

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月6日現在

機関番号：82708

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22780195

研究課題名（和文）魚類の胚発生におけるタンパク質分解系の生理的意義

研究課題名（英文）Physiological function of protein degradation pathway during fish development

研究代表者

今村 伸太郎 (IMAMURA SHINTARO)

独立行政法人水産総合研究センター・中央水産研究所水産物応用開発研究センター・主任研究員

研究者番号：80510007

研究成果の概要（和文）：魚類の胚発生におけるタンパク質分解経路の生理的な役割の解明を目指した。魚類胚は栄養飢餓適応、回遊行動および環境ストレス応答においてタンパク質分解系を介する生理機能を発揮し、恒常性を維持することを見いだした。特に、分子シャペロンである CDC48 タンパク質はタンパク質分解系であるユビキチン・プロテアソーム系および自食作用（オートファジー）を制御し、正常な胚発生に必須であることを見いだした。

研究成果の概要（英文）：The role of protein degradation pathway during fish development was characterized. Larval fish had physiological functions through protein degradation pathway against nutritional adaptation, migratory behavior and adaptation to environmental stresses. Molecular chaperone CDC48 protein regulated both ubiquitin-proteasome system and autophagy, and was essential for neurodevelopment.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産化学

キーワード：オートファジー、ユビキチン・プロテアソーム、ゼブラフィッシュ、胚発生

1. 研究開始当初の背景

自食作用（オートファジー）とは、不要な細胞小器官、タンパク質および脂質をオートファゴソームと言われる膜構造で包み込み、

リソソームへ運搬し分解するタンパク質分解系である（図1参照）。オートファジーは栄養飢餓条件下においてエネルギーを産生

することから生存に必須であり、酵母から脊椎動物まで進化的に共通した機構である。近年の研究からオートファジーの多様な生理および病態生理学的意義が明らかになりつつある。飢餓適応のみならず、細胞内の品質管理、神経変性疾患、感染制御、抗原提示、心疾患および癌等との関わりが注目されている。オートファジー誘導に必要なタンパク質 autophagy-related proteins (ATG5 および ATG7) のノックアウトマウスは生後致死となるが、その理由はエネルギー産生または新規タンパク質合成が正常に行われなためであると推定されている。本研究は魚類の胚発生におけるオートファジーの役割を解明するために、蛍光タンパク質 (GFP) とオートファゴソーム膜タンパク質 (MAP1-LC3B) を融合した遺伝子導入魚 (GFP-LC3) を用いて発生過程に誘導されたオートファゴソームを可視化して、オートファジーによるタンパク質分解を解析する技術の活用を目指した (図2 参照)。

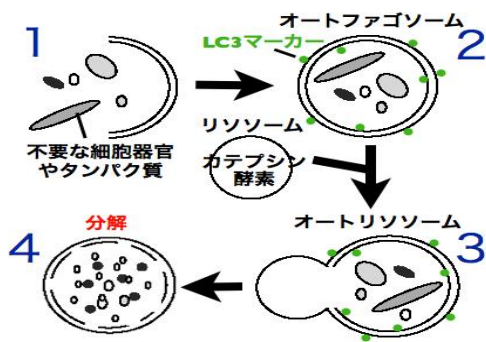


図1 オートファジーの膜動態 (タンパク質がオートファゴソームに包まれ、リソソーム内の酵素で分解されるタンパク質分解機構)

このような新しい動物モデルは、魚類の卵成熟から胚発生における以下の現象の解析に利用できると考えられた (図2 参照)。

①サケ、アユ、イカ等では成熟後期の成体は摂餌を抑制し、産卵後死亡する (成熟、卵・精子形成)

②受精卵は母体外で発生し、卵黄タンパク質から栄養を吸収する (発生、卵黄吸収)

③浮遊性仔魚は遊離アミノ酸生成によって浸透圧調節し、日周移動を行っている (日周移動)

④卵黄吸収から摂餌の切換え時の栄養飢餓耐性 (栄養飢餓適応)

⑤発生期における各種ストレス (酸化、低温、水質等) に対する防御適応反応 (ストレス応答)

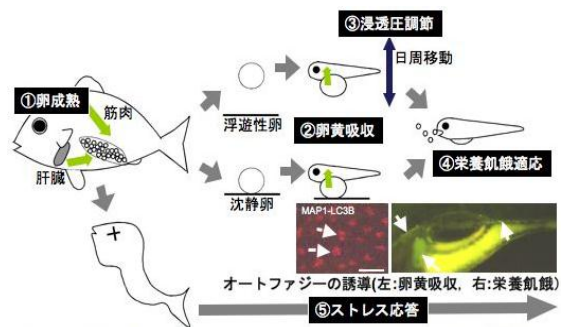


図2 魚類胚発生におけるオートファジーの多様な生理機能

このように魚類は、海洋環境に適応するため、オートファジーに基づく生理機能を有していると考えられた。担当者はこれまでの研究から、サケ、クロマグロ、サバ類、マアジ、外洋性イカ類等の成熟個体において、筋肉中でオートファジーが活性化し、筋肉での異常なタンパク質分解が誘導される現象を観察した。また、初期胚において、温度、酸化およびDNA損傷等に関わるストレスに対してオートファジーが防御作用を有する現象を見出している。このように、初期発生におけるオートファジーの多様な役割が推定された。そこで、栄養成分の吸収やストレス応答などの生理的機能に対するオートファジー誘導の分子機構を明らかにする必要がある。

