

魚類細胞におけるストレス誘発オートファジー 魚類細胞におけるストレスによって誘発されるオートファジーの観察

藪 健史*・山下倫明*

Observation of Stress-Induced Autophagy in Fish Cells

Takeshi YABU* and Michiaki YAMASHITA*

Abstract Starvation is one of important stress conditions that cause various physiological dysfunctions and deteriorate fish quality as a food. Here, we developed a biomarker to detect the state of stress and/or starvation in fish and cultured cells. In particular, we focused on the autophagic pathway that forms autophagic vacuoles, *i.e.* autophagosomes, in the starved cells by the withdrawal of amino acids from culture medium. The autophagy has been characterized to be an apoptotic pathway induced by stress conditions, such as starvation, heat shock and hypoxia, followed by intracellular protein degradation (bulk degradation) differs from the ubiquitin-proteasome system. We used fish cultured cells as a model to evaluate the influence and the degree of biochemical changes by heat stress and amino acids starvation. A microtubule binding protein that localized in autophagosome membranes can be used as a molecular marker for induction of autophagy. We established stable transformants of ZE cell line introduced with a fusion protein of green fluorescent protein (GFP) and microtubule-associated protein 1-light chain 3 (MAP1-LC3) to detect fluorescent autophagosome associated with the GFP-MAP1-LC3-fusion protein. The induction of autophagy was examined under amino acids starvation and heat stress conditions. The high temperature and amino acids withdrawal in the ZE cells induced autophagy in time-dependent manner by counting the number of fluorescent particles localized with GFP-LC3 fusion protein in the cell. The autophagy induced by the amino acids withdrawal was suppressed in the presence of phosphatidylinositol 3 kinase inhibitor, 3-methyladenine, in the culture medium and by overexpression of the *bcl-2* gene. A phosphatidylinositol 3 kinase, target of rapamycin (TOR), mediated autophagic signaling pathway that executes the starvation induced-autophagy. Therefore, we proposed a new biological model of autophagic signaling pathway induced under heat stress and amino acid starvation conditions in fish cultured cells.

Key words : autophagy, protein degradation, amino acids starvation, heat stress, microtubule-associated protein 1-light chain 3

魚類における飢餓条件

魚類における初期減耗要因として被捕食および飢餓が重要である (Houde, 1987)。とくに受精卵・仔魚期における生残には、水温や飢餓が強く影響すると考えられる。受精卵・仔魚の生理状態を把握し、種苗としての品質を評価するためのバイオマーカーの開発が期

待される。

また、魚類の生理機能の不全や品質の劣化をもたらす主要因として、飢餓による生理的变化が考えられる。水産物では、品質が時間とともに急速に低下し、生鮮食品および加工原料としての適性は大きく劣化する。この原因として筋肉タンパク質を特異的に分解するプロテアーゼが作用する例が報告されている (山下,

2008年4月23日受理 (Received on April 23, 2008)

* 中央水産研究所 236-8648 横浜市金沢区福浦 2-12-4 (National Research Institute of Fisheries Science, Fukuura, Kanazawa, Yokohama, 236-8648, Japan).
National Research Institute of Fisheries Science

* Tel: 81-45-788-7665. Fax: 81-45-788-5001. E-mail: mic@affrc.go.jp

1994)。産卵のため回帰するサケの普通肉の筋肉では、リソソーム系プロテアーゼのカテプシンL活性が非常に強い (Yamashita and Konagaya, 1990)。カテプシンLは、ミオシン、コネクチン、コラーゲンなどの筋肉のテクスチャーを形成する筋肉タンパク質に対して分解活性をもつ。産卵期サケ筋肉では、カテプシンLによるタンパク質分解活性によって、魚体やフィレアの低温貯蔵中にタンパク分解が生じた結果、著しい筋肉の軟化がしばしば生じる (山下, 1994)。著しい肉質軟化が観察される産卵期サケの筋細胞間にはマクロファージ様の食食細胞が分布し、その細胞にはカテプシンLが発現している。産卵期サケの筋肉の異常な軟化は、筋細胞に隣接した食食細胞が、筋肉構造タンパク質や細胞小器官をエンドサトシスによって食食し、オートファジーによってタンパク質が消化されたと推測される (Yamashita and Konagaya, 1991)。ヒラメの異常軟化肉 (Toyohara *et al.*, 1993) や産卵期のアユ (Yamashita *et al.*, 1990) でも強いカテプシンL活性が認められており、成熟や飢餓、感染などが引き金となりバルク分解経路が誘導された結果、著しい自己消化の原因となることが推定される。

