

令和 4 年 5 月 9 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K15909

研究課題名(和文) 魚類の飢餓適応における骨格筋タンパク質分解の意義

研究課題名(英文) Proteolytic adaptation to starvation in teleost skeletal muscle

研究代表者

小南 友里 (Kominami, Yuri)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・助教

研究者番号：30803572

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：魚類は生命活動に係るエネルギー産生をタンパク質の異化に大きく依存しているにも関わらず、飢餓時でも遊泳のために最低限の骨格筋タンパク質量を維持しながら生存できる。このような魚類特有の飢餓適応メカニズムを明らかにすることを目的として、絶食飼育したカンパチの普通筋についてペプチドーム解析を行なった。定量的ペプチドーム解析の結果からは絶食開始2日目にタンパク質分解が亢進することが示唆され、成長ホルモンの分泌やタンパク質合成に関与するタンパク質が主な被分解タンパク質として同定された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マダイやクロマグロ、カンパチなどの肉食魚類の養殖では、魚粉を大量に配合した飼料が使用されている。世界的に養殖産業が拡大しているなか、魚粉原料の資源量が減少傾向にあることや残餌による海洋環境汚染などの問題を考慮すると、このような魚粉に依存した養殖を継続することは非現実的である。本研究の成果は、肉食魚類の骨格筋において特定のシグナル伝達によって筋線維タンパク質の分解が抑制されることを示している。今後、シグナル伝達の詳細について解明することによって、魚類の筋肉タンパク質の蓄積効率を向上させる飼料や給餌スケジュールの設計が可能になると期待される。

研究成果の概要(英文)：Proteolysis is constantly activated to energy production in teleost skeletal muscle. Nevertheless, teleosts can save their muscular protein enough to swim during starvation. Proteolytic adaptation to starvation in teleost skeletal muscle was explored in this study. Quantitative peptidomic analysis of starved greater amberjack muscle was performed. Accelerated proteolysis on the second day of starvation was suggested from the results. Proteins related to secretion of growth hormone and protein synthesis were identified as the main targets of cellular proteases.

研究分野：水産化学

キーワード：飢餓適応 ペプチドーム解析 タンパク質分解 魚類 骨格筋

### 1. 研究開始当初の背景

魚類は糖類の吸収・利用効率が低く、生命活動に係るエネルギー産生をタンパク質の異化に大きく依存しているにも関わらず、飢餓時でも遊泳のために最低限の骨格筋タンパク質量を維持しながら生存できる。このようにタンパク質を節約しながら飢餓に耐える魚類特有の機構は、未だ多くの謎に包まれている。飢餓時の動物細胞では、オートファジーによるタンパク質分解で得たアミノ酸をエネルギー産生に利用することが知られており、魚類の骨格筋においても飢餓によるオートファジーの誘導が認められる。しかし、絶食1-2ヵ月後も骨格筋における粗タンパク質量の顕著な減少は認められない。すなわち、飢餓時の魚類骨格筋では「タンパク質分解が亢進するが、タンパク質はあまり減少しない」という矛盾した現象が観察される。

応募者はこれまで、タンパク質分解産物であるペプチドの網羅的解析(ペプチドーム解析)による魚類骨格筋タンパク質分解動態に関する研究に取り組んできた。その過程で、魚類骨格筋ではストレス負荷によって代謝関連酵素の分解が亢進することを見出した。この結果から、「飢餓時の魚類の骨格筋では、代謝のシフトチェンジを行う(代謝リプログラミング)ためにタンパク質の分解が亢進するのではないか」という仮説を着想した。

### 2. 研究の目的

飢餓適応過程の魚類骨格筋ではグリコーゲンおよび脂質含量の逐次的な変動と連動した代謝関連酵素群の遺伝子発現量変動が観察されており、代謝リプログラミングによる飢餓適応が強く示唆される。そこで本研究では、魚類の飢餓適応におけるタンパク質分解の意義を明らかにすることを目的として、飢餓適応過程の魚類骨格筋における代謝関連酵素群の合成・分解フローと代謝産物プロファイルの関係について調べた。

### 3. 研究の方法

#### (1) 絶食試験

カンパチ *Seriola dumerili* を試料魚に用い、10日の絶食飼育により飢餓適応を誘導した。絶食飼育開始初日から3日間は24時間毎に、以降は10日後に体長・体重を測定した。また、骨格筋を採取し、各種分析に供した(各試験区 n=3)。

