

令和 4 年 5 月 26 日現在

機関番号：34104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K11658

研究課題名(和文) 様々な栄養状態における細胞内のタンパク質分解システムの新たな分子機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of new molecular mechanism of intracellular proteolytic system in various nutritional states

研究代表者

棚橋 伸行 (Tanahashi, Nobuyuki)

鈴鹿医療科学大学・保健衛生学部・教授

研究者番号：30511927

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々の体は、絶食や飢餓により外部からのエネルギー源の供給が絶たれると、体内に備蓄しているグリコーゲンと脂肪に加え、タンパク質を分解し生じたアミノ酸もエネルギー源として利用する。この主なタンパク質の分解としてユビキチン・プロテアソーム系が存在する。今回の研究は、絶食状態したマウスの肝臓と脳を用いて、この分解系の機能変化や形成されるプロテアソームの状態を解析した。その結果、肝臓と脳の間で形成されるプロテアソームの形態には大きな違いが認められなかった。しかし、プロテアソームの機能には、大きな違いが認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

真核生物の細胞内には選択的なタンパク質の分解系と非選択的なタンパク質の分解系が存在する。今回の研究を進めることにより、この栄養状態における2つの分解系の協調性と役割分担の解明に繋がると考えており、さらに正常組織で解析することにより、まだ解明されていないユビキチン・プロテアソーム系と栄養状態が悪化することにより引き起こされる疾患との関係について追及していくことが期待される。

研究成果の概要(英文)：When the supply of energy sources from the outside is cut off due to fasting or starvation, our body uses the amino acids produced by decomposing proteins as energy sources in addition to the glycogen and fat stored in the body. The ubiquitin-proteasome system exists as the degradation of this major protein.

In this study, we analyzed the functional changes of this degradation system and the state of the proteasome formed using the liver and brain of fasted mice. As a result, there was no significant difference in the morphology of the proteasome formed between the liver and the brain. However, there were significant differences in the function of the proteasome.

研究分野：機能生物化学

キーワード：プロテアソーム 蛋白質分解 ユビキチン 分子集合

1. 研究開始当初の背景

我々の体は、絶食や飢餓により外部からのエネルギー源の供給が絶たれると、体内に備蓄しているグリコーゲンと脂肪に加え、タンパク質を分解し生じたアミノ酸もエネルギー源として利用する。しかし、アミノ酸プールは、通常でもタンパク質の生合成に必要なアミノ酸量の1/4程であるため、飢餓時にアミノ酸プールの恒常性を維持する為には、活発にタンパク質を分解してアミノ酸を供給する必要がある。このような非常事態への適応役を担う細胞内タンパク質分解系がオートファジー・リソソーム系であり、その重要性は古くから知られている。しかし、近年、ユビキチン・プロテアソーム系もアミノ酸プールの恒常性維持に重要であることが示されているが、その分子機序はほとんど明らかになっていない。

2. 研究の目的

絶食・飢餓とプロテアソームに関する研究は、栄養応答とストレス応答の観点から mTOR と FOXO シグナルに着目して行われており、ほとんどが酵母、培養細胞及びトランスジェニックマウスを用いて解析されている。そこで、本研究の目的としては、1) 細胞内のアミノ酸プールの維持に関する研究の対象組織が、これまではアミノ酸供給源としてのみ働く筋肉であったのに対し、本研究では全身の細胞に各種のエネルギー源を供給する肝臓と逆にエネルギー消費の主役を担う脳に着目し、同時に今まで解析されてない正常マウスを試料として解析を行う。2) 飢餓時にプロテアソームがアミノ酸プールの恒常性維持に貢献する分子機序の解明を目指して、絶食マウスの肝臓と脳におけるプロテアソームの発現と機能、すなわち構成成分及び分子集合に関わる因子を解析する。

3. 研究の方法

マウスを 12、24、48、72 時間の絶食状態と給餌状態で飼育した後、肝臓及び脳を採取し(研究 1)、また、脂質は一定にしてタンパク質と炭水化物の割合を変化させた 3 種類の餌と通常使用している餌(CE2)を 2 カ月及び 6 ヶ月間マウスに摂取させ、各餌の肝臓と脳を採取し(研究 2)、これらの臓器を用いて次の解析を行った。

- (1) プロテアソームの機能解析：採取した各々絶食状態の肝臓及び脳の抽出液(以下、粗抽出液とする)における 3 種のペプチダーゼ活性について合成基質を用いてプロテアソーム活性を測定する。さらに、粗抽出液を用いてユビキチン化されたタンパク質の蓄積の有無についてユビキチン鎖を認識する抗体で検出した。
- (2) プロテアソーム構成成分のタンパク質発現の解析：粗抽出液を用いてプロテアソーム、PA700、PA28 の各サブユニット及び各種プロテアソームの分子形成に関わる因子のタンパク質の発現変動をウエスタンブロット法で解析した。
- (3) 形成されるプロテアソームの機能と動態解析：粗抽出液を分子篩クロマトグラフィーにて展開し、各分画の各種のペプチダーゼ活性を測定する。また、分画された試料について 20S プロテアソーム、PA700、PA28 の各サブユニットの抗体を用いてタンパク質の動態を解析した。
- (4) 26S プロテアソームの再構築の解析：プロテアソームの動態変化が認められた絶食状態から給餌状態へ戻し経時的なプロテアソームの変動について(1)～(3)の方法で解析した。

4. 研究成果

研究成果 1

プロテアソームによるアミノ酸プールの恒常性維持に関与する分子機序を解明するために、4 週齢と 24 週齢の絶食マウス(12、24、48、72 時間)の肝臓と脳におけるプロテアソームの構成成分及び分子集合に関わる因子を解明する研究を進めた結果、

- 1) 各週齢の肝臓と脳のプロテアソームを構成するサブユニットのタンパク質の発現は給餌と絶食とでほとんど差が認められなかった。また、給餌状態では、プロテアソームの分子集合に必要な Ump1 は、プロテアソームを形成したあと、この酵素により分解される。しかし、

- 4 週齢の肝臓と脳では、この Ump1 が絶食時間依存的に蓄積された。
- 2) 4 週齢の肝臓と脳において、ユビキチン化されたタンパク質は絶食時間依存的に蓄積された。
- 3) 各々の飼育条件において、26S 及び 20S プロテアソームは同じ分画に溶出されたので、各々のプロテアソームの複合体のサイズは変化しないことが判明した。また、プロテアソームの活性は、4 週齢において肝臓と脳ともに絶食時間依存的に低下することが認められた。しかし、24 週齢では、絶食により 一旦は減少するが、絶食時間依存的に増加することが分かった。これらの活性の変動は、Ump1 の変動とユビキチン化されたタンパク質の蓄積に一致した。
- 4) 4 週齢の絶食マウスを給餌状態へ戻したとき、脳におけるプロテアソームの活性は完全に給餌状態まで回復したが、肝臓におけるプロテアソーム活性は給餌状態まで回復されなかった。この変動は、Ump1 の変動とユビキチン化されたタンパク質の蓄積に一致した。
- 以上より、1) 栄養状態の変化によるプロテアソームの変動を制御する因子として Ump1 が考えられること、2) 週齢が異なるとプロテアソームへの影響が異なることが示唆された。

研究成果 2

体重と臓器量の変化に関しては

- 1) 体重の変化は 2 ヶ月及び 6 ヶ月間飼育した場合共に、タンパク質含量が少ない餌において、CE2 を含む 3 種類の餌より体重の増加が少ないことが認められた。
- 2) 肝臓と腎臓の重量は、2 ヶ月及び 6 ヶ月間飼育した場合共に、タンパク質含量の少ない餌が他の 3 種類の餌より軽くなった一方、タンパク質含量の多い餌で 6 ヶ月間飼育した場合、腎臓の重量は他の 3 種類の餌より重くなった。

2 か月間飼育した場合の肝臓と脳のプロテアソームの機能や動態に関しては、

- 1) 肝臓では、CE2 摂取に比べ他の 3 種類の餌の方が、26S 及び 20S プロテアソーム活性が低下することが判明した。
- 2) 脳においては、CE2 よりタンパク質含量を少なくした場合、26S 及び 20S プロテアソーム活性が増加することが認められた。
- 3) 腎臓においては、CE2 よりタンパク質含量を少なくした場合もしくは多くした場合、26S 及び 20S プロテアソーム活性が増加することが判明した。
- 4) どの栄養状態でも、プロテアソームの分子サイズは変化しなかった。

6 か月間飼育した場合の肝臓と脳のプロテアソームの機能や動態に関しては

- 1) 脳と肝臓では、CE2 と 3 種類の餌では、形成された 26S プロテアソームのペプチダーゼ活性には大きな変動が認められなかった。一方、20S プロテアソームは肝臓や脳で 3 種類の餌で飼育した場合、CE2 よりわずかに増加する場合、低下する場合が認められた。
- 2) 栄養状態でも、プロテアソームの分子サイズは変化しなかった。

以上より、2 か月と 6 か月の間、摂取するタンパク質含量が異なることにより、26S 及び 20S プロテアソームの活性が変動することが判明したことから、プロテアソームの活性は、摂取する栄養素の影響を受ける可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nobuyuki Tanahashi, Moeko Komiyama, Mina Tanaka, Yuta Yokobori Shigeo Murata, and Keiji Tanaka	4. 巻 105
2. 論文標題 The effect of nutrient deprivation on proteasome activity in 4-week-old mice and 24-week-old mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Nutritional Biochemistry	6. 最初と最後の頁 0-0
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jnutbio.2022.108993	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------