

学位論文要旨

氏名	吉岡 豪
題目	ハロセン遺伝子保有豚における筋肉異常の発生機構 (The mechanism inducing abnormal muscle in pigs with Halothane gene)

本研究はハロセン (Hal) 遺伝子を保有する豚における、肉色が淡く (Pale), やわらかで (Soft), 水っぽい (Exudative) 性状を示すいわゆる PSE 肉の発生機構を明らかにすることを目的とした。

先ず、Hal 遺伝子をヘテロ型で保有する個体 (Nn) と Hal 遺伝子を保有しない正常な個体 (NN) に対して夏季高温環境下において輸送ストレスを負荷し、直腸温度、呼吸数、血清中のコルチゾール、サイロキシン (T4) およびトリヨードサイロニン (T3) の濃度ならびに筋原線維分解の指標として胸最長筋における遊離筋フィラメント量を測定し、ストレスと筋原線維分解の関係について調べた (実験 1)。その結果、正常個体では輸送ストレスにより血中 T3 濃度が低下するが、Hal 遺伝子を保有する個体では低下せず、正常個体との間に有意差が認められた。また、Hal 遺伝子を保有する個体では遊離筋フィラメント量が多く、筋原線維の分解が促進されていることが示され、PSE 肉発生の機構が示唆された。すなわち、ストレスによって上昇した血中グルココルチコイドが T3 と相乗的に作用して筋原線維の分解が促進され PSE が誘発されたと予想された。

そこで、この見解を確かめる目的で、正常子豚にストレスホルモンであるグルココルチコイドを給与し、血中ホルモン濃度、筋肉タンパク質分解酵素活性、遊離筋フィラメント量および屠殺 24 時間後の筋肉の保水力等について調べた (実験 2)。その結果、グルココルチコイドにより、血中 T3 濃度は増加、筋肉タンパク質分解酵素活性は上昇、遊離筋フィラメント量は増加、筋肉の保水力は低下して、筋肉は PSE 肉と同様の性状を呈した。これはストレスが PSE 肉の発生に密接に関与していることを示している。しかし、この実験では T3 の関与を明らかにできなかった。

そこで実験 3 では、Hal 遺伝子を保有する肥育豚に対して抗甲状腺剤であり同時に脱ヨード化酵素 (5'-ID) 阻害剤であるプロピルチオウラシル (PTU) を投与、夏季高温環境下で輸送ストレスを負荷し、血中ホルモン濃度、肝臓中 5'-ID 活性、筋肉タンパク質分解および肉質に及ぼす影響について検討した。その結果、Hal 遺伝子を保有する個体 (Nn) では、輸送ストレスにより筋肉タンパク質分解酵素活性が上昇、遊離筋フィラメント量は増加、筋肉の保水力は低下して、筋肉は PSE 肉と同様の性状を示した。さらに、Nn 個体では、輸送ストレスにより 5'-ID 活性が有意に増加し、正常個体に比べ血中 T3 濃度が有意に増加することが判明した。しかし、PTU で処理した Nn 個体においては、これらの輸送ストレスの作用はいずれも認められなかった。

以上の結果より、Nn 個体では、高温環境下の輸送ストレスによって 5'-ID 活性が誘導されて血中 T3 濃度が増加、この T3 と輸送ストレスによって増加したグルココルチコイドとの相乗作用によりタンパク質分解酵素活性が高まり、筋肉タンパク質の分解が促進され PSE 肉が発生したと考えられる。

学位論文要旨

氏名	Gou Yoshioka
題目	The mechanism inducing abnormal muscle in pigs with Halothane gene. (ハロセン遺伝子保有豚における筋肉異常の発生機構)

The present study was carried out to investigate the mechanisms of occurrence of pale, soft, exudative (PSE) meat in pigs with halothane (Hal) gene.

