

北信越 畜産学会誌

Hokushinetsu Journal of Animal Science

第1号 令和3年9月 Vol. 1, September 2021

一般論文

- シバ (*Zoysia japonica*) 優占草地の放牧適応性に関する植物の相対成長率の効果
…板野志郎¹・坂上清一²・中神弘詞³・富松 元⁴・田中繁史¹・
山城秀昭¹・吉田智佳子³
(新潟大学農学部¹・農研機構北海道農業研究センター²・
農研機構畜産研究部門畜産飼料作研究拠点³・国立環境研究所⁴) 1
- ナノバブルを用いた卵胞培養法の開発
…耕作比香留・富岡郁夫*
(信州大学大学院総合理工学研究科生命医工学専攻) 9
- 石川県産黒毛和種における脂肪酸組成に関する遺伝的パラメータ及び枝肉形質との遺伝相
関の推定
…石田美保¹・西川和奈¹・西和 隆²
(石川県農林総合研究センター畜産試験場¹・
公益社団法人全国和牛登録協会²) 19
- 筋芽細胞の分化におけるコレシストキニンの作用
…二橋佑磨・高谷智英
(信州大学大学院総合医理工学研究科) 25
- 牛肉のドライエイジングにおけるエダケカビ (*Thamnidium elegans*) の影響について
…五箇大成¹・佐丸郁雄²
(富山県農林水産部農業技術課広域普及指導センター¹
富山県農林水産部農業技術課²) 35

北信越畜産学会

Hokushinetsu Society of Animal Science

北信越畜産学会誌の発行と遅延のお詫び

会員の皆様におかれましては、日頃より本学会の活動と運営について、格別のご支援・ご協力を賜っていることに、改めて厚く御礼申し上げます。

さて、令和元年に開催された68回大会（福井大会）後、新型コロナウイルス感染症拡大の影響により、本学会の活動も大きく影響を受けました。学会報発行については、対面での作業はなく、コロナ禍の影響はないものでありましたが、事務局、編集委員会の不手際等により、発行が大幅に遅れてしまいました。執筆者の皆様はもとより、会員の皆様に多大なるご迷惑をおかけしましたこと、深くお詫び申し上げます。申し訳ございませんでした。

これまでの間、本学会では日本学術会議協力研究団体としての登録、また論文のさらなる公開に向けたJ-stageへの登録等、準備を進めてまいりました。しかし、これまでのような大会講演要旨のみの掲載による巻号があると、連続した学会報の発行とは認められないことが判明しました。加えて、講演要旨のみの巻号が会員の皆様に広く行きわたらないこともありました。

また平成12年度には、これまでの日本畜産学会北陸支部としての活動から、北信越畜産学会と名称を変更し、地域畜産業への更なる貢献を目指すこととなりました。この新学会発足時に、機関誌も「北信越畜産学会報」から、「北信越畜産学会誌」へと改めることが決議されたものの、今日に至るまで機関誌の名称変更は行われてきませんでした。

そこで、コロナ禍での議論や外部団体登録等への調査結果を機に、改めて「北信越畜産学会誌」と機関誌名称を変更することとなりました。さらに、印刷費高騰などの影響とあわせ、掲載論文を広く公開する意味から、冊子体での発行を取りやめ、電子媒体として学会誌を発行することを令和4年度の総会においてご承認いただきました。

今後、編集委員会としては、可及的速やかに遅れを取り戻す努力をしてまいりますので、何卒ご理解を賜りますようお願い申し上げます。

北信越畜産学会誌

編集委員長 竹田 謙一

シバ (*Zoysia japonica*) 優占草地の放牧適応性に関する 植物の相対成長率の効果

板野志郎^{1*}・坂上清一²・中神弘詞³・富松 元⁴・
田中繁史¹・山城秀昭¹・吉田智佳子¹

¹新潟大学農学部

新潟県新潟市西区五十嵐2の町8050, 950-2181

²農研機構北海道農業研究センター

北海道札幌市豊平区羊ヶ丘1,062-8555

³農研機構畜産研究部門畜産飼料作研究拠点

栃木県那須塩原市千本松768, 329-2793

⁴東北大学生命科学研究科

宮城県仙台市青葉区片平2-1-1, 980-8577

(2020. 1. 30 受付, 2021. 4. 21 受理)

要約 シバ草地では、低草量にも関わらず放牧が実施され、安定した植生を維持する。このことから、シバ草地を構成する植物群落は放牧に適応するための成長特性を持つと考えられる。本研究では、放牧シバ草地の植物成長の放牧適応能力について検討した。ウシによる放牧を実施したシバ草地において、定期的に地上部植物量を調査した。調査データから植物群落の相対成長率（単位重量当たりの群落成長速度）を算出し、放牧期間中の植物群落の相対成長率におよぼす草量と季節の効果を、一般化線形モデルを用いて解析した。モデル解析から、生存部量は相対成長率に最も強く影響し（ $P < 0.0001$ ）、相対成長率は、生存部量が少ないほど高く生存部量の増加に伴い急激に減少する特性が示された。4月中旬から5月末まで相対成長率は減少したが、それ以降は特徴的な変化は示さず、モデル解析の結果からは相対成長率に対する季節の効果は示されなかった（ $P = 0.51$ ）。一方、試験区による相対成長率への効果が示された（ $P = 0.001$ ）。モデルから、最大相対成長率（生存部量 = 1 g m^{-2} 時で計算）は $0.142 - 0.150 \text{ g g}^{-1} \text{ day}^{-1}$ 、群落最大成長量は $168.9 - 203.4 \text{ g m}^{-2}$ 、最大群落成長速度は $1.72 - 2.07 \text{ g m}^{-2} \text{ day}^{-1}$ でその時の生存部量が $62.1 - 84.1 \text{ g m}^{-2}$ であることが、推定された。これらの結果は、シバ草地では生存部量がかかなり低いときに生産力が高まることを示唆している。シバ草地において放牧で低い草量水準に維持することが、植物生産力を高め、季節的な成長低下や他植物種の侵入を抑制し、高い放牧適応性を導くことになる。

キーワード：季節、シバ草地、相対成長率、草量、放牧適応性

緒言

シバ (*Zoysia japonica*) が優占する群落（シバ草地）は日本の代表的な半自然草地であり、放牧に利用し維持されることが多い。潜在的なシバ群落の成長は、4月か

ら開始し、8月下旬に成長量がピークに達するとされる（庄司, 1972）。シバ草地の植物群落高は一般に5 - 30 cm と低く、その草量も一般的な牧草地の草量と比較して非常に少ない。放牧には家畜の採食圧や栄養要求に耐えうる植物量が必要であるが、シバ草地はその低い草

* 連絡先：Tel.025-262-6696, E-mail：isis@agr.niigata-u.ac.jp

量水準にもかかわらず高い放牧適応性が報告されている(平吉と松村, 1957; Nakagami *et al.*, 2008)。逆にシバ草地において、放牧圧が弱まることで他の植物種が侵入し、シバの優占性を低下させる(板野ら, 2008)。

草地の放牧許容量には、植物量だけでなく植物群落の成長や生産力が関与する。植物群落の成長や生産力の指標として、単位重量当たり生産速度である相対成長率(RGR: relative growth rate)は広く研究されてきた。草本植物のRGRについて、種間比較(Grime and Hunt, 1975; Patton *et al.*, 2007)、季節変化(Damhoureyeh and Hartnett, 2002; MacColl and Cooper, 1967)、葉面積や草高等の植物量との関係(Bell, 2005; Hartvigsen and McNaughton, 1995; Meerts and Garnier, 1996; Poorter and Remkes, 1990; Shipley, 2006)などの報告がある。また、McNaughton (1983)は草食動物による植物の補償成長について言及し、いくつかの研究では草本植物群落のRGRに対する放牧の影響が示唆されている(Hilbert *et al.*, 1981; Hartvigsen and McNaughton, 1995; Oosterheld, 1992)。

これらの報告に基づけば、低い草量水準にもかかわらずシバ草地が高い放牧適応性を示すのは、シバ草地の植物群落のRGRを伴う成長特性が関与していると考えるのが妥当であろう。シバ草地において植物生産力の季節変化を示した報告例(庄司, 1972; 大久保ら, 1977)はあるが、放牧と強く関係する草量とシバのRGRの関係は明確にされていない。シバ草地における放牧による低い草量水準が草地の放牧適応性を支えているなら、成長特性と草量の関係は明らかにされるべきである。そこで本研究では、シバ草地のRGRに及ぼす草量と季節の影響について調査し、シバ草地の放牧管理と放牧適応性の関連性を検討する。

材料および方法

調査地

調査は、日本の関東北部に位置する藤荷田山生態観測試験地(36° 55' N, 139° 58' E, 標高300 m)において、シバが優占する平坦な半自然草地の隣接する3つの試験区(各1 ha, 以降P1, P2, P3)で実施された。試験区は黒毛和種成雌牛により、2007年5月17日から10月2日、2008年5月21日から9月30日まで定置放牧された。P1区は2頭のウシ(平均体重428.2 kg)が238.8カウデーで放牧され、P2区とP3区は約4 mのゲートで繋がっており、同一処理で3頭のウシ(平均体重457.4 kg)が1ヘクタール当たり185.8カウデーで放牧された。全試験区は、1974年まではススキ草種で優占さ

れていた。放牧はP1区で1985年からP2区とP3区で1974年から異なる放牧圧で開始され、現在はすべての試験区でシバが優占している(山本ら, 1997; 板野ら, 2008)。ただし詳細な植生は、異なった放牧履歴のため試験区間でいくらか異なった(板野ら, 2008)。

調査

調査は2007年と2008年に実施した。2007年は4月17日から10月2日、2008年は4月22日から10月7日の期間に平均(±標準偏差, SD)15±3日間隔で以下の処理が計23回繰り返された。各試験区で任意に4地点を選定し、各地点に5–10 cm離して25×25 cmの枠を2つ設置した。同地点の2つの枠の設置には、シバが被度80%以上で優占しており視覚的にはほぼ同じ植生に見える場所を選んだ。同地点の一方の枠内の植生を地際で刈り取り、もう一方の枠内の上にケージ(60×60×60 cm)を被せ枠内の植生を放牧家畜による食草から保護した。ケージで保護された枠内の植生は、次回の調査時に地際で刈り取った。刈り取った植物は、シバとシバ以外の植物種の生存部と枯死部(立ち枯れとりター)に分離し、70℃で48時間以上乾燥した後、乾燥重量(g)を測定した。なお本論文では枠内の植物の乾燥重量を1 m²当たりに換算して解析した。

データ解析

各調査地点の生存部の相対成長率(RGR_i)を、式1で計算した(Fisher, 1920)。

$$RGR_i = \frac{1}{t} \ln \frac{W_F}{W_S} \quad (1)$$

ここでtはケージ設置間隔(日)、W_Sはケージ設置時に刈り取った生存部重量(g m⁻²)、W_Fはt日後の生存部重量(g m⁻²)である。各時期の試験区ごとのRGR(各試験区のRGR_iの平均値)と生存部量(W:調査日の各試験区のW_Sの平均値)および季節(T:1月1日を1としたケージ設置日)が、解析変数として利用された。

RGR, 生存部量および季節間の応答性をプロットし、それらの関係を検討した上でRGRを目的変数とした一般化線形モデル(正規分布と恒等連結を仮定)を作成した。後述するが生存部量と季節に対するRGRの応答は非線形関係を示し、生存部量と季節の間には一部相関関係が示された。また各試験区の放牧履歴の違いがシバの生産力に対して異なる処理効果を持つ可能性がある。それゆえ、モデルの説明変数として、季節(T)と生存部量(W)の対数変換値とその交互作用、および試験区効果(Place: P1, P2, P3)を選択した。

$$[RGR] = [\ln W] + [\ln T] + [\ln W \times \ln T] + \text{Place} \begin{bmatrix} P1 \\ P2 \\ P3 \end{bmatrix} \quad (2)$$

式2のモデル統計量から適正な変数を選択し再モデル化を繰り返すことで、各説明変数のRGRへの影響を検討した。モデル選択の統計量として、各変数に対するt検定と赤池情報量基準(AIC)を利用した。またモデルの適合性を、尤度比 χ^2 検定、自由度修正済み R^2 、Normal Q-Q図から検討した。決定したRGRの適正推定モデル

を使い、群落成長速度(CGR: crop growth rate)を式3で計算した。

$$CGR = W \cdot [RGR] \quad (3)$$

結 果

データ特性

利用したデータの統計量を表1に示した。植物サンプル中の枯死部量は生存部量より高かった。生存部量の平均(\pm SD)は $131.2 \pm 48.3 \text{ g m}^{-2}$ (変動係数36.8%)で、

Table 1 Statistics of plants samples and relative growth rates

		<i>n</i>	Mean	\pm	SD	Min	Max
Green herbage mass (g m^{-2})	Total plants	75	131.2	\pm	48.3	13.2	231.9
	<i>Zoysia</i> species	75	119.8	\pm	45.7	10.6	219.2
	Other species	75	11.4	\pm	5.7	2.6	27.8
Dry herbage mass (g m^{-2})		75	175.1	\pm	44.6	65.0	303.0
The proportion of <i>Zoysia</i> species in green herbage mass		75	0.91	\pm	0.04	0.76	0.98
The proportion of dead parts in total herbage mass		75	0.58	\pm	0.12	0.32	0.90
Relative growth rate ($\text{g g}^{-1} \text{ day}^{-1}$) Total		69	0.014	\pm	0.016	-0.013	0.072
	Grazing period	60	0.009	\pm	0.010	-0.013	0.032
	Pre-grazing period	9	0.047	\pm	0.012	0.034	0.072

Values were calculated using the pre-grazing period samples from April 17 to May 15, 2007, and from April 22 to May 19, 2008, as well as grazing period samples from May 15 to October 2, 2007, and from May 19 to October 7, 2008.

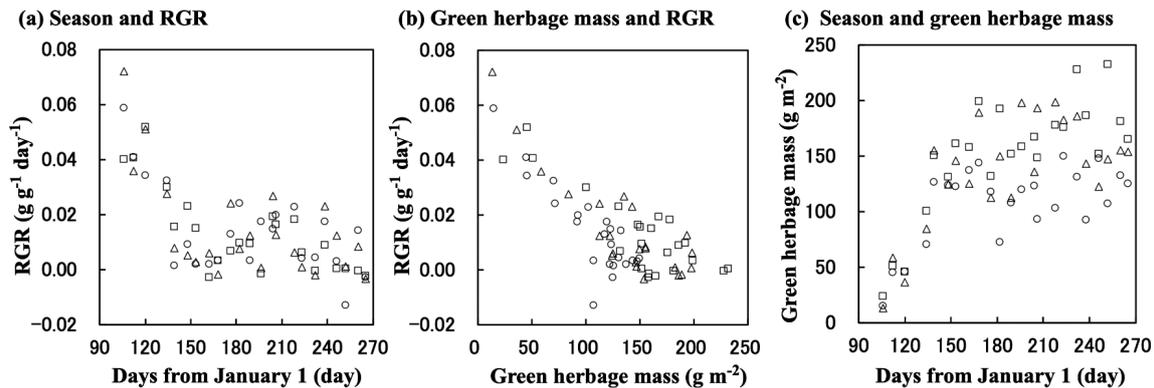


Figure 1. Relationships between the relative growth rate (RGR), season, and green herbage mass. Circles, triangles, and squares indicate P 1, P 2, and P 3 test areas, respectively. The units of the seasons denote the number of days from January 1, 2007, and 2008.

Table 2 Model statistics

	<i>n</i>	The P - statistic of model variable with t-test	AIC	Likelihood ratio χ^2	Model P-statistic	R^2
Model 1	67	$\ln W$ ($P < 0.0001$), $\ln T$ ($P = 0.72$), $\ln W \times \ln T$ ($P = 0.40$), Place ($P = 0.002$)	-464.4	117.3	$P < 0.001$	0.81
Model 2	67	$\ln W$ ($P < 0.0001$), $\ln T$ ($P = 0.51$), Place ($P = 0.002$)	-466.2	116.6	$P < 0.0001$	0.81
Model 3	67	$\ln W$ ($P < 0.0001$), Place ($P < 0.001$)	-470.9	116.2	$P < 0.0001$	0.81
Model 4	67	$\ln W$ ($P < 0.0001$)	-460.6	101.9	$P < 0.0001$	0.78

The model variables are log-transformed values of green herbage mass (*W*) and seasonal days (*T*), their interaction, and the effects of study sites (Place). AIC is Akaike's Information Criterion. The models were tested with a likelihood ratio χ^2 -test. R^2 values are adjusted for degrees of freedom.

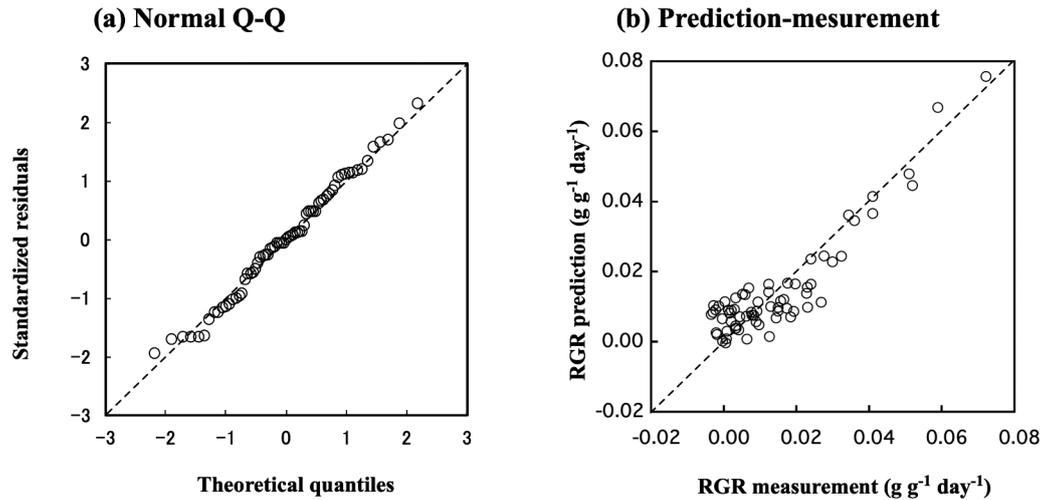


Figure 2. Assessments of the selected model with (a) normal Q-Q for residuals (b) the agreement between measured and predicted values for relative growth rate (RGR). The broken lines indicate the 1:1 ratio.

13.2–231.9 g m⁻²の範囲を広くばらついた。生存部量にしめるシバ生存部量の割合は平均で91%となり、シバ種を主体とした植物群落の成長が解析された。RGRの平均(±SD)は、0.014±0.016 g g⁻¹ day⁻¹で、放牧期間中のRGRは放牧前のそれより低い値を示した。

相対成長率、季節および植物量の関係

図1に示されるように、4月中旬から5月末(100–150日)の期間中にRGRは急激に低下したが、以降のRGRの変化は不明瞭であった。生存部量の増加に対しRGRは減少し、その減少の程度は生存部量が小さい値のときほど大きく、生存部量が100 g m⁻²以降緩やかになった。4月中旬から5月末(100–150日)の季節と生存部量0–100 g m⁻²の範囲で季節が進むと生存部量は増加したが、それ以外の範囲では明確な関係を示さなかった。また5月末(150日)以降のRGRと生存部量の季節変化、および生存部量100 g m⁻²以上のRGRの生存部量に対する応答は、試験区により異なる傾向を示した。

モデル選択

全変数を選択したRGRを推定するモデルは式4のように示された。

$$\text{RGR} = 0.164 - 0.029 \ln W - 0.0016 \ln T + (\ln W - 4.78)(\ln T - 5.21) + \text{Place} \begin{bmatrix} \text{P1} \rightarrow -0.0049 \\ \text{P2} \rightarrow 0.0042 \\ \text{P3} \rightarrow 0.0008 \end{bmatrix} \quad (4)$$

表2に示されるように、全変数モデル(モデル1)において生存部量(W)と季節(T)の対数値の交互作用効果は有意でないため(P=0.40)、交互作用効果を削除

し再モデル化した。次に、新しいモデル(モデル2)において季節(T)の対数値の効果も有意でなかったため(P=0.51)、さらに季節を削除した式5のモデル(モデル3)を作成した。

$$\text{RGR} = 0.146 - 0.028 \ln W + \text{Place} \begin{bmatrix} \text{P1} \rightarrow -0.0045 \\ \text{P2} \rightarrow 0.0039 \\ \text{P3} \rightarrow 0.0006 \end{bmatrix} \quad (5)$$

式5(モデル3)の生存部量(W)の対数値および試験区の両変数のRGRに対する効果はともに有意性(ln W: P<0.0001, Place: P<0.001)を示し、比較したモデルで最も低いAIC値を示した。また、データの残差はNormal Q-Q上で直線上に配置しており、残差が正規分布に近いことを示した(図2a)。このモデルからのRGRの予測値と実測値は自由度修正済みR²=0.81の高い精度で一致した(表2, 図2b)。以上のモデル解析の結果は、放牧期間中のシバ草地のRGRは季節の影響より草量の影響を強く受け、草量からある程度RGRを予測できることを示した。

相対成長率と成長速度のモデル推定

式5を使い、生存部量の変動に伴うRGR(g g⁻¹ day⁻¹)を推定した(図3)。初期成長におけるRGR(生存部量が0に近い1 g m⁻²時)は0.142–0.150の値を示した。生存部量が増加するに従い、RGRは急速に減少した。RGR=0時の生存部量(g m⁻²) (これは植物群落の最大成長量にあたる)は、P1区で168.9, P2区で228.7, P3区で203.4, 試験区の影響を考慮しない場合で198.8であった。

推定されたRGRを式3に当てはめ生存部量の変化に

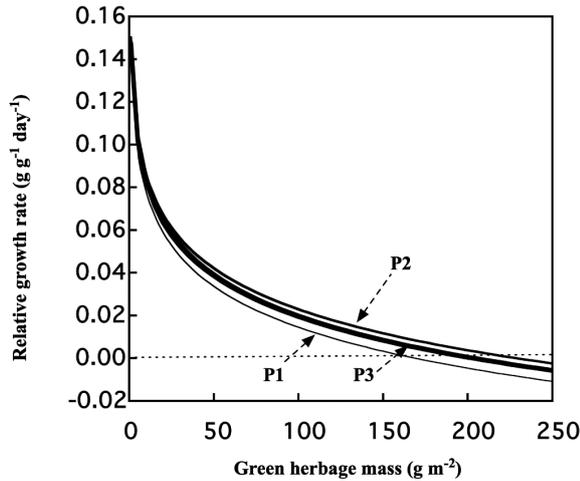


Figure 3. Relative growth rate estimation with green herbage masses in P1, P2, and P3 test areas, simulated by the model of Equation 5.

