

## 魚肉軟化機構の解明と遺伝子導入技術を用いた肉質改善技術の開発

豊原治彦\*

### Studies on Fish Muscle Tenderization and Improvement of Fish Meat Quality by Transgenic Technology

Haruhiko TOYOHARA \*

**Abstract** Fish meat is rapidly tenderized during storage after death. Muscle tenderization is supposed to be caused by the proteolytic breakdown of collagen in the connective tissue induced by matrix metalloproteinases (MMPs). The activity of MMPs is regulated by the endogenous tissue inhibitors of MMP (TIMPs). After death of fish, the regulation by the TIMPs is lost, thereby revealing the MMPs activity. We made an attempt to produce a transgenic fish line overexpressing TIMP to inhibit post-mortem muscle tenderization by using medaka.

We have successfully established a transgenic medaka line harbored Japanese flounder TIMP-(jfTIMP) gene. Transgenic medaka demonstrated the increase in the physical property of the muscle connective tissue after chilled storage. Then, we tried to make a transgenic red seabream having an extra TIMP gene to suppress meat tenderization after death. Since the integration of the introduced TIMP gene in the chromosome was hardly occurred by the similar method of transgenic medaka, co-injection of medaka transposase was applied. As a result, high integration of the foreign gene in the chromosomal DNA was attained in the F<sub>0</sub> generation.

**Key words :** collagen, muscle, medaka, red seabream, transgenic technology

魚肉は牛肉や豚肉などとくらべて鮮度低下が速やかなため、生肉のまま食用に供することは一般的には困難であり、そのため我が国では魚の保存方法が古来いろいろと工夫されてきた。塩蔵、乾燥などはその代表的なものであるが、そのほかにも燻製、発酵、缶詰などもその一例として挙げることができる。蒲鉾や竹輪などの魚肉練り製品も、一種の保存食品ということができる。

しかし、養殖技術の発達、我が国における高速道路網の拡充と活魚輸送技術の発達によりもたらされた輸送時間の短縮及び輸送範囲の拡大とあいまって、近年、わが国の魚の消費形態に大きな変革をもたらした。その結果、寿司や刺身のような魚の生食が普及し、現在ではマダイやブリは生産量の大半が養殖魚で占められており、そのほとんどが刺身や寿司ネタとして生(なま)で食べられようになっている。世界的にみると魚の調理法はほとんどが加熱料理であり、日本人が

好む寿司や刺身のように魚介類を生食する食文化はまれである。例えば国民一人当たりの魚介類の消費量がずば抜けて多いモルディブでは、ほとんどがカレーの煮込み料理として消費されている。これは魚介類を生で食べるには、一定レベルの鮮度保持技術が必要なため、内陸部や気温が高い熱帯・亜熱帯地域では寿司や刺身などの魚の生食文化が発達しなかったことが原因のひとつと考えられる。しかし最近では養殖技術、輸送技術、鮮度保持技術などの普及に加え、健康志向ブームの追い風もあり、アメリカ、ヨーロッパをはじめ中国、韓国などでも寿司や刺身など魚の生食が受け入れられるようになり、海外で寿司屋を見かけることも珍しいことではなくなってきた。

このように魚介類の養殖は、今後、世界的にますます拡大していくものと予想される。しかし、農業や畜産業が長い時間をかけて優良品種を作出してきたのに対し、魚介類の養殖においてはこれまでほとんど品種

改良がなされてこなかった。この点は同じ一次産業であっても、漁業が農業や畜産業と大きく異なる点である。最近では耐病性の高い系統と成長の早い系統の交配により、すぐれた形質をもった品種の開発が試みられているが、多くの養殖魚は成熟に2-3年を要するため、思うように短期間には品種改良が進まないという問題がある。