The experiment 1 was done to examine the influence of transport stress on rectal temperature, respiratory rate, serum concentrations of cortisol, thyroxine (T4) and triiodothyronine (T3), and easily releasable myofilament content of Longissimus dorsi (LD) in pigs with heterozygous Halothane (Hal) gene (Nn), a major gene that causes the PSE, in a hot environment (32–34°C) and compared with normal pigs (NN). Serum concentrations of cortisol were increased in all animals by the transport stress. Serum concentrations of T4 and T3 were not changed by the transport in Nn pigs, whereas they were significantly decreased after the transport in NN pigs. Easily releasable myofilament content after the transport was higher in Nn pigs than that of NN pigs. Accordingly, it was anticipated that synergisms of higher serum concentrations of cortisol and T3 induced by transport stress might cause the accelerated myofibrillar degradation.

To confirm the idea derived from experiment 1, experiment 2 was undertaken to examine the effects of exogenous cortisol in normal piglets on serum concentration of T3, activities of muscle proteinase, easily releasable myofilament content and 24hr postmortem muscle drip loss. Serum T3 concentration, activities of muscle proteinases, easily releasable myofilament content and drip loss were all increased by the cortisol treatment. These results show that stress relate closely to the occurrence of PSE meat. However, in experiment 2, the role of T3 on PSE meat occurrence could not be clarified.

Experiment 3 was thus conducted to examine the effect of propylthiouracil (PTU) an anti-thyroid drug and also a 5'-ID inhibitor on serum concentrations of hormones, hepatic 5'-deiodinase activity (5'-ID), easily releasable myofilament content, activities of proteases and meat quality in pigs with Hal gene in response to transport stress in a hot environment (32–34°C). Serum concentration of T3 in Nn pig was higher than that of NN pig after the transport while there was no difference in serum cortisol between Nn and NN groups. Muscle μ -calpain activity, easily releasable myofilament content and drip loss were all increased by the transport stress in Nn pigs, but not in NN pigs. Moreover, hepatic 5'-ID activity in Nn pigs was higher than that of NN pigs. However, influences of the transport stress observed in Nn group were all disappeared by the PTU treatment. These results show that higher activity of 5'-ID in Nn pigs caused by the transport in a hot environment increased serum concentration of T3 and induced PSE meat in pigs with Halothane gene.

学位論文審査結果の要旨

学位申請者 氏名	吉岡 豪		
	主査 鹿児島 大学 教授 林 國興		
	副査 鹿児島 大学 助教授 大塚 彰		
審査委員	副査 佐賀 大学 教授 柳田 晃良		
	副査 琉球 大学 教授 屋 宏典		
	副査 宮崎 大学 教授 入江 正和		
審査協力者	鹿児島大学 名誉教授 富田 裕一郎		
題目	ハロセン遺伝子保有豚における筋肉異常の発生機構 (The mechanism inducing abnormal muscle in pigs with Halothane gene)		

本研究はハロセン (Hal) 遺伝子を保有する豚における、肉色が淡く (Pale), やわらかで (Soft), 水っぽい (Exudative) 性状を示すいわゆる PSE 肉の発生機構を明らかにすることを目的としている。Hal 遺伝子はリアノジン受容体 (Ca^{2+} チャンネル) 遺伝子の突然変異によって生じたと考えられており、この遺伝子を有する個体はハロセンガスに対して特異的な感受性を有する。

本研究では、先ず、Hal 遺伝子をヘテロ型で保有する個体 (Nn) と Hal 遺伝子を保有しない正常な個体 (NN) に対して夏季高温環境下において輸送ストレスを負荷し、直腸温度、呼吸数、血清中のコルチゾール、サイロキシン (T4) およびトリヨードサイロニン (T3) の濃度ならびに筋原線維分解の指標として胸最長筋における遊離筋フィラメント量を測定し、ストレスと筋原線維分解の関係について調べた (実験 1)。その結果、正常個体では輸送ストレスにより血中 T3 濃度が低下するが、Hal 遺伝子を保有する個体では低下せず、正常個体との間に有意差が認められた。また、Hal 遺伝子を保有する個体では遊離筋フィラメント量が多く、筋原線維の分解が促進されていることが示され、PSE 肉発生の機構が示唆された。すなわち、ストレスによって上昇した血中グルココルチコイドが