以上のように、飢餓応答に関する生理学的・生化学的な解析の結果、リソソーム系のタンパク質分解経路の活性化、すなわちオートファジーの誘導が飢餓条件において生じると推測されるが、これまでの生化学的分析手法では、魚類のオートファジーの分子メカニズムを解析することは困難であった。そこで、魚類のストレス応答や飢餓状態を定量的に把握するため、アミノ酸飢餓や熱ストレスによって誘発されるオートファジーの発現に着目した。分子生物学的指標となるバイオマーカーを開発し、アミノ酸飢餓や熱ストレスによって誘発されるオートファジーの誘導経路を特定した。

オートファジーのバイオマーカー

出芽酵母、線虫、ショウジョウバエ、哺乳類などの多くの生物でオートファジーが解析され、オートファジーのバイオマーカーとしてオートファゴソーム膜に特異的に結合する微小管結合タンパク質 Microtubule-associated protein 1-light chain 3 (MAP1-LC3) が報告されている (Kabeya *et al.*, 2000)。MAP1-LC3は、定常状態ではポリペプチドのC末端側のグリシン残基の位置で切断されて細胞質に分布する。この分子の状態をMAP1-LC3-Iフォームという。オートファジー誘導下では、フォスファチジルエタノールアミン転移酵素の作用により、MAP1-LC3-IのC末端のグリシン

119番目へフォスファチジルエタノールアミンが付加されることによって、MAP1-LC3-IIフォームとなり、本分子は活性化される。このようなMAP1-LC3-IIはオートファゴソームの脂質二重膜の内外膜に結合するため、MAP1-LC3に対する特異的抗体を用いて蛍光抗体法で細胞内に生じたオートファゴソームを顆粒として検出することができる。また、ウエスタンブロットでは、化学修飾された活性型のMAP1-LC3-IIフォームは、SDS-PAGEの陽極側にバンドの位置がシフトするため、MAP1-LC3-IフォームとMAP1-LC3-IIフォームを特異的に検出することが可能であり、オートファジーの誘導能やその応答性を評価することができる。

ゼブラフィッシュ、ブリなどの魚類培養細胞をモデルとして、飢餓条件、すなわちアミノ酸を含まない培養条件によって誘発されるオートファジーを観察した。このようなオートファジーのバイオマーカーであるMAP1-LC3の遺伝子をゼブラフィッシュ、ブリ、ヒラメ、マグロからクローニングした。このcDNAのN末端側に緑色蛍光タンパク質を融合したキメラタンパク質の遺伝子発現系を作製し、それを導入したゼブラフィッシュの細胞株を樹立した (Fig. 1) (Yabu *et al.*, submitted)。この細胞株は、オートファジーの誘導に伴って、蛍光性のGFP-MAP1-LC3融合分子がオートファゴソーム膜に結合するため、蛍光性の顆粒、すなわちオートファゴソームが細胞内に出現する。さらに、このGFP-MAP1-LC3融合遺伝子発現系を導入したトランスジェニック魚の系統化した。これらの培養細胞や魚類は蛍光性のオートファゴソームを検出することによって、オートファジーの動態を観察することが可能であるため、魚類における飢餓条件、オートファジーの誘導メカニズムなどの研究に利用できる。