一方、1970年代初頭に開発された遺伝子組換え技術は、当初は微生物を対象としたものであったが、その後、植物のほか魚類や哺乳類などの脊椎動物も対象とした技術へと発展してきた。その結果、医学のみならず動植物の品種改良の技術としても注目されるようになってきた。実際1982年に、マウスの卵にラットの成長ホルモン遺伝子を注入することにより、通常の約2倍の体重を持つジャイアントマウスが作り出され (Palmiter *et al.*, 1982), その後、この方法を用いて様々な動物で同様の実験が試みられ、1994年にはジャイアントサーモンが作出されるにいたったことはよく知られている (Devlin *et al.*, 1994)。

### 魚肉の軟化現象

鮮度のよい魚肉は強い歯ごたえをもつのにに対し、鮮度が低下した魚肉は歯ごたえのよさをなくしている。したがって、日本人は生の魚を食べるときには、「鮮度のよい魚ほど歯ごたえがよくておいしい」と判断する傾向がある。ただし、マグロやカツオのように厚い切り身にして食べる魚は、この限りではない。マグロやカツオの場合、活魚が入手できることはきわめてまれであり、これらの魚では、通常、肉質が軟化し

たものしか流通しておらず、厚い切り身のねっとりとした歯触りを楽しむことになる。そこで以下では、マダイ、ブリ、ヒラメなど、活魚が流通している魚種について話を進めていく。

Fig.1は魚肉の軟化の様子を示したものである。従来、魚肉の軟化現象は魚体の硬直現象と混同して理解されてきたところがあるが、実際には死後硬直が始まる死後数時間後より早く、即殺直後から魚肉の軟化はおこることがわかる (豊原と志水, 1988)。魚種によっては、魚体の最大硬直時に肉質がやや硬くなるものもあるが、多くの養殖魚ではFig.1に示すように、即殺直後から筋肉の軟化が始まる。この図では、剃刀型のプランジャーを用いたせん断力を測定しているが、円柱形プランジャーによる破断強度測定でも同じ傾向の変化を示す。

魚類の筋肉組織は、大別して筋肉細胞 (筋繊維) と結合組織から成っている。前者は主にミオシンとアクチンから、後者はコラーゲンから構成されており、結合組織は筋肉細胞どうしを結着する役割を果たしている。Fig.2に示すように、魚肉に一定の加重を与えた場合、即殺直後には変化がないが、24時間冷蔵後には筋肉細胞が部分的に分離している様子が観察された。つまり、新鮮な魚肉が持つ歯切れのよさは筋肉細胞をつないでいる結合組織の強度に依存していると考えられた。結合組織は、畜肉やトラフグのような硬い肉質の魚の筋肉では特によく発達しているが、多くの魚肉の結合組織は未発達である。また、同じ魚種でも天然魚と養殖魚を比較すると、養殖魚の結合組織は未発達である。

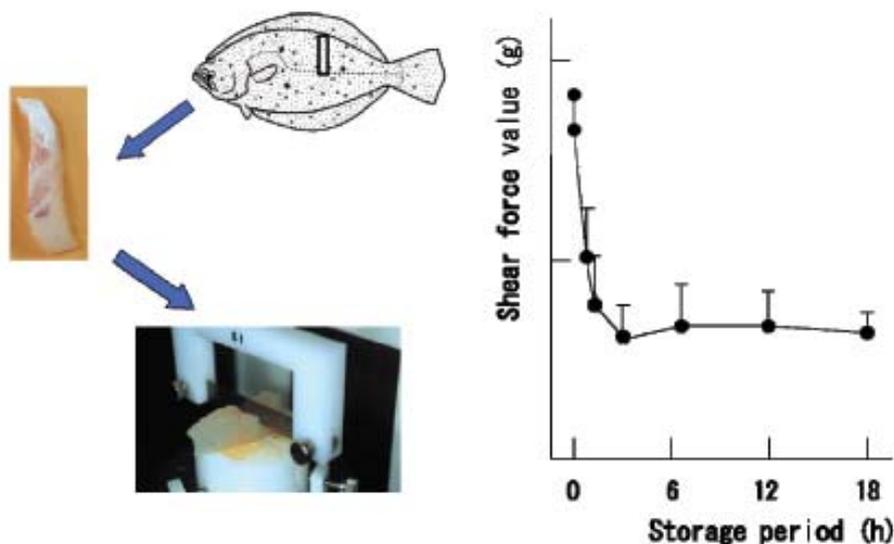


Fig 1. Muscle tenderization after death of fish. Japanese flounder was sacrificed and the piece of muscle was excised. The shear force value was measured in accordance of the storage period at 4°C .