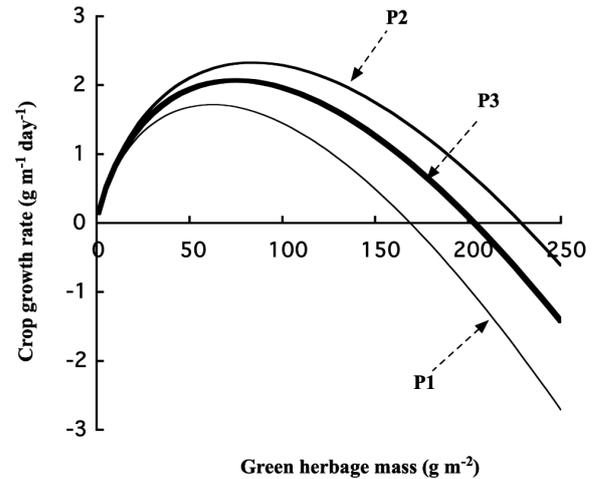


Figure 4. Crop growth rate estimation with green herbage masses in P1, P2, and P3 test areas, simulated by applying the relative growth rates estimated in Equation 5 to Equation 3.

伴う CGR ($\text{g m}^{-2} \text{ day}^{-1}$) を推定した (図 4)。推定された最大 CGR は P1 区で 1.72, P2 区で 2.33, P3 区で 2.07, 試験区の効果を考慮しない場合で 2.02 であった。その最大 CGR 時の生存部量 (g m^{-2}) は, P1 区で 62.1, P2 区で 84.1, P3 区で 74.8, 試験区の効果を考慮しない場合で 73.1 であった。

考 察

シバ草地の相対成長率

各調査地点の RGR (RGR_i) は各試験区の生存部の全ての重量の変化のみに基づいて計算された。しかし精度を改善するためには, RGR_i の推定量は式 1 において測定期間中の枯死量 (ΔD) に対して式 6 の形に補正される必要がある。

$$\text{RGR}_i = \frac{1}{t} \ln \frac{W_f + \Delta D}{W_s} \quad (6)$$

一般にシバ群落は 4 月から 8 月下旬にかけて成長する (庄司, 1972) ため, 枯死の大部分は成長期間後に始まると考えられる。本試験の調査期間は 9 月を除くと一般的なシバの成長期間中であり, サンプル間隔が比較的短期 (平均 15 日) である。そのため, 高い枯死部の割合 (表 1) は前年に枯死したものに強く由来すると考えられる。この前年からの枯死部の存在は正確な ΔD の把握を困難にしている。富松ら (2008) は, 本試験のシバ草地で, 草量推定時の誤差の主要因が枯死部量のバラツキにあることを報告している。このような理由から, RGR の算出には ΔD を考慮に入れなかった。

多くの研究が安定した条件下での牧草や草本種の RGR を調査している。Grime and Hunt (1975) は, 120 種の草本を含む植物種の潜在的 RGR ($\text{g g}^{-1} \text{ day}^{-1}$) が 0.031–0.386 の範囲にあることを示している。その他, セレンゲティ平原の優占種の 0.02–0.06 (Hartvigsen and McNaughton, 1995), パンパ草原の 2 つの永年草種の 0.02–0.08 (Oosterheld, 1992), 西ヨーロッパの 24 草種の 0.113–0.365 (Poorter and Remkes, 1990) 等の報告がある。シバでは Patton *et al.* (2007) が 0.085 の値を示した。これらの値と比較して, 本試験のシバ草地の RGR (全期間平均で 0.014; 放牧期間で 0.009) は低い。この低さは, 本試験が現実の放牧地での調査結果であることや ΔD を考慮していないことも影響しているかもしれない。また土壌や気候などの環境条件も植物群落の RGR には影響すると考えられる。特に Patton *et al.* (2007) が示したシバの RGR=0.085 は, 制御された試験栽培環境下で調査された値であるため, 放牧や自然環境の影響を受けにくく, 本研究のシバ草地の値より高くなったと考えられる。放牧条件下のシバ草地の RGR の報告はほとんど無いため, 本研究の結果はシバの成長特性に対する重要な情報であろう。

草量と季節の影響

生存部量の増加に伴う RGR の減少が線形回帰によって説明されるとき, 植物群落の成長はロジスティック曲線を示す。この曲線は植物の成長モデルとして広く利用されている。本試験ではシバ放牧草地の RGR は生存部量の初期の増加に対して急激な減少を示しており, 線形

とはかなり異なる。これは、放牧シバ草地の成長は、草量が少ない時に相対的に急激な初期成長を引き起こし、そこからの草量の増加で成長が急激に低下し、結果的に $168.9\text{--}228.7\text{ g m}^{-2}$ の少ない最大量までしか成長しないことを示している。

牧草の最大CGR ($\text{g m}^{-2}\text{ day}^{-1}$)は、イタリアンライグラス $15\text{--}35$ (大久保ら, 1975), ペレニアルライグラス $5.3\text{--}8.6$ (Watanabe *et al.*, 1984) 等の報告がある。また、寒地型牧草の平均CGR ($\text{g m}^{-2}\text{ day}^{-1}$)で $0.5\text{--}8$ (Okubo *et al.*, 1985; Fukuyama, 1985), 暖地型牧草の平均CGR ($\text{g m}^{-2}\text{ day}^{-1}$)で 15 (Okubo *et al.*, 1985) の研究例がある。本試験のモデルから予測されたシバ草地のCGRは最大でも $1.7\text{--}2.3\text{ g m}^{-2}\text{ day}^{-1}$ であり、これは牧草よりかなり低い。

このシバ草地の低いCGRから、シバ草地の放牧適性がそれほど高くないと解釈されるかもしれない。しかしながら、本シバ草地における最大CGR時の生存部量は非常に低かった ($62.1\text{--}84.8\text{ g m}^{-2}$)。板野ら (2005) はシバ草地においてウシの放牧で採食量が低下せず (つまり体重が低下しないで) 維持できる草量の水準を $100\text{--}120\text{ g m}^{-2}$ と推定しており、それ以下の草量水準で家畜を放牧することは少ないと考えられる。これは、草量が強い放牧区により低下しても、家畜の栄養維持水準の草量以下まで低下することはあまりなく、シバ草地の最大CGRに近づいていくため、常にCGRは増加へ導かれることを示唆している。季節と草量の関係 (図1 c) で示された様に、放牧期間の5月から9月 ($120\text{--}270$ 日) は、放牧区の高いP2区、P3区の生存部量でさえ、最大CGRの生存部量の水準 ($62.1\text{--}84.8\text{ g m}^{-2}$) 以上となるのがほとんどである。すなわち、5月から9月のシバ草地の放牧は、草地生産力の増加を導きシバ群落を維持されることになる。これは、シバ草地では牧草地に比べ生産力が低いため放牧収容力は制限されるが、シバ優占植生は放牧に対して高い適応性を持つことを示唆している。

反対に放牧しない場合や弱い放牧により生存部量の増加が導かれるなら、シバ草地の最大CGRから離れていくため、シバ優占植生のCGRは低下していくことになる。多くの草本種はシバより生存部量がより高いところに最大CGRを持つと考えられる。そのため、この生存部量の増加は、シバ以外の草本種のCGRを増加させることになる。一般的に植物群落の適正な維持のためには、その植物群落の最大CGRを維持することが、有効な手法となる。それゆえ、シバ草地で放牧圧を弱めることは、他の植物種優占への転換を進め、シバ草地が維持

できなくなる可能性が高い。

季節とRGRの関係 (図1 a) は、4–5月 ($100\text{--}150$ 日) の期間は、他時期より生産性が高く、季節が進むと草地の生産性が低下することを示している。庄司ら (1972) は放牧しない6月初旬の1回刈り取り処理を実施したシバ草地の生産性には季節性があることを示している。一般に植物生産力は季節的な変化を示すのが普通である。しかしながら本研究のモデル解析では季節の影響は大きくないことが示され、RGR推定モデルの変数としては採用されなかった。これは6月以降の季節の影響が確認できないことが一因と考えられる (図1 a)。庄司 (1972) は非放牧のシバ草地では9月以降の生産性が負の値を取ることを示した。しかしながら、本研究では、9月中 ($240\text{--}270$ 日) のRGRは正の値を取ることが多い (図1 a)。上述した草量とRGRおよびCGRの関係から示されるように、シバ草地では放牧による草量の抑制が植物成長を導くため、9月中も成長が引き起こされた可能性が高い。以上のことは、放牧シバ草地の管理を行うとき、放牧に伴う草量水準の変動が季節要因以上に考慮されるべきであることを示唆している。

ここで提示された結果から、シバ草地においては放牧で低い草量水準に維持することが、より高い植物生産力を導き季節的な成長低下や他草種の侵入を抑制する効果的な管理であることを示唆している。これらは、シバがもつ放牧期間中の生存部量が少ないほど高く生存部量の増加に伴い急激に減少するRGRの特性と、その結果から導かれる低い草量水準で高くなるCGRに起因する。シバ草地の放牧適応性の高さを決定しているのは、このような特徴的なシバ草地の成長特性と考えられる。

しかしながらシバ草地において、放牧により草量水準が低下したときになぜ生産力が高まるかについて、明確な生態学的知見はない。植物群落の草量には、植物群落の草高が大きく関わる。板野ら (2013) は、シバ草地が長期間の放牧により、高い植被を維持しながら $5\text{--}10\text{ cm}$ 程度の群落高に抑えられて維持されることを示した。おそらく、放牧圧が上昇することによりシバ草地の草高が低下し、その結果として草量は減少すると考えられる。シバ草地において、草高が低く草量が少ないとき生産力が上昇するには、密度の増加が関与している可能性が高い。ネザサ草地では、放牧によりネザサの草高が低下し植物量が減少するが、地下茎の節密度と稈密度が増加することで葉生産が促進され、生産力が増加することが示されている (大久保ら 2001; 渡辺ら 1999)。同様のことが、放牧シバ草地におけるシバのほふく茎の節密度と茎密度で生じている可能性があり、今後検討し

ていく必要がある。

文 献

- Bell LW. Relative growth rate, resource allocation and root morphology in the perennial legumes, *Medicago sativa*, *Dorycnium rectum* and *D. hirsutum* grown under controlled conditions. *Plant Soil*, 270: 199-211. 2005.
- Damhoureyeh SA, Hartnett DC. Variation in grazing tolerance among three tallgrass prairie plant species. *Am. J. Bot.*, 89: 1634-1643. 2002.
- Fisher RA. Some remarks on the methods formulated in a recent article on 'The quantitative analysis of plant growth'. *Ann. appl. Biol.*, 7: 376-372. 1920.
- Fukuyama M. Production characteristics of short grass pastures. *JARQ*, 19: 202-211. 1985.
- Grime JP, Hunt R. Relative growth-Rate: Its range and adaptive significance in a local flora. *J. Ecol.*, 63: 393-422. 1975.
- Hartvigsen G, McNaughton SJ. Tradeoff between height and relative growth rate in a dominant grass from the Sarengeti ecosystem. *Oecologia*, 102: 273-276. 1995.
- Hilbert DW, Swift DM, Detling JK, Dyer MI. Relative growth rates and the grazing optimization hypothesis. *Oecologia*, 51: 14-18. 1981.
- 平吉功・松村正幸. シバ牧野に関する研究：第1報. 日本草地研究会誌, 3: 16-22. 1957.
- 板野志郎・堤道生・坂上清一・中神弘詞・佐々木貴宏. 植物生長と被食量の関係を利用した放牧家畜群の被食量推定法. 日本草地学会誌, 51(別): 302-303. 2005.
- 板野志郎・堤道生・前田聡子・坂上清一・高橋繁男・中神弘詞・山本嘉人・高橋 俊・北原徳久・芝山道郎・中村徹. 藤荷田山半自然草地の長期人為的処理条件下における植生遷移：(1) 試験地・処理・植生 (植被率・群落高・種組成). 草地の動態に関する研究第7次中間報告 (梨木守・板野志郎・坂上清一・堤道生・下田勝久・加納春平編). 34-46. 農研機構畜産草地研究所草地動態モニタリング室. 那須塩原. 2008.
- 板野志郎・堤道生・坂上清一・中神弘詞・下田勝久・富松元. 藤荷田山地区シバ優占草地における放牧強度と植生遷移：2002-2011. 草地の動態に関する研究第8次中間報告 (梨木守・池田哲也・板野志郎編). 48-57. 農研機構畜産草地研究所. つくば市. 2013.
- MacColl D, Cooper JP. Climatic variation in forage grasses: III Seasonal changes in growth and assimilation in climatic races of *Lolium*, *Dactylis* and *Festuca*. *J. Appl. Ecol.*, 4: 113-127. 1967.
- Mcnaughton SJ. Compensatory plant growth as a response to herbivory. *Oikos*, 40: 329-336. 1983.
- Meerts P, Garnier E. Variation in relative growth rate and its components in the annual *Polygonum aviculare* in relation to habitat disturbance and seed size. *Oecologia*, 108: 438-445. 1996.
- Nakagami K, Sakanoue S, Takahashi S. Impact of defoliation intensity on net primary productivity of *Zoysia japonica*-dominated pasture under grazing conditions. *JARQ*, 42: 223-229. 2008.
- Oosterheld M. Effect of defoliation intensity on aboveground and belowground relative growth rates. *Oecologia*, 92: 313-316. 1992.
- Okubo T, Hirakawa M, Okajima T, Kayama R, Tano H, Kihira N. Energy efficiency of primary and secondary production in grazed pasture of *Dactylis glomerata* as compared with those of *Paspalum notatum*. In: Proc. XV Int. Grassl. Congr., 736-738. 1985.
- 大久保忠旦・高橋繁男・秋山侃. クロロフィル量を指標とした牧草の物質生産の解析：IV クロロフィル含量の異なる栄養系を用いたイタリアンライグラス群落の最大乾物生産速度. 日本草地学会誌, 21: 280-290. 1975.
- 大久保忠旦・高橋繁男・秋山侃・井上楊一郎・岩元守男. 放牧草地のエネルギー効率：第2報シバ型草地の物質生産と光利用効率の季節的推移—禁牧した場合. 日本草地学会誌, 23: 30-42. 1977.
- 大久保忠旦・渡辺也恭・板野志郎. 放牧と禁牧条件下におけるネザサ (*Pleiblastus chino* var. *viridis*) の物質生産. 日本草地学会誌, 47: 262-268. 2001.
- Patton AJ, Volenec JJ, Reicher ZJ. Stolon growth and dry matter partitioning explain differences in Zoysiagrass establishment rates. *Crop Sci.*, 47: 1237-1245. 2007.
- Poorter H, Remkes C. Leaf area ratio and net assimilation rate of 24 wild species differing in relative growth rate. *Oecologia*, 83: 553-559. 1990.
- Shipley B. Net assimilation rate, specific leaf area and leaf mass ratio: Which is most closely correlated with relative growth rate? A meta-analysis. *Funct. Ecol.*, 20: 565-574. 2006.
- 庄司舜一. シバ型草地の生態に関する研究：(1)シバ実験個体群における生産と生長特性. 東北大学農学研究所報告, 24: 149-176. 1972.
- 富松元・板野志郎・堤道生. ライジングプレートメータを用いたシバ優占草地の草量推定に影響を与える要因の解析. 日本草地学会誌, 54: 134-140. 2008.
- Watanabe K, Sato Y, Sakurai T, Koyama Y. Effects of fertilization level on the regrowth of perennial ryegrass : II Growth analysis in process of regrowth. *Jap. J. Grassl. Sci.*, 29: 298-303. 1984.
- 渡辺也恭・板野志郎・大久保忠旦. 放牧条件下でのネザサ (*Pleiblastus chino* var. *viridis*) の地上茎密度の維持機構. 日本草地学会誌, 44: 328-331. 1999.
- 山本嘉人・斎藤吉満・桐田博光・林治雄・西村格. ススキ型草地における異なる人為圧による植生遷移の方向. 日本草地学会誌, 42: 307-314. 1997.

Effects of the relative growth rate of plants on adaptability to grazing in *Zoysia*-dominated pastures

Shiro ITANO¹, Seiichi SAKANOUÉ², Koji NAKAGAMI³,
Hajime TOMIMATSU⁴, Shigefumi TANAKA¹,
Hideaki YAMASHIRO¹, Chikako YOSHIDA¹

¹Faculty of Agriculture, Niigata University, 8050, Ikarashi 2-no-cho, Niigata, 950-2181

²NARO Agricultural Research Center for Hokkaido Region, 1 Hitsujigaoka, Toyohira, Sapporo, Hokkaido, 062-8555

³Nasu Research Station, Institute of Livestock and Grassland Science, NARO, 768 Senbonmatsu, Nasushiobara, Tochigi, 329-2793

⁴Graduate School of Life Sciences, Tohoku University, 2-1-1 Katahira, Aoba-Ku, Sendai, Miyagi,

Abstract

Pastures dominated by *Zoysia japonica*, whose growth features probably exhibit good adaptability to grazing, are used in grazing management despite their relatively low herbage mass. We studied the effects of herbage mass and season on the relative growth rate (RGR) of plants in *Zoysia*-dominated pastures using a generalized linear model and examined their potential for grazing adaptability. The effect of green herbage mass on the RGR in the model was highly significant ($P < 0.0001$). The RGRs were higher when pastures exhibited lower green herbage mass, showing a logarithmic decrease with increasing green herbage mass. No seasonal effect on the RGR was observed ($P = 0.51$), whereas we did detect a site-specific effect ($P < 0.001$). The model simulated a maximum RGR for initial plant growth (at green herbage mass = 1 g m^{-2}) of $0.142\text{--}0.150 \text{ g g}^{-1} \text{ day}^{-1}$, a maximum plant growth of $168.9\text{--}203.4 \text{ g m}^{-2}$, maximum crop growth rate (CGR) of $1.72\text{--}2.07 \text{ g m}^{-2} \text{ day}^{-1}$, and green herbage mass at maximum CGR of $62.1\text{--}84.1 \text{ g m}^{-2}$. We conclude based on these growth features that pasture management, controlling lower herbage mass with grazing, enables higher plant production, suppresses seasonal growth decline and invasion of other plant species, and is related to good adaptability to grazing in *Zoysia* pastures.

Keywords: grazing adaptability, herbage mass, relative growth rate, season, *Zoysia* pasture

ナノバブルを用いた卵胞培養法の開発

耕作比香留・富岡郁夫*

信州大学大学院 総合理工学研究科 生命医工学専攻
長野県上伊那郡南箕輪村8304

(2020.1.30 受付, 2020.4.30 受理)

要約 本研究は、高い浸透力をもったナノバブルを培養液に用いることで、酸素などの気体や吸着された栄養素などが卵胞の基底膜を通過できると考え、構造を保ったまま卵胞を培養することを目的に実施した。超微細気泡発生装置を用いて空気 (Air 培地) あるいは100%窒素ガス (N₂培地) を通気し、ナノバブル含有培地を作製した。各培地でマウス線維芽細胞 (MEF) および未成熟マウスより採取した卵胞を培養し、細胞増殖率と遺伝子発現量、卵胞成長と生存率を解析した。その結果、N₂ナノバブル培地で培養した MEF において、Sirt1 および Hif1a 遺伝子の発現が有意に上昇した。また、ナノバブルの卵胞培養に対する顕著な効果は認められなかったものの、ナノバブル含有培地で卵胞生存率および細胞増殖率が上昇する傾向が見られた。以上の結果、ナノバブルの気相条件や培地への含有量の改良などにより、細胞の遺伝子発現やミトコンドリアの機能制御を介して細胞・組織培養に応用できる可能性が示された。

キーワード：体外培養, ナノバブル, ミトコンドリア, 卵胞

緒言

近年、工学分野においてナノテクノロジーが目覚ましい進歩を遂げているが、医学や農学分野にもその技術が応用され始めている。その中でナノバブル技術はマイクロバブルを圧壊あるいは剪断することで、水中では不安定で短時間しか存在しえないナノバブルを長時間、安定して存在させることに成功した技術である。このナノバブルが持つ細胞間・細胞内への高い浸透力が細胞・組織培養技術分野で注目されている (Bhandari et al., 2017; Cavalli et al., 2009)。現在の細胞培養技術では、培養皿に一層あるいは数層までの培養が限界であり、何十、何百層の立体構造をもつ組織や器官の体外培養は不可能である。その理由の一つに酸素や栄養素が内部の細胞層まで浸透せず、壊死してしまうことが挙げられる。組織や器官を体外で培養する技術は、未分化細胞や一部の組織から器官を形成させることで損傷器官の修復や、摘出器官の保管培養を可能にするなど、農医工分野で重要なものである。

一方、動物生産における生殖補助技術において、体外での卵胞培養は多数の卵母細胞生産を可能とする技術である。卵母細胞はそれを取り囲む顆粒層細胞と相互作用を持ち、外層にコラーゲンを主成分とする頑強な基底膜で保護された卵胞という立体構造を保ちながら発育する。しかし、未発育卵胞は発育過程において99%以上が死滅してしまう (眞鍋, 2013)。現在の卵胞培養技術では、この基底膜により酸素や栄養素が遮断されるため、卵胞の長期間培養は不可能である。そのため、発育完了した卵胞から卵母細胞だけを取り出し成熟培養させるしなく、ごく小さい未発育卵胞の培養はできない。そこで本研究では、極めて高い浸透力をもった酸素ナノバブルを培養液に用いることで、酸素や気体に封入・吸着された栄養素などが卵胞の基底膜を通過でき、卵胞構造を保ったままの培養を可能にする技術開発を構想した。ナノバブルを用いた卵胞培養技術を開発することで、生体内で99%以上が死滅する未発育卵母細胞を最大限に有効利用でき、動物生産効率を飛躍的に向上させる可能性が考えられる。また、卵母細胞の得にくい動物種でも体外

