

# ウシ骨格筋の形成機構とその熟成に関する分子生物学的研究

室谷 進（農業・食品産業技術総合研究機構畜産草地研究所）

muros@affrc.go.jp

ウシ骨格筋形成の初期過程について筋分化関連因子の発現制御機構を培養細胞系で明らかにした。また牛肉に関し、分解されることで熟成指標となる筋タンパク質トロポニン T の塩基配列を決定し、10 種の分子多型の存在を初めて示した。さらに、熟成におけるトロポニン T の分解機構を解明し、切断箇所が多型で異なること、速筋型分子から食味関連ペプチドが生成することを明らかにした。

## 1. はじめに

食肉の品質に対する消費者のニーズは多様であり、消費者を満足させ食肉自給率を高めるためにも肉質を自在に制御できる技術が求められている。屠畜後のみならず家畜生体の骨格筋形成まで遡って肉質制御因子を解明できれば、一方で生きた筋肉の質的または量的制御、他方で食肉熟成管理による肉質制御、両面での食肉の生産制御が可能になると考えられる。筋分化調節因子や細胞接着分子は筋タンパク質合成や筋線維肥大等、筋形成に重要であることがマウス等で知られているが、家畜の筋形成過程で調べられた例がほとんどなく、家畜の分子・細胞レベルの筋形成機構は不明であった。また、牛肉熟成中の筋タンパク質変動については生化学的に分解の有無が観察されていたにすぎず、その分解機構が詳細に解明されていなかったため、食肉軟化や食味改善の技術開発は閉塞的状况にあった。分子レベルで筋タンパク質の分解機構が解明されれば、それはアミノ酸やペプチド等の呈味性物質の生成や食肉軟化を制御する技術の基盤になると考えられる。

こうした背景から本研究ではウシを対象とし、培養細胞系により筋形成初期過程における筋分化調節因子と細胞接着分子の役割の解明、さらに牛肉で熟成指標としてのみならず食味改善成分としても応用が期待されるトロポニン T (TnT) 関連分子の動態解明を目的として解析を行った。

## 2. ウシ筋芽細胞の筋管形成機構の解析

骨格筋形成の初期過程では、単核の筋芽細胞が外から筋分化刺激を受け、細胞が分化、融合して多核化する（筋管形成）。本研究では、この過程で主導的な役割を果たす筋分化調節因子（MyoD, Myf5, myogenin, MRF4）および融合に重要な細胞接着分子（ $\alpha 4$  integrin, VCAM-1）の遺伝子塩基配列と mRNA 発現様式を解析した<sup>1,2,3)</sup>。その結果、ウシに特異な VCAM-1 アイソフォームを新規に発見した<sup>1)</sup>。また、筋分化調節因子の遺伝子は MyoD、Myf5、myogenin、MRF4 の順で活性化され、筋管形成初期過程の上流で MyoD、Myf5 が、下流で myogenin、MRF4 が段階に応じて役割を分担しながら筋管形成を調節することが示唆された<sup>3)</sup>。アンチセンス

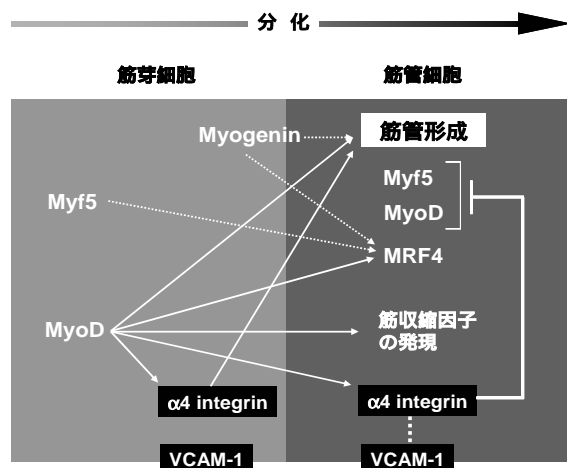


図 1. ウシ筋芽細胞の筋管形成過程における筋分化調節因子群、 $\alpha 4$  integrin, VCAM-1 の遺伝子発現制御の相互関係。本研究で明らかにした関係を実線でマウス等では関係を示した関係を破線で示した。は正の制御を、は負の制御を示す。

オリゴ DNA 法による MyoD の遺伝子発現抑制実験では、下流の MRF4、myosin 重鎖等の筋収縮因子だけでなく、 $\alpha 4$ 、 $\alpha 5$  および  $\alpha 7$  integrin の遺伝子発現抑制が観察された<sup>4)</sup>。筋管形成は  $\alpha 4$  integrin と VCAM-1 に対する抗体でも抑制された。以上の結果から、MyoD を中心とし  $\alpha$  型 integrin を介したウシ筋管形成の分子機構が明らかになった (図 1)。さらに、骨格筋は myosin 重鎖アイソフォームの発現様式により収縮速度の異なる速筋または遅筋に大別されるが、成牛骨格筋 10 部位で筋分化調節因子の発現を調べたところ、MyoD は速筋に、Myf5 は遅筋に相互に対照的な発現分布が見られることがわかった<sup>5)</sup>。このことから家畜の骨格筋の性質に応じた MyoD と Myf5 の固有の役割が新たに示唆された。

### 3. ウシ TnT cDNA 塩基配列の決定

TnT はその分解断片が食肉の軟化だけでなく熟成指標として注目されてきたことから、本研究では TnT の分解機構の解明を目的とした。分解されるときに切断部位を特定するために必要なアミノ酸配列構造情報が得るため、はじめに成牛骨格筋に発現する計 10 種の TnT アイソフォームの cDNA 塩基配列を決定した<sup>6)</sup>。また、ブタ TnT ではウシ TnT に比べ、どのアイソフォームもアミノ酸配列の 97%以上が一致した<sup>7)</sup>。これらの推定されたアミノ酸配列によると、N 末端領域にはアイソフォーム間または動物種間で顕著な違いがある一方、グルタミン酸残基に著しく富む点が共通していた。アイソフォーム間の違いは mRNA 上のミニエクソンの選択的スプライシングによるものであり、これが 10 種ものアイソフォーム間に等電点の違いをうみ、機能の差異をもたらすと考えられた。アイソフォームの発現様式は速筋と遅筋で異なることから、発現割合を調節された TnT アイソフォームが各骨格筋の収縮能に寄与するものと考えられた。

### 4. 食肉熟成中の TnT の分解機構の解明とその意義

分子レベルで食肉熟成中の TnT 分解機構を解明するために、分解による切断部位の決定を行った。おもに牛肉で熟成中に生成する複数の分解断片をウェスタンブロットで確認するとともに (図 2) その N 末端アミノ酸配列をペプチドシーケンサーで決定した<sup>8)</sup>。これを TnT のアミノ酸配列上へマッピングしてみると、アイソフォームに関わらずいずれの断片の配列も N 末端領域に位置していたことから、TnT が N 末端領域でのみ特異的に分解されることが強く示唆された。特に、最も多く生成して熟成指標となる「30 kDa」断片は、胸最長筋に多く発現する速筋型アイソフォーム fTnT2 および fTnT3 がそれぞれ His37-Glu38 および His31-Glu32 で切断されることにより生じることがわかった。また、N 末端領域はグルタミン酸残基に富むことから親水性が高いことが容易に予想され、プロテアーゼによる分解を受けやすく、また生じる断片の等電点は塩基性を示すと考えられた。これらの仮説は 2 次元電気泳動後のウェスタンブロット像で分解断片のスポットが塩基性領域に偏在したことから裏付けられた<sup>9)</sup>。さらに、決定された TnT 切断部位と熟成ではたらく有力なプロテアーゼの基質特異性を照合すると、TnT を分解するプロテアーゼが calpain であることが示唆された。実際にその一つ m-calpain はブタ筋原線維に作用し、本研究で決定された切断部位で TnT を切断した<sup>10)</sup>。以上の結果より、食肉熟成中の TnT の分解機構が明らかになった。

fTnT2 および fTnT3 はともに熟成中におもに 4 箇所切断され、牛肉および豚肉ではこのうち 2 箇所の切断により APPPPAEV(P/E)EVHHEEVH 配列をもつペプチドが生成することも明らかになった。これは水溶性ペプチドであるため、「30 kDa」断片とは異なり検出のための食肉試料調製に手間がかからず現場で使える熟成指標として非常に有効である。さらに近年、このペプチドが熟成中に食肉

の風味にまろやかさを与える酸味抑制作用をもつことが明らかにされ、その応用が期待されている。

## 5. TnT アイソフォームの多様性が食肉の熟成に与える影響

TnT のアイソフォームには APPPPAEV(P/E)EVHEEVH 配列をもたないタイプもあり、アイソフォーム間では分解の程度や分解産物の構造が少しずつ異なると考えられた。そこで発現するアイソフォーム型が異なるウシ胸最長筋、横隔膜、咬筋で TnT の分解様式を比較した結果、遅筋である咬筋からは「30 kDa」断片とは異なる断片が検出された<sup>11)</sup>。APPPPAEV(P/E)EVHEEVH ペプチドを含むアイソフォームが発現しない咬筋では、胸最長筋と分解産物が異なり、このペプチドが生じないと考えられた。このことは骨格筋部位によって最適な熟成指標が異なることを示すとともに、部位間に食味の違いがうまれる可能性を示している(図2)。また、横隔膜では熟成の時間経過に伴う TnT 分解の進行が胸最長筋より遅く、このことも骨格筋部位間に食味発現の違いをもたらすと考えられる。以上のように TnT アイソフォームが多様であることから、骨格筋部位に応じた適切な熟成管理によってそれぞれの部位に固有の食味を引き出すことができると考えられる。

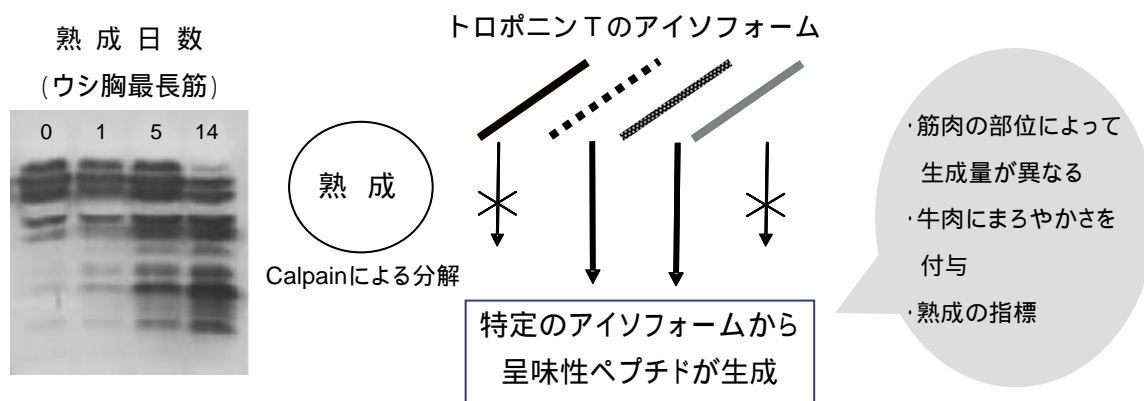


図2. 牛肉におけるトロポニンTの分解機構とTnT アイソフォームが熟成後の食肉に与える影響. 分解図式はウェスタンブロット像による。

## 6. おわりに

より高品質な食肉を効率的に生産するために、今後も家畜生体、熟成後の食肉、さらにその間の変換過程といった幅広い視野で筋肉を見つめながら研究の展開を考えていきたい。筋タンパク質の多くには収縮速度に応じたアイソフォームが存在する。今後も、TnTに限らず、分子多様性について研究を進めることで食肉におけるあらたな付加価値を見出していきたい。こうした研究成果がいずれ実用化されて生産・流通の現場に役立つことを願ってやまない。

## 謝辞

本研究ではウシ筋芽細胞の筋管形成機構の研究総括にあたり、東北大学大学院農学研究科の山口高弘 教授には懇切なるご指導をいただきました。食肉熟成における TnT 分解機構の研究遂行にあたっては、広島大学大学院生物圏科学研究科の西村敏英 教授、田辺創一助 教授、ならびに大学院生の北村慎一氏に共同研究の機会をいただき、多大なご指導とご支援をいただきました。農業・食品産業技術総合研究機構食品総合研究所の亀山眞由美 成分解析ユニット長には電気泳動スポットの質量分析にあたり多大なご支援をいただきました。さらに、研究全体において同機構畜産草地研

究所の千國幸一 食肉プロテオーム研究チーム長には終始懇切かつ多大なるご指導とご支援をいただきました。同研究所の新國佐幸 研究管理監、元品質開発部長の小堤恭平氏、他関係諸氏には本研究に対して深いご理解とご支援をいただきました。皆様に心より厚くお礼申し上げます。また、本農学進歩賞にご推薦下さいました日本畜産学会の泉水直人 理事長、農業・食品産業技術総合研究機構の柴田正貴 理事、ご支援いただきました同機構畜産草地研究所の松本光人 企画管理部長、他関係諸氏に深く感謝いたします。

## 業績リスト

- 1) Muroya S, Nakajima I, Chikuni K. 2001. Bovine skeletal muscle cells predominantly express a vascular cell adhesion molecule-1 seven-Ig domain splice form. *Zoological Science*, 18: 797-805.
- 2) Muroya S, Nakajima I, Chikuni K. 2001. Nucleotide sequencing of bovine alpha4 integrin cDNA, and its expression in the primarily-cultured skeletal muscle satellite cells. *Animal Science Journal*, 72: 505-512.
- 3) Muroya S, Nakajima I, Chikuni K. 2002. Sequential expression of myogenic regulatory factors in bovine skeletal muscle and the satellite cell culture. *Animal Science Journal*, 73: 375-381.
- 4) Muroya S, Nakajima I, Oe M, Chikuni K. 2005. Effect of phase limited inhibition of MyoD expression on the terminal differentiation of bovine myoblasts. *Development, Growth & Differentiation*, 47: 483-492.
- 5) Muroya S, Nakajima I, Chikuni K. 2002. Related expression of MyoD and Myf5 with myosin heavy chain isoform types in bovine adult skeletal muscles. *Zoological Science*, 19: 755-761.
- 6) Muroya S, Nakajima I, Chikuni K. 2003. Amino acid sequences of multiple fast and slow troponin T isoforms expressed in adult bovine muscles. *Journal of Animal Science*, 81: 1185-1192.
- 7) Kitamura S, Muroya S, Nakajima I, Chikuni K, Nishimura T. 2006. Amino acid sequences of porcine fast and slow troponin T isoforms. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 70: 726-728
- 8) Muroya S, Kitamura S, Tanabe S, Nishimura T, Nakajima I, Chikuni K. 2004. N-terminal amino acid sequences of troponin T fragments, including 30 kDa one, produced during postmortem aging of bovine longissimus muscle. *Meat Science*, 67: 19-24.
- 9) Muroya S, Ohnishi-Kameyama M, Oe M, Nakajima I, Chikuni K. 2007. Postmortem changes in bovine troponin T isoforms on two-dimensional electrophoretic gel analyzed using mass spectrometry and western blotting: The limited fragmentation into basic polypeptides. *Meat Science*, in press.
- 10) Kitamura S, Muroya S, Tanabe S, Okumura T, Chikuni K, Nishimura T. 2005. Mechanism of the production of troponin T fragments during postmortem aging of porcine muscle. *Journal of Agricultural and Food Science*, 53: 4178-4181.
- 11) Muroya S, Nakajima I, Oe M, Chikuni K. 2006. Difference in postmortem degradation pattern among troponin T isoforms expressed in bovine longissimus, diaphragm, and masseter muscles. *Meat Science*, 72: 245-251.

## Roles of Transcription Factors in Live Bovine Muscle and Troponin T in Aged Beef

Susumu Muroya (National Institute of Livestock and Grassland Science)

muros@affrc.go.jp