

論文内容の要旨

水圏生物科学専攻
平成 26 年度博士課程入学
氏名 小南 友里
指導教員 潮 秀樹

論文題目 マアジ骨格筋における致死誘導性細胞生物学的変動に関する研究

細胞は単位細胞および細胞群を維持するための機構を備えている。それらの詳細を解明し、理解することは様々な疾患の予防や治癒への貢献が期待される。細胞生物学の発展に伴い、細胞のストレス応答機構や細胞死に至る機構に関する事象は広く解明されてきた。とくに細胞死に関しては、アポトーシスやネクローシス、オートファジー細胞死などの制御やクロストークの機構について、極めて多くの知見が得られている。しかし、細胞死の詳細が明らかにされる一方で、個体が死に至る環境下の細胞内外の動態については大部分が未解明である。すなわち、個体死を誘導するほどの激しいストレス下における細胞応答から破綻に至るまでの変動を十分に説明できる知見は得られていない。

多くの真骨魚類は、大気への曝露によって苦悶状態に陥り、死に至ることが知られている。すなわち、真骨魚類は大気曝露によって致死性的ストレスを受けるものと見なすことができる。サバやアジなどの多獲性魚は漁獲時に大気曝露を強いられることが多いことから、大気曝露による筋肉組織の性状変化およびそれらが魚肉としての美味しさに及ぼす影響が多数報告されている。致死性的ストレスが魚類の筋肉組織に及ぼす影響に関して、食品科学的な知見は比較的得られているが、それらの根底にある細胞生物学的な変動はブラックボックス状態にある。

以上の背景から本研究では、致死性的ストレス下における細胞機能の破綻過程を明らかにすることを目的とし、大気曝露時の魚類筋肉における細胞生物学的変動を明らかにした。本論文では、既往研究において大気曝露による顕著な筋肉組織の性状変化が報告されているマアジ *Trachurus japonicus* の骨格筋組織を実験に供した。

1. 致死性的ストレス下における組織学的および生化学的変化

致死性的ストレス下における骨格筋の生理的变化を明らかにするために、大気曝露時のマアジ骨格筋の組織学的変化および生化学的性状変化について検討した。活マアジを用い、延髄刺殺を行った個体を即殺個体、10 分間の大気曝露の後に延髄刺殺を行った個体を苦悶死個体とした。laminin を標的とした免疫組織化学の結果では、苦悶死個体において筋細胞間の拡張が観察された。また、走査型電子顕微鏡による観察結果では、苦悶死個体で筋肉組織中の結合組織が脆弱化することが示された。さらに、透過型電子顕微鏡による観察結果では、

苦悶死個体の筋肉組織におけるグリコーゲン顆粒の顕著な減少とミトコンドリアの構造崩壊が観察された。生化学的变化については、苦悶死個体の筋肉組織における著しい ATP 消費と保水力の低下が認められ、また遠心ドリップ中の遊離アミノ酸含量は増加傾向にあった。これらの結果から、大気曝露時のマアジ骨格筋について、苦悶時の強い筋収縮によって組織損傷や代謝の活性化に伴う保水力の低下、タンパク質分解の亢進などが誘導されるものと考えられた。

2. 致死ストレス下における遺伝子発現動態

近年では、次世代シーケンサーを用いた解析の普及によって、非モデル生物について生存可能なストレス環境下の筋肉組織における遺伝子発現変動が報告されている。そこで、速やかに延髄刺殺を行った個体 (Decap) および 1, 5, 10 分の大気曝露後に延髄刺殺を行った個体 (AirEx1, AirEx5, AirEx10) の骨格筋組織について次世代シーケンサーを用いた RNA-seq を行い、致死ストレス下におけるトランスクリプトームの変動を明らかにした。まず、*de novo* アセンブリを行い、相同性検索を用いた重複配列を除去してマアジ骨格筋のリファレンス配列を構築した。続いて、RNA-seq で得られたリードを構築したリファレンス配列にマッピングし、発現変動遺伝子解析を行った。

通常の *de novo* アセンブリに対して、相同性検索による重複配列の除去を行うことによって得られたリファレンス配列の N50 の値は、重複配列除去前よりも大幅に増加し、リファレンス配列の質が向上したものと考えられた。相同性検索による *de novo* アセンブリ中の重複配列の除去は、既に植物の発現変動遺伝子解析において応用されていたが、マアジのような非モデル魚種においても有用である可能性が示唆された。発現変動遺伝子解析の結果では、大気曝露時間に応じて増加する mRNA の関連細胞機能が異なっていた。すなわち、AirEx1 ではアミノ酸代謝やタンパク質分解に関連する mRNA が増加していたのに対し、AirEx5 ではタンパク質発現や TCA 回路に関連する mRNA が増加していた。また、AirEx10 ではタンパク質発現や膜タンパク質の局在、ミトコンドリアの電子伝達系に関連する mRNA が増加していた。これらの結果から、致死ストレス下における魚類筋組織では僅か数分間に遺伝子発現制御が動的に変動することが示唆された。