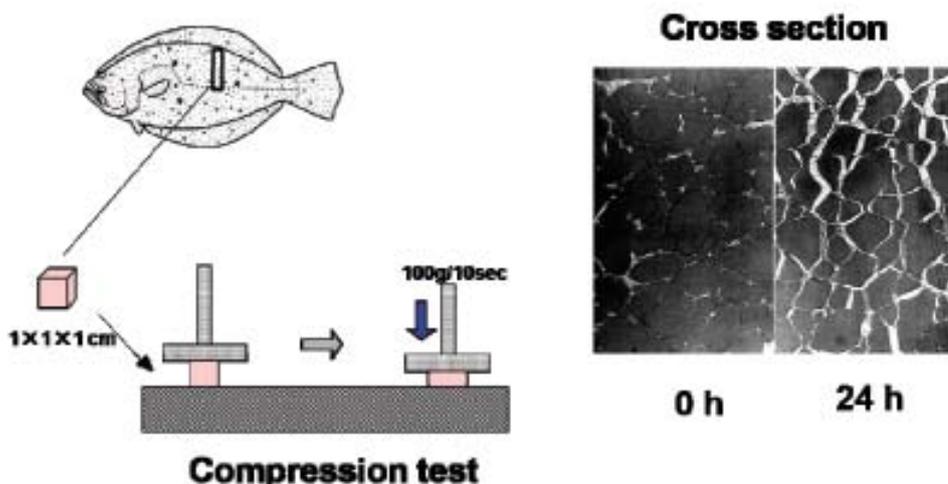


Fig 2. Compression test against the muscle excised immediately after death or 24 h storage. Muscle cross section is shown in the right figures. As shown in the photos, muscle fibers were detached by the compression test (100 g/ 1 sec) after 24 h, suggesting that the physical strength of the muscle connective tissue was lowered during cold storage.

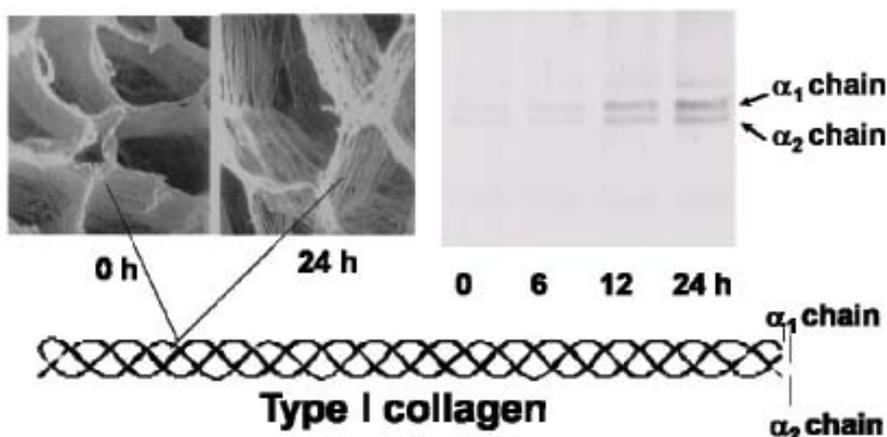


Fig 3. Solubilization of collagen from muscle after death of Japanese flounder. Left two photos are the SEM observation of muscle connective tissue at 0 h and 24 h. Right photo shows the western blot analysis of type I collagen. Gradual Solubilization possibly reflecting the degradation of muscle connective tissue was recognized in the western blot analysis.