T3 と相乗的に作用して筋原線維の分解が促進され PSE が誘発されたと予想された。

そこで、この見解を確かめる目的で、正常子豚にストレスホルモンであるグルココルチコイドを給与し、血中ホルモン濃度、筋肉タンパク質分解酵素活性、筋フィラメント量および屠殺 24 時間後の筋肉の保水力等について調べた（実験 2）。その結果、グルココルチコイドにより、血中 T3 濃度は増加、筋肉タンパク質分解酵素活性は上昇、筋フィラメント量は増加、筋肉の保水力は低下して、筋肉は PSE 肉と同様の性状を呈した。これはストレスが PSE 肉の発生に密接に関与していることを示している。しかし、この実験では T3 の関与を明らかにできなかった。

次に、実験 3 では、Hal 遺伝子を保有する肥育豚に対して抗甲状腺剤であり同時に脱ヨード化酵素(5'-ID)阻害剤であるプロピルチオウラシル(PTU)を投与、夏季高温環境下で輸送ストレスを負荷し、血中ホルモン濃度、肝臓中 5'-ID 活性、筋肉タンパク質分解および肉質に及ぼす影響について検討した。その結果、Hal 遺伝子を保有する個体(Nn)では、輸送ストレスにより筋肉タンパク質分解酵素活性が上昇、遊離筋フィラメント量は増加、筋肉の保水力は低下して、筋肉は PSE 肉と同様の性状を示した。さらに、Nn 個体では、輸送ストレスにより 5'-ID 活性が有意に増加し、正常個体に比べ血中 T3 濃度が有意に増加することが判明した。しかし、PTU で処理した Nn 個体においては、これらの輸送ストレスの作用はいずれも認められなかった。

以上の結果より、Nn 個体では、高温環境下の輸送ストレスによって 5'-ID 活性が誘導されて血中 T3 濃度が増加、この T3 と輸送ストレスによって増加したグルココルチコイドとの相乗作用によりタンパク質分解酵素活性が高まり、筋肉タンパク質の分解が促進され PSE 肉が発生したと考えられる。

以上のように、本論文は、ハロセン(Hal) 遺伝子により Ca^{2+} 代謝に異常が生じ PSE 肉が発生するという従来の説を覆し、それに変わる新たな機構を提示したものであり、博士の学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

最終試験結果の要旨

学位申請者 氏名	吉岡 豪		
	主査 鹿児島 大学 教授 林 國興		
	副査 鹿児島 大学 助教授 大塚 彰		
審査委員	副査 佐賀 大学 教授 柳田 晃良		
	副査 琉球 大学 教授 屋 宏典		
	副査 宮崎 大学 教授 入江 正和		
審査協力者	鹿児島大学 名誉教授 富田 裕一郎		
実施年月日	平成18年 1月27日		

試験方法 (該当のものを○で囲むこと。)

(口答)・筆答

主査及び副査は、平成18年1月27日の公開審査会において学位申請者に対して、学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について試問を行った。具体的には別紙のような質疑応答がなされ、いずれも満足できる回答を得ることができた。