* 連絡先：Tel. 0265-77-1404, E-mail : tomioka@shinshu-u.ac.jp

で安定した供給が可能となるため、絶滅危惧種などの保全にも有効な技術である。さらに、体外において体内で発育した卵母細胞と同等の質の高い卵母細胞を作出できるため、ヒト生殖補助医療への応用なども期待できる。よって、本研究はマウスを対象動物とし、ナノバブル技術を用いて卵胞培養系を開発することを目的とした。

材料および方法

ナノバブル含有培地の作成

超微細気泡発生装置 (AMB3; HUCK UFB 株式会社, 甲府市) を用いて, DMEM/Ham's 12培地に30分間, 空気 (Air 培地) あるいは100%窒素ガス (N_2 培地) を通気し, ナノバブル含有培地を作成した。各気相のナノバブル含有培地に5% FBS, 1% ITS, 1% 抗生物質を添加し, ろ過滅菌した後, 培養培地として用いた。コントロール培地 (Ctl 培地) は, 30分間空気ナノバブルを通気した後, オートクレーブすることで脱気した milliQ 水を用いて, 同様の組成で作製した。

ナノバブル含有培地中のナノバブル計数

上述の方法で作製したナノバブル含有培地中に含まれるナノバブル数を, 作製後1日および2週間で, ナノバブル計測装置 ZetaView (マイクロトラック・ベル株式会社, 大阪市) を用いて計数した。

ナノバブル含有培地で培養したマウス胎子線維芽細胞 (MEF) の遺伝子発現変化

全ての動物実験は, 大学の定める信州大学動物実験等実施規程に則り実施した。妊娠13.5日のマウス胎子より樹立した線維芽細胞を, Ctl 培地, Air 培地, N_2 培地で6日間培養した。 1×10^5 cells で細胞を播種し, 2日毎に培地交換および細胞計数をおこない, 細胞増殖を比較解析した。また, 培養6日後の MEF の遺伝子発現変化をリアルタイム PCR を用いて解析した。

マウス卵胞の採取と培養

供試動物として3週齢の未成熟雌マウス (日本 SLC, 浜松市) を用いた。また, 飼料と水は自由摂取, 室温は $22^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, 明暗サイクル12時間 (午前7時点灯, 午後7時消灯) の環境下で飼育した。3週齢の未成熟雌マウスから, PMSG 投与後24時間で卵巣を採取した。採取した卵巣を細切し, ピペッティングにより $80 \mu\text{m} \sim 140 \mu\text{m}$ の卵胞を単離した。卵胞を Propidium Iodide (PI) 核染色 (和光純薬株式会社, 大阪市) し, 内部まで染色された死滅卵胞を除去し, 選抜した。96-well plate を用い, 各培地区で1卵胞/well で培養し, 2日毎に培地交換し, 12日間培養した。培養条件は5% CO_2 , 95% 空気, 湿度100%であった。4日毎に観察・写真撮

影し, 卵胞径を計測することで, 卵胞成長率および生存率を算出した。

結 果

ナノバブル含有培地中のナノバブル計数

ナノバブル含有培地のナノバブル数を測定した結果, 通気後1日では 7.5×10^6 個/mL のナノバブルが含まれており, 通気後2週間では 4.2×10^6 個/mL とほぼ半減していた (図1)。以上の結果より, 超微細気泡発生装置 (AMB3) を用いて培養培地にナノバブルを含有させることができ, ナノバブルは時間経過に従い減少することが示された。よって本研究では, 作製から1週間以内のナノバブル含有培地を実験に用いた。

ナノバブル含有培地で培養した MEF の遺伝子発現量解析

ナノバブル含有培地では, 酸素などの培地中に含まれる多量の気体による毒性が懸念されるため, まず, 一層の培養細胞の細胞増殖と遺伝子発現量解析により, ナノバブル含有培地の毒性や効果を評価した。MEF を, Ctl 培地, Air 培地, N_2 培地で培養し細胞増殖を比較した結果, ナノバブル含有培地 (Air 培地, N_2 培地) で6日後の細胞数が多い傾向にあったものの, Ctl 培地区と比べ有意差はなかった (図2)。また, 6日後の細胞を回収し, リアルタイム PCR を用いてミトコンドリアに関係する遺伝子群で, 長寿遺伝子として知られる Sirtuin1, 低酸素誘導性遺伝子として知られる Hif1a, およびミトコンドリアから始まる初期のアポトーシスシグナルとして知られる Caspase 9 の遺伝子発現量解析を行った。その結果, ナノバブル含有培地 (Air 培地, N_2 培地) で Sirtuin1 および Hif1a とともに高い傾向にあり, 特に N_2 培地区で, 有意に Sirtuin1 および Hif1a の遺伝子発現量が高かった (図3)。一方で Caspase 9 の遺伝子発現量と細胞増殖に有意差はなかった (図3)。

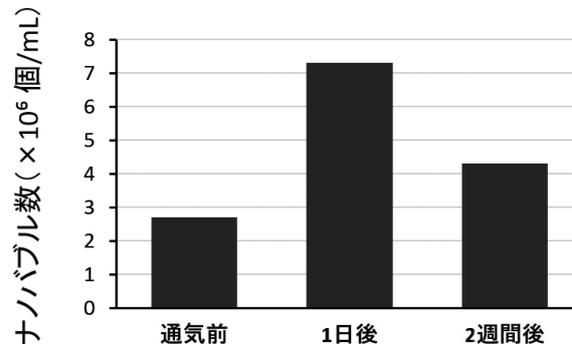


図1. 時間経過とナノバブル数の変化
通気前, ナノバブル通気1日後, およびナノバブル通気2週間後の培地におけるナノバブル数 ($\times 10^6$ 個/mL)。

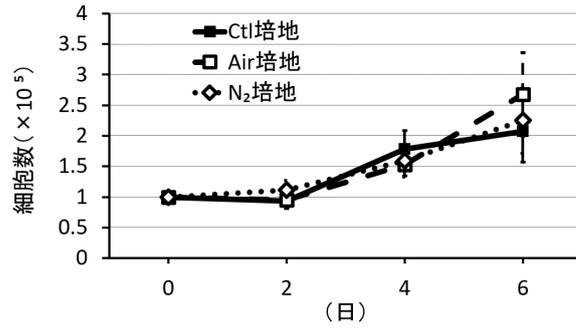


図2. 各培地で培養したMEFの増殖曲線
MEFをCtl培地, Air培地, N₂培地で培養後2日, 4日および6日における細胞数。実線, 破線および点線の折れ線はそれぞれCtl培地, Air培地およびN₂培地における細胞数を示す(平均値±標準誤差, n = 5)。

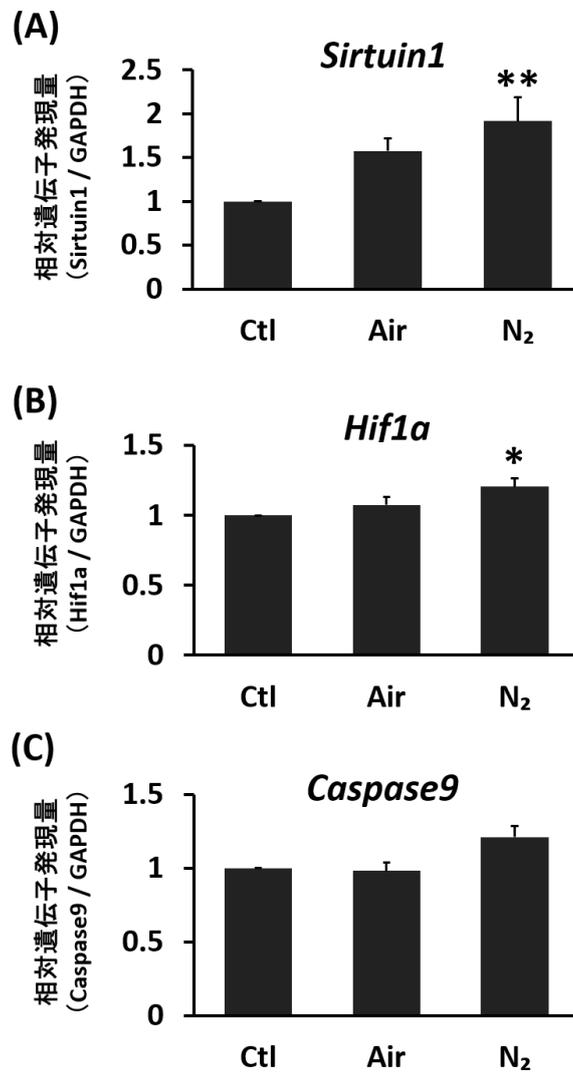


図3. ナノバブル含有培地で培養したMEFの遺伝子発現量変化
Ctl培地, Air培地, N₂培地で培養したMEFを培養後6日で回収し, 遺伝子発現量解析した。(A) Sirtuin1の遺伝子発現量変化(平均値±標準誤差, n = 5)。(B) Hif1aの遺伝子発現量変化。(C) Caspase9の遺伝子発現量変化。*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ (Ctl培地に対する有意差)

マウス卵胞の採取と培養

3週齢の未成熟雌マウスから卵胞を単離し、PI染色により生存卵胞と死滅卵胞を選別した。PI染色で染色されない卵胞と50%以下の細胞が染色された卵胞を生存卵胞とし、50%以上の細胞が染色された卵胞を死滅卵胞とした(図4)。生存卵胞のみを選別し、卵胞直径を80~100 μm, 100~120 μm, および120~140 μmに分け、各培地で12日間培養した。培養した卵胞には、卵胞直径が増加する発育(図5 A)、卵胞直径に変化が見られない維持(図5 B)、卵胞直径が減少する萎縮(図5 C)、卵胞構造が壊れる崩壊(図5 D)の4つのパターンが見られた。12日後に発育と維持に該当する卵胞を生存卵胞、萎縮と崩壊に該当する卵胞を死滅卵胞とした。その

結果、培養開始時に直径80~100 μmおよび100~120 μmの卵胞は、培養日数に従い卵胞成長が認められ、12日後における卵胞直径はAir培地、Ctl培地、N₂培地の順に大きかった(図6)。しかしながら、全ての処理区で有意差はなく、卵胞培養に対するナノバブルの顕著な効果は認められなかった。また、培養開始時に直径120~140 μmの卵胞は、全処理区で8日後まで卵胞成長が見られたものの、12日後では平均卵胞直径の減少が認められ、N₂培地区で卵胞直径が大きい傾向にあったものの、有意差はなかった(図6)。

一方、卵胞の生存率について全ての処理区で有意差はなかったものの、12日間培養後のN₂培地区で高い傾向にあった(表1)。

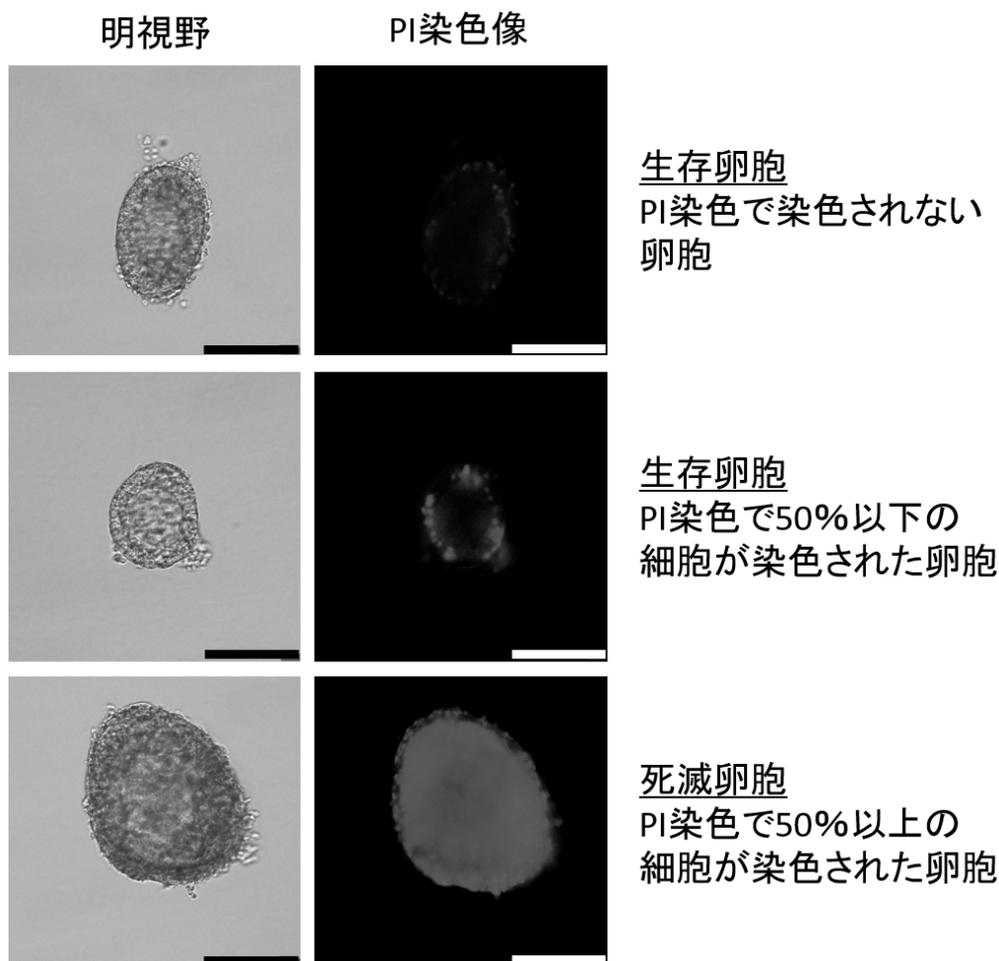


図4. 生存卵胞と死滅卵胞の選別

PI染色後の単離卵胞の写真。左側の写真は普通光で撮影した写真を示し、右側の写真は赤色蛍光で撮影した写真を示す(Bar=100 μm)。

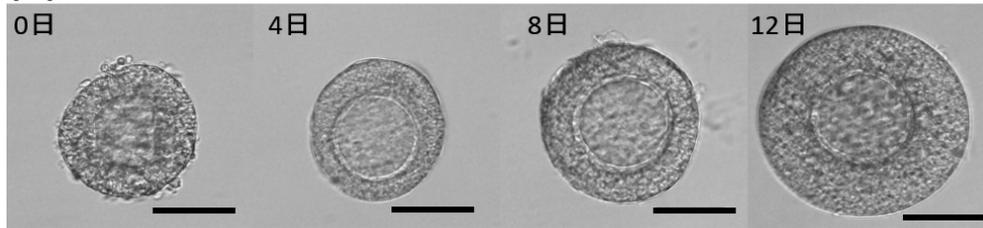
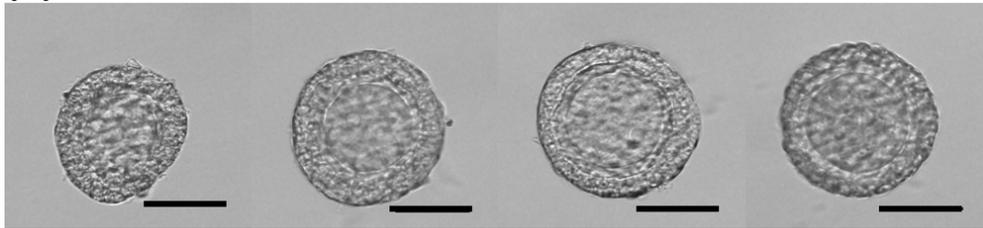
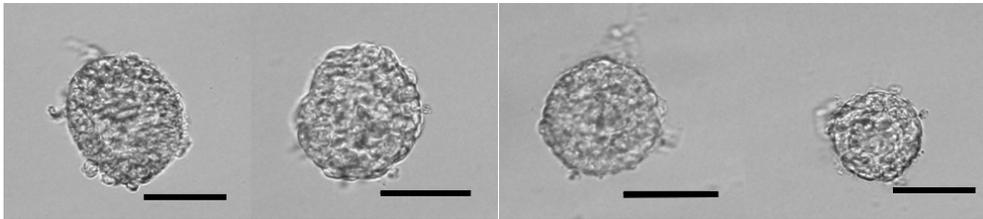
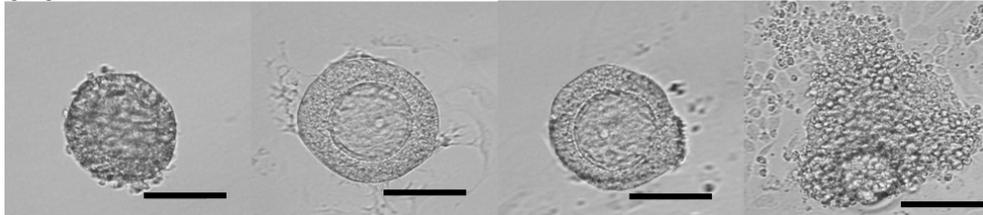
(A) 発育**(B) 維持****(C) 萎縮****(D) 崩壊**

図5. 卵胞の成長パターン

単離卵胞を培養後0日、4日、8日および12日で撮影した写真。(A)卵胞直径が増加する発育に該当する卵胞の写真。(B)卵胞直径に変化が見られない維持に該当する写真。(C)卵胞直径が減少する萎縮に該当する写真。(D)卵胞構造が壊れる崩壊に該当する写真 (Bar=50 μ m)。

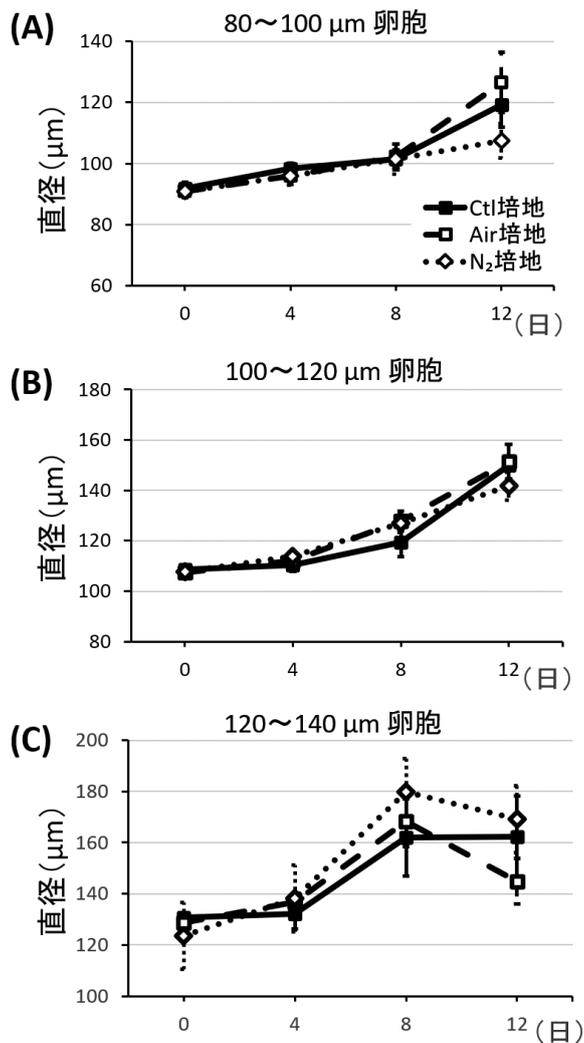


図6. 各培地で培養した卵胞の成長曲線

Ctl 培地, Air 培地, N₂培地で培養した卵胞の培養後0日, 4日, 8日および12日における直径。(A)培養開始時点で80~100 μmの卵胞の成長曲線。(B)培養開始時点で100~120 μmの卵胞の成長曲線。(C)培養開始時点で120~140 μmの卵胞の成長曲線。実線, 破線および点線の折れ線はそれぞれ Ctl 培地, Air 培地および N₂培地における成長曲線を示す (平均値±標準誤差)。

表1. 各培地で培養した生存卵胞数と生存率

	培養後			
	0日	4日	8日	12日
Ctl 培地	71	65 (91.6)	54 (76.1)	27 (38.0)
Air 培地	86	80 (93.0)	69 (80.2)	31 (36.1)
N ₂ 培地	79	75 (94.9)	61 (77.2)	35 (44.3)

表中の数値は各培地の各培養日数における合計生存卵胞数を示す。カッコ内の数値は, 培養開始時点の卵胞数を100%として算出した, 培養後4日, 8日および12日における生存率を示す。

考 察

ナノバブル含有培地で培養したMEFにおいて、Sirt1およびHif1 α の遺伝子発現が有意に上昇することが示された。Sirtuinファミリーの1つであり、ヒストン脱アセチル化酵素であるSir2は、長寿遺伝子として酵母で初めて発見された (Imai et al., 2000)。哺乳類においてはSir2と最も類似するSirtuin1がミトコンドリアのエネルギー産生に関与し、細胞のストレス耐性を調節することが知られている (Vaziri et al., 2001; Shiratsuki et al., 2016)。低酸素ストレス環境下では、Sirtuin1が脱アセチル化を介して低酸素誘導性因子であるHif1 α を活性化し (Laemmle et al., 2012; Joo et al., 2015)、細胞増殖およびアポトーシスの抑制などに関与する様々な遺伝子を制御する (Nishimoto et al., 2014; Yao et al., 2012)。また、低酸素下ではTCA回路の阻害によりミトコンドリアの機能が抑制されることも知られている (Kim et al., 2006)。ミトコンドリアの内部には、アポトーシス誘導因子であるシトクロムcおよびApoptosis-inducing factor (AIF)などが含まれており、ミトコンドリアがアポトーシスの引き金となっている (Green and Reed, 1998; Susin et al., 1996)。N₂培地区ではHif1 α の発現量が有意に高かったことから、培地中の酸素が欠乏し低酸素状態であることが推察される (図3B)。低酸素状態であるN₂培地区では、Sirtuin1の発現が促進され、Sirtuin1の脱アセチル化によりHif1 α が活性化し、ミトコンドリアの機能およびアポトーシスが抑制された結果、死滅卵胞数や退行卵胞数が減る傾向にあったと推察された。そのため、N₂ナノバブルは細胞の長期培養や保存に適する可能性があると考えられた。以上のことより、ナノバブルの気相条件により、ミトコンドリア関連遺伝子の発現を変化させ得ることが示された。一方でCaspase9の遺伝子発現量と細胞増殖に有意差はなかったことから、ナノバブルに細胞毒性はないと考えられた (図3C)。

