

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08058

研究課題名(和文) 肉用鶏の浅胸筋肥大の特異性をモデルとしたオートファジー系タンパク質分解制御の解明

研究課題名(英文) Regulation of autophagy in the skeletal muscle of broiler chickens

研究代表者

中島 一喜 (NAKASHIMA, Kazuki)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・畜産研究部門・上級研究員

研究者番号：70370583

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、鶏の骨格筋を用いて、オートファジーの制御機構を転写レベル(オートファジー関連遺伝子発現)ならびに翻訳後の修飾レベル(LC3タンパク質の脂質化)で検討した。肉用鶏の浅胸筋において、オートファジーは、絶食により転写レベルでは差はなく、翻訳後の修飾レベルで増加した。肉用鶏と卵用鶏の浅胸筋の比較では、オートファジーは、転写レベルで肉用鶏が卵用鶏に比べて高くなったが、翻訳後の修飾レベルでは差がなかった。鶏培養筋管細胞のオートファジーは、mTOR阻害により転写レベルでは差はなく、翻訳後の修飾レベルで増加した。鶏骨格筋のオートファジーは、翻訳後の修飾レベルでの制御が重要であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、骨格筋におけるオートファジー系タンパク質分解に対し肉用鶏の浅胸筋の特異性をモデルに検討し、鶏培養筋肉細胞を用いて、オートファジー系タンパク質分解の制御機構の一端を明らかにした。オートファジーが食肉生産に直結する骨格筋のタンパク質量を制御している可能性は非常に高い。骨格筋のオートファジーによるタンパク質分解の調節機構に関する一連の研究は、家畜の栄養生理学的研究の深化に大きく寄与するだけでなく、骨格筋タンパク質分解を制御する新しい栄養生理学的制御技術の開発に資するものである。また、食肉の生産性向上や飼養管理技術の改善など、畜産業界に大きく貢献していくものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The present study addressed the role of autophagy process (at the transcriptional and at the post-translational modification levels) in the skeletal muscle of chickens. Food deprivation induced autophagy at the post-translational modification (lipidation of LC3 protein) but not at the transcriptional (autophagy-related gene expression) levels in the pectoralis muscle of broiler chickens. In the pectoralis muscle of broiler and layer chickens, there were no differences at the post-translational modification levels. However, the expression of autophagy-related gene was higher in the skeletal muscle of broilers than in the layers. mTOR inhibitor induced autophagy at the post-translational modification but not at the transcriptional levels in cultured chick myotubes. These results suggested that autophagy at the post-translational modification is an important cellular process for protein degradation in the skeletal muscle of chicken.

研究分野：家畜栄養学・家畜生理学

キーワード：肉用鶏 タンパク質分解 骨格筋 オートファジー アトロジン-1

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 肉用鶏における最大の目的は鶏肉タンパク質の生産であり、正味のタンパク質生産量はタンパク質の合成量と分解量の差である。骨格筋におけるタンパク質合成と分解の制御が可能になれば、正味のタンパク質生産量が増加し、効率的な鶏肉生産技術の開発につながる。したがって、肉用鶏の生産物である骨格筋のタンパク質の合成と分解の制御機構を明らかにすることは、家禽生産において極めて重要な研究である。

(2) 細胞内タンパク質分解経路は、主にユビキチン-プロテアソーム系とオートファジー系の2つが存在する。これまで、鶏骨格筋タンパク質分解にユビキチン-プロテアソーム系のタンパク質分解に関与するユビキチンリガーゼのアトロジン-1 遺伝子が様々な栄養ならびに生理条件下における重要な役割を果たしていることを明らかにしている。一方、バルク (大規模かつ非選択) のタンパク質分解に関与するオートファジー系のタンパク質分解に関しては、鶏骨格筋においては、十分に検討されていない。骨格筋の筋原線維を構成する構造タンパク質であるミオシンやアクチンはタンパク質の大半を占めるため、骨格筋量に大きく寄与している。この構造タンパク質はオートファジー系で分解される。そこで、構造タンパク質の分解に関与するオートファジー系の制御機構を明らかにすることは、さらなる食肉生産において重要な研究である。