以上の結果から、審査委員会は申請者が博士（農学）の学位を受けるに必要な十分の学力ならびに識見を有すると認めた。

学位申請者 氏 名	吉岡 豪
[質問]	今回示した一連の現象は甲状腺ホルモンと副腎皮質の相乗作用によるものなのか。
[回答]	甲状腺ホルモンだけでは作用が現れない、コルチゾールとの相乗作用が重要である。
[質問]	本研究結果をヒトにあてはめた場合、ストレスより「疲労」が重要になってくる。 コルチゾールのみをストレスの指標として用いることについてはどう考えるか？ TGF- β など他のホルモンは指標とならないのか？
[回答]	これからは正常なブタでもコルチゾール以外の他のホルモンも大切になってくると考えられる。個体そのものを数値化する指標も必要と考えている。
[質問]	体温が変化すれば、プロテアーゼも活性化され PSE が発生するのか。その場合肉を冷却すれば効果あるのか？
[回答]	屠殺前のプロテアーゼの活性化が重要なので、屠殺後に肉を冷却しても PSE 肉を防ぐことはできない。
[質問]	PSS 遺伝子は筋小胞体カルシウムイオンの放出の他に血液のトリヨードサイロニン濃度に影響しているが、その機構は？
[回答]	甲状腺ホルモンと PSS 遺伝子の変異が連鎖していると考えている。
[質問]	今回は PSS 遺伝子ヘテロの個体を使用しているが、PSS 遺伝子を劣勢ホモで有する個体ではどうなのか？
[回答]	ヘテロの場合 80% の頻度で PSE が発生する。しかし、成獣まで成長しないことが多いので、実験に必要な頭数をそろえることが困難であるため材料として使用できない。
[質問]	プロピルチオウラシル (PTU) を飼料に添加して与えれば PSS 遺伝子ブタだけでなく正常ブタでも肉質の向上が期待できるのではないか？
[回答]	PTU には食欲を低下させる副作用もある。適切な添加量を決定すれば十分使用可能である。しかし飼料添加物としての認可が必要である。
[質問]	甲状腺機能を低下させることにより PSE を防除できるということですが、抗甲状腺剤を食肉となる豚に使うことは可能か？
[回答]	抗甲状腺剤を使わず甲状腺機能を変えることは可能です。
[質問]	ハロセン遺伝子の塩基配列は決定されているか？
[回答]	すでに決定されています。ハロセン遺伝子とは、リアノジン受容体遺伝子の突然変異によって生じたと考えられており、この遺伝子を有する個体はハロセンガスに対して特異的な感受性を持っています。

- [質問] 遊離ミオフィラメントの多い筋肉はPSEになりやすいということですが、と殺する前に簡単に検査できるか？
- [回答] 可能ですが、現実にはむつかしいと思います。
- [質問] 筋肉タンパク質の分解の程度を調べるのに遊離ミオフィラメントを用いていますか、メチルヒスチジンは使えないのか？
- [回答] 代謝試験を行っていないので測定しませんでした。（司会者：豚ではメチルヒスチジンは代謝されるので指標として使えません）
- [質問] ハロセン遺伝子をホモ型で保有する豚を用いなかつたのはなぜか？
- [回答] ホモ型の豚は肥育を始める前にほとんど死亡します。
- [質問] 抗甲状腺剤であるPTUを豚に投与すると肉質が改善されるとの事ですが、その他、豚に及ぼす影響は？
- [回答] 飼料摂取量が低下します。実験では、すべての区への飼料給与量を2kgに設定しました。これは、飼料摂取量の違いによる影響を最小限にするためです。また、先ほどの発表で、PTU投与を受けた豚では、輸送前の時点で体温が有意に低下していることも示しました。豚を触ると冷たいと感じる程です。
- [質問] 遊離筋フィラメント量の測定の方法は？遊離筋フィラメント量とメチルヒスチジンの排泄量との関係は？
- [回答] 遊離筋フィラメントは、筋肉サンプルをホモジナイズし、遠心分離によって分画します。収縮タンパク質であるアクチン、ミオシンフィラメントは上清に、Z-帯タンパク質等のタンパク質は残渣に含まれ、その割合で遊離筋フィラメントの放出量は定義されています。また、遊離筋フィラメントの放出量は、筋肉タンパク質の分解と関連があるため、メチルヒスチジンの排泄量とも関連があります
- [質問] Ha1遺伝子型のタイピングはどの様にして行ったのか。大変ではないのか？
- [回答] Ha1遺伝子に該当する、塩基置換部分をPCRによって増幅し、その部分を認識して特異的に切断する制限酵素を使って切断させます。変異がある個体とそうでない正常な個体は、切断の有無で判定します。判定自体は、PCR、制限酵素での切断、電気泳動という流れですので用意さえすればたいした手間ではありません。また、ゲノミックDNAの抽出をすることなく、個体の毛根があればそのまま、PCRによる増幅が可能ですので、時間もそれほど必要ではありません。
- [質問] 実験で用いた豚の屠場での格付け結果があれば教えて欲しい。それから、ドリップロスがHa1遺伝子を保有する個体で高く、PTUを給与された個体では低いというが目で見て明確に違いがあるのか？また、実験では、大ヨークシャー種を用いている