N₂ナノバブル含有培地で卵胞を培養した結果、培養開始時に直径120~140 μ mの卵胞では培養8日目の卵胞直径が大きく (図6C)、また培養12日目の生存率が高い傾向にあった (表1)。N₂ナノバブルは細胞や組織の周囲に吸着し、酸化を防ぐことが知られており、大きな卵胞の退行遅延や卵胞の生存率の維持に関与することが推察された。よって、N₂ナノバブルは細胞や組織の保管や輸送のための培養技術に応用できる可能性がある。

本研究は、高い浸透力をもったナノバブルを培養液に用いることで、酸素などの気体や吸着された栄養素など

が卵胞の基底膜を通過できると考え、卵胞構造を保ったまま培養することを目的に実施した。結果、ナノバブル含有培地で細胞増殖や卵胞成長・生存率が上がる傾向が見られ、特に遺伝子発現については、気相条件に応じて特定の遺伝子の発現を変化させることができた。将来的にはナノバブルを用いて特定の遺伝子やミトコンドリア機能を制御できると考えられ、今後の改良により細胞・組織培養に応用できる可能性が示された。

謝 辞

本研究は、一般財団法人 畜産ニューテック協会の研究助成事業 (29畜二協発第9号) により実施された。

文 献

- Arata Nishimoto, Naruji Kugimiya, Tohru Hosoyama, Tadahiko Enoki, Tao-Sheng Li, Kimikazu Hamano. HIF-1 α activation under glucose deprivation plays a central role in the acquisition of anti-apoptosis in human colon cancer cells. *Int. J. Oncol.*, 44: 2077-2084. 2014.
- Alexander Laemmle, Antje Lechleiter, Vincent Roh, Christa Schwarz, Simone Portmann, Cynthia Furer, Adrian Keogh, Mario P. Tschan, Daniel Candinas, Stephan A. Vorburger, Deborah Stroka. Inhibition of SIRT1 Impairs the Accumulation and Transcriptional Activity of HIF-1 α Protein under Hypoxic Conditions. *PLoS ONE*. 7: e 33433. 2012.
- Douglas R. Green, John C. Reed. Mitochondria and Apoptosis. *Science*. 281: 1309-1312. 1998.
- Homayoun Vaziri, Scott K. Dessain, Elinor Ng Eaton, Shin-Ichiro Imai, Roy A. Frye, Tej K. Pandita, Leonard Guarente, Robert A. Weinberg. hSIR2 (SIRT1) Functions as an NAD-Dependent p53 Deacetylase. *Cell*. 107: 149-159. 2001.
- Hyun-Yoo Joo, Miyong Yun, Jaemin Jeong, Eun-Ran Park, Hyun-Jin Shin, Seon Rang Woo, Jin Kyu Jung, Yong-Min Kim, Joong-Jean Park, Joon Kim, Kee-Ho Lee. SIRT1 deacetylates and stabilizes hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) via direct interactions during hypoxia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 462: 294-300. 2015.
- Jung-whan Kim, Irina Tchernyshyov, Gregg L. Semenza, Chi V. Dang. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: A metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab.*, 3: 177-185. 2006.
- Lan Yao, Xiaowei Nie, Shuai Shi, Shasha Song, Xuewei Hao, Shuzhen Li, Daling Zhu. Reciprocal regulation of HIF-1 α and 15-LO/15-HETE promotes anti-apoptosis process in pulmonary artery smooth muscle cells during hypoxia. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*. 99: 96-106. 2012.
- 眞鍋昇. 繁殖生物学. 第1版. 30-40. 株式会社インターズー. 東京. 2013.
- Pushpak Bhandari, Xiaolei Wang, Joseph Irudayaraj. Oxygen

- Nanobubble Tracking by Light Scattering in Single Cells and Tissues. *ACS Nano*. 11: 2682-2688. 2017.
- R.Cavalli, A.Bisazza, P.Giustetto, A.Civra, D.Lembo, G.Trotta, C.Guiot, M.Trotta. Preparation and Characterization of Dextran Nanobubbles for Oxygen Delivery. *Int. J. Pharm.*, 381: 160-165. 2009.
- S A Susin, N Zamzami, M Castedo, T Hirsch, P Marchetti, A Macho, E Daugas, M Geuskens, G Kroemer. Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease. *J. Exp. Med.*, 184: 1331-1341. 1996.
- Shin-ichiro Imai, Christopher M. Armstrong, Matt Kaeberlein, Leonard Guarente. Transcriptional silencing and longevity protein Sir 2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature*. 403: 795-800. 2000.
- Shogo Shiratsuki, Tomotaka Hara, Yasuhisa Munakata, Koumei Shirasuna, Takehito Kuwayama, Hisataka Iwata. Low oxygen level increases proliferation and metabolic changes in bovine granulosa cells. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 437: 75-85. 2016.

Development of ovarian follicle culture system using nanobubbles.

Hikaru Kousaku, Ikuo Tomioka

Graduate School of Science and Engineering, Shinshu University.
8304, Minamiminowa-mura, Kamiina-gun, Nagano, Japan.

Abstract

Nanobubbles, a novel industrial technology, have been applied to the field of biology in recent years. Although nanobubbles have unique properties such as high penetration into cells, there are few reports on its bioactive effects. Therefore, the present study investigated the possible effects of nanobubbles on ovarian follicle culture. A medium containing air nanobubbles (Air medium) or 100% nitrogen gas nanobubbles (N₂ medium) was prepared by a bubble generator. Mouse embryonic fibroblast (MEF) and ovarian follicles were cultured in nanobubble-containing medium and subjected to the following analyses; the cell count, quantitative-PCR, the follicle growth measurement, and survival rate calculation. As a result, the expression of mitochondria-related genes such as Sirt1 and Hif1a were significantly increased in MEF cultured in N₂ medium compared to those in the Air and control medium. In addition, the cell proliferation rates and the follicle survival rates were tended to increase in the medium containing the N₂ and Air nanobubbles. In conclusion, the present study showed that the nanobubbles might be able to control the mitochondrial function-related gene expressions, and the culture system using nanobubbles could lead to innovative culture technology.

Key words: Ovarian Follicles, In vitro culture, Mitochondria, Nanobubbles.

石川県産黒毛和種における脂肪酸組成に関する遺伝的パラメータ及び枝肉形質との遺伝相関の推定

石田美保^{1*}・西川和奈¹・西 和隆²

¹石川県農林総合研究センター畜産試験場

石川県羽咋郡宝達志水町坪山ナ部93-2 929-1325

²公益社団法人全国和牛登録協会

京都府京都市中京区烏丸通御池上る二条殿町546-2 604-0845

(2020.1.22 受付, 2021.6.18 受理)

要約 石川県産黒毛和種肥育牛の胸最長筋の脂肪酸および枝肉形質に関する遺伝率と繁殖雌牛における遺伝相関を推定し、脂肪酸組成の遺伝的改良の可能性を検討した。石川県で生産された黒毛和種肥育牛の枝肉第6-7肋骨間切断面の筋間脂肪のオレイン酸含有率（以下、オレイン酸）、飽和脂肪酸割合（以下、SFA）、一価不飽和脂肪酸割合（以下、MUFA）を食肉脂質測定器で測定し、アニマルモデルBLUP法でそれぞれの遺伝的パラメータを推定した。調査対象牛は5,113頭（去勢3,745頭、雌1,368頭）で、脂肪酸の遺伝率はオレイン酸、SFA および MUFA でそれぞれ0.453, 0.446 および 0.450 であった。脂肪酸組成の記録を100頭以上持つ種雄牛のオレイン酸育種価は、-3.85から+2.87と6ポイント以上の差があった。また、オレイン酸と枝肉形質との繁殖雌牛における遺伝相関は-0.23から0.07と低かった。以上より、石川県産黒毛和種においては種雄牛の脂肪酸組成の育種価の活用により、オレイン酸をはじめとした脂肪酸組成について枝肉形質に影響を及ぼさずに遺伝的観点から改良できる可能性が示唆された。

キーワード：黒毛和種 脂肪酸組成 育種価

緒 論

石川県は、県の銘柄牛である能登牛の特長として、牛肉のおいしさを挙げている。石川県の和牛生産は、戦後もなく食肉の需要の高まりに応えるように、旧柳田村（現能登町）に和牛繁殖基地が設立され、兵庫県から牛を導入して繁殖し、子牛を農家に譲渡したことが基となっている（石川県農村文化関係史料第3集, 1986）。このことから、資質系と言われる但馬の牛で固められ、肉質に優れ「おいしい牛肉」と評価されてきた経緯がある。

一方で、全国的に黒毛和種の枝肉改良は、脂肪交雑や枝肉重量に重点が置かれている。中でも、脂肪交雑の度合いを表すBMS No. が枝肉の価格を決定する要因（岡本ら, 2003; 井上ら, 2008）とされ、輸入牛肉との差別

化を図るため積極的に遺伝的改良や飼養技術の改善が行われてきた。石川県においては、1993年から育種価評価を開始し、1989年次分より2018年次までに年次毎、計30回の評価を行ってきた。評価結果は公表し、能登牛改良指針に反映させ、石川県農林総合研究センター能登畜産センター（以下、能登畜産センター）に繋養する繁殖雌牛への交配種雄牛の選定に活用してきた。その結果、この30年間で枝肉重量、BMS No. において大きく改良が進んできた（石田, 2019）。

しかし、近年の消費者ニーズの多様化に対応することを目的として、国が定めた家畜改良増殖目標においては、脂肪交雑だけでなく、牛肉中の脂肪酸組成をはじめとする「おいしさ」に関する改良が目標としてあげられている（農林水産省, 2015）。中でも、牛肉脂肪中のオレイン酸含有率（以下、オレイン酸）が上昇すると牛肉

* 連絡先：Tel. 0767-28-2284, E-mail : i-miho@pref.ishikawa.lg.jp

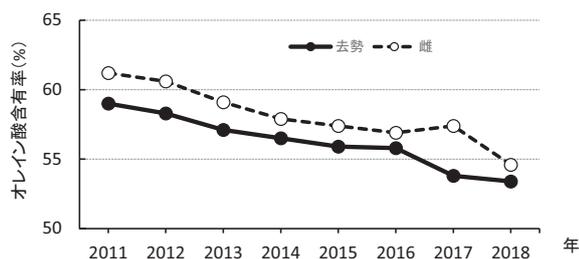


図1 石川県産黒毛和種肥育牛のオレイン酸含有率の推移

の風味が向上する (Westerling and Hedrick, 1979), 肉の食味性にオレイン酸, 一価不飽和脂肪酸割合 (以下, MUFA) が関連している (佐久間ら, 2011) と報告があることから, 全国的にも, 牛肉ブランド戦略の一つとしてオレイン酸を認定基準に採用する取り組みが盛んである。石川県においても2006年度より「脂肪酸組成に着目した肥育技術の開発」に取り組んでいる (表ら, 2010)。2007年第9回全国和牛能力共進会においては, 石川県から第9区「去勢肥育」に出品した肥育牛のオレイン酸が高いことを評価され, 「脂肪の質賞」を受賞した。この受賞以降, 石川県のブランド牛肉である能登牛は, 「牛肉のおいしさ=高いオレイン酸」を特色の一つにあげており, 能登牛の中でも, 格付成績がA5でBMS No. が10以上, もしくは8, 9の場合はオレイン酸が55%以上であるものを能登牛プレミアムとして認定するなど, オレイン酸を条件に入れている。また, 能登牛プレミアム制度の導入に伴い, 枝肉販売会出品牛の脂肪酸測定によるデータ収集の体制が整備されたために, 石川県内供用中雌牛の脂肪酸育種価判明率は75.7%と高い (全国和牛登録協会, 2019)。しかし, 石川県内産黒毛和種肥育牛のオレイン酸は, 年々減少傾向にあり, 2018年では測定当初の2011年と比較すると5%近く低下した (図1)。

そこで, 本研究では, オレイン酸に係る遺伝的パラメータを推定し, 枝肉重量や脂肪交雑などの枝肉形質との遺伝相関を調べ, 石川県産黒毛和種の脂肪酸組成に係る改良の可能性を検討した。

材料および方法

脂肪酸組成の測定に用いた調査牛は, 石川県内で肥育され, 2011年12月から2018年12月までに金沢食肉流通センターに出荷された黒毛和種肥育牛5,182頭である。

測定には, 食肉脂質測定装置 (S-7010: 相馬光学, 東京, 日本) を用い, 枝肉の第6-7肋骨間切断面の筋間脂肪におけるオレイン酸, 飽和脂肪酸割合 (以下, SFA), およびMUFAを3回測定し, その平均値を採

用した。

遺伝的パラメータの推定は, 5,182頭のうち, 測定結果に矛盾のあるもの (オレイン酸がMUFAより高い, SFAとMUFAの総和が100%を超える等) を除いた5,113頭 (去勢3,745頭, 雌1,368頭) を用い, 併せて格付成績と農家情報を収集した。

分散成分値と遺伝率はAI-REML法により推定し, その分散成分を用いたアニマルモデルBLUP法 (最良線形不偏予測法) により推定育種価を算出した (アニマルモデルBLUP法育種価評価プログラム (公益社団法人全国和牛登録協会))。なお, 母数効果は性 (2水準), 食肉脂質測定装置の検量線 (3水準), 農家の効果 (28水準), 近交係数 (1次回帰), と畜月齢 (1次回帰と2次回帰), 変量効果は, 相加的遺伝, 残差とし, 血統連結個体は石川県産肥育素牛 (本研究の対象牛5,113頭) から少なくとも3代祖とし, 最大で1975年以降生まれの5代祖まで遡った。

結 果

分析形質の基本統計量

脂肪酸測定牛の各枝肉形質及び出荷月齢の基本統計量を表1に示した。オレイン酸含有率は, 去勢牛と比較して雌牛が有意に高かった。

脂肪酸組成に関する遺伝的パラメータの推定

アニマルモデルによって評価された脂肪酸組成に関する遺伝的パラメータを表2に示した。脂肪酸組成の遺伝率はオレイン酸, SFA およびMUFAでそれぞれ0.453, 0.446および0.450であった。

表3に枝肉形質, 脂肪酸組成および繁殖形質のすべての記録を有する雌牛847頭の各形質間の遺伝相関を示した。オレイン酸とMUFA, 枝肉重量とバラ厚との間に高い正の相関が認められた。

出荷月齢

脂肪酸組成に対する月齢の効果を1次と2次の回帰で図2示した。オレイン酸とMUFAともに出荷月齢が進むとともに効果は高くなったが, 30ヵ月齢以降での含有率の上昇度合いは小さかった。

種雄牛

脂肪酸組成の記録が100頭以上ある種雄牛15頭について推定育種価を表4に示した。オレイン酸の育種価は-3.85から+2.87と6ポイント以上の差があった。マイナスの育種価を示した種雄牛が9頭と全体の約6割を占めていた。MUFAとSFAについてもオレイン酸と同様に, プラスからマイナスまで広い分布となっていた。一方で脂肪交雑, ロース芯面積とバラ厚ではすべての種雄

表1 脂肪酸組成測定牛の各枝肉形質と脂肪酸組成の基本統計量

	去勢	雌	計
調査頭数	3745	1368	5113
出荷月齢 (カ月)	28.51±1.31	28.42±1.68	28.48±1.42
枝肉重量 (kg)	479.59±53.71	414.99±50.16	462.32±60.03
ロース芯面積 (cm ²)	58.57±8.97	55.45±8.50	57.73±8.95
バラの厚さ (cm)	7.69±0.84	7.40±0.77	7.61±0.83
皮下脂肪厚 (cm)	2.44±0.71	2.86±0.82	2.55±0.76
歩留まり基準値 (%)	73.89±2.50	73.78±1.36	73.86±2.25
脂肪交雑 (unit)	7.02±2.42	6.19±2.32	6.80±2.42
オレイン酸 (%)	55.61±4.35	58.00±3.81	56.25±4.34
SFA (%)	36.57±4.75	34.07±4.27	36.11±7.26
MUFA (%)	60.55±4.58	62.97±4.12	61.39±9.32

平均±S.D
SFA：総飽和脂肪酸
MUFA：一価不飽和脂肪酸

表2 枝肉の脂肪酸割合に関する遺伝的パラメータ

	オレイン酸	SFA	MUFA
遺伝分散	7.01	8.60	7.80
残差分散	8.45	10.70	9.52
遺伝率	0.453	0.446	0.450

SFA：総飽和脂肪酸
MUFA：一価不飽和脂肪酸

表3 産肉形質、枝肉脂肪酸組成と繁殖性に係る育種価間の相関係数

	ロース芯	バラ厚	皮下脂肪厚	歩留	脂肪交雑	オレイン酸	SFA	MUFA	初産月齢	分娩間隔
枝重	0.50	0.80	0.33	-0.04	0.43	-0.23	0.16	-0.20	-0.54	-0.04
ロース芯		0.45	0.06	0.71	0.58	-0.05	0.01	-0.02	-0.42	0.04
バラ厚		0.33	0.16	0.51	-0.22	0.15	-0.19	-0.48	0.00	
皮下脂肪厚				-0.53	0.04	-0.11	0.08	-0.08	-0.07	0.01
歩留					0.44	0.07	-0.08	0.08	-0.19	0.05
BMS						0.01	-0.03	0.02	-0.58	0.02
オレイン酸							-0.95	0.97	-0.02	0.02
SFA								-0.98	0.06	-0.02
MUFA									0.03	0.02
初産月齢										0.29

枝肉6形質、脂肪酸組成、繁殖形質の記録を全て有する雌、n=847

SFA：総飽和脂肪酸

MUFA：一価不飽和脂肪酸

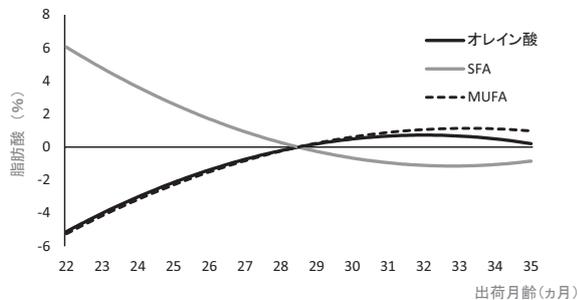


図2 出荷月齢の効果 (1次と2次の回帰)

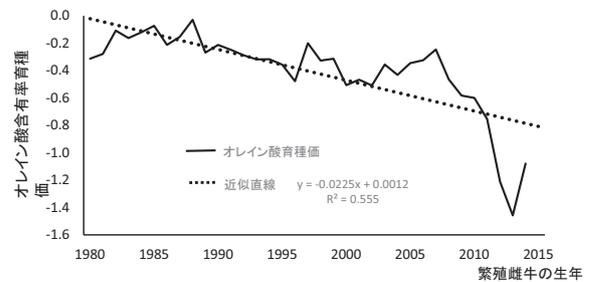


図3 繁殖雌牛のオレイン酸含有率育種価の遺伝的趨勢

表4 種雄牛の脂肪酸および枝肉形質の育種価

種雄牛	育種価										記録のある頭数	
	オレイン酸	SFA	MUFA	枝肉重量	ロース芯面積	バラ厚	皮下脂肪厚	歩留基準値	脂肪交雑	枝肉記録	脂肪酸記録	
1	0.772	-1.504	1.120	77.054	5.220	1.077	-0.256	0.754	1.118	953	435	
2	2.874	-3.827	3.384	-9.718	12.002	0.496	-0.523	2.569	1.088	303	257	
3	-3.320	3.868	-3.522	71.447	4.789	0.616	0.732	-0.437	1.878	226	227	
4	-2.539	2.625	-2.090	5.042	17.769	0.021	-0.785	3.092	1.785	121	208	
5	1.084	-0.816	1.395	15.303	7.719	0.291	-0.156	1.253	1.917	168	208	
6	0.720	-1.377	1.055	46.639	6.658	0.675	-0.092	0.909	1.030	266	205	
7	-1.108	0.654	-0.716	100.524	11.380	1.126	-0.397	1.430	1.746	166	200	
8	-2.020	1.410	-1.248	19.429	4.357	0.845	-0.114	1.091	1.792	127	196	
9	-2.825	3.058	-2.938	151.622	17.397	1.343	-0.065	1.390	1.714	230	180	
10	-3.345	3.831	-4.048	46.401	8.082	0.639	-0.542	1.474	1.163	83	142	
11	-0.893	1.121	-1.044	23.177	0.878	0.461	-0.368	0.519	0.526	256	136	
12	1.767	-2.122	2.100	16.722	7.079	0.567	-0.554	1.696	1.283	134	129	
13	-3.854	4.317	-3.493	54.245	10.031	1.030	0.270	1.164	0.490	59	110	
14	0.574	0.114	-0.151	83.289	11.796	0.859	0.495	0.693	0.792	117	107	
15	-0.110	0.509	-0.127	13.979	7.397	0.190	-0.970	1.872	1.692	81	101	

SFA：総飽和脂肪酸

MUFA：一価不飽和脂肪酸

牛がプラスの育種価を示し、枝肉重量や歩留基準値においても14頭の種雄牛がプラスの値を示した。また、皮下脂肪厚についても12頭の種雄牛が好ましい方向であるマイナスの値を示した。

繁殖雌牛

血統連結個体の雌牛10,532頭のうち、1980年以降生まれの10,125頭のオレイン酸育種価の趨勢を図3に示した。オレイン酸の育種価は1990年以降低下傾向を示し、特に2010年以降に急激な低下が認められた。

考 察

本研究ではオレイン酸の推定育種価を分析するとともに、枝肉重量や脂肪交雑などの枝肉形質との遺伝相関を調べ、石川県産黒毛和種の脂肪酸組成に係る改良の可能性を検討した。