二つの細胞内タンパク分解系

真核細胞に共通したタンパク質分解系として、二つの経路が存在する。前者のユビキチン-プロテアソーム系は、特定の基質分子だけを特異的に分解除去するために作用する選択的な分解系である。Nエンドルールに従って、タンパク質のN末端領域にあるアミノ酸配列に応じて、ユビキチンがタンパク質のリジン残基に付加される。このユビキチン化されたタンパク質は、ユビキチンが標識なり、プロテアソームに認識されるよって分解される。後者は、オートファジーであり、細胞内で不要となったタンパク質や細胞内小器官をオートファゴソームに取り込んで、リソゾームと

結合して除去する非選択的な分解系である。

実際には、両者は細胞内で密接に関連している。ストレス条件下で生じた異常タンパク質や一過的に誘導されるシグナル分子は、その後、ユビキチン化され、プロテアソームによって速やかに分解されるが、分解されきれないユビキチン化タンパク質は他の多くの細胞内タンパク質と同様にオートファジーによっても分解されると考えられる。

飢餓適応としてのオートファジー

飢餓時には、異化作用が高まり、タンパク質、グリコーゲンおよび中性脂肪を分解し、ATP合成に利用される。生体内のグルコースの貯蔵が枯渇すると、糖新生が活性化される。オートファジーによって生じるアミノ酸の一部はその材料に用いられると考えられる。この過程ではアミノ酸の脱アミノ反応が作用し、この結果生じた有毒なアンモニアの大半は、鰻による拡散や尿として排出される。肝臓以外ではとくに筋肉で分岐鎖アミノ酸の脱アミノ反応の活性化により、アミノ基のほとんどはピルビン酸、 α -ケトグルタル酸やグルタミン酸に転移され、それぞれはアラニンやグルタミンとして血中に放出される。肝臓はアラニンを受け取り、これを利用して糖新生が生じる（グルコース-アラニン回路）。脱アミノされたアミノ酸のC骨格は、各組織でクエン酸回路を経由してエネルギー産生へと利用される。このようにして、アミノ酸は、タンパク質合成、糖新生およびエネルギー産生と多岐にわたる機能を有しており、オートファジーはそれを制御する主要な機構であると考えられる。

飢餓適応としてオートファジーの重要性は、魚類以外のモデル生物では、オートファジー不能変異体の解析によって明らかにされてきた。オートファジー不能酵母は、栄養飢餓時に速やかに死滅する (Tsukada and Ohsumi, 1993)。細胞性粘菌 (Otto *et al.*, 2003) やショウジョウバエ (Scott *et al.*, 2004) のオートファジー変異体も飢餓時には生存率が低下する。マウスは、出生直後の新生児は胎盤を介した栄養が突然遮断されることにより極度な飢餓状態であることが知られている (Kuma *et al.*, 2004)。出生直後の新生児マウスの様々な組織でオートファジーが一過的に誘導される。マウスでは生理的飢餓状態に対してオートファジーが重要であると考えられる (Kuma *et al.*, 2004)。ショウジョウバエ幼虫は、第3齢期より摂餌を離れ飢餓状態となり、やがて蛹になると完全な飢餓状態となるが、オートファジーが生じないと致死となる (Scott *et al.*, 2004; Juhasz *et al.*, 2003)。魚類の発生過程では、

卵黄吸収がオートファジーによって生じ、卵黄タンパク質が分解されるとともに、形態形成が進行していた (今村ら, 2008)。甲状腺ホルモンによって誘導される変態期では、摂餌量が低下することが知られている。この変態期においてもオートファジーが必要であると推測される。

オートファジーは栄養飢餓時に激しく誘導される。哺乳類の培養細胞の培地から、アミノ酸あるいは血清を除去すると1時間以内にオートファジーが誘導されるが、ゼブラフィッシュ胚由来細胞やブリ尾鰭由来細胞の場合、1時間後から誘導される (Fig.1)。また、この誘導は、Bcl-2 や3-メチルアデニン(3-MA)によって阻害されることから、PI3キナーゼクラスIIIの経路がオートファジーを抑制するシグナル経路に関わることが明らかとなった。また、アミノ酸そのものにオートファジー抑制作用があることは明らかであるが、生体では、血中のアミノ酸濃度は、絶食後ではほとんど変動しない。オートファジーは、インスリン様成長因子-1 (IGF-1)、インスリンやレプチンを中心とした内分泌系によって制御されていると推測されるが、魚類の場合、これらのホルモンが、細胞内タンパク質代謝を司る機能を有するかは不明である。ショウジョウバエを用いた遺伝学的解析では、ショウジョウバエ幼虫を栄養飢餓状態にすると、脂肪体 (Fat body; 魚類の肝臓にあたる臓器) オートファジーが誘導された。しかし、インスリンシグナルの高発現変異体やインスリンシグナルの負の制御因子を欠く変異体では、オートファジーが誘導されない (Scott *et al.*, 2004)。一方、インスリンシグナル伝達因子の欠損変異体は、飽食時でもオートファジーが誘導された。