#### (2) ペプチドーム解析

採取したカンパチ骨格筋試料から遊離ペプチドを抽出した。脱塩および濃縮した後、cHiPLC® SystemNanoLC-Ultra™ system (Eksigent ekspert™) で分離し、ESI-MS/MS (TT5600, AB SCIEX™) によってMSスペクトラムを得た。ProteinPilot® software version 4.5 (AB SCIEX™)にてMSスペクトラム解析を行い、ペプチドームを得た。

#### (3) プロテオーム解析

採取したカンパチ骨格筋試料から水溶性タンパク質画分を調製した。トリプシン消化を行い、脱塩および濃縮した後に(2)ペプチドーム解析と同様にnanoLC-ESI-MS/MSにて分析し、MSスペクトラムを得た。

### 4. 研究成果

図1に示すように、10日間の絶食試験において顕著なコンディションファクター(▲)の低下は認められなかった。一方、肝臓重量指数(●)は絶食期間の延長に伴って低下傾向にあった。肝臓重量指数は絶食開始2日間で急激に減少し、その後は緩やかに減少した。

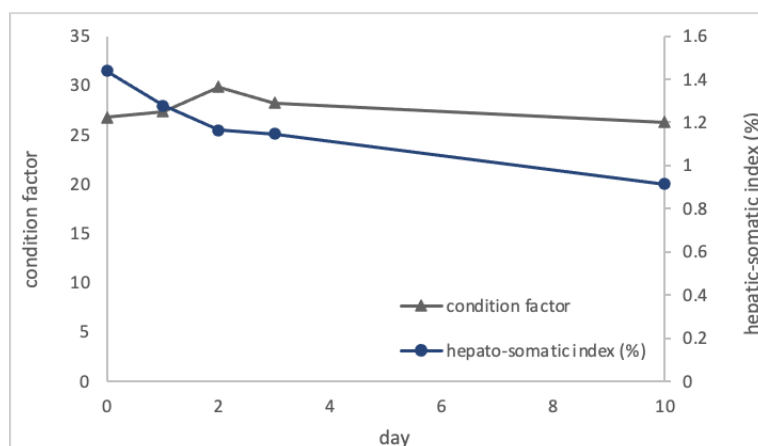


図1 絶食によるカンパチの変化

ペプチドーム解析によって同定された被分解タンパク質および各タンパク質の相対的分解量増減を図2に示す。図中のカラースケールは、絶食開始日を対照として算出した fold change の大小を表している。カンパチ普通筋では絶食開始後2日にタンパク質分解が亢進することが示唆される。特に、growth hormone secretagogue receptorの分解物量が絶食開始前の約6倍となっていた。また、cytotoxic and regulatory T-cell moleculeの分解物量も増加していた。いずれも細胞膜表面に発現するタンパク質であることから、細胞膜へリクルートされる前の輸送小胞自体が分解の標的となった可能性も考えられる。絶食開始後1日目から10日目まで histone タンパク質はいずれも分解量が減少した。転写の際にヒストンタンパク質のターンオーバーがあることから、カンパチ骨格筋では絶食によって転写の抑制もしくはヒストンタンパク質の更新抑制が誘導されると推察される。