Fig.3は、ヒラメの筋肉をアルカリ処理することで筋肉組織中の筋原繊維タンパク質を分解し、残った結合組織を走査電子顕微鏡により観察したものである。Fig.2で得られた結果を裏付けるように、24時間貯蔵したものでは結合組織が脆弱化している様子が観察される。この結合組織の脆弱化がコラーゲンの可溶化によるものであることは、右図に示したウエスタンブロット分析の結果からも支持される。このコラーゲンの可溶化がタンパク質分解酵素（プロテアーゼ）の作用によるものであることは、Fig.4に示したプロテアーゼインヒビターの生きたヒラメへの注射実験で確認された。

プロテアーゼは、その活性中心のアミノ酸配列の特徴から、酸性プロテアーゼ（ペプシン、カテプシンD

など）、システインプロテアーゼ（パパイン、ブロメライン、カテプシンLなど）、セリンプロテアーゼ（トリプシン、キモトリプシンなど）、金属プロテアーゼ（マトリックスメタロプロテアーゼなど）に分類される。それぞれのタイプのプロテアーゼには特有のインヒビターが知られていることから、これらのインヒビターを生きたヒラメの尾部大動脈から注入し、死後の筋肉の軟化に及ぼす影響を調べた（Kubota M. *et al.*, 2003）。その結果、Fig.4に示すように、金属プロテアーゼのインヒビターである1, 10-フェナントロリンを注入した場合に死後の筋肉の軟化が抑制されることが明らかとなった。この結果から魚肉の軟化には金属プロテアーゼであるマトリックスメタロプロテアーゼ（MMPと略される）が関わっている可能性が示唆された。

マトリックスメタロプロテアーゼは結合組織を構成する細胞外マトリックスタンパク質を分解する能力を有する酵素の総称であり、基質特異性の異なる30種程度の分子種が存在することが知られている。これらの酵素のうち、MMP-2とMMP-9はコラーゲン分解能を有することから、魚肉の自己消化への関与が疑われた。そこで、ヒラメからこれらの酵素をコードする遺伝子をクローン化し、その組換え体を用いてコラー

ゲンの分解能を検討した結果、Fig.5に示すように組換えMMP-9を粗結合組織画分に加えると、低温下でもコラーゲンの可溶化が起こることが示された。この結果は、MMP-9が魚肉の軟化現象に関わっていることを示すものであった。

魚が生きている間は、MMP-9の活性は内因性のタンパク性インヒビターであるTIMP(Tissue Inhibitor for Metalloproteinase)により制御されているが、魚が死

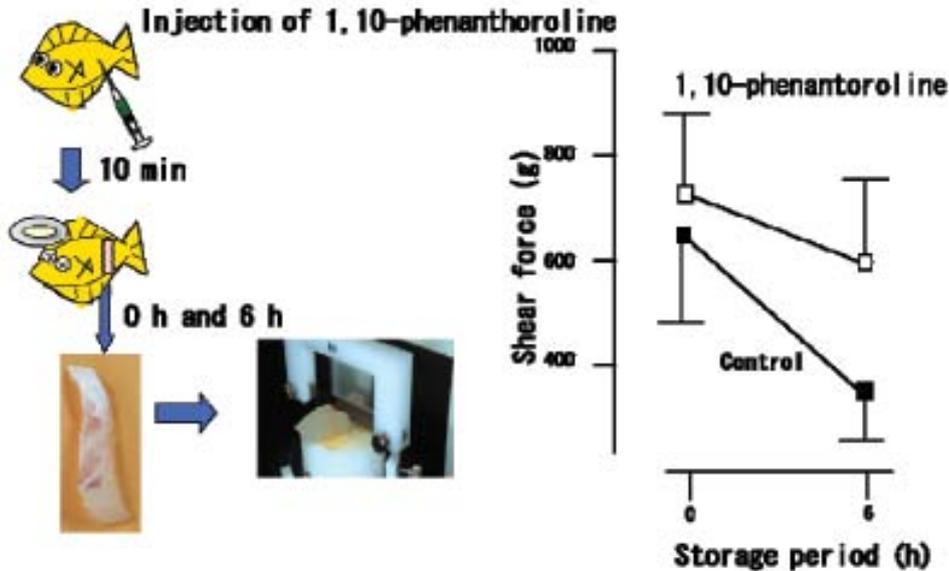


Fig 4. Inhibition of muscle tenderization after death of fish by the injection of 1, 10-phenanthroline, a specific inhibitor of metalloproteinases including MMPs. As shown in the right figure, muscle tenderization was partly inhibited by the injection of 1, 10-phenanthroline, suggesting that MMPs might be implicated in the muscle tenderization after death of fish.