TORキナーゼによるシグナル伝達機構

これらの一連のオートファジー抑制シグナルで最下流に位置するシグナル分子がTarget of rapamycin (TOR) キナーゼである (Noda and Ohsumi, 1998)。魚類の培養細胞への栄養源の供給を阻害した条件で、蛍光顕微鏡下でオートファゴソームの形成を調べた結果、飢餓条件によって時間依存的にオートファジーが誘導され、蛍光性の顆粒が細胞内で多数生じた。このことから、飢餓に対する適応能は細胞レベルで獲得しており、適応応答することが明らかとなった。オートファジーのシグナル伝達の抑制機構を調べるため、3-MA やワルトマニン (PI3キナーゼ阻害剤) の培地への添加試験、Bcl-2 または細胞分裂周期遺伝子48 (cell division cycle CDC48/VCP/p97) の過剰発現試験の結果、アミノ酸飢餓条件下で誘発されるオートファ

ジーが阻害された。このことから、アミノ酸飢餓によって誘発されるオートファジーは、PI3 キナーゼ経路を介してオートファジーが抑制された。このことから、PI3 キナーゼを活性化させる因子として、アミノ酸および IGF-1 が考えられた。そこで、アミノ酸飢餓状態下に魚類の培養細胞を曝しオートファジーを誘導したのち、アミノ酸投与またはヒト IGF-1 の刺激の試験の結果、アミノ酸飢餓条件下で誘導されるオートファジーは消失した。このように、魚類における飢餓誘導性オートファジーは、TOR キナーゼに依存することが推定された。

本研究では、CDC48 が TOR キナーゼの基質として、C 末端領域にあるセリン 784 番目が特異的にリン酸化され、活性化する分子メカニズムを明らかにした。栄養源が充足した条件では、TOR キナーゼは定常的に活性化しているため、CDC48 は TOR キナーゼのリン酸化によって活性化され、タンパク合成、細胞増殖および細胞分裂が促進される。活性型の CDC48 リン酸化型は、ユビキチン-プロテアソーム経路によるタンパク分解を促進し、細胞分裂周期を制御している。

魚類のシャペロン介在性オートファジー

産卵のため回帰するサケは、河川への遡上の約二ヶ月前に摂食を離れ、飢餓状態となる。この産卵期における飢餓時では、肝臓や筋肉の細胞内に蓄積された糖や脂肪を利用して、解糖系や TCA 回路そして β 酸化により、エネルギーを生産する。各組織における糖や脂肪が枯渇すると、マクロファージ様の食細胞によりエンドサトーシスによって筋肉構造タンパク質や細胞小器官が食され、オートファジーによるタンパク質分解によってアミノ酸が産生される。グルコース-アラニン回路を主に利用して生きながらえていると推測される。さらに飢餓が長期になるとシャペロン介在性オートファジー (chaperone mediated autophagy) が誘導されていると推測される。この経路は、オートファゴソームを経由せずに基質タンパク質がリソソーム膜を直接透過して内腔へ輸送される。そのため分解基質は細胞質に局在する HSC70 (Heat shock cognate protein 70) によって認識される。シャペロン介在性オートファジーは、オートファジーの中でも選択性を有し、HSC70 との基質の複合体はリソソーム膜に結合し、基質は解きほぐされてからリソソーム膜を通過する。シャペロン介在性オートファジーは、細胞小器官を分解するのではなく可溶性タンパク質の分解に適していると考えられている (Dice, 1990)。シャペロン介在性オートファジーは、オートファジーと同様に、