アニマルモデルによって推定した脂肪酸組成の遺伝率は、オレイン酸で0.453であったが、中橋ら(2012)は0.52、横田ら(2011)は0.65、野儀と大山(2008)は0.78、井上らは(2008)0.54と高い値を報告している。しかし、黒毛和種において改良が進められている枝肉形質の遺伝率は0.35~0.54(向井, 1996)、0.48~0.67(加藤ら, 2014)であることや、当県の枝肉形質の遺伝率0.36~0.49(石田, 2019)と比較しても同程度であり、本研究で得られた脂肪酸組成の遺伝率は、十分に改良可能な値であるといえる。

横田ら(2011)は、脂肪交雑や枝肉重量等の枝肉形質の改良によって脂肪酸組成は影響されないとし、井上ら

(2008)も脂肪酸組成は枝肉形質との間で遺伝的に独立した関係にあると報告している。本報告でも、繁殖雌牛におけるオレイン酸と枝肉形質間の遺伝相関を調査した結果、各形質間の相関がともに低かったことから、脂肪酸組成の育種価は、枝肉形質に影響を及ぼさずに遺伝的改良の指標として利用可能であることが示唆される。

出荷月齢とオレイン酸の関係については、既報(三橋ら, 1988;野儀と大山, 2008)と一致した。枝肉の熟成度を増すためにあえて長期肥育を行う方法もあるが、30ヵ月齢以上になるとオレイン酸の上昇率が低下することや、枝肉重量重視の改良が進み早期出荷が可能になったことにより経済性があがったことを考えるならば、より一層、育種価を活用してオレイン酸の向上を図る必要があると考えられる。

表4にまとめた15頭の種雄牛は、石川県産肥育牛の主な種雄牛で、供用中雌牛の父牛の大半を占めている。これら種雄牛の育種価をみると、脂肪酸組成以外の形質の育種価ではほとんどの種雄牛は好ましい方向の値を示した。このことは石川県の和牛生産における改良の方向性とも一致する。

以上の経緯から、枝肉形質に関しては好ましい方向に改良が進んでいるものの、脂肪酸組成の改良は好ましい方向には進まず、近年のオレイン酸の低下につながったのではないかと考えられる。これは今回調査した石川県繁殖雌牛の遺伝的趨勢にも表れている。繁殖雌牛のオレイン酸の推定育種価は、1990年以降低下し、2010年以降は大きく落ち込んでいる。このことは、肥育農家が必要

とする形質（枝肉重量, BMS No.）ではより良い効果を持つものの、オレイン酸に関してはマイナスの効果を持つ種雄牛が供用されたためと考えられる。実際、石川県産肥育牛の主な種雄牛15頭のうち10頭はオレイン酸に対する効果がマイナスを示した。特に、脂肪交雑の効果が上位5頭については、4頭がオレイン酸に対する効果がマイナスを示した。このように、オレイン酸に対する効果がマイナスの種雄牛が多く供用されていること、かつこれら種雄牛が石川県繁殖雌牛の父牛の大半を占めていることから石川県繁殖雌牛のオレイン酸育種価の低下につながったと考えられる。このことから石川県産黒毛和種の脂肪酸組成の遺伝的改良を進める上で、種雄牛は大きな要因であると考えられる。

以上から、石川県産黒毛和種においては種雄牛の育種価評価をもとに遺伝的観点からほかの枝肉形質に影響を与えることなく、脂肪酸組成を改良できる可能性が示唆される。今後、脂肪酸組成を選抜形質に組み込むことで、オレイン酸の増加、ひいては肉の風味や食味の向上が期待できる。

謝 辞

育種価評価にあたり血縁情報の提供を頂いた公益社団法人全国和牛登録協会石川県支部に深謝致します。

なお、本研究に係る脂肪酸組成の遺伝的パラメータの解析は、令和元年度畜産振興事業（JRA 事業）「和牛の遺伝的多様性等活用調査研究事業」により実施されたものです。

文 献

- 井上慶一・庄司則章・小林正人. 黒毛和種肥育牛の脂肪融点、脂肪酸組成および格付形質間の遺伝的関係. 日畜会報, 79(1): 1-8. 2008.
- 石田美保. 石川県における能登牛の産肉性形質に関する育種価からみた改良の推移. 石川畜試研究報告48. 5-12. 2019.
- 石川県農村文化協会. 石川県農村文化関係史料—第3集—石川の農林産物とむら—畑作・養蚕・畜産篇—. 127-142. 石川県教育委員会. 石川県. 1986.
- 加藤啓介・前田さくら・口田圭吾. 黒毛和種における胸最長筋内脂肪交雑粒子の細かさに関する遺伝的パラメータの推定. 日畜会報, 85(1): 21-26. 2014.
- 三橋忠由・三津本充・山下良弘・小沢忍. 黒毛和種去勢牛の発育にとまなう蓄積脂肪の融点と脂肪酸組成の変化. 中国農研報, 2: 43-51. 1988.
- 向井文雄. 和牛のフィールド記録を利用した枝肉形質の改良(1). 畜産の研究, 50(7). 755-760. 1996
- 中橋良信・由佐哲朗・増田豊・日高智・口田圭吾. 黒毛和種におけるロース芯内交雑脂肪酸組成に関する遺伝的パラメータの

推定. 日畜会報, 83(1): 29-34. 2012.

野儀卓哉と大山憲二. 2008. 鳥取和牛肉の脂肪酸組成割合に関する遺伝的パラメータの推定. 鳥取県畜試研究報告36: 14-21. 2008.

農林水産省畜産局. 家畜改良増殖目標. 11-19. 農林水産省畜産局. 東京. 2015.

岡本圭介・口田圭吾・加藤貴之・鈴木三義・三好俊三. 枝肉形質および画像解析形質が牛枝肉価格に与える影響. 日畜会報, 74(4): 475-482. 2003.

表俊雄・鳥野健・庄司勇一・坂井良輔・石田美保. 脂肪酸組成に着目した「能登牛」生産技術の開発. 石川県畜試研究報告, 42: 4-7. 2010.

佐久間弘典・斎藤薫・曾和拓・浅野早苗・小平貴都子・奥村寿章・山田信一・河村正. 黒毛和種肥育牛の胸最長筋における官能特性に及ぼす粗脂肪含量と脂肪酸組成の影響について. 日畜会報, 83(3): 291-299. 2012.

Westerling DB, Hedrick HB. Fatty acid composition of bovine lipids as influenced by diet, sex and anatomical location and relationship to sensory characteristics. Journal of Animal Science, 48: 1343-1348. 1979.

横田祥子・杉田春奈・大友良彦・須田義人・鈴木啓一. 黒毛和種牛肉における脂肪酸組成と枝肉形質および肉質形質との遺伝的関係. 東北畜産学会報, 60(3): 80-85. 2011.

公益社団法人全国和牛登録協会. 育種評価の現状. 和牛, 289: 16-40. 2019.

Estimation of Genetic Parameters for Fatty Acid Composition and Genetic Correlations with Carcass Traits in Japanese Black of ISHIKAWA

Miho ISHIDA, Kazuna NISHIKAWA, Kazutaka NISHI

¹Ishikawa Prefectural Agriculture and Forestry Research Center, Livestock Experiment Station, Ishikawa 929-1325

²Wagyu Registry Association, Kyoto 604-845

Abstract

In this study, we estimated genetic parameters on fatty acid composition in Japanese Black of Ishikawa, and investigated the possibility of genetic improvement for fatty acid composition. Fatty acid composition of intramuscular fat from 5,113 carcasses of Japanese Black in Ishikawa was measured using near infrared spectroscopy. Breeding values associated with oleic acid, saturated fatty acids (SFA) and mono-unsaturated fatty acids (MUFA) percentages, and each genetic parameter were estimated by the animal model BLUP method. As a result, the heritability of oleic acid, SFA and MUFA percentages was estimated to be 0.453, 0.446, and 0.450 respectively. Breeding values of 15 sires (have 100 or more records of fatty acid composition) for fatty acid composition ranged from -3.85 to 2.87. And genetic correlations between fatty acids and carcass traits were low(-0.23~0.07). These results suggest that fatty acid composition including oleic acid percentage could be improved without influence on other carcass traits.

Key Words: Japanese Black, fatty acid composition, breeding value

筋芽細胞の分化におけるコレシストキニンの作用

二橋佑磨・高谷智英*

信州大学大学院総合医理工学研究科
長野県上伊那郡南箕輪村8304 399-4598

(2020.2.20 受付, 2020.9.7 受理)

要約 筋組織の形成で中心的な役割を担う筋芽細胞（筋前駆細胞）の分化には、多様なサイトカインが関与する。我々は最近、コレシストキニン（CCK）がニワトリ筋芽細胞の分化過程で特徴的な発現パターンを示すことを報告した。CCKは、中枢神経系では神経伝達因子、腸管では消化管ホルモンとして作用することが知られているが、筋芽細胞における役割は知られていない。本研究では、大型動物の筋形成モデルとしてヒト筋芽細胞を用い、その分化におけるCCKの作用を検討した。定量PCRの結果、ヒト筋芽細胞がCCK前駆体と2つのCCK受容体の遺伝子を発現していることがわかった。8残基の活性型CCK（CCK-8）を筋芽細胞に投与して分化誘導したところ、筋分化マーカー遺伝子の発現や、ミオシン重鎖陽性の筋管形成に変化は見られなかった。しかし、CCK-8または4残基型CCK（CCK-4）をインスリンとともに筋芽細胞に投与すると、筋管形成率が有意に上昇した。以上の結果は、筋芽細胞や他臓器から分泌されたCCKが、インスリン存在下で筋形成に寄与することを示唆する。

キーワード：筋芽細胞, 骨格筋, コレシストキニン, ペプチド

緒言

食肉たる骨格筋組織は多数の筋線維から構成される。筋線維の細胞膜と基底膜の間には、衛星細胞と呼ばれる幹細胞が存在する。骨格筋の形成過程において、静止状態にある衛星細胞は筋芽細胞（筋前駆細胞）へと活性化される。筋芽細胞は数回の細胞分裂を経て増殖した後、単核の筋細胞へと分化する。筋細胞は互いに融合して多核の筋管を形成し、これらが新規筋線維へと成熟したり、既存の筋線維と融合することで筋組織が肥大する(Dumont *et al.*, 2015)。したがって、食肉生産の新たな技術開発には、筋形成で中心的な役割を果たす筋芽細胞の増殖・分化機構の理解が不可欠である。筋芽細胞の分化には、筋原性転写因子による遺伝子発現制御、細胞間相互作用、および多種のサイトカインが寄与するが、その分子基盤は動物種間で高度に保存されている(Abmayer and Pavlath, 2012)。例えば、マウスとニワトリの筋芽細胞は培養条件下で自発的に異種間融合する

ことが報告されており(Takaya *et al.*, 2017)、ニワトリ筋芽細胞で得られた知見の多くは哺乳類にも適用することができる。

我々は最近、肉用鶏と卵用鶏の筋芽細胞の遺伝子発現を比較し、それらの分化過程で特徴的な発現パターンを示すサイトカインとして、コレシストキニン(cholecystokinin; CCK), CXCL14(C-X-C motif chemokine ligand 14), ミッドカイン, エンケファリンを同定した。さらに、エンケファリンがニワトリ筋芽細胞の増殖を抑制すること、エンケファリン遺伝子の発現パターンはマウスとヒトの筋芽細胞においても筋分化とともに減少することを明らかにした。(Nihashi *et al.*, 2019)。以上の結果は、ニワトリ筋芽細胞で同定されたこれらのサイトカインが、哺乳類筋芽細胞にも作用する可能性を強く示唆する。本研究では、卵用鶏の未分化な筋芽細胞で高発現し、分化に伴って発現量が低下するCCKに着目した。

CCKは、中枢神経系(Saito *et al.*, 1980)や消化管

*連絡先：Tel. 0265-77-1426, Email : ttakaya@shinshu-u.ac.jp

(Bitar and Makhlof, 1982) で発現するホルモンとして知られるが、最近、ブタ心臓における CCK 前駆体の発現パターンが新生子豚と成体で変化することが報告され (Goetze *et al.*, 2018), 様々な臓器から分泌されるペプチドとして注目されている。CCK 前駆体からは、4, 8, 22, 33, 39, 58 残基の活性型 CCK ペプチドが生成される。特に、C 末端側 8 残基からなる CCK-8 (Asp-Tyr-Met-Gly-Trp-Met-Asp-Phe) は脳と末梢血の両方に存在することから、CCK ペプチド群の中でも重要な役割を担っていると考えられる (Rehfeld *et al.*, 2007)。CCK-8 のアミノ酸配列は、ヒト、ウシ、ブタ、マウス、ニワトリで完全に一致しており、その生理活性は C 末端の 4 残基からなる CCK-4 (Trp-Met-Asp-Phe) が発揮する (Rehfeld *et al.*, 1980)。CCK-8 は、中枢および末梢神経系では神経伝達因子あるいは神経調節因子として機能する (Crawley *et al.*, 1985; Soltani *et al.*, 2018)。CCK の受容体には、末梢神経系で発現する CCKA 受容体 (CCKAR) と、主に脳で発現する CCKB 受容体 (CCKBR) の 2 つのサブタイプが存在する (Huppi *et al.*, 1995)。しかし、筋芽細胞における CCK 受容体の発現に関する報告はない。

本研究では、大型動物の筋形成モデルとしてヒト筋芽細胞を用い、その分化における CCK-4 と CCK-8 の作用を検討した。高い筋再生能力を示すマウスの筋芽細胞は、大型動物の筋芽細胞と比べ、細胞の形態が異なることが知られている。一方、ヒトとブタの組織は解剖学および生理学的に類似しており (Douglas, 1972; Groenen *et al.*, 2012), 特に骨格筋については、ブタ筋ジストロフィーモデルはマウスモデルよりもヒトの症状を忠実に再現する (Klymiuk *et al.*, 2013)。大型動物の骨格筋は、体重の約 4 割を占める生体最大の組織であり、その運動に伴う最大酸素摂取量 ($VO_2 \text{ max}$) は体重と指数的に逆相関する。ヒト、ウシ、ヤギなど大型動物の $VO_2 \text{ max}$ /体重比は、中・小型動物とは大きく隔たった値を示す (Bassett and Howley, 2000)。各動物の筋芽細胞の性質の一部は、形成される筋組織のサイズを反映すると考えられており、ヒト筋芽細胞の分化誘導系は、大型動物の筋形成の優れたモデルであるといえる。

材料および方法

細胞培養

市販のヒト筋芽細胞 (CC-2580, Lot #0000483427; Lonza) を、I-C 型コラーゲン (Cellmatrix; 新田ゼラチン) でコートした培養皿に播種し、37°C, 5% CO_2 で培養した。増殖培地には SkGM-2 Skeletal Muscle

Cell Growth Medium-2 BulletKit (CC-3245; Lonza) を用いた。分化培地には、2% ウマ血清 (SH 30074. 03; HyClone), 100 units/ml のペニシリンおよび 100 $\mu\text{g/ml}$ のストレプトマイシン (ナカライ) を添加したダルベッコ改変イーグル培地 (ナカライ) を用いた。CCK-4 (4083-v; ペプチド研究所) と CCK-8 (4100-v; ペプチド研究所) は、生理食塩水で 1 mM に溶解したものを、最終濃度 0.1~30 μM となるように分化培地に添加した。CCK の投与濃度は、ラット間質血管細胞の脂肪分化誘導で用いられた濃度 (0.1~10 μM) に準じた (Plaza *et al.*, 2019)。インスリン (099-06473; 富士フィルム和光純薬) は、0.01 N の HCl 溶液に溶解したものを、最終濃度 100 $\mu\text{g/ml}$ となるように分化培地に添加した。対照群には、各ペプチドの溶媒を等量添加した。

定量 PCR

筋芽細胞を生理食塩水で洗浄後、TRIzol Reagent (Thermo Fisher Scientific) を用いて RNA を回収した。ReverTra Ace qPCR RT Master Mix (東洋紡) を用いて RNA を逆転写し、cDNA を作製した。GoTaq qPCR Master Mix (Promega) および StepOne Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) を用いて定量 PCR を行った。 ΔCt 法で算出した各遺伝子の発現量は、内部標準である *YWHAZ* 遺伝子の発現量で補正した。定量 PCR に用いたプライマーの配列は表 1 に記載した。

蛍光免疫染色

筋芽細胞を 2% パラホルムアルデヒドで固定し、0.2% Triton X-100 (ナカライ) で透過処理をした後、一次抗体に 0.5 $\mu\text{g/ml}$ の抗ミオシン重鎖 (MHC) 抗体 (MF 20) (MAB 4470; R&D Systems), 二次抗体に 1 $\mu\text{g/ml}$ の Alexa Fluor 488 標識抗マウス IgG 抗体 (715-545-150; Jackson ImmunoResearch) を用いて免疫染色した。細胞核は DAPI (4, 6-diamidino-2-phenylindole) で染色した。染色像は EVOS FL Auto 蛍光顕微鏡 (AMAFD 1000; Thermo Fisher Scientific) で撮影した。MHC 陽性細胞率は、MHC 陽性細胞内の核数を、総核数で除して算出した。筋管形成率は、MHC 陽性の多核筋管内の核数を、総核数で除したものとした。細胞核数は ImageJ ソフトウェア (アメリカ国立衛生研究所) で計測した。

統計解析

2 群間の比較には Student's *t*-test を用い、3 群間以上の比較には一元配置分散分析後に Scheffe's *F* test を用いた。データは平均値 \pm 標準誤差で示し、有意確率 *p* が 0.05 未満のときに水準間に有意な差があると判定した。

表 1. 定量 PCR に用いたプライマーの配列

遺伝子名	配列 (5'-3')	文献
<i>CCK</i> -Fwd	CAGAGGAGGCAGAATAAGAA	Ritze <i>et al.</i> , 2014
<i>CCK</i> -Rev	CAGGAGTCACAGATGAAGAA	
<i>CCKAR</i> -Fwd	GGAActCTACCAGGGAATAA	Zhou <i>et al.</i> , 2014
<i>CCKAR</i> -Rev	GCATGCGGATCACCCCTTTTC	
<i>CCKBR</i> -Fwd	GACACGAGAATTGGAGCTGG	Zhou <i>et al.</i> , 2014
<i>CCKBR</i> -Rev	CAAAGATGAATGTGCCCATGAG	
<i>MYH3</i> -Fwd	GGACAGGAAGAATGTGCTGAGATT	Norman <i>et al.</i> , 2009
<i>MYH3</i> -Rev	GCCTCTTGTAGGACTTGACTTTCAC	
<i>MYOD1</i> -Fwd	TGCTCCGACGGCATGATGGAC	Sharma <i>et al.</i> , 2013
<i>MYOD1</i> -Rev	TCGACACCGCCGACTCT	
<i>MYOG</i> -Fwd	AACCCAGGGGATCATCTGCTCAC	Sharma <i>et al.</i> , 2013
<i>MYOG</i> -Rev	GTTGGGCATGGTTTCATCTGGGAAG	
<i>YWHAZ</i> -Fwd	CAAGCATACCAAGAAGCATTTGA	Nihashi <i>et al.</i> , 2019
<i>YWHAZ</i> -Rev	GGGCCAGACCCAGTCTGA	

結 果

筋芽細胞の分化過程における CCK と受容体の発現を調べた。筋芽細胞を増殖培地で播種した翌日、分化培地に交換して筋分化を誘導した。分化誘導 0, 2, 4 日目の筋芽細胞から RNA を回収し、*CCK*, *CCKAR*, *CCKBR* 遺伝子の発現を定量 PCR で解析した (図 1)。*CCK* の発現は未分化な筋芽細胞で高かったが、分化誘導 2 日目以降には発現量が著明に減少した。*CCKAR* と *CCKBR* の発現量は分化を通じて有意に変化しなかった。*CCKBR* の相対的な発現量は *CCKAR* と比べて 40 倍以上高く、筋芽細胞においては、末梢系の *CCKAR* よりも中枢系の *CCKBR* が支配的であることが示唆された。

次に、筋芽細胞の分化における CCK-8 の作用を調べた。10 μ M の CCK-8 を添加した分化培地で筋芽細胞を 24 時間分化誘導し、筋分化マーカー遺伝子の発現を定量 PCR で解析した (図 2)。筋原性転写因子 *MYOD 1* の発現量は、対照群と比べて CCK-8 投与群で増加する傾向にあったが、有意な差はなかった ($p=0.144$, Student's *t*-test)。また、*MYOD 1* の下流に位置する転写因子 *MYOG* と胚性ミオシン重鎖 *MYH 3* の発現量は、

CCK-8 の投与によって変化しなかった。

続いて、筋芽細胞の分化と筋管形成における CCK-8 の作用を MHC の免疫染色により評価した。0.1, 1.0, 10 μ M の CCK-8 を添加した分化培地で筋芽細胞を 48 時間分化誘導し、免疫染色像から MHC 陽性細胞率と筋管形成率を算出して筋分化を評価した (図 3)。いずれの濃度においても、対照群と CCK-8 投与群で MHC 陽性細胞率と筋管形成率に有意な差はなかった。

最近、ラットの脂肪において、CCK-8 はインスリン存在下でのみ *CCKBR* 依存的にアディポネクチンの生産を亢進することが報告された (Plaza *et al.*, 2019)。そこで、インスリン存在下での筋分化における CCK-8 の作用を MHC の免疫染色によって検討した。30 μ M の CCK-4 または CCK-8 と、100 μ g/ml のインスリンを添加した分化培地で筋芽細胞を 48 時間分化誘導し、MHC 陽性細胞率と筋管形成率を算出して筋分化を評価した (図 4)。CCK-4, CCK-8, インスリンをそれぞれ単体投しても、MHC 陽性細胞率および筋管形成率は変化しなかった。しかし、インスリン存在下で CCK-4 または CCK-8 を同時に投与した群では、インスリン非存在下の対照群と比べ、筋管形成率が有意に上昇していた。

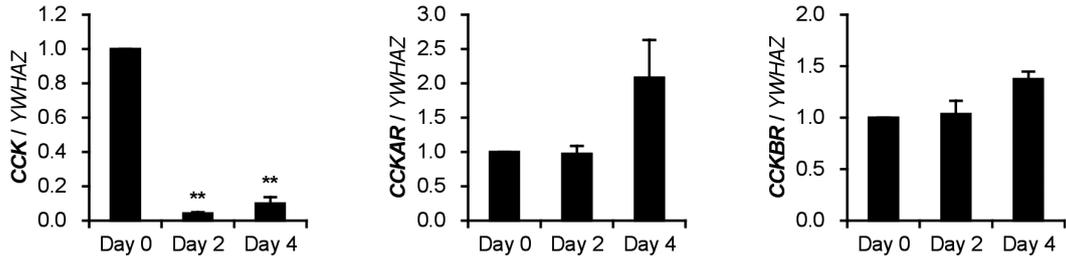


図1. 筋芽細胞の分化における CCK, CCKAR, CCKBR 遺伝子の発現

筋芽細胞を増殖培地で播種した翌日, 分化培地に交換して筋分化を誘導した。分化誘導 0, 2, 4 日目の筋芽細胞における CCK, CCKAR, CCKBR 遺伝子の発現を定量 PCR で解析した。n=3, *p<0.05 vs Day 0, Scheffe's F test.