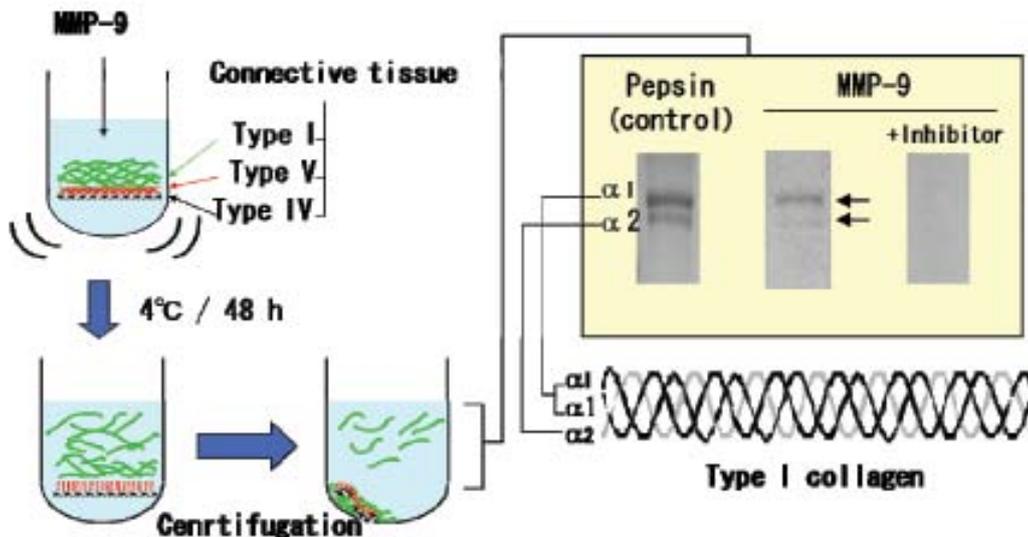


Fig 5. Solubilization of collagen from muscle by recombinant MMP-9. MMP-9 was produced by the insect cell production system. In the presence of MMP-9, collagen was solubilized in vitro similar to in vivo. By adding the specific inhibitor 1, 10-phenanthroline, the solubilization was completely inhibited, suggesting that MMP-9 has the activity to solubilize collagen from muscle connective tissue. The right panel inserted in the figure shows the western blot analysis of the solubilized fraction.

ぬと何らかの未知のメカニズムにより TIMP による MMP-9 の活性制御が崩壊するものと予想され、その結果、魚肉の軟化が誘発されるものと推測された。

### 遺伝子組換えメダカの作出

そこで、ヒラメから TIMP 遺伝子をクローニングし、その組換え体を用いて *in vitro* における MMP-9 の活性阻害を調べたところ、用量依存的に阻害を示すことが確認された (Kubota S. *et al.*, 2003)。このように TIMP が魚肉軟化の原因酵素である MMP-9 の活性を抑制することがわかったので、私たちは、トランスジェニック技術を用いて TIMP を過剰発現させたメダカを作出し、魚肉中の MMP の活性を阻害することで、死後の魚肉の軟化抑制を試みた。

Fig.6 にヒラメ TIMP 遺伝子導入メダカの作出手順を示した。この実験においては、 $\alpha$ -アクチンという筋肉だけに発現しているタンパク質をコードする遺伝子のプロモーター領域 (日下部岳広博士よりご供与) を用いて、メダカの筋肉にヒラメ TIMP が発現するように工夫した。