飢餓や酸化ストレス、毒性化学物質などによって活性化することが知られている (Dice, 1990)。哺乳類の研究では、シャペロン介在性オートファジーの基質タンパク質は、アルドラーゼ、Glyceraldehydephosphate dehydrogenase (GAPDH)、ヘモグロビン、ミクログロブリン、HSC70 などが同定されている (Dice, 1990)。

サケ稚魚を 20 日間無給餌で飼育試験した場合、筋肉中の水溶性タンパク質であるアルドラーゼ、GAPDH およびパルブアルブミンが減少した (山下・鈴木, 1996)。産卵期サケでは、普通筋の筋肉中のアルドラーゼが特異的に減少した (Yamashita and Konagaya, 1991)。また、ブリ鱈由来の培養細胞を熱ストレス条件下やアミノ酸飢餓条件下で培養すると、HSC70 がリソソームへ移行し、シャペロン介在性オートファジーが誘導された (Yabu *et al.*, submitted)。このように、HSC70 の基質となりうるタンパク質が特異的に減少したことから、とくに魚類の極度な飢餓状態では、シャペロン介在性オートファジーが活性化されるものと推測される。

以上の結果から、Fig. 2 のように魚類のストレス状態や飢餓条件におけるオートファジーの誘導の新しいモデルを提案する。すなわち、細胞が飢餓状態に曝されると、グルコース、ATP などのエネルギー源が低下するため、TOR キナーゼのリン酸化シグナルが減少し、タンパク質合成能、タンパク質翻訳能および細胞分裂能などの細胞増殖に関わる機能が低下する。TOR キナーゼ活性の減少によって、基質分子である CDC48, Eukaryotic translation initiation factor 4 elongation binding protein (4EBP1), p70S6 キナーゼのリン酸化が抑制されるとともに、脱リン酸化されるため、異化作用が促進される。また、CDC48 によって制御されるユビキチン-プロテアソーム系の経路が停止する。細胞分裂周期が停止するとともに、オートファジーによるタンパク分解経路が活性化する。タンパク分解によって生じたアミノ酸を用いて、異化作用および糖新生作用が向上する。今後、これらのオートファジー誘導に関わるバイオマーカーを利用して、受精卵・仔魚における大量死、魚類の変態、産卵期サケの筋肉におけるタンパク分解などの現象について、その分子機序を解明する予定である。

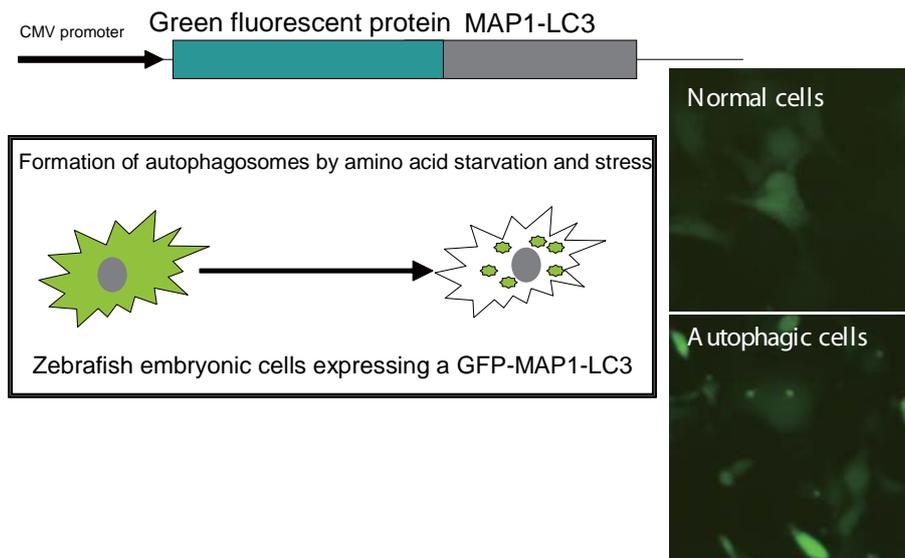


Fig. 1 The constructed plasmid with zebrafish microtubule-associated protein 1-light chain 3 (MAP1-LC3) A plasmid constructed that contained the zebrafish MAP1-LC3 cDNA under the control of the CMV promoter was generated and fused to the green fluorescent protein (GFP) gene (pEGFP-C1; Clontech) . Autophagy was induced in response to amino acid withdrawal in zebrafish embryonic cells expressing a fluorescent MAP1-LC3 autophagosome marker.