2. 研究の目的

魚類の受精卵・仔魚期は、生活史のなかで致死率が最も高い時期であり、好適な栄養お

よび環境が後の生残に大きく影響する。受精卵は母体外で卵黄タンパク質を分解し、遊離アミノ酸を栄養源として利用する。浮遊性仔稚魚はアミノ酸を生成することによって浸透圧調節を行う。また、卵黄吸収から摂餌の切り替わり時に自らの組織を分解して生き延びる。これらの適応機構にはタンパク質分解系であるユビキチン・プロテアソーム系およびオートファジーが密接に関与していることが考えられた。本研究では、魚類の胚発生でのタンパク質分解経路におけるオートファジーの必須性およびその調節機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 魚類初期発生におけるタンパク質分解経路の役割

受精卵の卵黄タンパク質はリソソーム分解酵素によって分解されることが分かっているが、オートファジー活性化の組織及び発生段階特異性、ユビキチン・プロテアソーム分解系との役割分担については未解明な問題が多い。そこで、発生段階ごとにオートファジー活性化をGFP-LC3ゼブラフィッシュを用いて解析した。また、オートファジー活性化はLC3抗体を用いたウエスタンブロット法で定量した。さらに、細胞分裂周期遺伝子CDC48はユビキチン・プロテアソーム系を亢進し、ユビキチン・プロテアソーム系が正常に機能しない場合にオートファジーを活性化し、恒常性を維持する作用があることが報告されていることから、この分子に着目して、発生におけるタンパク質分解経路の重要性をCDC48遺伝子の翻訳阻害によって解析した。

(2) オートファジー活性化と浸透圧調節機構

浮遊性仔稚魚は遊離アミノ酸生成によっ

て浸透圧調節し、日周移動を行っている。この遊離アミノ酸産生機構を調べるために、LC3抗体を用いたウエスタンブロット法によってオートファジーの誘導を調べた。オートファジー誘導機構には光量が関係している可能性がある。そこで、ヒラメ受精卵に光を照射し、オートファジーの誘導および遊離アミノ酸量の変化を調べた。また、光量に対して浸透圧がどのように変化するか比重を調べた。

(3) ストレス応答におけるオートファジーの防御適応反応

初期発生は体を形成する上で重要な期間であり、ストレスを軽減する必要がある。そこで、外因性ストレスである酸化、放射線、低温に対して、オートファジーの生理的役割を解明するために、GFP-LC3ゼブラフィッシュを用いてオートファジーの誘導性を明らかにし、仔稚魚の内在性ストレス発生の度合いをバイオマーカーによって検出した。

4. 研究成果

(1) 魚類胚発生におけるユビキチン・プロテアソーム系とオートファジーの役割を解明することを目的とした。オートファジー可視化魚を用いて、卵黄吸収及び栄養移行時期の体内でのオートファジー活性化部位を観察した結果、受精後発生段階が進むに従って少しずつ活性化し、給餌開始時期（受精後4～5日）に摂餌できない場合、急激に活性が上昇することが分かった。一方、給餌が開始された場合、活性化は起こらなかった。また、体内のアミノ酸量が低下することが分かった。以上から仔魚の栄養飢餓適応はオートファジーを介したアミノ酸生成が重要であると考えられた。

ユビキチン・プロテアソーム系を調節す

る分子として CDC48 の発生段階における役割を解析した (図 3)。

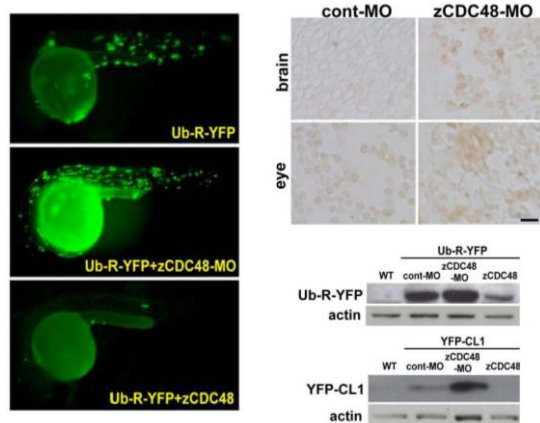


図 3 CDC48 によるユビキチン化タンパク質の分解 (Ub-R-YFP:ユビキチン化タンパク質, cont-MO:コントロール, zCDC48-MO:翻訳阻害)

