

## 審査の結果の要旨

氏名 小南 友里

小南友里によって提出された「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」は、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細胞レベルでの破綻に至るまでの生物学的変動を、遺伝子、タンパク質、情報伝達経路、タンパク質分解経路などの総合的な視点から解明しようとしたものである。概要を以下に示す。

致命的ストレス下における骨格筋の生理的変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。延髄刺殺を行った個体を即殺個体 (Decap), 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 (AirEx1, 5 および 10) とした。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した。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ミトコンドリアの構造崩壊が観察された。生化学的変化については、苦悶死個体における著しい 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した。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。

非モデル生物であるマアジについて、致命的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。相同性検索による重複配列の除去を行うことによってリファレンス配列の質が向上した。発現変動遺伝子解析の結果では、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 が増加した。これらの結果から、致命的ストレス下における魚類筋組織ではわず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。

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、致命的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、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。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。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。特に、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、制御系の破たん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。

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。そこで、定量的ペプチドーム解析を行った。その結果、AirEx1, 5, 10ではDecapと比較して解糖系関連酵素や筋原線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、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ところ、大気曝露の時間経過に伴ってタンパク質分解制御系が破綻するものと考えられた。

以上のように、本研究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。また、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新骨魚類に限らず、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。

以上、本研究は致死誘導性ストレスが非モデル生物であるマアジ筋肉に及ぼす影響について網羅的かつ詳細に検討を加え、これまで全く不明であった個体死から細胞死への移行における細胞生物学的応答を明らかにした。よって審査委員一同は本論文が博士(農学)の学位論文として価値あるものとした。