(3) 肉用鶏の浅胸筋重量は、他の骨格筋に比べて特異的に増大する。また、肉用鶏は卵用鶏と比べて成長が速く、浅胸筋重量も大きい。これらの肉用鶏の浅胸筋増大の特異性は、他の骨格筋に比べて、タンパク質合成速度よりも、タンパク質分解速度が低いことに起因していることが知られている。これらの現象は、肉用鶏においては骨格筋量の大きさや、成長の速さ、飼料効率の良さを基準に個体の選抜が繰り返された結果、骨格筋、特に、浅胸筋において特異的なタンパク質分解制御機構が存在する可能性を示している。そこで、肉用鶏の浅胸筋においてオートファジー系のタンパク質分解に関与している可能性があり、また、制御機構を明らかにする必要がある。

(4) 鶏骨格筋におけるユビキチン-プロテアソーム系のアトロジン-1 の生化学的、栄養生理学的機能は数多く報告されつつあるが、オートファジー系のタンパク質分解に関与する遺伝子ならびにタンパク質の制御機構については十分に検討されていない。そこで、本研究では、肉用鶏の浅胸筋の特異的増大をモデルに用い、オートファジー系のタンパク質分解に関与する因子の制御機構を解明し、新たな鶏骨格筋タンパク質代謝制御技術の確立において基礎となる研究を計画した。

2. 研究の目的

細胞内タンパク質は、半減期の長さによって短寿命タンパク質と長寿命タンパク質の2つに分類できる。酵素や転写因子などの短寿命タンパク質はユビキチン-プロテアソーム系で分解される。一方、骨格筋の構造タンパク質であるミオシンやアクチンはオートファジー系で分解される。

肉用鶏の骨格筋の種類 (浅胸筋、大腿二頭筋、腓腹筋、ヒラメ筋) において絶食に対するアトロジン-1 の発現への影響の違いを調べ、浅胸筋で発現が最も低いことを明らかにしている (Nakashima and Ishida, 2015)。また、肉用鶏と卵用鶏における骨格筋の成長速度の違いをモデルに骨格筋タンパク質分解を分子レベルで検討するため、タンパク質分解関連遺伝子発現について検討した。その結果、肉用鶏に比べ、卵用鶏でユビキチン-プロテアソーム系の律速酵素であるアトロジン-1 遺伝子の発現が高かった (Nakashima et al, 2009)。しかしながら、鶏において、骨格筋におけるオートファジーの研究は十分に検討されていない。オートファジーに関して、電子顕微鏡観察によるオートファゴソームの形成を確認する必要があり、オートファジーの定量化が不可能であった。しかしながら、近年、ウエスタンブロット法により、Microtubule-associated protein light chain 3 (LC3)-I が脂質修飾された LC3-II への変化を調べることで、オートファゴソーム形成によるオートファジーの定量化が可能である。また、哺乳類の骨格筋においてオートファジー関連遺伝子が次々に明らかにされつつある。しかしながら、鶏骨格筋におけるこれらオートファジー関連遺伝子についての知見はない。

そこで、本研究では肉用鶏の浅胸筋のタンパク質分解の特異性をモデルにオートファジー系のタンパク質分解関与を検討すると同時に、鶏培養筋肉細胞系を用い、詳細な鶏骨格筋オートファジー系のタンパク質分解制御機構の明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 肉用鶏 (ブロイラー) の骨格筋間 (浅胸筋、大腿二頭筋、腓腹筋、ヒラメ筋) でオートファジー系のタンパク質分解について検討した。鶏ヒナを24時間絶食後、骨格筋 (浅胸筋、大腿二頭筋、腓腹筋、ヒラメ筋) を採取し、RNAを抽出後、リアルタイムPCR法でオートファジー関連遺伝子 (LC3B、GABA (A) receptor-associated protein like 1 (GABARAPL1)、autophagy-related 12 (ATG12)) の発現量を測定した。また、絶食による鶏骨格筋のユビキチン-プロテアソーム系の律速酵素であるアトロジン-1 遺伝子発現についても調べた。オートファジーは、まず、オートファゴソーム形成が重要であり、LC3タンパク質の翻訳後の脂質修飾されることで開始される。そこで、このLC3タンパク質の翻訳後修飾 (脂質の修飾) をウエスタンブロット法を用いて検討し、オートファジーの肉用鶏の骨格筋間のタンパク質分解速度の違いが、オートフ