まず、メダカ受精卵にこの発現ベクターを注入し、孵化、成長させ  $F_0$  を得た。成熟した  $F_0$  を野生種と交配し  $F_1$  を得、この  $F_1$  とさらに野生種と交配し  $F_2$  を得た。これら  $F_2$  には理論的には 50% の個体にヒラメ TIMP 遺伝子が存在していることになるが、実際、 $F_2$  個体の尾ビレの一部を切り取り、ヒラメ TIMP 遺伝子の存在を PCR で調べたところ、およそ半分の個体にその存在が確認された。そこで、遺伝子導入が確認されたこれら  $F_2$  を用いて、ヒラメ TIMP 遺伝子が実際に転写、翻訳されているのかを検討した。

PCR 分析でヒラメ TIMP 遺伝子の存在が確認された  $F_2$  個体から mRNA を調製し、それを逆転写して得た cDNA についてヒラメ TIMP 遺伝子の転写産物の有無を PCR 分析で調べたところ、トランスジェニック個体においてのみ、ヒラメ TIMP 遺伝子の転写産物が検出された。さらにその翻訳産物であるタンパク質についてウエスタンブロット分析を行ったところ、mRNA と同様、トランスジェニック個体においてのみその発現が確認された。これらの結果は、人為的に導入したヒラメ TIMP 遺伝子が  $F_2$  世代の個体において、正常に転写、翻訳されていることを証明するものであった (Toyohara *et al.*, 2004)。

前述したように、魚の肉質を決定する鍵は結合組織の物理的強度にある。そこで、非導入魚とヒラメ TIMP 遺伝子導入魚の筋肉組織についてそれぞれ切片を作製し、組織学的観察を行った。非導入魚の筋肉を冷蔵庫で 24 時間貯蔵後に作製した切片では、ほとんどの筋繊維が筋内膜部分で分離していたが、興味深いことに、ヒラメ TIMP 遺伝子導入魚の筋肉では、24 時間貯蔵後に作製した切片でも筋繊維の分離は認められなかった。この事実は、ヒラメ TIMP タンパク質がメダカ MMP の活性を阻害し、その結果、トランスジェニック魚で筋内膜の強度低下が軽減された可能性を示していた。

### 遺伝子組換えメダカの作出

海産魚類養殖は 1950 年代後半に和歌山県白浜町の近畿大学水産研究所でハマチの網生養殖技術が開発されて以降急速に発展し、さらに 1980 年代後半から養殖用の稚魚 (種苗) を卵から人工生産する技術が急

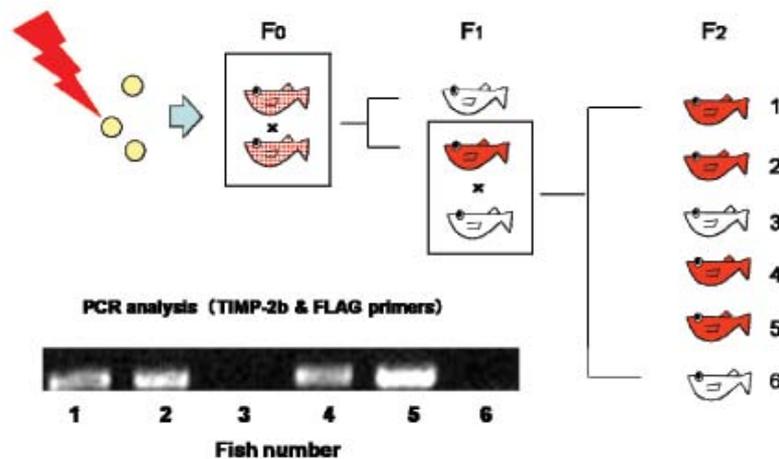


Fig 6. Establishment of the transgenic medaka line having Japanese flounder TIMP-2b gene. Japanese flounder TIMP-2b gene driven by  $\beta$ -actin promoter was microinjected into one cell fertilized egg. As shown in the figure, transgenic medaka having the foreign gene in the chromosomal DNA was made. Integration of the foreign gene was confirmed by the PCR analysis.