Protein	Definition	Starv_day1	Starv_day2	Starv_day3	Starv_day10
XP_022618624.1	troponin C, skeletal muscle-like	0.38670585	0.43752531	0.43738944	0.49761292
XP_022617456.1	WD repeat-containing protein 78-like	0.0827873	0.16712291	0.09010777	0.09082329
XP_022616266.1	histone H3.3	0.00978163	0.00998842	0.00927297	0.00966284
XP_022616217.1	E3 ubiquitin-protein ligase rnf152-B-like	0.52873502	0.70286934	0.82544714	0.93083956
XP_022615490.1	aldehyde oxidase 3-like	0.0246308	2.5594744	0.03146156	0.66574581
XP_022613332.1	solute carrier family 28 member 3	0.65890876	0.14825042	0.71465933	0.56381012
XP_022612888.1	LOW QUALITY PROTEIN: titin-like	1.16563898	2.77767919	0.99402161	1.89864378
XP_022612717.1	THO complex subunit 4	0.04220412	2.75052869	0.03063977	0.74756983
XP_022612380.1	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	0.15353253	0.85426578	0.31606618	0.51138348
XP_022608276.1	manganese-transporting ATPase 13A1 isoform X1	0.09388738	0.11984207	0.13317203	0.1104318
XP_022606655.1	growth hormone secretagogue receptor type 1-like	0.4120013	6.15784814	0.35396432	2.08849159
XP_022601722.1	cytotoxic and regulatory T-cell molecule isoform X3	0.84006885	1.67608822	1.45153941	2.18140084
XP_022601538.1	creatine kinase M-type	0.63950991	0.86820565	0.32970844	1.0332703
XP_022601528.1	histone H2B 5	0.01504848	0.01475839	0.01530823	0.01460329
XP_022600389.1	LOW QUALITY PROTEIN: uncharacterized protein LOC111221314	0.01014961	0.01097868	0.00917669	0.00996952
XP_022599092.1	fructose-bisphosphate aldolase A	0.84298482	1.92125658	0.80379219	1.37135022
XP_022597206.1	alpha-enolase isoform X2	0.01647318	0.01454322	0.01231703	0.01776563
XP_022596394.1	tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 4 isoform X2	0.11893945	0.10435264	0.13671059	0.09233185
XP_022594410.1	ubiquitin-60S ribosomal protein L40	0.01181838	0.01918056	0.01319606	0.01260271
XP_022593616.1	tribbles homolog 2	0.19871206	0.35685833	0.28818834	0.26729139

図2 被分解タンパク質の同定結果

ペプチドームの末端配列傾向について解析した結果を図3に示す。タンパク質分解産物である遊離ペプチドの末端配列はそれらを分解したプロテアーゼの基質特異性に依存する。したがって、ペプチドームの末端配列傾向はその系のタンパク質分解に寄与したプロテアーゼ群の基質特異性を反映したものと見なすことができる。ペプチドームの末端配列傾向が絶食開始前後で大きく変化したことから、カンパチ骨格筋では絶食によって特定のタンパク質分解系が優位となることが示唆される。また、末端配列傾向から絶食時のタンパク質分解には cathepsin D もしくは E が強く寄与する可能性が考えられる。既往研究によって絶食時の魚類骨格筋におけるオートファジーの誘導が示されていることから、cathepsin D による分解が優位となる可能性が高いといえる。

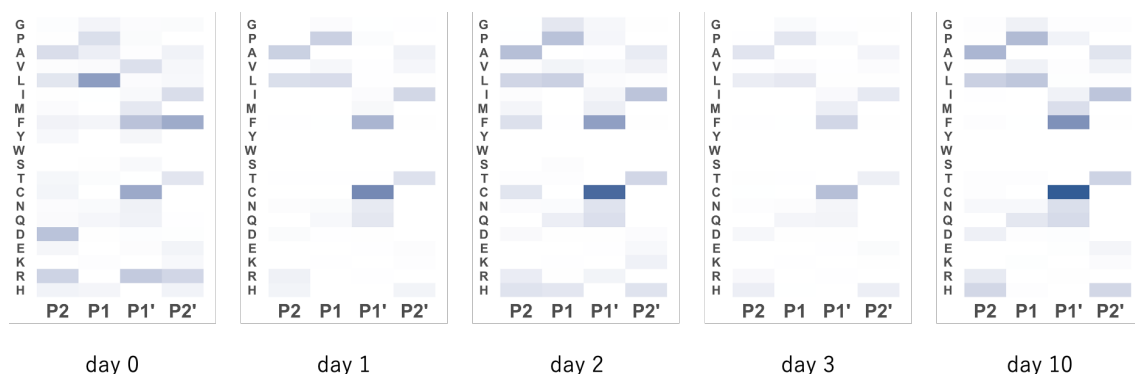


図3 ペプチドームの末端配列傾向

水溶性タンパク質画分についてプロテオーム解析を行い、同定された代謝関連酵素を KEGG pathway map にマッピングした結果の一部を図4に示す。絶食開始後2日目に多くの解糖系関連酵素の発現量低下があり、以降は発現量が増加する傾向にあった。ペプチドーム解析およびプロテオーム解析の結果から、fructose bisphosphate aldolase は絶食開始後2日目までに分解亢進によって発現量が低下し、絶食開始後10日目にはターンオーバーの活性化が考えられる。