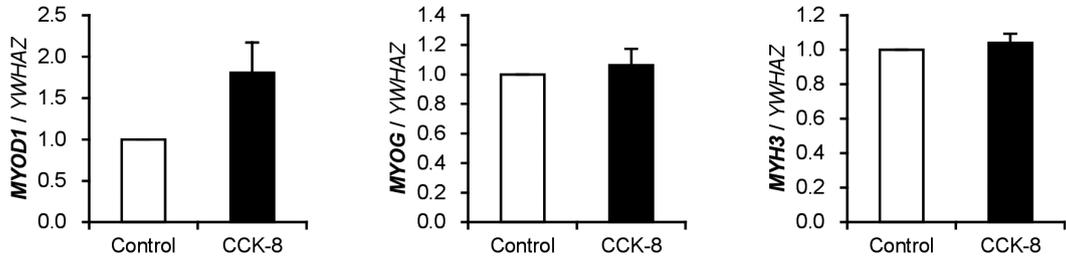


図2. 筋分化マーカー遺伝子の発現における CCK-8の作用

10 μM の CCK-8 を添加した分化培地で筋芽細胞を分化誘導した。24 時間後の筋芽細胞における MYOD 1, MYOG, MYH 3 遺伝子の発現を定量 PCR で解析した。n = 3。

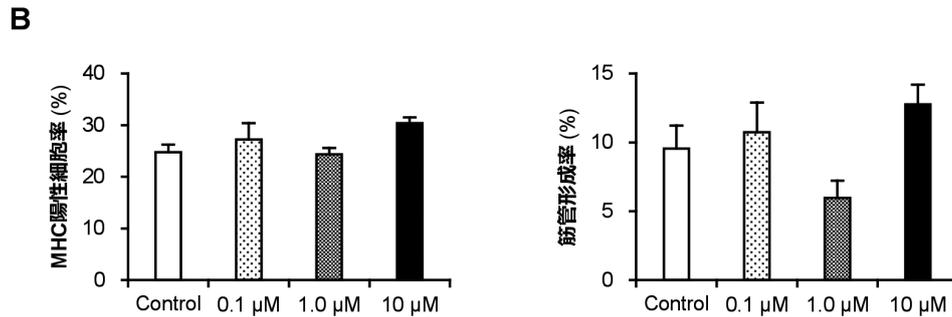
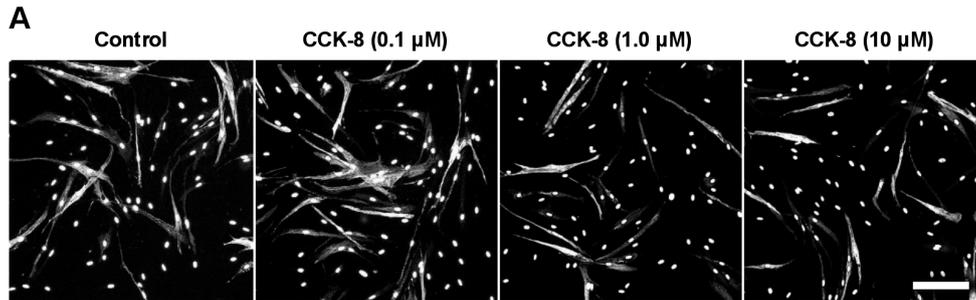


図3. 筋芽細胞の分化における CCK-8の作用

0.1, 1.0, 10 μM の CCK-8 を添加した分化培地で筋芽細胞を分化誘導し, 48 時間後に MHC の免疫染色により筋分化を定量した。(A) MHC 免疫染色像。白: 細胞核 (DAPI), 灰: MHC。スケールバー: 200 μm。(B) MHC 陽性細胞率と筋管形成率。n = 6。

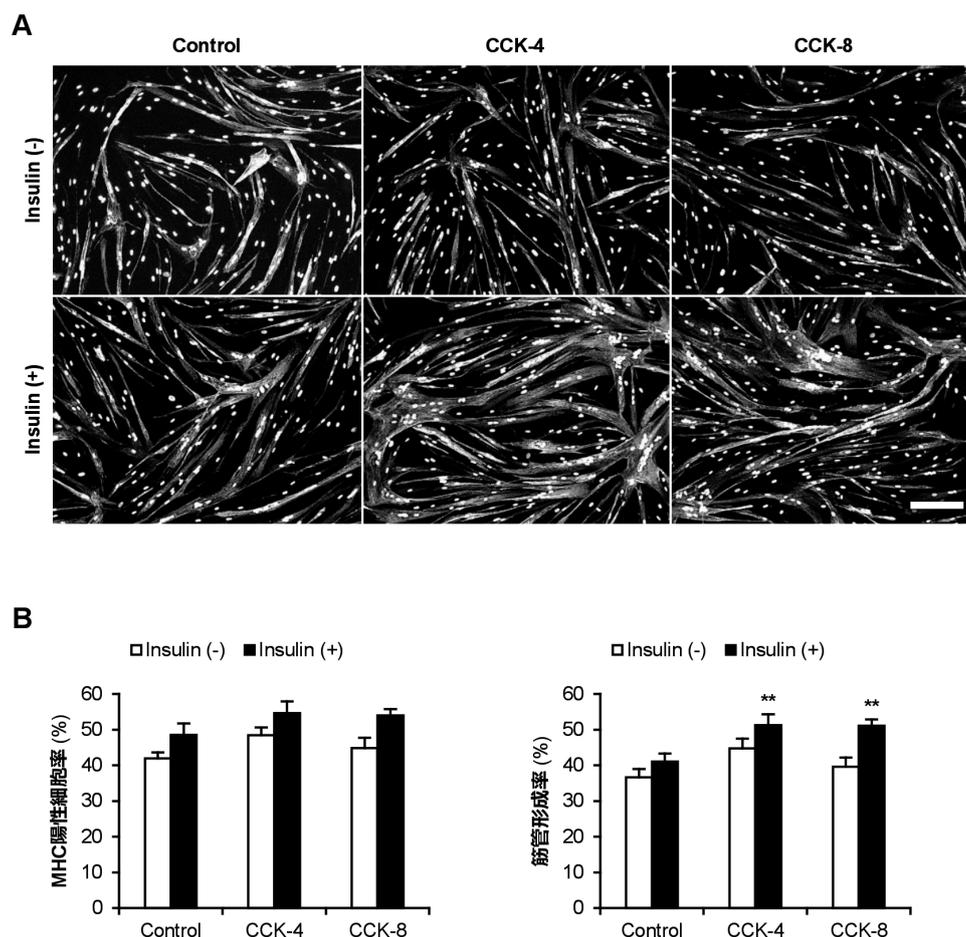


図4. インスリン存在下での筋分化における CCK-4/8の作用

30 μ M の CCK-4/8 と 100 μ g/ml の インスリン を 添加 した 分化 培地 で 筋芽 細胞 を 分化 誘導 し、48 時間 後に MHC の 免疫 染色 により 筋 分化 を 定量 した。(A) MHC 免疫 染色 像。白：細胞 核 (DAPI)，灰：MHC。スケール バー：200 μ m。(B) MHC 陽性 細胞 率 と 筋管 形成 率。n=6, **p<0.01 vs Control-Insulin (-), Scheffe's Ftest.

考 察

本研究によって、ヒト筋芽細胞では CCK, CCKAR, CCKBR 遺伝子が発現しており、CCK-4と CCK-8はインスリン存在下で筋芽細胞の筋管形成を促進することが示された。筋芽細胞が CCK 遺伝子を発現することから、CCK は自己分泌シグナルとして筋形成に作用することが考えられる。CCK 遺伝子の発現量は筋芽細胞の分化に伴って著明に減少したが、転写調節因子 TIF1 γ (transcription intermediary factor 1 γ) 遺伝子を欠損させたマウスでは、分化誘導した筋芽細胞で CCK の発現が亢進することが報告されている (Parks *et al.*, 2019)。マウス TIF1 γ の発現量は、正常な筋組織で低く、筋再

生の誘導で高まるが、筋線維が修復されると再び減少することから、TIF1 γ は筋分化に寄与していると考えられている (Mohassel *et al.*, 2015)。造血幹細胞や生殖細胞では、TIF1 γ は TGF β シグナルを阻害して細胞の運命を制御する (Dupont *et al.*, 2005; He *et al.*, 2006; Dupont *et al.*, 2009)。TGF β は筋芽細胞の分化を抑制するため (Dumont *et al.*, 2015)、TIF1 γ は筋分化の促進を介して CCK の発現低下に関与しているのではないかと考えられる。今後、筋芽細胞における CCK と TIF1 γ の関係を詳細に調べることで、CCK 遺伝子の発現機序が明らかになると期待される。

CCK 遺伝子の発現量は筋分化誘導後に著減した一方、CCK 受容体遺伝子の発現量は分化の過程で一貫して高

かった。これらの遺伝子発現パターンは、筋芽細胞は筋分化を通してCCK感受性を示すが、受容するCCKは未分化時に自己分泌されるものに限らないことを示唆する。ラット腹腔内にCCK-8を単回投与すると、筋組織でAMPキナーゼのリン酸化と脂肪酸の β 酸化が亢進することから(Merino *et al.*, 2008)、他臓器から血中に放出されたCCKも筋組織に到達して作用すると考えられる。特に、CCKはインスリン存在下で筋管形成を促進することから、消化管由来のCCKとの関連性が考えられる。摂食後、管腔の脂質やタンパク質に反応して腸管から分泌されたCCKは、血中に放出され、中枢神経系に作用して食欲を抑制する(Cummings and Overduin, 2007)。このように、腸管CCKの分泌タイミングと生理作用はインスリンと類似している。CCKとインスリンは、筋芽細胞でも同時に受容されて効果を発揮することから、摂食と筋形成を連関させるシグナルとして機能している可能性が考えられる。

インスリンは、インスリン様成長因子(insulin-like growth factor; IGF)を介してセリン/スレオニンキナーゼ(Akt)シグナルを活性化し、骨格筋の形成を調節する(Song *et al.*, 2013)。また、ホスファチジルイノシトール3キナーゼ(phosphatidylinositol-3 kinase; PI3K)/Aktシグナルの活性化は、筋芽細胞の増殖、分化、成熟を促進する(Mnatsakanyan *et al.*, 2018)。脂肪前駆細胞では、CCK-8はインスリン存在下でのみCCKBR依存的にアディポネクチンの発現を誘導するが、この作用はAkt阻害剤でキャンセルされる(Plaza *et al.*, 2019)。すなわち、CCKBRが受容したCCK-8のシグナル伝達には、インスリンによるAkt経路の活性が不可欠と推測される。筋分化や筋管形成におけるCCKとインスリンの相互作用については、今後の研究でさらなる検討が必要である。

本研究ではCCK-4とCCK-8を実験に用いたが、筋芽細胞が分泌・受容する活性型CCKペプチドの種類は未同定である。翻訳されたCCK前駆体は細胞内でタンパク質分解を受け、長さの異なるCCKペプチドが生成された後、硫酸化などの修飾を受ける。各活性型CCKに共通するC末端配列がCCK-4で、動物種間で高度に保存されている。CCKのプロセッシングは細胞特異的であり、CCKの機能と密接な関係がある(Rehfeld *et al.*, 2007)。ラットでは、CCK-8ではなくCCK-33が胃腸管に作用して摂食行動を調節する(Washington *et al.*, 2016)。また、CCK-58の摂食抑制効果は、CCK-8と比較して長時間に及ぶ(Glatzle *et al.*, 2008)。ペプチド長依存的なこれらの差異には不明な点も多いが、プロテ

アーゼや受容体との親和性の違いが理由として考えられる。ヒト血漿中におけるCCKの半減期は、CCK-4が13分、CCK-8が18分だが、CCK-10は30分、硫酸化CCK-8は50分と、ペプチドの延長や翻訳後修飾によってCCKの安定性が高まる(Koulischer *et al.*, 1982)。筋分化におけるCCKの役割を正確に理解するには、筋芽細胞が受容するCCKペプチドを特定するとともに、CCK-4/8以外の活性型CCKの作用を検証しなければならない。

本研究によって、ヒト筋芽細胞がCCKとその受容体の遺伝子を発現すること、そしてCCK-4/8がインスリン存在下で筋管形成を促進することが明らかになった。CCKは自己分泌因子として、特に筋分化の初期段階に寄与していることが示唆された。CCK遺伝子の発現量は肉用鶏と卵用鶏で異なっており(Nihashi *et al.*, 2019)、CCKの分泌量は筋芽細胞の増殖・分化能と関連している可能性がある。肉牛と乳牛の筋芽細胞の比較などによって、大型動物の筋芽細胞でもCCK量の品種間差を調べることで、CCKと筋分化の関係がより明確になると考えられる。また一方で、CCKは食餌に反応して腸管から分泌されるサイトカインでもあり、膵臓から分泌されるインスリンと協働して、食欲の制御に加えて、筋組織の形成や恒常性の維持に関与しているのではないかと考えられた。CCK-8とCCK-58では摂食抑制効果が異なるように(Glatzle *et al.*, 2008)、CCKの筋管形成促進作用もペプチド長に依存している可能性がある。肉用家畜の摂食後の血中CCKの構成比を明らかにすることは、食欲には影響せず、より効果的に筋形成を促す食餌サプリメントの開発などにもつながると期待される。中でもCCK-4は4残基のペプチドで、生産も比較的容易である。サイトカインとして機能する微量のCCKを給餌することは技術的に充分可能である。今後、筋分化におけるCCKの作用機序をより詳細に解明していくことで、肉用家畜の肥育にも有用な知見が得られることが期待される。

謝 辞

本研究の一部は、日本学術振興会特別研究員奨励費(DC1)(課題番号:19J20888)の交付を受けて実施した。

文 献

- Abmayr SM, Pavlath GK. Myoblast fusion: lessons from flies and mice. *Development*, 139: 641–656. 2012.
- Bassett DR Jr, Howley ET. Limiting factors for maximum

- oxygen uptake and determinants of endurance performance. *Med. Sci. Sports Exerc.*, 32: 70-84. 2000.
- Bitar KN, Makhoul GM. Receptors on smooth muscle cells: characterization by contraction and specific antagonists. *Am. J. Physiol.*, 242: 400-407. 1982.
- Crawley JN, Stivers JA, Blumstein LK, Paul SM. Cholecystokinin potentiates dopamine-mediated behaviors: evidence for modulation specific to a site of coexistence. *J. Neurosci.*, 5: 1972-1983. 1985.
- Cummings DE, Overduin J. Gastrointestinal regulation of food intake. *J. Clin. Invest.*, 117: 13-23. 2007.
- Douglas WR. Of pigs and men and research: a review of applications and analogies of pig, *sus scrofa*, in human medical research. *Space Life Sci.*, 3: 226-234. 1972.
- Dumont NA, Bentzinger CF, Sincennes MC, Rudnicki MA. Satellite cells and skeletal muscle regeneration. *Compr. Physiol.*, 5: 1027-1059. 2015.
- Dupont S, Mamidi A, Cordenonsi M, Montagner M, Zacchigna L, Adorno M, Martello G, Stinchfield MJ, Soligo S, Morsut L, Inui M, Moro S, Modena N, Argenton F, Newfeld SJ, Piccolo S. FAM/USP 9 x, a deubiquitinating enzyme essential for TGF β signaling, controls Smad 4 monoubiquitination. *Cell*, 136: 123-135. 2009.
- Dupont S, Zacchigna L, Cordenonsi M, Soligo S, Adorno M, Rugge M, Piccolo S. Germ-layer specification and control of cell growth by ectodermin, a Smad 4 ubiquitin ligase. *Cell*, 121: 87-99. 2005.
- Glatzle J, Raybould HE, Kueper MA, Reeve JR, Zittel TT. Cholecystokinin-58 is more potent in inhibiting food intake than cholecystokinin-8 in rats. *Nutr. Neurosci.*, 11: 69-74. 2008.
- Goetze JP, Hunter I, Zois NE, Terzic D, Valeur N, Olsen LH, Smith J, Plomgaard P, Hansen LH, Rehfeld JF, Balling L, Gustafsson F. Cardiac procholecystokinin expression during haemodynamic changes in the mammalian heart. *Peptides*, 108: 7-13. 2018.
- Groenen MA, Archibald AL, Uenishi H, Tuggle CK, Takeuchi Y, Rothschild MF, Rogel-Gaillard C, Park C, Milan D, Megens HJ, Li S, Larkin DM, Kim H, Frantz LA, Caccamo M *et al.* Analyses of pig genomes provide insight into porcine demography and evolution. *Nature*, 491: 393-398. 2012.
- He W, Dorn DC, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Moore MA, Massague J. Hematopoiesis controlled by distinct TIF 1 γ and Smad 4 branches of the TGF β pathway. *Cell*, 125: 929-941. 2006.
- Huppi K, Siwarski D, Pisegna JR, Wank S. Chromosomal localization of the gastric and brain receptors for cholecystokinin (CCKAR and CCKBR) in human and mouse. *Genomics*, 25: 727-729. 1995.
- Klymiuk N, Blutke A, Graf A, Krause S, Burkhardt K, Wuensch A, Krebs, S, Kessler B, Zakhartchenko V, Kurome M, Kemter E, Nagashima H, Schoser B, Herbach N, Blum H, Wanke R, Aartsma-Rus A, Thirion C, Lochmuller H, Walter MC, Wolf E. Dystrophin-deficient pigs provide new insights into the hierarchy of physiological derangements of dystrophic muscle. *Hum. Mol. Genet.*, 22: 4368-4382. 2013.
- Koulischer D, Moroder L, Deschodt-Lanckman M. Degradation of cholecystokinin octapeptide, related fragments and analogs by human and rat plasma in vitro. *Regul. Pept.*, 4: 127-139. 1982.
- Merino B, Cano V, Guzman R, Somoza B, Ruiz-Gayo M. Leptin-mediated hypothalamic pathway of cholecystokinin (CCK-8) to regulate body weight in free-feeding rats. *Endocrinology*, 149: 1994-2000. 2008.
- Mnatsakanyan H, Serra RS, Rico P, Salmeron-Sanchez M. Zinc uptake promotes myoblast differentiation via Zip 7 transporter and activation of Akt signalling transduction pathway. *Sci. Rep.*, 8: 13642. 2018.
- Mohassel P, Rosen P, Casciola-Rosen L, Pak K, Mammen AL. Expression of the dermatomyositis autoantigen transcription intermediary factor 1 γ in regenerating muscle. *Arthritis Rheumatol.*, 67: 266-272. 2015.
- Nihashi Y, Umezawa K, Shinji S, Hamaguchi Y, Kobayashi H, Kono T, Ono T, Kagami H, Takaya T. Distinct cell proliferation, myogenic differentiation, and gene expression in skeletal muscle myoblasts of layer and broiler chickens. *Sci. Rep.*, 9: 16527. 2019.
- Norman H, Zackrisson H, Hedstrom Y, Andersson P, Nordquist J, Eriksson LI, Libelius R, Larsson L. Myofibrillar protein and gene expression in acute quadriplegic myopathy. *J. Neurol. Sci.*, 285: 28-38. 2009.
- Parks CA, Pak K, Pinal-Fernandez I, Huang W, Derfoul A, Mammen AL. Trim 33 (Tif 1 γ) is not required for skeletal muscle development or regeneration but suppresses cholecystokinin expression. *Sci. Rep.*, 9: 18507. 2019.
- Plaza A, Merino B, Del Olmo N, Ruiz-Gayo M. The cholecystokinin receptor agonist, CCK-8, induces adiponectin production in rat white adipose tissue. *Br. J. Pharmacol.*, 176: 2678-2690. 2019.
- Rehfeld JF, Larsson LI, Goltermann NR, Schwartz TW, Holst JJ, Jensen SL, Morley JS. Neural regulation of pancreatic hormone secretion by the C-terminal tetrapeptide of CCK. *Nature*, 284: 33-38. 1980.
- Rehfeld JF, Friis-Hansen L, Goetze JP, Hansen TV. The biology of cholecystokinin and gastrin peptides. *Curr. Top. Med. Chem.*, 7: 1154-1165. 2007.
- Ritze Y, Bardos G, D'Haese JG, Ernst B, Thurnheer M, Schultes B, Bischoff SC. Effect of high sugar intake on glucose transporter and weight regulating hormones in mice and humans. *PLoS One*, 9: e 101702. 2014.
- Saito A, Sankaran H, Goldfine ID, Williams JA. Cholecystokinin receptors in the brain: characterization and distribution. *Science*, 208: 1155-1156. 1980.
- Sharma V, Harafuji N, Belayew A, Chen YW. DUX 4 differentially regulates transcriptomes of human rhabdomyosarcoma and mouse C 2 C 12 cells. *PLoS One*, 8: e 64691. 2013.