速に発展して種苗が安定供給されるようになった結果、海産魚類養殖は現在では我が国の総漁業生産額の約17%を占める重要で欠かさない存在にまで発展している。その中でもマダイは最も重要な養殖魚種の一つであり、2003年の養殖生産量はブリ類に次いで多く約8万3千トンであり、さらに養殖用種苗生産尾数は最も多く同年に5千3百万尾以上が生産されている。

これまでに選択的交配 (Murata *et al.*, 1996) や染色体操作 (Kato *et al.*, 2001, 2002, 2003) は試みられてきたが、海産魚の遺伝子組換え技術に関する報告はまだまだ少ない (Zang *et al.*, 1998)。魚類でこれまでに行われてきた主要な遺伝子導入方法としてエレクトロポレーション法、パーティクルガンを用いる方法、マイクロインジェクション法などがあるが (Meng *et al.*, 1999, Lu *et al.*, 2002, Yazawa *et al.*, 2005)、マダイにおいては、最も安価で確実な導入方法であるマイクロインジェクション法を採用した。マダイの場合には親魚のサイズが大きく1尾の雌から一度に大量(数万～十数万粒)の未受精卵を得ることができる。またその未受精卵は少なくとも数時間は受精能を保持している。さらに精液は2～3日間は冷蔵保存可能である。これらの特徴とマダイの卵は受精後時間の経過とともに卵膜の硬化が進むことを考えて、マダイ用にマイクロインジェクション技術を改良した。すなわち、成熟親魚から未受精卵および精液を採取し、数百粒のみ受精して受精後5分以内にマイクロインジェクションを行った。直ちに新たに数百粒のみ受精して受精後5分以内にインジェクションした。

この改良法でマダイβ-アクチンプロモーターを含む発現ベクターをマダイ受精卵に導入したところ、明瞭なGFPの発現が観察されたことから、改良法によって外来遺伝子をマダイの細胞内で発現させることが可能となった。そこで次に肉質改善用の発現ベクターを構築する目的で、マダイゲノムDNAライブラリーから筋肉特異的に発現するα-アクチン遺伝子をクローニングし、筋肉特異的TIMP発現ベクターを構築し、このベクターを用いてトランスジェニックマダイの作出を試みた。しかし、メダカの場合とは異なり、マダイの場合、染色体への外来遺伝子の組み込みはまったくおこらず、TIMPを恒常的に発現する系統の作出はできなかった。

そこで、トランスポゾン様配列で両側をはさんだGFP発現ベクター作製し、メダカのトランスポゼースmRNAとともに共注入を行ったところ、きわめて高率に染色体DNAへの組み込みが起こることがわかった。まだ予備的な実験結果であるが、必ずしもトランスポゼースが共存しなくても高い確率で染色体

DNAへの組み込みが検出されたことから、トランスポゾン配列があれば、マダイでも容易に染色体DNAへの組み込みが起こる可能性が示唆された。

## おわりに

魚肉の軟化現象は、長く「自己消化」によると説明されてきたが、その詳細な機構は不明のままであった。本研究の結果から、魚肉の軟化現象が筋肉細胞をつないでいる結合組織の物理的強度の低下によること、この強度の低下は結合組織の主要成分であるコラーゲンの可溶化によること、この可溶化は金属プロテアーゼであるマトリックスメタロプロテアーゼの1種であるMMP-9によることなどが明らかとなった。また、MMP-9の活性は内因性のインヒビターであるTIMPにより制御されており、魚の死後、この制御機構が崩壊することによりMMP-9の活性が昂進し、その結果として、結合組織コラーゲンが可溶化することも明らかとなった。