ファジー系のタンパク質分解が、LC3 タンパク質の翻訳後の修飾により制御されているかを調べた。

(2) 肉用鶏（ブロイラー）と卵用鶏（レイヤー）の浅胸筋におけるオートファジー系タンパク質分解について検討した。自由摂取させた14日齢の卵用鶏ならびに肉用鶏の浅胸筋を採取し、RNAを抽出後、リアルタイムPCR法でオートファジー関連遺伝子（LC3B、GABARAPL1、ATG12）の発現量を測定した。また、レイヤーならびにブロイラーの浅胸筋において、ユビキチン-プロテアソーム系の律速酵素であるアトロジン-1 遺伝子発現についても調べた。オートファゴソーム形成の指標であるLC3 タンパク質の翻訳後修飾（脂質の修飾）をウエスタンブロット法にて検討し、オートファジーの肉用鶏と卵用鶏の骨格筋タンパク質分解速度の違いが、オートファジー系のタンパク質分解の翻訳後の修飾により制御されているかを調べた。

(3) 鶏骨格筋特異的なオートファジーの詳細な機構を調べるため、*in vitro* で、鶏培養筋管細胞とオートファジーに関与する阻害剤を用いて検討した。鶏培養筋管細胞を各種阻害剤（を添加した培地で培養し、オートファジーのマーカーをウエスタンブロット法にて測定した。オートファジーは、オートファゴソーム形成時にLC3 タンパク質の翻訳後の修飾が重要であることから、LC3 タンパク質の翻訳後修飾（脂質の修飾）をマーカーとして用いて調べた。鶏培養筋管細胞から、RNAを抽出後、リアルタイムPCR法でオートファジー関連遺伝子（LC3B、GABARAPL1、ATG12）の発現量を測定した。また、ユビキチン-プロテアソーム系の律速酵素であるアトロジン-1 遺伝子発現についても調べた。さらに、オートファジーを制御していると考えられているmechanistic Target of Rapamycin (mTOR) シグナリングについても検討した。mTOR シグナリングは、mTOR のターゲットタンパク質であるS6 ribosomal protein kinase 1 (S6K1)、S6 ribosomal proteinならびにeukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1 (4E-BP1) のリン酸化を測定して評価した。

4. 研究成果

(1) 肉用鶏（ブロイラー）の浅胸筋の特異的な増大をモデルに用い、オートファジー系のタンパク質分解に対する絶食の影響を骨格筋間で比較した。絶食によるタンパク質分解速度は、赤筋に比べ、白筋が速いことが知られている。肉用鶏の骨格筋間（浅胸筋、大腿二頭筋、腓腹筋、ヒラメ筋）におけるオートファジー系タンパク質分解制御について検討した。さらに、ユビキチン-プロテアソーム系のアトロジン-1 の発現に対する影響についても検討した。その結果、肉用鶏の浅胸筋は、他の骨格筋に比べ、オートファジーの翻訳後修飾レベル（オートファゴソーム形成）での指標であるLC3-II/LC3-I比（LC3 タンパク質の脂質修飾）が高かった。これは、摂食時において、浅胸筋は、他の骨格筋に比べ、オートファジーが促進していることを示している。LC3-II/LC3-I比は絶食により、浅胸筋、大腿二頭筋、腓腹筋、ヒラメ筋において増加した。これは、鶏骨格筋は、絶食により翻訳後修飾レベルでオートファジーが促進されることを示している。絶食によりオートファジー関連遺伝子であるLC3Bの発現は、ヒラメ筋のみ増加した。一方、GABARAPL1の遺伝子発現は、浅胸筋のみ増加した。ATG12発現には差は見られなかった。これらの結果から、鶏骨格筋において、絶食によるオートファジーの促進は、転写レベルより、翻訳後修飾レベルで制御されていると考えられた。また、オートファジー遺伝子発現は、骨格筋間で異なることが示唆された。骨格筋ユビキチン-プロテアソーム系のアトロジン-1の発現は、ヒラメ筋>腓腹筋>大腿二頭筋>浅胸筋の順で高かった。また、絶食により各骨格筋のアトロジン-1遺伝子の発現は増加し、大腿二頭筋>腓腹筋>ヒラメ筋>浅胸筋の順で高くなった。これらの結果から、肉用鶏の骨格筋において、ユビキチン-プロテアソーム系とオートファジー系のタンパク質分解は異なった制御機構が存在する可能性が示唆された。