ゼブラフィッシュ胚において CDC48 の翻訳阻害を行うと発生致死, 神経発生の異常, ポリユビキチン化されたタンパク質が神経細胞に蓄積した (図 3)。生体内でユビキチン化タンパク質の蓄積を可視化できるバイオアッセイ系を構築した。この遺伝子の翻訳阻害を行うと, ユビキチン化された蛍光タンパク質が生体内で分解されずに蓄積することが蛍光観察および蛍光タンパク質に対する抗体によるウェスタンブロット法で明らかになった (図 3)。様々な変異を加えた発現系でレスキュー試験から, CDC48 の ATPase 活性が神経発生において重要であることが分かった。この結果から, ユビキチン・プロテアソーム系によるタンパク質分解も胚発生に必須であることが明らかになった。

以上から栄養吸収および神経発生において, ユビキチン・プロテアソーム系およびオートファジーは重要な役割を持つことを見いだした。

(2) 海産魚の浮遊性卵は日周運動として垂直分布が変化することが知られており, 浮力調節は生存適応戦略に関わる重要な生理機

能であると考えられる。仔稚魚は卵黄タンパク質の分解によって生じたアミノ酸を浸透圧調節に利用することが明らかにされている。そこで, ヒラメ受精卵に光 (400-4300 Lux) を照射し, オートファジーの誘導性および遊離アミノ酸量の変化を調べた。ヒラメ仔魚は光および紫外線照射によって体内の浸透圧および遊離アミノ酸量が上昇し, オートファジーが誘導された。仔魚の比重 (NBS) は, 非照射区では孵化直後までは低く, 孵化 20 時間後に上昇したが, 光照射によって孵化直前から孵化 20 時間後まで上昇し, 光に対する応答は発生段階特異的であることが分かった。オートファジーに関わるリソソーム分解系の阻害剤ロイペプチン, E-64 およびバフィロマイシン A1 を飼育水中に投与すると光照射に関わらず比重の低下が見られた。また, オートファジーを活性化するラパマイシンを添加すると比重が増加した。これらの反応は c-Jun N-terminal kinase (JNK) 阻害剤 SP600125 によって濃度依存的に抑制されたことから, JNK を介するシグナルによってオートファジーが活性化されることが明らかになった。以上からヒラメ仔魚は光応答性オートファジーによって浮力調節を行っていることが明らかになった。

(3) ゼブラフィッシュ卵の受精直後および胚発生期には内在性の活性酸素種が生成されることを蛍光プローブで検出した。この活性酸素種が胚発生にどのような影響を与え, 防御機構を有しているのか明らかにするために, 胚に過酸化水素を投与した。その結果, 過酸化水素処理によってゼブラフィッシュ胚でオートファジーが活性化されることを GFP-LC3 ゼブラフィッシュを用いて観察した。アンチセンスを用いてオートファジーを誘導するタンパク質の翻訳を阻害すると酸化ストレスに対する感受性

が上昇し、発生異常を起こした。これは体内の酸化タンパク質の蓄積と酸化 DNA 発生による染色体異数性が原因であることが分かった。

CDC48 はユビキチン化タンパク質のプロテアソーム系によるタンパク質分解を促進する分子シャペロンであるが、オートファゴソームの生合成を促し、ユビキチン化タンパク質の分解を補完する分子機構が推定された。そこで、ストレス条件下でのオートファジー活性化における CDC48 の役割を調べた。魚類胚に DNA 損傷ストレスを与えると CDC48 がリン酸化され、この分子が複合体を形成し、オートファジーが活性化される分子機構を見いだした。ゼブラフィッシュ胚に 0.1-8 Gy の γ 線 (セシウム-137) を照射し、CDC48 のリン酸化 Ser-784 特異抗体を用いて検出した結果、線量依存的に Ser-784 がリン酸化された。CDC48 を免疫沈降し、SDS-PAGE で泳動したところ、CDC48 結合因子が特定された。アンチセンスモルフオリノオリゴにより CDC48 の翻訳を阻害すると、 γ 線照射胚の頭部および眼で萎縮が生じ、神経組織でアポトーシスが誘導された。GFP-LC3 ゼブラフィッシュを用いると、線量依存的に GFP-LC3 が脳および眼で観察された。V 型 ATP アーゼ阻害剤バフィロマイシン A1 (0.1 μ M) を投与すると、 γ 線照射によって脳および眼でのアポトーシス誘導が増強された。さらに、CDC48 の阻害によってオートファジー誘導が抑制され、神経組織においてポリユビキチン化タンパク質が蓄積した。以上の結果から、CDC48 Ser-784 のリン酸化と複合体形成によって、ポリユビキチン化タンパク質のオートファジーによる分解を促進し、神経細胞でのアポトーシスを抑制する分子機序を明らかにした。