以上の結果を受け、遺伝子組換え技術を用いてヒラメ由来のTIMP-2b遺伝子を過剰発現するトランスジェニックメダカの系統を作出した。この系統のメダカにおいては、死後の筋肉における結合組織の崩壊が抑制されていたことから、遺伝子導入による肉質軟化抑制魚の作出が可能である可能性が示された。同様の方法でトランスジェニックマダイを作出したが、マダイではメダカとくらべて染色体DNAへの外来遺伝子の組み込み率が極端に低かった。そこで、組み込み効率の向上を目的として、トランスポゼースmRNAとの共導入を試みた結果、高い導入を達成することができた。今後は、遺伝子組換え技術を有効に活かしていくために、「食の安心・安全」の観点から、また、「世界的に見た食糧需給」の観点から、国民レベルの議論が必要と考えられる。

## 文 献

- Devlin R.H., Yesaki T.Y., Biangi C.A., Donaldson E.M., Swanson P. and Chan W-H. 1994: Extraordinary salmon growth. *Nature*. **371**. 209-210.
- Kato K., Hayashi R., Yuasa D., Yamamoto S., Miyashita S., Murata O. and Kumai. H. 2002: Production of cloned red sea bream. *Pagrus major* by chromosome manipulation. *Aquaculture*. **207**. 19-27.
- Kato K., Miyashita S., Murata O. and Kumai H. 2003: Gonadal sex differentiation and sex control in red sea bream. *Pagrus major*. *Fish Physiol. Biochem.* **28**.

- 155-156. O.). Plenum Press. New York. pp. 15-18.
- Kato K., Murata O., Yamamoto S., Miyashita S. and Kumai H. 2001: Viability, growth and external morphology of meiotic- and mitotic-gynogenetic diploids red sea bream. *Pagrus major*. *J. Appl. Ichthyol.* **17**. 97-103.
- Kubota M., Kinoshita M., Takeuchi K., Kubota S., Toyohara H. and M. Sakaguchi M. 2003: Solubilization of Type I collagen from fish muscle connective tissue by matrixmetalloproteinase-9 at chilled temperature. *Fish. Sci.* **69**. 1053-1059.
- Kubota S., Kinoshita M., Uji S., Yokoyama Y., Yamamoto E., Hirono I., Aoki T., Sakaguchi M., Morioka K., Itoh Y. and Toyohara H. 2003: Occurrence of two distinct types of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) in teleost fish. *Biochim. Biophys. Acta.* **1629**. 102-108.
- Lu J.K., Fu B.H., Wu J.L. and Chen T.T. 2002: Production of transgenic silver sea bream (*Sparus sarba*) by different gene transfer methods. *Mar. Biotechnol.* **4**. 328-337.
- Meng A., Jessen J.R. and Lin S. 1999: Transgenesis. *Methods Cell Biol.* **60**. 133-148.
- Murata. O., Harada. T., Miyashita. S., Izumi. K., Maeda. S., Kato K. and Kumai H. Selective breeding for growth in red sea bream. 1996: *Fish. Sci.* **62**. 845-849.
- Palmiter R.D., Brinster R.L., Hammer R.E., Trumbauer M.E., Rosenfield M.G., Birnberg. N.C. and Evans R.M., 1982: Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein - growth hormone fusion genes. *Nature*. **300**. 611-615.
- 豊原治彦 . 志水寛 . 1988: 魚体の死後硬直と魚肉の物性の関係 . 日水誌 . **54**. 1795-1798.
- Toyohara H., Takagi M., Hosoi M., Kinoshita M., Hirono I., Aoki T. and Kubota S. 2004: Establishment of a transgenic medaka line expressing Japanese flounder tissue inhibitor of metalloproteinase for the suppression of post-mortem meat tenderization. *Mar. Biotechnol.* **6**. S413-417.
- Yazawa R., Hirono I., Yamamoto E. and Aoki. T. 2005: Gene transfer for Japanese flounder fertilized eggs by particle gun bombardment. *Fish. Sci.* **71**. 869-874.
- Zhang P., Yongli L., Zongzhu X., Xiang Y., Du S. and Hew C. L. 1998: Gene transfer in red sea bream (*Pagrosomus major*), in "New Developments in marine biotechnology" (ed. By Gal. Y. L. and Halvorson. H.