る。また、解糖系における律速酵素の1つである phosphofructokinase の発現量が絶食開始2日目から比較的高く維持されていた。絶食時のカンパチ骨格筋では、主なエネルギー源であるアミノ酸の供給不足に応じて解糖系が積極的に活用される可能性が考えられる。

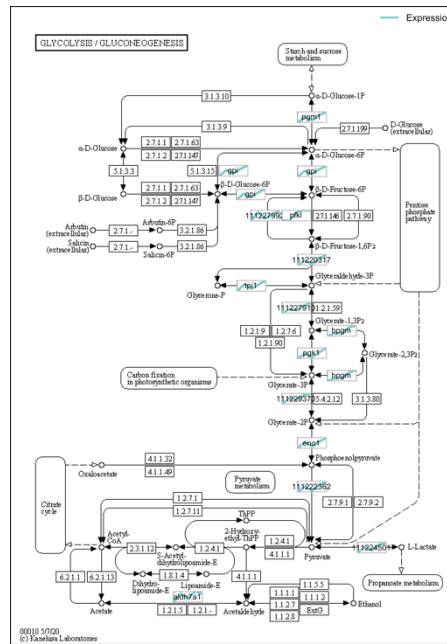


図4 プロテオーム解析結果

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Desamero Mark Joseph, Kakuta Shigeru, Tang Yulan, Chambers James Kenn, Uchida Kazuyuki, Estacio Maria Amelita, Cervancia Cleofas, Kominami Yuri, Ushio Hideki, Nakayama Jun, Nakayama Hiroyuki, Kyuwa Shigeru	4. 巻 9
2. 論文標題 Tumor-suppressing potential of stingless bee propolis in in vitro and in vivo models of differentiated-type gastric adenocarcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 19635
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-55465-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kominami Yuri, Nakakubo Hiroki, Nakamizo Ryoko, Matsuoka Yoko, Ueki Nobuhiko, Wan Jianrong, Watabe Shugo, Ushio Hideki	4. 巻 68
2. 論文標題 Peptidomic Analysis of a Disintegrated Surimi Gel from Deep-Sea Bonefish <i>Pterothrissus gissu</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Agricultural and Food Chemistry	6. 最初と最後の頁 12683 ~ 12691
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jafc.0c04427	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yuan Xiao, Nakao Tomohiko, Satone Hina, Ohara Kazuyuki, Kominami Yuri, Ito Miho, Aizawa Teruki, Ueno Tomoya, Ushio Hideki	4. 巻 12
2. 論文標題 The Effects of Brown Algae-Derived Monosaccharide L-Fucose on Lipid Metabolism in C57BL/6J Obese Mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 3798 ~ 3798
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/nu12123798	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Lee Cheng-Linn, Kominami Yuri, Ushio Hideki	4. 巻 6
2. 論文標題 Mechanism of Delayed Convulsion in Fish: The Actions of Norepinephrine in Spinal Cord	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Fishes	6. 最初と最後の頁 12 ~ 12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/fishes6020012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kominami Yuri、Hayashi Tatsuya、Tokihiro Tetsuji、Ushio Hideki	4. 巻 3
2. 論文標題 Peptidomic analysis characterising proteolysis in thaw-aging of beef short plate	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Food Chemistry: Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 100051 ~ 100051
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.fochms.2021.100051	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件(うち招待講演 1件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 森村健人, 舘野龍平, 上林将大, 小南友里, 渡邊壮一, 浅川修一, 潮秀樹, 壁谷尚樹, 芳賀穰, 佐藤秀一, 山下倫明, 廣川祐介, 南隆之
2. 発表標題 フェルラ酸によるカンパチの成長遅滞の改善
3. 学会等名 日本水産学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小南友里
2. 発表標題 食品加工プロセス研究におけるプロテオミクスの活用
3. 学会等名 日本プロテオーム学会大会(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中尾友彦, 小南友里, YUAN Xiao, 潮秀樹, 伊東美保, 相澤光輝, 久保村大樹, 赤堀雄介
2. 発表標題 フコースがマウス脂肪細胞のトランスクリプトームに及ぼす影響
3. 学会等名 日本農芸化学学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中尾友彦 , 小南友里 , YUAN Xiao , 潮秀樹 , 伊東美保 , 相澤光輝 , 久保村大樹 , 赤堀雄介
2. 発表標題 マウス脂肪細胞における単糖6-デオキシ-L-ガラクトースの脂肪蓄積抑制効果
3. 学会等名 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

〔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
---------	---------