

学位論文審査の結果の要旨

氏名	中辻 伸嘉
審査委員	主査 森岡 克司 副査 足立 亨介 副査 小川 雅廣 副査 合谷 祥一 副査 岸田 太郎

論文名

コラーゲン代謝関連遺伝子発現量を指標としたマダイ肉の物性評価に関する研究

審査結果の要旨

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、コラーゲン含量の分析は肉質評価の重要な項目の1つとなる。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。

コラーゲン合成酵素として Prolyl 4-hydroxylase (P4H) は、コラーゲンに特異的な構成アミノ酸であるヒドロキシプロリンを生合成することが知られている。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。本研究では、コラーゲン代謝関連因子としてこれら3つの遺伝子に着目した。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、魚の死後における筋肉 RNA の分解動態を評価する必要がある。

第1章では、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以上であり、不安定と考えていた RNA は想定外に安定であったが、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と示された。

第2章では、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調べ、養殖業者間及び季節間の二つの観点から比較し、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。季節間での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、マダイ生体内で各コラーゲン代謝関連因子の遺伝子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。

第 3 章では、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、同分子代謝関連遺伝子発現量及び組織学的観察による筋肉の微細構造を比較し、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中のコラーゲン含量は 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。この結果から、天然マダイの物性は、市販養殖マダイより硬く、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、筋肉中の筋内膜の網目構造の密度が関与することが示唆された。

以上のように本研究では、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を明らかにした。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と筋肉コラーゲン含量及び肉の破断強度との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。これらの成果は、魚類筋肉におけるコラーゲン代謝に関する基礎的知見として水族生化学・分子生物学分野において優れたものであるとともに、養殖現場において、魚の少量の肉片から定量された遺伝子発現量を用いて魚肉の物性を推定する新たな肉質評価法の開発に繋がる可能性を示しており、実用的な視点からも非常に有用な知見を提示していると判断される。

本論文の公開審査会は、平成 31 年 2 月 9 日に愛媛大学農学部において開催され、論文発表とこれに関連する質疑応答が行われた。引き続き行われた学位論文審査委員会において本論文の内容について審査し、審査委員全員一致して本論文が博士（農学）の学位を授与するに値すると判定した。