が理由はあるのか？この実験で用いた豚は去勢してあるのか？生産現場では去勢されているのか？

[回答] 本研究は、岐阜県畜産研究所の屠場で屠殺を行い、解体しています。そのため、格付け委員による格付けは行っておりません。また、ドリップロスについては、肉片を切り出し、プラスチックバックに入れて吊り下げ、肉汁の漏出を測定するのですが、死後24時間の時点では、Nn型の個体のドリップが大量に確認され、一目瞭然です。大ヨークシャー種を用いた理由は、当研究所で繁殖し、岐阜県内の農家さんに対して譲渡している関係で多くの頭数を飼養しています。その為、実験に供試し易いという点と、現場への寄与が高いという点で利用しました。本研究では、全て雄豚を使っております。去勢は、豚への強いストレスになることが予測されましたので行いませんでした。つまり、Hal遺伝子保有豚において去勢ストレスにより、死亡する個体を減らしたいということと、性差を無くすためです。しかし、生産現場では肥育豚は、一般的に去勢されています。

[質問] Hal遺伝子保有豚では、リアノジン受容体(RYR1)遺伝子の塩基置換が原因でPSE肉が発生する。演者はPSSやPSE肉発生に、夏季の輸送によってHal遺伝子保有豚のみが高い甲状腺ホルモン(T3)濃度が関与しているとのことを観察しているが、RYR1遺伝子の塩基置換が原因なのか？

[回答] Hal遺伝子保有豚での輸送に対する特異的な甲状腺ホルモン濃度の応答の原因として2つ推察しています。1つは、遺伝的な要素によるものです。豚の甲状腺ホルモン遺伝子は特定されていませんが、Hal遺伝子と連鎖した領域に豚の甲状腺ホルモン遺伝子が存在し、そこにHal遺伝子のみに特異的な要素があり、それが原因で、特異的な応答を示し、Hal遺伝子とともに遺伝するのではないかと考えられます。もう1つは、後天的な要因が考えられます。Hal遺伝子によってストレスにより、PSS症状が発生しやすい状態になっています。Hal遺伝子を保有する個体は、生後、様々なストレスに曝され、PSS症状が頻発していることが予想されます。PSS症状は強い筋硬直を促し、大量のATPが消費されています。不足したATPを補う必要があるため、甲状腺ホルモン濃度を上昇させ、呼吸系によるATP合成を亢進させ対応している可能性があります。しかし、この適応は、夏季高温環境下では逆に悪い方向に働き、PSS症状（高体温・高い呼吸数）を助長しているのではないかと考えています。しかし、以上についてあくまでも推測の域をでません。

[質問] 屠場への輸送ストレスを緩和すれば肉質は改善できるのか？どの様に対応するのが良いのか？また、ストレスの前の血中ホルモン、この研究で言えば甲状腺ホルモ

ンを測定すれば肉質が劣化する個体を予測できる可能性はあるのか？

[回答] 屠場へのストレスを緩和すれば肉質は改善できると思われます。岐阜県内の養豚農家で、出荷 7 日前から豚を出荷するコンテナに出荷豚を移動し、馴致させ、トラック搬入ストレスを軽減させ、屠場へ搬入している方がいます。この方によると、肉質のみならず、輸送中における死亡数が低下したことを認識しておられます。また、2 つ目の質問ですが、ホルモン濃度を測定することによって悪い肉質を示す個体を推定できる可能性はあると考えています。

[質問] この研究ではストレスの指標としてコルチゾールを測定しているが、コルチゾールのみでストレスを評価するのではなく、その他の測定項目も併せて評価する必要があるのではないか？

[回答] コルチゾールは、ストレスによって増加し、筋肉タンパク質を分解させる事が指摘されているので測定しました。しかし、先生のご指摘の通り、ストレス状態の評価には他の項目も加える必要は感じています。それは、血中のホルモン動態のみならず、供試した豚を生き物として客観的に評価する項目が必要であると思います。今、具体的には思いつきません。