(2) 肉用鶏（ブロイラー）と卵用鶏（レイヤー）の浅胸筋を用い、オートファジー系タンパク質分解制御機構を遺伝子発現レベルならびに翻訳後修飾レベルで検討した。さらに、ユビキチン-プロテアソーム系の律速酵素であるアトロジン-1の発現に対する影響についても検討した。その結果、卵用鶏ならびに肉用鶏の浅胸筋におけるオートファジーの翻訳後修飾レベル（オートファゴソーム形成）の指標であるLC3-II/LC3-I比（LC3 タンパク質の脂質修飾）に有意な差は見られなかった。肉用鶏ならびに卵用鶏の浅胸筋におけるオートファジー関連遺伝子LC3Bの発現量は、卵用鶏に比べ、肉用鶏で高くなる傾向が見られた。また、オートファジー関連遺伝子のGABARAPL1ならびにATG12の遺伝子発現は、卵用鶏に比べ、肉用鶏で有意に高くなった。ユビキチン-プロテアソーム系の律速酵素であるアトロジン-1 遺伝子発現量は、卵用鶏に比べ、肉用鶏で有意に低くなった。これらの結果から、オートファジー関連遺伝子の発現は、卵用鶏に比べ、肉用鶏で有意に高いにもかかわらず、翻訳後修飾レベルでは差がないことが明らかになった。また、肉用鶏と卵用鶏の浅胸筋重量ならびにタンパク質分解速度の差は、ユビキチン-プロテアソーム系のタンパク質分解が関与している可能性が高いことが示唆された。

(3) 鶏骨格筋特異的なオートファジー系のタンパク質分解機構を明らかにするため、鶏培養筋管細胞を用いて、培地に各種阻害剤を添加し検討した。また、ユビキチン-プロテアソーム系の遺伝子であるアトロジン-1の発現に対する影響についても比較検討した。その結果、鶏筋管細胞をオートファジー過程におけるオートファゴソームとリソソームの融合の阻害剤を添加して

培養すると、オートファジーの翻訳後修飾レベル（オートファゴソーム形成）の指標である LC3-II/ LC3-I 比（LC3 タンパク質の脂質修飾）は増加し、オートファジー関連遺伝子である LC3B 発現は減少した。一方、GABARAPL1 ならびに ATG12 の遺伝子発現には、影響は見られなかった。また、アトロジン-1 の発現にも影響は見られなかった。次に、栄養センサーであり、オートファジーを制御している mTOR の阻害剤を添加して培養すると、S6K1、S6 ribosomal protein ならびに 4E-BP1 タンパク質のリン酸化が減少し、mTOR 活性の阻害を確認した。また、鶏培養筋管細胞において、mTOR の阻害は、LC3-II/ LC3-I 比ならびにアトロジン-1 の遺伝子発現は増加させたが、オートファジー関連遺伝子の発現には、影響は見られなかった。オートファジー関連遺伝子ならびにアトロジン-1 の発現を調節している Forkhead box O (FOXO) 転写因子の阻害剤を添加して培養すると、LC3B ならびにアトロジン-1 の遺伝子発現は減少したが、GABARAPL1 ならびに ATG12 の遺伝子発現には、影響は見られなかった。また、LC3-II/ LC3-I 比にも影響は見られなかった。プロテアソームの活性阻害剤を添加して培養すると LC3B ならびにアトロジン-1 の発現は減少したが、GABARAPL1 ならびに ATG12 の遺伝子発現には、影響は見られなかった。また、LC3-II/ LC3-I 比にも影響は見られなかった。以上の結果から、鶏骨格筋において、オートファゴソームとリソソームの融合を阻害すると、LC3 タンパク質の脂質化が増加し、オートファジー関連遺伝子の発現は減少すること、mTOR がオートファジーならびにユビキチン-プロテアソーム系の両方を制御していること、また、FOXO 転写因子は、ユビキチン-プロテアソームとオートファジーの関連遺伝子発現を調節しているが、オートファジーの翻訳後修飾レベルでは関与していないこと、さらに、プロテアソーム活性を阻害するとオートファジーならびにユビキチン-プロテアソームの関連遺伝子の発現が減少するが、オートファジーの翻訳後修飾レベルでは影響を及ぼさない可能性が示唆された。

<引用文献>

Nakashima K and Ishida A. Response of atrogen-1/MAFbx expression in various skeletal muscles to fasting in broiler chickens. *Journal of Poultry Science*. 52: 217-220. 2015.

Nakashima K, Ishida A, and Katsumata M. Comparison of proteolytic-related gene expression in the skeletal muscles of layer and broiler chickens. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 73: 1869-1871. 2009

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 Kazuki Nakashima and Aiko Ishida	4. 巻 57
2. 論文標題 Regulation of Autophagy in Chick Skeletal Muscle: Effect of mTOR Inhibition	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Poultry Science	6. 最初と最後の頁 77-83
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2141/jpsa.0190008	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
研究協力者	石田 藍子 (ISHIDA Aiko)		