- Soltani N, Roohbakhsh A, Allahtavakoli M, Salari E, Sheibani V, Fatemi I, Shamsizadeh A. Heterogeneous effects of cholecystokinin on neuronal response properties in deep layers of rat barrel cortex. *Somatosens. Mot. Res.*, 35: 131-138. 2018.
- Song YH, Song JL, Delafontaine P, Godard MP. The therapeutic potential of IGF-I in skeletal muscle repair. *Trends Endocrinol. Metab.*, 24: 310-319. 2013.
- Takaya T, Nihashi Y, Kojima S, Ono T, Kagami H. Autonomous xenogenic cell fusion of murine and chick skeletal muscle myoblasts. *Anim. Sci. J.*, 88: 1880-1885. 2017.
- Washington MC, Mhalhal TR, Sayegh AI. Cholecystokinin-33, but not cholecystokinin-8 shows gastrointestinal site specificity in regulating feeding behaviors in male rats. *Horm. Behav.*, 85: 36-42. 2016.
- Zhou L, Yang H, Okoro EU, Guo Z. Up-regulation of cholesterol absorption is a mechanism for cholecystokinin-induced hypercholesterolemia. *J. Biol. Chem.*, 289: 12989-12999. 2014.

Effect of Cholecystokinin during Differentiation of Skeletal Muscle Myoblasts

Yuma NIHASHI, Tomohide TAKAYA

Graduate School of Medicine, Science and Technology, Shinshu University
8304 Minami-minowa, Kami-ina, Nagano 399-4598, Japan

Abstract

Various kinds of cytokines contribute to differentiation of myogenic precursor cells, myoblasts, that play a central role during skeletal muscle development. We recently identified that chicken myoblasts express cholecystokinin (CCK). CCK has been known as a neurotransmitter in central nervous system and as a gastrointestinal hormone in intestine, however, there is no information of its function in myoblasts. The present study investigated the effect of CCK during differentiation of human myoblasts as a model of muscle formation in large mammals. Quantitative PCR demonstrated that human myoblasts express the genes of CCK precursor and its two receptors. Treatment of eight-residue-active form of CCK (CCK-8) had no effects on expression of myogenic marker genes and myotube formation of the myoblasts. Intriguingly, co-treatment of CCK-8 or four-residue-CCK (CCK-4) with insulin significantly facilitated the myotube formation. These results indicate that the CCK secreted from myoblasts would contribute to muscle formation as an autocrine signal in the presence of insulin.

Key words: myoblast, skeletal muscle, cholecystokinin, peptide

牛肉のドライエイジングにおける エダケカビ (*Thamnidium elegans*) の影響について

五箇大成^{1*}・佐丸郁雄²

¹富山県農林水産部農業技術課広域普及指導センター

富山市吉岡1124-1, 939-8153

²富山県農林水産部農業技術課

富山市桜橋通り5-13 富山興銀ビル10階, 930-0004

(2020.2.19 受付, 2021.3.9 受理)

要約 ドライエイジングに伴う牛肉の水分含量, pH, 加熱損失, テクスチャー, 遊離アミノ酸含量, 味, 香りの変化にエダケカビ (*Thamnidium elegans*) が与える影響について調査した。遊離アミノ酸含量についてはエダケカビの影響を明確にするため牛肉の内部と表層を別々に分析した。熟成に伴う牛肉の水分含量, pH, 加熱損失, テクスチャーの変化にエダケカビの影響は確認できなかった。熟成に伴う牛肉内部の遊離アミノ酸 ALA 含量の減少, GLY 含量の増加抑制, 牛肉表層の GLU, PRO 含量の増加, GLY 含量の減少にエダケカビが影響した可能性があった。調べた他の遊離アミノ酸含量の変化にエダケカビの影響は確認できなかった。熟成に伴い牛肉の旨味はヒトが知覚できる程度に増加したが, エダケカビの影響は確認できなかった。熟成に伴う牛肉中の香りに関係する揮発性物質の変化にエダケカビが影響した可能性があった。これらの結果からエダケカビはドライエイジングにおける牛肉の性状, テクスチャー, 味の変化に関与しないが, 独特な熟成香の生成に関与する可能性が示唆された。

キーワード: 牛肉, ドライエイジング, エダケカビ (*Thamnidium elegans*), 熟成香

緒言

牛肉は熟成により味, 香りが向上し, 軟らかさが増す(松石ら, 2015) ことから, 熟成させてから食肉とする。熟成方法は, 真空包装して一定期間冷蔵するウェットエイジングが, 衛生的でロスが少なく, 貯蔵・移動が容易であることから一般的である。

近年, 温度, 相対湿度及び風速を管理した条件下で一定期間空気に暴露し熟成するドライエイジングという熟成方法が, 牛肉に独特の風味が付与されることから, アメリカとオーストラリアにおいて関心が高まっており(Dashdorj *et al.*, 2016), 日本国内においても牛肉のドライエイジングを行う業者が現れている。

しかしながら, 牛肉のドライエイジングにおける温度, 相対湿度, 風速, 熟成期間, 微生物の有無や種類な

どの熟成条件については様々な報告があり(Dashdorj *et al.*, 2016), 牛肉に独特の風味が付与される仕組みは, 明らかになっていない。

ドライエイジングにおいて牛肉の揮発性物質が平均13種類から平均78種類に大きく増加すること(小林と佐々木, 2015)が報告されており, ドライエイジングの独特な熟成香は揮発性物質に由来するものと考えられる。

また, ドライエイジングにおいては, 牛肉を空気に暴露して熟成するが, 表面を抗菌処理すると香気が抑えられる(沖谷ら, 1992; 松石ら, 1993)ことが報告されており, 微生物が熟成香の付与に関係している可能性がある。

エダケカビ (*Thamnidium elegans*) は, ドライエイジングの過程(Dashdorj *et al.*, 2016) や冷蔵中の真空包装していない牛肉表面(Brooks and Hansford, 1923) で

* 連絡先: Tel. 076-429-5044, E-mail: taisei.goka@pref.toyama.lg.jp

表1 熟成条件及び熟成に伴う牛肉性状の変化に及ぼすエダケカビの影響

		C区			N区			K区			
熟成条件	温度 (°C)				1.7 ± 0.3			1.8 ± 0.3			
	相対湿度 (%)				70.0 ± 2.0			69.3 ± 2.7			
肉の性状	水分含量 (%)	T区				30.5 ± 1.1 B			28.1 ± 1.0 B		
		I区	73.6 ± 1.4 A				57.6 ± 1.5 B			59.8 ± 0.9 B	
	pH	5.51 ± 0.02 A			5.60 ± 0.05 B			5.67 ± 0.04 B			
	加熱損失 (%)	29.3 ± 1.6 A			8.1 ± 2.9 B			10.5 ± 2.4 B			
	テクスチャー	軟らかさ (kgw/cm ²)	98.7 ± 9.5			75.6 ± 4.6			88.7 ± 24.1		
		噛み応え (kgw/cm ² ·cm)	847 ± 141			686 ± 106			816 ± 395		
		しなやかさ	1.53 ± 0.06 Aa				1.19 ± 0.12 B			1.31 ± 0.07 b	
脆さ		1.33 ± 0.06			1.51 ± 0.16			1.44 ± 0.20			

Mean ± SD, ab p < 0.05, AB p < 0.01

生育が確認されている。このカビは、牛肉のドライエイジングにおいて黒クルミ様の熟成香の付与に利用できるという報告 (Williams, 1957; 1962) もあることから、ドライエイジングにおける熟成香の付与に關与する微生物である可能性がある。

また、エダケカビはタンパク質及び脂肪分解能を持つ (Kotula *et al.*, 1982) ことから牛肉の性状や味等にも影響する可能性がある。

そこで本試験では、ドライエイジングに伴う牛肉の水分含量, pH, テクスチャー, 遊離アミノ酸含量, 味, 香りの変化にエダケカビが与える影響を調査した。

材料および方法

供試牛肉と熟成条件

富山県産のホルスタイン種去勢肥育牛 (20.5か月齢, 等級 C-2) の左右のうちもも (左: 9.9 kg, 右: 10.1 kg) をと殺後, 真空包装し, 0°C で6日間保管した後, 半膜様筋を採取し, 12片に分割したものを供試した。12片の試料は筋肉内の場所が偏らないよう留意して, 熟成しないC区 (n = 4,400~575 g), エダケカビ無しで35日間熟成するN区 (n = 4,715~920 g), エダケカビ有りで35日間熟成するK区 (n = 4,825~1,015 g) の3区に分けた。

C区は分割後速やかに分析用試料を採取した。N及びK区の各試料は温度及び相対湿度を10分間隔で測定 (おんどり RTR-503, 株式会社ティアンドデイ) し, 温度及び相対湿度ができる限り同じになるよう調整 (表1) した別々の冷蔵庫内に置き, 週3回庫内の場所と天地を変えながら, 35日間熟成を行った後, 分析用試料を採取した。

冷蔵庫内の風速は, 風速計 (クリモマスター風速計 MODEL6531-21, 日本カノマックス株式会社) を用い,

庫内の6か所を測定し, 平均値から求めた。

エダケカビ (*Thamnidium elegans*) (NBRC6152) は独立行政法人製品評価技術基盤機構から購入し, PDA培地で25°C, 6日間培養後, 滅菌水10 mlを加え, 培地表面をコンラージ棒で掻き取り懸濁液とした。懸濁液に含まれるエダケカビの孢子数は, PDA培地で培養し, コロニー数をカウントしたところ 1.6×10^6 個/mlであった。

K区は, 1試料当たり平均1.4 gの懸濁液を滅菌したシリコン製刷毛で試料表面に塗布して熟成した。また, N区は同様な方法で1試料当たり平均1.6 gの滅菌水を塗布して熟成した。

水分含量・pH・加熱損失・テクスチャー

ドライエイジングした牛肉は, 硬化・変色した表層をトリミングして, 内部が食用として供されるが, 本試験においては, エダケカビの影響を詳細に検討するため, 試料内部の他, トリミングした表層からも試料を採取した。

牛肉は35日間, N及びK区それぞれを, 温度 $1.7 \pm 0.3^\circ\text{C}$, $1.8 \pm 0.3^\circ\text{C}$, 相対湿度 $70.0 \pm 2.0\%$, $69.3 \pm 2.7\%$ (表1), 両区を風速平均 0.03 m/s でドライエイジングした後, 硬化・変色した試料表層から採取した部分をT区とし, 水分含量及び遊離アミノ酸含量の分析を行い, 試料内部から採取した部分をI区とし, 水分含量, pH, 加熱損失, テクスチャー, 遊離アミノ酸含量, 味, 香りの分析を行った。

試料の一部は採取後速やかにミンサー (ヘルシーミンサー, DK0580, 貝印株式会社) で複数回細断し, よく混ぜミンチ肉とした。水分含量, pHはミンチ肉作製後速やかに測定し, 遊離アミノ酸, 味, 香りの分析に供するミンチ肉は, 遠沈管に入れ, 酸化防止のため窒素ガスを充てんし, 分析まで -30°C で保管した。

水分含量の測定は、ミンチ肉約2gを、アルミ製秤量容器に入れ、秤量したものを1試料当たり3個用意し、105℃で24時間乾燥し、デシケーター内で30分放冷後、秤量して算出した(齋藤ら, 2010)。

pHの測定については、ミンチ肉約2gを秤量し、10倍量の蒸留水に加え、10,000 rpmで1分間ホモジナイズしたものを測定した(Ahnström *et al.*, 2006)。

加熱損失の測定は、試料を約50g(45.3~64.8g)の立方体状に切り分けたものを1試料当たり2~4個作製、秤量し、それぞれをビニール袋に入れ、できるだけ空気を抜いたものを70℃で1時間湯煎し、流水で30分間放冷後、肉汁をふき取り、秤量して算出した(齋藤ら, 2010)。

テクスチャーの測定は、加熱損失を測定した試料を筋繊維に平行に1cmの厚さにスライスし、4℃で一晩保管した後、テンシプレスサー(TENSIPRESSER My Boy, 有限会社タケトモ電機)を用い、やわらかさ、しなやかさ、噛みごたえ、脆さを、1試料当たり4か所以上測定(齋藤ら, 2010)した。

遊離アミノ酸含量

試料中の遊離アミノ酸の変化を最小限にするため、ミンチ肉を氷冷しながら解凍し、乾物換算で約1.5g秤量し、内部標準として1/10 NNaOH液に溶かした15 μmol/lノルロイシン1.0 ml添加し、HPLC用蒸留水10 mlを加え、氷冷しながら10,000 rpmで1分間ホモジナイズした。その後、脱脂のため、n-ヘキサン10 mlを加えよく攪拌し、1216×g、0℃で3分間遠心分離し、上澄みのn-ヘキサンを除くことを2回繰り返した。次に、除タンパク質のため、アセトニトリル30 mlを加えよく攪拌し、1750×g、0℃で15分間遠心分離し、上澄みのアセトニトリルをろ過しながら回収し、残った沈殿物にHPLC用蒸留水5 mlとアセトニトリル15 mlを加えよく攪拌し、1750×g、0℃で15分間遠心分離し、再度上澄みをろ過しながら回収した。これをHPLC用蒸留水で100 mlまでメスアップし、フィルター(マイレクス-LH 0.45 μm 1, SLLHC13NL, MILLPORE)でろ過し、分析まで-30℃で保存した(齋藤ら, 2010)。

17種の遊離アミノ酸(アラニン(ALA), アルギニン(ARG), アスパラギン酸(ASP), シスチン(CYS), グルタミン酸(GLU), グリシン(GLY), ヒスチジン(HIS), イソロイシン(ILE), ロイシン(LEU), リシン(LYS), メチオニン(MET), フェニルアラニン(PHE), プロリン(PRO), セリン(SER), トレオニン(THR), チロシン(TYR), バリン(VAL))含量は、AccQ・Tag 試薬キット(WAT052880, 日本ウォー

ターズ株式会社), HPLC (Waters2690, 日本ウォーターズ株式会社), 蛍光検出器(Waters474, 日本ウォーターズ株式会社)を用いて測定した。各遊離アミノ酸含量は、内部標準と試料の水分含量で測定値を補正し、試料の乾物重量あたりとして算出した。

味

試料中の遊離アミノ酸含量の変化を最小限にするため、ミンチ肉を氷冷しながら解凍し、現物約30gを秤量し、重量の1%のNaClを加えよく混ぜ、4℃で18時間保管した後、厚さ1cmの楕円板状のパテに整形し、ホットプレート(NHS-300ND, 株式会社日伸理化)を用い、両面を200℃で4分間加熱した。室温まで放冷後、パテ内部から5g採取し、15%エタノール水溶液(v/v)30 mlを加え、1,960×gで10分間遠心分離し、上澄み15 mlを採取し、15%エタノール水溶液60 mlで希釈し、味覚センサーC00, AE1, AAE, CA0, GL1を取り付けた味認識装置(TS-5000Z, 株式会社INSENT社)で、酸味、苦味雑味、渋味刺激、旨味、苦味、旨味コク、甘みを測定した(Chikuni *et al.*, 2010)。

香り

一般社団法人家畜改良事業団家畜改良技術研究所に依頼し、小林らの方法により、ミンチ肉から抽出、揮発性物質の分析を行った(小林と佐々木, 2015)。

統計処理

水分含量, pH, 加熱損失, テクスチャー, 味, 香りのC, N, K区間の比較はTukeyの多重検定, 遊離アミノ酸含量におけるC区に対するN区のT, I区, K区のT, I区の4区間の比較はDunnettの検定, この4区間の比較はTukeyの多重検定を用いた。これら統計処理はR-3.4.4 for Windowsで行った。

結 果

N区では、熟成終了の35日目まで、試料表面のカビは視認できなかった。K区では、熟成12日目に、試料表面に白色のカビが視認でき(写真1)、熟成30日目には、白色のカビがさらに明瞭となった(写真2)。試料表面のカビの同定をNPO法人カビ相談センター(東京都大田区)に依頼し、光学顕微鏡での鏡検及び培養により、その形状を確認したところ、エダケカビ(*Thamnidium elegans*)及びケカビ(*Mucor sp.*)であった。

試料内部の水分含量は、熟成前のC区の73.6%と比較して、熟成後のI区のN区57.6%, K区59.8%で、両区で有意に減少したが、N, K区間で有意な差はなかった。また、試料表層の水分含量は、熟成前と比較して、熟成後のT区のN区30.5%, K区28.1%で、両区で有意

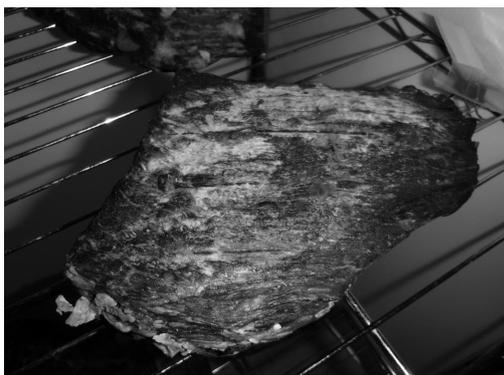


写真1 エダケカビを塗布したK区の牛肉（熟成12日目）



写真2 エダケカビを塗布したK区の牛肉（熟成30日目）

表2 熟成に伴う牛肉の表面及び内部における遊離アミノ酸含量 (μg/DMg) の変化とエダケカビの影響

	C区		N区			K区		
		T区	I区		T区	I区		
ALA	1,133 ± 56	892 ± 56 ††	1,040 ± 47		959 ± 58 ††	970 ± 43 ††		
ARG	1,375 ± 128	1,148 ± 171	1,643 ± 169 *		1,272 ± 63	1,635 ± 126		
ASP	1 ± 1	6 ± 7	38 ± 32		22 ± 8	49 ± 40		
CYS	201 ± 37	0 ± 0	0 ± 0 ††		56 ± 112 ††	0 ± 0 ††		
GLU	305 ± 49	416 ± 70	994 ± 91	**	457 ± 48 *	1,034 ± 83 **		
GLY	259 ± 31	201 ± 28	511 ± 48 **	a	175 ± 26 †	427 ± 52 **	b	
HIS	2,628 ± 457	1,546 ± 152 ††	2,739 ± 390		1,485 ± 116 ††	2,437 ± 254		
ILE	113 ± 19	323 ± 41 **	696 ± 66 **		289 ± 49 **	698 ± 59 **		
LEU	291 ± 37	715 ± 67 **	1,059 ± 73 **		632 ± 79 **	1,055 ± 43 **		
LYS	211 ± 18	443 ± 91 *	831 ± 149	**	428 ± 81 *	846 ± 87 **		
MET	128 ± 16	280 ± 22 **	513 ± 43 **		261 ± 22 **	506 ± 50 **		
PHE	123 ± 27	456 ± 23 **	736 ± 58 **		415 ± 34 **	753 ± 59 **		
PRO	177 ± 21	110 ± 12	257 ± 26	A	1,000 ± 316 **	241 ± 30	B	
SER	284 ± 36	432 ± 65	941 ± 87 **		417 ± 60	873 ± 115 **		
THR	808 ± 53	603 ± 61 ††	1,051 ± 69 **		697 ± 42	1,058 ± 59 **		
TYR	196 ± 21	483 ± 42 **	674 ± 108 **		454 ± 40 **	745 ± 84 **		
VAL	266 ± 30	463 ± 67 **	946 ± 80 **		455 ± 60 **	941 ± 70 **		
合計	8,496 ± 993	8,515 ± 812	14,668 ± 1,141 **		9,470 ± 535	14,265 ± 841 **		

Mean ± SD, C区に対して有意に多い* p < 0.05 ** p < 0.01, C区に対して有意に少ない † p < 0.05 †† p < 0.01, T区及びI区のN, K間の有意差 ab p < 0.05 AB p < 0.01

表3 熟成に伴う牛肉の味の変化とエダケカビの影響

	C区	N区	K区
酸味	ND	ND	ND
苦味雑味	0.02 ± 0.01	ND	ND
渋味刺激	ND	ND	ND
旨味	11.70 ± 0.01	13.43 ± 0.03 **	13.36 ± 0.06 **
苦味	0.07 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.02 ± 0.01 *
渋味	0.08 ± 0.04	ND	ND
旨味コク	0.86 ± 0.16	1.43 ± 0.01 *	1.40 ± 0.01 *
甘味	5.97 ± 0.04	6.73 ± 0.29	6.02 ± 0.30

Mean ± SD, C区に対する有意差 * p < 0.05, ** p < 0.01

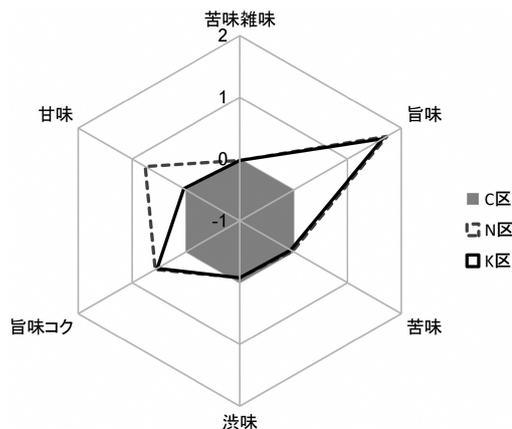


図1 熟成に伴う牛肉の味の変化とエダケカビの影響熟成前のC区を基準として1以上の差はヒトが知覚できる味の変化

に減少したが、N、K区間で有意な差はなかった（表1）。

pHは、熟成前のC区の5.51と比較して、熟成後は、N区5.60、K区5.67で、有意に上昇したが、N、K区間で有意な差はなかった（表1）。

加熱損失は、熟成前のC区の29.3%と比較して、熟成後は、N区8.1%、K区10.5%で、有意に減少したが、N、K区間で有意な差はなかった（表1）。

テクスチャーについては、熟成前のC区のしなやかさと比較して、熟成後は、N、K区で有意に減少、軟らかさは低下（軟らかくなる）傾向、噛み応えは低下傾向、脆さは増加傾向にあったが、N、K区間で有意な差はな

かった（表1）。

試料内部の遊離アミノ酸含量について、熟成前のC区と熟成後のN、K区の各I区を比較すると、N、K両区でGLU、GLY、ILE、LEU、LYS、MET、PHE、SER、THR、TYR、VAL及び17種の合計が有意に増加し、CYSが有意に減少し、N区のみでARGが有意に増加し、K区のみでALAが有意に減少した。N、K区間で有意な差があったのは、GLYのみで、N区と比較してK区で有意に少なかった（表2）。