3. 致死ストレス下におけるタンパク質の動態

発現変動遺伝子解析によって、大気曝露時の致死ストレス下における筋組織では遺伝子発現制御が動的に変化することが示唆されたが、DNA から mRNA への転写と mRNA からタンパク質への翻訳の間には時間差があると考えられる。既報では、観測されるトランスクリプトームとプロテオームの傾向が一致するまでの時間差が指摘されている。すなわち、遺伝子の発現変動は必ずしも細胞内の状態を反映しているとは限らず、むしろ大部分は細胞の今後の動態を示すものであると考えられる。そこで、致死ストレス下におけるタンパク質の動態を明らかにするために、大気曝露時のマアジ骨格筋の水溶性タンパク質につい

てプロテオームおよびリン酸化プロテオームについて解析を行った。試料は、RNA-seq 解析と同様に Decap, AirEx1, AirEx5, AirEx10 の骨格筋組織を用いた。定量的プロテオーム解析の結果、AirEx1 および AirEx5 では解糖系に関わる酵素や筋原繊維タンパク質の相対量が増加していたが、AirEx10 では脂肪酸結合タンパク質についてのみ顕著な相対量の増加が認められた。1-10 分間の大気曝露でタンパク質発現が亢進した可能性よりも、分解や修飾、凝集によって水溶性画分における相対量が増加したものと考えられた。定量的リン酸化プロテオームの結果では、AirEx1, 5, 10 において乳酸デヒドロゲナーゼのリン酸化が亢進されていた。他のタンパク質は大気曝露時間に応じてタンパク質のリン酸化頻度が異なっていた。とくに、AirEx10 において正常な状態ではリン酸化されにくいパルブアルブミンのリン酸化が顕著に亢進されていた。これらの結果から致死ストレス下における魚類筋組織では、プロテオームの変動と並行して、制御系の破綻による急激なリン酸化プロテオームの変動が起こることが示唆され、タンパク質のリン酸化動態が大きく変化するものと考えられた。

4. 致死ストレス下におけるタンパク質分解動態

走査型電子顕微鏡による結合組織の観察および遠心ドリップ中の遊離アミノ酸含量測定の結果から、大気曝露時のマアジ骨格筋におけるタンパク質分解の亢進が示唆された。また定量的プロテオーム解析の結果において、一部の塩溶性タンパク質が水溶性タンパク質画分中に多く検出されたことから、筋原繊維タンパク質の分解亢進が誘導されるものと考えられた。既往の研究では、マグロ骨格筋において大気曝露によるオートファジーの誘導が示唆されている。これらのことから、致死ストレス下においてタンパク質分解が亢進される可能性は極めて高いものと考えられた。そこで、タンパク質分解産物である遊離ペプチドに着目し、定量的ペプチドーム解析を行った。定量的ペプチドーム解析の結果、AirEx1, 5, 10 では Decap と比較して解糖系関連酵素や筋原繊維タンパク質由来のペプチドが有意に増加した。とくに、AirEx10 ではリボソームやプロテアソームの構成タンパク質由来ペプチドが増えていた。この結果から、大気曝露の時間経過に伴って主要な被分解タンパク質が変動するものと考えられた。続いて、RNA-seq 解析によって得られたトランスクリプトームを基にマアジ骨格筋において発現しているプロテアーゼの同定を行い、それらが分類される EC クラスの基質特異性をデータベースから得た。また、定量的ペプチドームの結果から各試験区のペプチド末端配列特異性を算出した。得られたプロテアーゼの基質特異性とペプチドームの末端配列特異性について、線形重回帰モデルを用いた解析を行い、タンパク質分解の制御状態に関する特徴量を算出した。その結果、大気曝露の時間経過に伴ってプロテアーゼの寄与度の分散が大きくなる傾向が認められ、タンパク質分解制御の破綻が生じるものと示唆された。

以上のように、本論文ではマアジの骨格筋を対象とし、大気曝露による致死ストレスが及ぼす影響についてトランスオミクス的な検討を行った。得られた全ての結果からは、致死

的ストレス下における骨格筋では遺伝子発現およびタンパク質のリン酸化動態が速やかに変化し、同時にタンパク質分解の制御が破綻するものと推察された。致死ストレス下における~1分間に認められた顕著な動態変化は細胞のストレス応答を示すものと考えられ、タンパク質分解制御系の破綻は細胞死を誘導する主要因である可能性が高いと推察された。

本論文では、マアジの骨格筋における致死誘導性細胞生物学的変動が明らかにされたとともに、非モデル生物のストレス下における動態に関して新たな記述方法が提案することに成功した。本論文で用いた方法は真骨魚類に限らず、様々な生物種に応用可能であり、今後の発展的な応用が期待される。