低温ストレス条件下では、CDC48 の翻訳阻害によって発生の遅延が生じることを見いだした。CDC48 には低温条件下で生じる神経細胞での細胞死を抑制し、ユビキチン化タンパク質の分解を促進する作用があることを見いだした。低温条件下ではオートファゴソームの形成に異常が見られ、オートファジーの基質である p62 タンパク質が蓄積したことから、オートファジーが正常に機能していないことが示唆された。以上から、低温条件下ではユビキチン・プロテアソーム系がより重要な役割を持つことが考えられた。

本課題では、魚類の胚発生におけるタンパク質分解経路におけるオートファジーの役割を見出した。海洋における仔稚魚の生残および成長は、捕食者からの逃避行動、栄養状態の良否、生育環境の適合などが影響することが Houde によって示唆されている (Houde E. D., Am. Fish. Soc. Symp., 2, 17-29, 1987)。本課題では魚類の発生段階におけるタンパク質分解経路、特にオートファジーが、栄養飢餓適応、環境ストレスに対する生物応答および日周鉛直運動による行動制御において重要な役割を果たすことを明らかにした。このように、オートファジーは、海洋環境での生存適応戦略を担う重要な生理機能である。Houde が提唱するモデルに密接に関わっている。

魚類におけるオートファジー誘導経路において、これまでユビキチン・プロテアソーム経路の主要因子と考えられていた CDC48 が関与し、オートファジー誘導機構の引き金として作用することが推定された。今後、この分子がユビキチン化、リン酸化、タンパク質分解などの制御機構を介して、環境適応に関与する分子機序を明らかにする。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

①今村伸太郎, 藪健史, 山下倫明, Protective role of cell division cycle 48 (CDC48) protein against neurodegeneration via ubiquitin-proteasome system dysfunction during zebrafish development. The Journal of Biological Chemistry, 査読あり, 2012, 287 巻, 27 号, 23047-23056

[学会発表] (計10件)

①今村伸太郎, 藪健史, 石原賢司, 山下由美子, 山下倫明, 低線量放射線による CDC48 を介するオートファジーの活性化, 日本水産学会大会, 2013

②今村伸太郎, 藪健史, 山下倫明, Role of molecular chaperone CDC48 via the proteasome and autophagy during zebrafish neurodevelopment, The 6th International Symposium on Autophagy 2012, 国際学会, 2012

③今村伸太郎, 藪健史, 山下倫明, Protective roles for ubiquitin selective chaperone CDC48 protein on developmental retardation, oxidative stress, and apoptosis in cold adaptation in zebrafish, マリンバイオテクノロジー国際学会, 国際学会, 2012

④今村伸太郎, 藪健史, 山下倫明, Essential role of the ubiquitin-selective chaperone CDC48 in a poikilothermic vertebrate in cold adaptation, Experimental Biology 2012 学会, 国際学会, 2012

⑤今村伸太郎, 藪健史, 石原賢司, 山下倫明, 低温適応における細胞分裂周期遺伝子 CDC48 の分子シャペロン機能, 日本水産学会大会, 2012

⑥今村伸太郎, 藪健史, 山下倫明, ゼブラフィッシュ神経発生におけるユビキチン・プロテアソーム系およびオートファジーを介した CDC48 の分子シャペロン機能, 第84回日本生化学会大会, 2011

⑦今村伸太郎, 藪健史, 山下倫明, Protective function of autophagy against oxidative stress in zebrafish, Experimental Biology 2011, 国際学会, 2011

⑧鈴木道子, 今村伸太郎, 木宮隆, 木村メイコ, 平岡芳信, 高温順化によるオートファジー活性化の生理的意義, 日本水産学会大会, 2010

⑨今村伸太郎, 藪健史, 山下倫明, オートファジーによる酸化ストレス耐性のメカニズム, 日本分子生物学会年会 日本生化学会大会合同大会, 2010

⑩今村伸太郎, 山下倫明, Role of autophagy under oxidative stress in zebrafish models, The zebrafish embryo model in toxicology and teratology, 国際学会, 2010

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ベストプレゼンテーション賞・The American Society for Biochemistry and molecular Biology, 今村伸太郎, 藪健史, 山下倫明, Protective function of autophagy against oxidative stress in zebrafish, Experimental Biology 2011 学会, 2011

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今村 伸太郎 (IMAMURA SHINTARO)

独立行政法人・水産総合研究センター・中央水産研究所・水産物応用開発研究センター・主任研究員

研究者番号: 80510007

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし