

博士論文（要約）

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

2016年

小南 友里

目次

序論

略語

第一章 致死のストレス下における生理的变化

第一節 大気曝露下におけるマアジ骨格筋の組織様態

第二節 大気曝露下におけるマアジ骨格筋の生化学的性状

第三節 考察

第二章 致死のストレス下における遺伝子発現動態

第一節 *de novo* アセンブリによるマアジ骨格筋のリファレンス配列の構築

第二節 大気曝露下におけるマアジ骨格筋の発現変動遺伝子

第三節 考察

第三章 致死のストレス下におけるタンパク質の動態

第一節 大気曝露下におけるマアジ骨格筋のプロテオーム

第二節 大気曝露下におけるマアジ骨格筋のリン酸化プロテオーム

第三節 考察

第四章 致死のストレス下におけるタンパク質分解動態

第一節 大気曝露下におけるマアジ骨格筋のペプチドーム

第二節 大気曝露下におけるマアジ骨格筋のタンパク質分解の動的制御状態

第三節 考察

総合考察

文献

序 論

細胞生物学の発展はモデル生物によって支えられてきたといえる。真菌類では酵母 *Saccharomyces cerevisiae*, 植物ではシロイヌナズナ *Arabidopsis thaliana* やイネ *Oryza sativa*, 哺乳類ではハツカネズミ (マウス) *Mus musculus* やドブネズミ (ラット) *Rattus norvegicus*, 魚類ではメダカ *Oryzias latipes* やゼブラフィッシュ *Danio rerio* など多くのモデル生物が広く研究に使用されている。これまでの長きに渡る研究によって, 単細胞生物である酵母から多細胞生物であるヒト *Homo sapiens* に至るまで, 生命維持に係る主要な細胞機能の多くが種を越えて保存されていることが示されてきた。例えば, 酵母において発見された飢餓ストレスによるオートファジーの誘導は[1], 哺乳類や魚類の細胞においても同様に観察されることが示されている[2-4]。また最近では, 多細胞生物に特有の機構であると考えられていたアポトーシスと類似の細胞死が酵母でも起こることが報告された[5]。すなわち, 単細胞における生命維持だけでなく, 細胞群の維持においても種を越えて共通な機構が多く存在するといえる。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療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。特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[6]。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, 新骨魚類は大気曝露によって致死性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[7]。ただし, 致死性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多く

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。第一章では、組織観察および生化学性状に関する分析を通じて致死ストレス下における生理的変化を明らかにした。第二章では、RNA-seq 解析を行い、非モデル生物であるマアジ骨格筋のリファレンス配列を構築するとともに、発現変動遺伝子解析を行った。第三章では、定量的プロテオーム解析および定量的リン酸化プロテオーム解析によって致死ストレス下におけるタンパク質動態を明らかにした。第四章では、定量的ペプチドーム解析によって被分解タンパク質の量的変動を明らかにした。さらに、線形重回帰モデルを用いた解析によってタンパク質分解の制御状態に関する特徴量を求め、致死ストレス下におけるタンパク質分解動態を示した。

略 語

Decap; Decapitation

AirEx; Air exposure

SEM; Scanning electron microscope

TEM; Transmitted electron microscope

DEG; Differentially expressed gene

FPKM; Fragments per kilobase of exon per million reads mapped

第一章 致死性ストレス下における生理的变化

本章の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。5年以内に出版予定。

第二章 致死性ストレス下における遺伝子発現動態

本章の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。5年以内に出版予定。

第三章 致死性ストレス下におけるタンパク質の動態

本章の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。5年以内に出版予定。

第四章 致死性ストレス下におけるタンパク質分解動態

本章の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。5年以内に出版予定。

総合考察

第一章では、致死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。生化学的変化については、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。

第二章では、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 アセンブルを行い、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 アセンブル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、致死性ストレス下における魚類筋組織では僅か数分の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。

第二章において、発現変動遺伝子解析によって、大気曝露時の致死性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、第三章では致死性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性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。

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、第四章では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し唆された。