また、試料表層の遊離アミノ酸含量について熟成前のC区と熟成後のN、K区の各T区を比較すると、N、K両区でILE、LEU、LYS、MET、PHE、TYR、VAL

表4 熟成に伴う牛肉の揮発性物質（relative abundance）の変化に及ぼすエダケカビの影響

		C区		N区		K区		
アルコール	ブタノール	0.59	± 0.05	0.62	± 0.10	0.639	± 0.19	
	3-メチル-1-ブタノール	0.05	± 0.06	A 0.07	± 0.14	A 2.82	± 1.18	B
	1-ペンタノール	1.61	± 0.30	A 7.74	± 1.20	B 6.14	± 2.47	B
	1-ヘプタノール	0.25	± 0.02	0.49	± 0.35	0.28	± 0.35	
	1-オクテン-3-オール	7.05	± 0.98	10.80	± 13.99	10.97	± 16.11	
	オクタノール	1.01	± 0.15	1.06	± 0.40	1.35	± 0.49	
	フェネチルアルコール	0.03	± 0.01	A 0.04	± 0.04	a 0.46	± 0.27	Bb
	1-ノナノール	0.18	± 0.03	0.04	± 0.07	0.05	± 0.11	
アルデヒド	ヘキサナール	3.99	± 0.92	a 74.11	± 39.27	b 56.66	± 23.83	b
	ヘプタナール	1.206	± 0.26	a 6.072	± 3.023	b 4.764	± 2.628	
	オクタナール	1.633	± 0.67	a 6.954	± 5.245	11.24	± 5.015	b
	ノナナール	7.078	± 1.79	5.747	± 2.52	4.854	± 1.289	
	2,4-デカジエン-1-アール	0.501	± 0.1	a 4.292	± 2.174	b 4.011	± 1.147	b
	2-デセナール	0.027	± 0.05	a 0.878	± 0.65	b 1.168	± 0.325	b
カルボン酸	酢酸	77.61	± 1.57	Aa 355.4	± 127.4	B 272.4	± 77.97	b
	プロピオン酸	2.703	± 0.11	A 9.641	± 1.493	B 8.412	± 1.152	B
	イソ酪酸	5.07	± 0.75	a 10.71	± 2.246	b 11.31	± 3.888	b
	酪酸	42.48	± 5.87	A 186.7	± 38.29	B 146.5	± 50.56	B
	イソ吉草酸	0.202	± 0.04	Aa 1.095	± 0.314	b 1.311	± 0.473	B
	吉草酸	4.838	± 0.8	A 16.62	± 3.922	B 10.48	± 3.76	
	カプロン酸	60.78	± 11.7	A 223.1	± 46.64	B 135.9	± 64.92	
	ヘプタン酸	3.587	± 0.33	a 6.307	± 1.142	b 5.856	± 1.998	
	カプリル酸	8.243	± 2.11	14.23	± 8.681	19.07	± 11.21	
	ペラルゴン酸	12.45	± 0.75	10.62	± 2.283	11.01	± 1.811	
ピラジン	2-メチルピラジン	0.025	± 0.01	0.126	± 0.065	0.079	± 0.093	
	2,5-ジメチルピラジン	0.09	± 0.01	0.314	± 0.166	0.255	± 0.28	
	2,6-ジメチルピラジン	0.024	± 0	0.029	± 0.041	0.046	± 0.073	
	2,3-ジメチルピラジン	0.012	± 0	0.016	± 0.018	0.01	± 0.021	
	2,3,5-トリメチルピラジン	0.125	± 0.03	0.965	± 0.659	0.363	± 0.419	
ラクトン	γ-ヘキサノラクトン	0.097	± 0.01	A 0.947	± 0.074	B 0.796	± 0.162	B
	γ-ノナノラクトン	1.52	± 0.27	7.556	± 5.169	8.304	± 3.712	
	δ-ドデカノラクトン	0.211	± 0.14	Aa 2.012	± 0.816	B 1.296	± 0.381	b
その他	マルトール	0.09	± 0.03	0.444	± 0.29	0.341	± 0.261	
	2-ペンチルフラン	0.313	± 0.06	Aa 9.187	± 5.04	b 13.61	± 5.431	B

Mean ± SD, ab p < 0.05, AB p < 0.01

が有意に増加し、ALA, CYS, HIS が有意に減少し、N区のみでTHRが有意に減少し、K区のみでGLU, PROが有意に増加し、GLYが有意に減少した。N, K区間で有意な差があったのは、PROのみで、N区と比較してK区で有意に多かった(表2)。

味について、熟成前のC区と比較すると、熟成後のN, K両区で旨味、旨味コクが有意に増加したが、N, K区間で有意に差はなかった。また、苦味がK区で有意に減少した。それ以外の味については熟成前後で有意な差がないか検出限界以下であった(表3)。N, K区の各味の測定値をC区を基準として、1以上の差でヒトが知覚できる数値に換算すると、C区に対し、熟成後のN, K区の両区の旨味が、ヒトの知覚できる範囲で増加していた(図1)。

揮発性物質について、熟成前のC区と比較すると、熟成後のN, K両区で、1-ペンタノール、ヘキサナール、2,4-デカジエン-1-アール、2-デセナール、酢酸、プロピオン酸、イソ酪酸、酪酸、イソ吉草酸、 γ -ヘキサノラクトン、 δ -ドデカノラクトン、2-ペンチルフランが有意に増加し、熟成後のN区で、ヘプタナール、吉草酸、カプロン酸、ヘプタン酸が有意に増加したが、N, K区間で有意な差はなかった。また、熟成前のC区と比較して、熟成後のK区で3-メチル-1-ブタノール、フェネチルアルコール、オクタナールが有意に増加し、3-メチル-1-ブタノール、フェネチルアルコールについては、N区に対しても有意に多かった(表4)。

考 察

エダケカビ (*Thamnidium elegans*) を塗布したK区においては、熟成中に白色のカビが牛肉表面の全体に広がった(写真1, 写真2)が、滅菌水を塗布したN区においてはカビを視認できなかったことから、本試験においてK区はエダケカビの影響を受けたものとした。K区において、塗布したエダケカビの他にエダケカビと同じケカビ目のケカビ (*Mucor sp*) が確認された理由は不明である。

本試験において、ドライエイジングにおける牛肉の水分含量、pH、加熱損失の変化にエダケカビの影響は確認できなかった。

また、本試験において、ドライエイジングにより牛肉のしなやかさが低下(噛み切り易さが向上)することが明らかになったが、エダケカビの影響は確認できなかった。熟成に伴う牛肉の軟化はウエットエイジング(Nishimura *et al.*, 1988; 沖谷ら, 1990; Warren and Kastner, 1992; Simada *et al.*, 1992; John and Elaine,

2015), ドライエイジング(Warren and Kastner, 1992; Campbell *et al.*, 2001)の両方で報告されており、ウエットエイジングとドライエイジングを比較した報告では、ウエットエイジングの方が軟化する(Perry *et al.*, 1991; Sitz *et al.*, 2006; John and Elaine, 2015), ドライエイジングの方が軟化する(Campbell *et al.*, 2001), 同程度である(Warren and Kastner, 1992; John and Elaine, 2015)と様々な報告がある。これらの報告において、微生物の有無については言及されておらず、微生物が牛肉の軟化に影響するか不明である。熟成による牛肉の軟化は肉に含まれるたんぱく質分解酵素の働きが主要因とされており、ドライエイジングにおいてエダケカビは、牛肉のせん断力価に影響しないという報告(Kotula *et al.*, 1988)や、エダケカビは、タンパク質分解能を有するが、低温においてはその能力は低いという報告(Kotula *et al.*, 1982)があり、通常0~4℃(USMEF, 2014; Dashdorj *et al.*, 2016)で熟成するドライエイジングにおいて、エダケカビが牛肉のテクスチャーに影響する可能性は低いと考えられる。

本試験において、ドライエイジングによる牛肉内部の遊離アミノ酸含量の変化を見ると、熟成前と比較して、エダケカビの有無に関わらず、GLU, GLY, ILE, LEU, LYS, MET, PHE, SER, THR, TYR, VAL及び合計含量が有意に増加した(表2)。この結果は、ウエットエイジングした牛肉における報告(Parrish *et al.*, 1969; Nishimura *et al.*, 1988; Simada *et al.*, 1992; Mullena, 2000; 常石ら, 2008)と同様であった。

一方、ウエットエイジングにおいて、牛肉中の遊離アミノ酸のCYS濃度は変化しないという報告(Parrish *et al.*, 1969; Nishimura *et al.*, 1988; Simada *et al.*, 1992; Mullena, 2000; 常石ら, 2008)と異なり、本試験ではエダケカビの有無に関わらず有意に減少し0になった。このことから熟成によるCYS含量の減少は、ドライエイジングに特有なものと考えられた。

また、ウエットエイジングでは牛肉のALA含量が増加するという報告(Parrish *et al.*, 1969; Nishimura *et al.*, 1988; Simada *et al.*, 1992; 常石ら, 2008)はあったが、本試験では、ALA含量がエダケカビ有りの熟成後に有意に減少したこと(表2)から、エダケカビがALA含量の変化に影響した可能性がある。

次に、本試験において、エダケカビの影響がより強いと予想される牛肉表面の遊離アミノ酸含量の変化を見ると、熟成前と比較して、牛肉内部と同様、エダケカビの有無に関わらず、ILE, LUE, LYS, MET, PHE, TYR, VAL含量が有意に増加したが、牛肉内部とは異

なり、GLY, SER, THR 及び合計含量について、有意な増加は確認できなかった(表2)。また、牛肉内部と同様に、熟成前と比較して、エダケカビの有無に関わらず、牛肉表層のCYS含量は有意に減少した(表2)。牛肉表層のPRO含量は、熟成前と比較して、エダケカビ有りの熟成後に有意に増加し、エダケカビ無しの熟成後に対しても有意に多かったこと(表2)から、牛肉表層のPRO含量の増加に、エダケカビの影響があったと考えられる。

牛肉表層のほとんどの遊離アミノ酸含量は、牛肉内部と比較して少ない傾向にあった。これは、乾燥した牛肉表層で、タンパク質分解酵素の活性が低下したためと考えられる。

本試験において、ドライエイジングによる牛肉の味の変化を見ると、熟成前と比較して、エダケカビの有無に関わらず、旨味及び旨味コクが、人が知覚できる程度まで有意に増加した。これは牛肉中の旨味に関連するGLU(船山信次, 2009)等の遊離アミノ酸含量が熟成前より増加し、同時に、ドライエイジングに伴う牛肉の水分含量の減少により、GLU等が濃縮されたことが一因であると考えられる。それ以外の味については、熟成前後で有意な変化がないか検出限界以下であり、エダケカビの影響も確認できなかった。これらの結果から、エダケカビはドライエイジングによる味の変化に関与しないと考えられる。

ドライエイジングとウエットエイジングの香りを比較すると、ドライエイジングの方が好ましい熟成香が強いこと(Warren and Kastner, 1992; 松石ら, 1993; Campbell *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2014), ドライエイジングにおいて乳雄牛肉の揮発性物質が平均13種類から平均78種類に大きく増加する(小林と佐々木, 2015)こと、ドライエイジングのような空気に暴露する熟成と比較してウエットエイジングでは香気が抑制される(沖谷ら, 1992)ことが報告されており、熟成香の生成に熟成時の空気への暴露が重要であると考えられる。一方、空気に暴露した熟成においても、表面を抗菌処理した牛肉の香気は抑えられる(沖谷ら, 1992; 松石ら, 1993)ことが報告されており、ドライエイジングにおける独特な熟成香の生成に微生物が関与していると考えられる。

エダケカビは牛肉の黒クルミ様の熟成香の付与に利用できるという報告(Williams, 1957; Williams, 1962)があり、タンパク質及び脂肪の分解能を持つ(Kotula *et al.*, 1982)ことから、牛肉の赤身または脂肪、もしくはその両方に作用し、ドライエイジングに特有な熟成香を生成する可能性がある。

本試験において、エダケカビ有りの熟成後の牛肉中で、3-メチル-1-ブタノール、フェネチルアルコールの2種のアルコールが、熟成前及びエダケカビ無しの熟成後の牛肉に対し、顕著に増加していた(表4)。この2種は共に香りを有するアルコールであるが、フェネチルアルコールについては、ドライエイジングに特徴的な熟成香であることが報告されており(小林と佐々木, 2015), ドライエイジングに特徴的な熟成香の生成には、エダケカビが関与していると考えられる。また、エダケカビ有りの熟成後の牛肉からは、明らかに一般にナッツ臭と言われる特有な熟成香が感じられた。

本試験のエダケカビ有りの熟成後の牛肉表層における、熟成前と比較した、PRO, GLU含量の増加やGLY含量の減少、エダケカビ無しの熟成後の牛肉表層と比較した、THR含量の減少などの特徴的な遊離アミノ酸含量の変化は、この独特な熟成香の生成と関係しているかもしれない。

松石らは、空気に暴露し熟成した牛肉で、連鎖桿菌の*Brochothrix thermosphacta*が、甘いミルク様な好ましい熟成香を産生すると報告(Matsuishi *et al.*, 2000)しており、ドライエイジングの熟成香は、エダケカビ以外にも様々な細菌、酵母、カビ等が関係し、それぞれが独特の熟成香を生成している可能性がある。

本試験の結果をまとめると、ドライエイジングにおいてエダケカビは、熟成時の牛肉の水分含量、pH、テクスチャー、味の変化に影響しないが、特徴的な熟成香の生成に関与している可能性が示唆された。

謝 辞

本研究を進めるにあたって、肉の水分活性測定等にご協力頂いた富山県農林水産総合技術センター食品研究所寺島晃也副主幹研究員、味認識装置による肉の味の分析と解析にご協力頂いた富山県薬事総合研究開発センター永井秀昌主任研究員、カビの取り扱いをご指導頂いた彌榮麻衣子氏、肉の揮発性物質の分析にご協力頂いた一般社団法人家畜改良事業団家畜改良技術研究所小林正人氏に心から感謝の意を表します。

文 献

- Ahnström ML, Seyfert M, Hunt MC, Johnson DE, Dry aging of beef in a bag highly permeable to water vapour. *Meat Sci.* 73(4): 647-679. 2006
- Brooks FT, Hansford CG. Mould growths upon cold-store meat. *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, 8(3): 113-142. 1923
- Campbell RE, Hunt MC, Chambers IV PE. Dry-Aging Effect on Palatability of Beef Longissimus Muscle. *J. Food. Sci.*, 66(2):

- 196-199. 2001
- Chikuni K, Oe M, Sasaki K, Shibata M, Nakajima I, Ojima K, Muroya S. Effects of muscle type on beef taste-traits assessed by an electric sensing system. *Anim Sci J.*, 81(5): 600-605. 2010
- Dashdorj D, Tripathi VK, Cho S, Kim Y, Hwan I. Dry aging of beef. *Review. J. Anim. Sci. Technol.*, 58: 28. 2016.
- John AM, Elaine VM. Dry and Wet Aging Effects on Tenderness, Palatability and Oxidative Rancidity in Beef Steaks. *Inter. J. Sci. Commerce and Humanities.*, 3(2): 39-44
- Kotula AW, Campano SG, Kinsman DM. Proteolytic and Lipolytic Activity of Molds Isolated from Aged Beef. *J. Food Protection.*, 45(13): 1242-1244. 1982
- Kotula AW, Campano SG, Kinsman DM. Ineffectiveness of Three Added Mold Species to Enhance the Rapid Aging of Beef. *J. Food Prot.*, 51(2): 126-129. 1988
- Li X, Babol J, Bredie WL, Nielsen B, Tománková J, Lundström K. A comparative study of beef quality after ageing longissimus muscle using a dry ageing bag, traditional dry ageing or vacuum package ageing. *Meat Sci.*, 97(4): 433-442. 2014
- Matsuishi M, Fujimori M, Moon YH, Okitani A. Isolation and Characterization of a Bacterium Producing the Conditioned Raw Beef Aroma. *Anim. Sci. J.* 71(4): 409-415. 2000
- Mullena AM, Stoeva S, Laib K, Gruebler G, Voelter W, Troya DJ. Preliminary analysis of amino acids at various locations along the M. longissimus dorsi in aged beef. *Food Chem.*, 69(4): 461-465. 2000
- Nishimura T, Rhue MR, Okitani A, Kato H. Components Contributing to the Improvement of Meat Taste during Storage. *Agric. Biol. Chem.*, 52(9): 2323-2330. 1988
- "Parrish Jr FC, Goll DE, Newcomb II WJ, de Lumen BO, Chaudhrt HM, Kline EA. Molecular Properties of Post-Mortem Muscle. 7.Changes in Nonprotein Nitrogen and Free Amino Acids of Bovine Muscle. *J. Food Sci.*, 34: 196-202. 1969"
- Parrish Jr FC, Boles JA, Rust RE, Olson DG. Dry and wet aging effects on palatability attributes of beef loin and rib steaks from three quality grades. *J. Food Sci.*, 56(3): 601-603. 1991
- Perry N. Dry aging beef. *Inter. J. Gastronomy and Food Sci.*, 1(1): 78-80. 2012
- Simada A, Watanuki M, Tanisawa Y, Hatae K. Changes in the Taste of Beef with Aging. *J. Home Econ. Jpn.*, 43(3): 199-206. 1992
- Sitz BM, Calkins CR, Feuz DM, Umberger WJ, Eskridge KM. Consumer sensory acceptance and value of wet-aged and dry-aged beef steaks. *J. Anim. Sci.*, 84(5): 1221-1226. 2006
- U.S. Meat Export Federation. Guidelines for U.S. Dry-Aged Beef for International Markets., 2014.
- Warren K, Kastner CL. A comparison of dar-aged and vacuum-aged beef strip loins. *J. Muscle Foods.*, 3(2): 151-157. 1992.
- Williams BE. Method for aging meat. United States Patene Office., US 2816836 A. 1957
- Williams BE. Method for aging and flavoring meat. United States Patene Office., US 3056679 A. 1962
- 沖谷明紘・松石昌典・根岸晴夫・吉川純夫. 凍結貯蔵牛肉の解凍後貯蔵による食味性の向上. *日畜会報*, 61(11): 993-997. 1990
- 沖谷明紘・森壽一郎・松石昌典. 牛肉の含気熟成による香りの向上. *日畜会報*, 63(2): 189-191. 1992
- 小林正人・佐々木整輝. 牛肉の匂いに及ぼす熟成と加熱調理の影響. 平成26年度 食肉に関する助成研究調査成果報告書, 33: 39-45. 2015
- 齋藤薫・奥村寿章・曾和拓・佐久間弘典・山田信一. 食肉の理化学分析及び官能評価マニュアル. 独立行政法人家畜改良センター. 福島県. 2010.
- 松石英作・丸山新・松橋珠子・小林直彦・坂口慎一・神谷充. 牛肉中の遊離アミノ酸含量に対する冷蔵貯蔵日数の影響. *西日本畜産学会報*, 51: 79-82, 2008
- 船山信次. アミノ酸 タンパク質と生命活動の科学. 184. 東京電機大学出版局. 東京都. 2009
- 松石昌典・森壽一郎・文允熙・沖谷明紘. 牛肉の含気貯蔵による生鮮香気, 熟成香の生成. *日畜会報*, 64(2): 163-170. 1993
- 松石昌典・西邑隆徳・山本克博. 肉の機能と科学. 第1版. 70-84 (松石昌典・沖谷明紘). 朝倉書店. 東京都. 2015

The Influence of *Thamnidium elegans* on Dry-Aging of Beef

Taisei GOKA¹, Ikuo SAMARU²

¹Toyama Prefectural Agriculture, Forestry & Fisheries Department Agricultural Technology Division
Wide Area Agricultural Extension Center, 1124-1, Yosioka, Toyama 939-8153

²Agriculture, Forestry & Fisheries Department Agricultural Technology Division, Toyama Kougoin Building 10F 5-13,
Sakuradouri, Toyama 930-0004

Abstract

The effects of mold strain (*Thamnidium elegans*) associated with dry aging process in beef were investigated. Specifically, changes in water content, pH, cooking loss, texture, free amino acid content, taste and aroma were analyzed during the dry aging of beef with the mold strain. The mold did not affect the water content, pH, cooking loss, and texture. The amino acid content of the internal and surface (trimming sections) meat samples was separately analyzed and clarify the effects of the mold. The analyses revealed that the internal meat samples in the mold-aging beef showed a decrease of alanine and remained glycine. On the other hand, the surface samples showed a dramatical increases of proline and glutamate and a decrease of glycine in the presence of mold. In addition, the dry aging process enhanced tastes, such as umami, compared to the non-aging process beef. However, the enhancement did not occur in the presence of mold. These results strongly suggest that *T. elegans* did not contribute to the changes in the properties, such as texture, and umami taste of beef during dry aging. Furthermore, we found that the dry aging with mold produces some volatile substances associated with intensive “nutty” aged aroma, suggesting that *T. elegans* may produce some unique aroma compounds during aging beef.

Key words: beef, dry aging, mold, *Thamnidium elegans*, aged aroma

北信越畜産学会誌 第1巻

(会員配布, 年会費1,500円)

令和3年9月30日 発行

編集兼発行者 代表 神 勝紀

発行所 **北信越畜産学会**

〒399-4598

長野県上伊那郡南箕輪村 8304

信州大学農学部内

印刷所 信教印刷株式会社

〒381-0022

長野市大豆島東沖 4321

北信越畜産学会誌

会長 神 勝紀

編集委員長 竹田 謙一

編集委員 上野 豊, 河原岳志, 下里剛士, 高木優二, 田中沙智,
平松浩二, 米倉真一

学会事務局 399-4598 長野県上伊那郡南箕輪村8304 信州大学農学部内
略称 北信越畜会誌

Hokushinetsu Journal of Animal Science

President : Katsuki Koh

Editorial Board

Editor-in-Chief : Ken-ichi Takeda

Yutaka Uyeno, Takashi Kawahara, Takeshi Shimosato, Yuji Takagi,
Sachi Tanaka, Kohzy Hiramatsu, Shinichi Yonekura

Correspondence Faculty of Agriculture, Shinshu University
8304 Minamiminowa, Kamiina, Nagano 399-4598 Japan

Abbreviation Hokushinetsu J. Anim. Sci.

ONLINE ISSN : 2759-2731