に、養殖間で示された知見が天然マダイにおいても同様なのか検証するために、天然マダイ（和歌山県加太産：RK）及び養殖マダイ（高知県産：RC）を対象として肉の物性、筋肉コラーゲン含量、組織学的筋肉構造及び同分子代謝関連遺伝子発現量を比較し、それらの関連性について調べた。その結果、RK の肉の破断強度は RC のそれより有意に高い値を示した。従来から知られている破断強度と関係性がある筋肉コラーゲン含量は RK で高い傾向があったが、有意差はみられなかった。一方、組織学的観察から RK の筋繊維面積は RC のそれより有意に小さく、筋繊維の結合組織である筋内膜の網目構造が密であることが観察された。歯ごたえの良い RK では筋肉での結合組織網目構造の密度が肉の破断強度に関与することが示唆された。RK の筋肉で P4H α (I)、MMP-9 及び TIMP-2 の遺伝子発現量は、RC と比べていずれも約 2.6、19.3 及び 6.2 倍と高い値を示した。RK 及び RC 間で肉の破断強度に顕著な差異がみられたにもかかわらず、筋肉コラーゲン含量は差異がみられず、RK の P4H α (I)、MMP-9 及び TIMP-2 遺伝子発現量は RC と比べて顕著に高い値を示した。この結果は第 2 章の養殖間での傾向とは異なった。さらに、より詳細な知見を得るために、前章での結果と合わせてコラーゲン代謝関連因子の遺伝子発現量と筋肉コラーゲン含量及び肉の破断強度との関係性を検証した。その結果、RK でのコラーゲン合成に関与する P4H α (I)は養殖マダイで示された同遺伝子発現量と肉の破断強度及び筋肉コラーゲン含量の回帰直線上にプロットされた。一方、コラーゲン分解抑制に関与する TIMP-2 及びコラーゲン分解酵素である MMP-9 遺伝子発現量に関しては、養殖マダイで示された回帰直線上とは異なるクラスターにプロットされ、養殖マダイとは異なるコラーゲン分解系を有することが示唆された。このことから、RK 肉の物性は、RC のそれより硬く、この物性の差異には従来から知られているコラーゲン含量だけでなく、筋内膜の網目構造の密度が関与することが示唆された。また、RK の MMP-9 及び TIMP-2 遺伝子発現量は養殖マダイと比べて異なり、コラーゲン代謝（分解系）が養殖マダイとは異なることが示唆された。

以上の結果より、氷蔵したマダイの筋肉 RNA は死後 5 日間、安定であり、死後迅速に RNA 抽出を行うことが困難な現場養殖マダイにおいても、遺伝子発現量を指標とした評価系に必要な質の RNA を容易に確保できることが示された。また、養殖マダイにおいてコラーゲン代謝関連因子の遺伝子発現量は肉の破断強度及び筋肉コラーゲン含量と関係性が明らかになり、同遺伝子発現量を指標とした新たな肉質評価手法の可能性が示された。一方で、筋肉コラーゲン含量が高く、歯ごたえの良いマダイ筋肉では MMP-9 の遺伝子発現量が抑制されていると同時に正の効果を与えるはずの P4H α (I)及び TIMP-2 の発現量も抑制されていることが示された。また、天然マダイにおいて肉の破断強度には、筋肉のコラーゲン含量ばかりでなく、結合組織の密度も関与する。そのため、今後、本手法により高精度の結果を得るためには、コラーゲン代謝関連因子の遺伝子発現量のみならず、筋繊維形成に関与する因子を特定し、同因子の遺伝子発現量にも考慮する必要がある。