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。

文献

- [1] Takeshige, K., Baba, M., Tsuboi, S., Noda, T. and Ohsumi, Y. (1992). Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction. *The Journal of cell biology* 119, 301-311.
- [2] Yabu, T., Imamura, S., Mizusawa, N., Touhata, K. and Yamashita, M. (2012). Induction of autophagy by amino acid starvation in fish cells. *Marine biotechnology* 14, 491-501.
- [3] Rabinowitz, J.D. and White, E. (2010). Autophagy and Metabolism. *Science* 330, 1344.
- [4] Kourtis, N. and Tavernarakis, N. (2008). Autophagy and cell death in model organisms. *Cell Death Differ* 16, 21-30.
- [5] Yamaki, M., Umehara, T., Chimura, T. and Horikoshi, M. (2001). Cell death with predominant apoptotic features in *Saccharomyces cerevisiae* mediated by deletion of the histone chaperone ASF1/CIA1. *Genes to Cells* 6, 1043-1054.
- [6] Edinger, A.L. and Thompson, C.B. (2004). Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Current Opinion in Cell Biology* 16, 663-669.
- [7] Ando, M., Joka, M., Mochizuki, S., Satoh, K.-I., Tsukamasa, Y. and Makinodan, Y. (2001). Influence of death struggle on the structural changes in chub mackerel muscle during chilled storage. *Fisheries Science* 67, 744-751.
- [8] Bence, N.F., Sampat, R.M. and Kopito, R.R. (2001). Impairment of the Ubiquitin-Proteasome System by Protein Aggregation. *Science* 292, 1552-1555.
- [9] Repnik, U., Stoka, V., Turk, V. and Turk, B. (2012). Lysosomes and lysosomal cathepsins in cell death. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1824, 22-33.
- [10] Mahrus, S., Trinidad, J.C., Barkan, D.T., Sali, A., Burlingame, A.L. and Wells, J.A. (2008). Global Sequencing of Proteolytic Cleavage Sites in Apoptosis by Specific Labeling of Protein N Termini. *Cell* 134, 866-876.
- [11] Gelman, J.S., Sironi, J., Castro, L.M., Ferro, E.S. and Fricker, L.D. (2011). Peptidomic Analysis of Human Cell Lines. *Journal of Proteome Research* 10, 1583-1592.
- [12] Schrader, M. and Schulz-Knappe, P. (2001). Peptidomics technologies for human body fluids. *Trends in Biotechnology* 19, S55-S60.
- [13] Schulz-Knappe, P., Schrader, M. and Zucht, H.-D. (2005). The Peptidomics Concept. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* 8, 697-704.
- [14] Baggerman, G., Verleyen, P., Clynen, E., Huybrechts, J., De Loof, A. and Schoofs, L. (2004). Peptidomics. *Journal of Chromatography B* 803, 3-16.

- [15] Lone, A.M., Kim, Y.-G. and Saghatelian, A. (2013). Peptidomics methods for the identification of peptidase–substrate interactions. *Current Opinion in Chemical Biology* 17, 83-89.
- [16] Dallas, D.C., Guerrero, A., Parker, E.A., Robinson, R.C., Gan, J., German, J.B., Barile, D. and Lebrilla, C.B. (2015). Current peptidomics: Applications, purification, identification, quantification, and functional analysis. *PROTEOMICS* 15, 1026-1038.
- [17] Luge, T. and Sauer, S. (2016) Generating Sample-Specific Databases for Mass Spectrometry-Based Proteomic Analysis by Using RNA Sequencing. In *Proteomics in Systems Biology: Methods and Protocols* (Reinders, J., ed.^eds), pp. 219-232. Springer New York, New York, NY.
- [18] Wang, X., Slebos, R.J.C., Wang, D., Halvey, P.J., Tabb, D.L., Liebler, D.C. and Zhang, B. (2012). Protein Identification Using Customized Protein Sequence Databases Derived from RNA-Seq Data. *Journal of Proteome Research* 11, 1009-1017.
- [19] Evans, V.C., Barker, G., Heesom, K.J., Fan, J., Bessant, C. and Matthews, D.A. (2012). De novo derivation of proteomes from transcriptomes for transcript and protein identification. *Nat Meth* 9, 1207-1211.
- [20] Davis, M.W. and Parker, S.J. (2004). Fish Size and Exposure to Air: Potential Effects on Behavioral Impairment and Mortality Rates in Discarded Sablefish. *North American Journal of Fisheries Management* 24, 518-524.
- [21] Poli, B.M., Parisi, G., Scappini, F. and Zampacavallo, G. (2005). Fish welfare and quality as affected by pre-slaughter and slaughter management. *Aquaculture International* 13, 29-49.
- [22] Addis, M.F. et al. (2012). 2D DIGE/MS to investigate the impact of slaughtering techniques on postmortem integrity of fish filet proteins. *Journal of Proteomics* 75, 3654-3664.
- [23] Yamashita, M. (2010) *Stress Response of Fish during Capture*, Kouseisha Kouseikaku. Tokyo, Japan.
- [24] Ando, M., Joka, M., Mochizuki, S., Satoh, K.-I., Tsukamasa, Y. and Makinodan, Y. (2001). Influence of death struggle on the structural changes in chub mackerel muscle during chilled storage. *Fisheries Science* 67, 744-751.
- [25] Bolger, A.M., Lohse, M. and Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for

- Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30, 2114-2120.
- [26] Grabherr, M.G. et al. (2011). Trinity: reconstructing a full-length transcriptome without a genome from RNA-Seq data. *Nature biotechnology* 29, 644-652.
- [27] Betancur-R, R. et al. (2013). The Tree of Life and a New Classification of Bony Fishes. *PLoS Currents* 5, ecurrents.tol.53ba26640df0ccaee75bb165c8c26288.
- [28] Betancur, R.R. et al. The tree of life and a new classification of bony fishes. LID – 10.1371/currents.tol.53ba26640df0ccaee75bb165c8c26288 [doi] LID - ecurrents.tol.53ba26640df0ccaee75bb165c8c26288 [pii].
- [29] Li, W. and Godzik, A. (2006). Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics* 22, 1658-1659.
- [30] Li, W. and Godzik, A. Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences.
- [31] Ono, H., Ishii, K., Kozaki, T., Ogiwara, I., Kanekatsu, M. and Yamada, T. (2015). Removal of redundant contigs from de novo RNA-Seq assemblies via homology search improves accurate detection of differentially expressed genes. *BMC Genomics* 16, 1031.
- [32] Roberts, A. and Pachter, L. (2013). Streaming fragment assignment for real-time analysis of sequencing experiments. *Nat Meth* 10, 71-73.
- [33] Leng, N., Dawson, J. and Kendzioriski, C. (2013) EBSeq: An R package for differential expression analysis using RNA-seq data. [arXiv:1303.3472v1 \[cs.LG\]](#)
- [34] Leng, N. et al. EBSeq: an empirical Bayes hierarchical model for inference in RNA-seq experiments.
- [35] Kanehisa, M. and Goto, S. (2000). KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic acids research* 28, 27-30.
- [36] Schechter, I. and Berger, A. (1967). On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochemical and biophysical research communications* 27, 157-162.
- [37] Rawlings, N.D., Barrett, A.J. and Finn, R. (2015). Twenty years of the MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic acids research*, gkv1118.
- [38] Moon, T.W. (2001). Glucose intolerance in teleost fish: fact or fiction? *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 129, 243-249.
- [39] Polakof, S., Panserat, S., Soengas, J.L. and Moon, T.W. (2012). Glucose metabolism in fish: a review. *Journal of Comparative Physiology B* 182, 1015-1045.

- [40] Sugita, T. and Yamashita, M. (2012) Stress response in fish at whole body and cellular levels. In *Quality improvement of coastal fish and marine invertebrates - Achievement by short-term rearing and associated systems for transportation and marketing* (Fukuda, Y. and Watabe, S., ed.^eds), pp. 9-24, Tokyo, Japan.
- [41] Aedo, J.E. et al. (2015). mRNA-seq reveals skeletal muscle atrophy in response to handling stress in a marine teleost, the red cusk-eel (*Genypterus chilensis*). *BMC Genomics* 16, 1024.
- [42] Gomes-Marcondes, M.C.C. and Tisdale, M.J. (2002). Induction of protein catabolism and the ubiquitin-proteasome pathway by mild oxidative stress. *Cancer Letters* 180, 69-74.
- [43] Zhao, L.D., Zhang, Z., Xie, G., Selsby, J.T., Baumgard, L.H. and Rhoads, R.P. (2016). Activation of ubiquitin-proteasome system components in heat-stressed pig skeletal muscle. *The FASEB Journal* 30, 915.34.

謝 辞

本研究の遂行及び論文の作成にあたり、終始懇切なるご指導とご助言を賜りました東京大学大学院 潮 秀樹教授に深甚な感謝の意を表します。また、多くのご助言とご指導を賜りました東京大学大学院 浅川修一教授、松永茂樹教授、金子豊二教授、木下滋晴准教授に深く感謝いたします。

本研究の遂行にあたり、数理モデルの構築および解析の実施に甚大なご助力を賜りました東京大学大学院 時弘哲治教授、林 達也氏に心より御礼申し上げます。また、次世代シーケンサーの使用に際し、ご協力賜りました北里大学 渡部終五教授に深く御礼申し上げます。

本研究の実施に際し、東京大学大学院 中谷操子博士、石綱史子博士をはじめとして、多くの方々に技術指導を賜りました。ここに厚く感謝いたします。また、質量分析計の操作に関する多くの助言を賜りました昭和学院短期大学 大原和幸助教に深く感謝申し上げます。

さらに、本研究の進展にあたり、様々な面でお力添えを頂いた東京大学 水産化学研究室、水圏生物工学研究室、水圏天然物化学研究室内の諸兄の皆様に感謝の意を表します。

小南友里