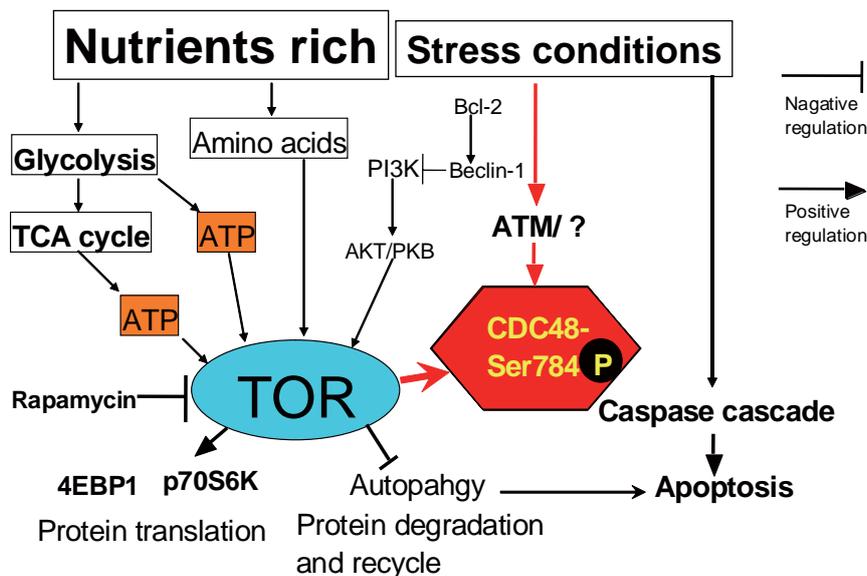


Fig. 2 A model of autophagic signaling pathway induced under stress and starvation conditions in the fish cells.

文献

Dice J. F., 1990: Peptide sequences that target cytosolic proteins for lysosomal proteolysis. *Trends Biochem. Sci.*, **15**, 305-309.

Houde E. D., 1987: Fish early life dynamics and recruitment variability. *Am. Fish. Soc. Symp.*, **2**, 17-19.

Juhasz G., Csikos G., Sinka R., Erdelyi M., Sass M., 2003: The Drosophila homolog of Aut1 is essential for autophagy and development. *FEBS Lett.*, **543**, 154-158.

Kuma A., Hatano M., Matsui M., Yamamoto A., Nakaya H., Yoshimori T., Ohsumi Y., Tokuhisa T., Mizushima N., 2004: The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature*, **432**,

- 1032-1036.
- Kabeya Y., Mizushima N., Ueno T., Yamamoto A., Kirisako T., Noda T., Kominami E., Ohsumi Y., Yoshimori T., 2000: LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J.*, **19**, 5720-5728.
- Medina J. M., Vicario C., Juanes M., Fernfindez E., 1992: Biochemical adaptations to early extrauterine life. *Perinatal Biochemistry*, CRC Press, Boca Raton., 233-258.
- Noda T., Ohsumi Y., 1998: Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast. *J.Biol.Chem.*, **273**, 3963-3966.
- Imamura S., Yabu T., Yamashita M., (submitted) : *In vivo* analysis of autophagy in response to starvation using transgenic zebrafish expressing a fluorescent.
- 今村伸太朗, 藪健史, 山下倫明, (投稿中) : 魚類の胚発生におけるオートファジーが関与する卵黄吸収機構, 水産総合研究センター研究報告.
- Otto G. P., Wu M. Y., Kazgan N., Anderson O. R., Kessin R. H., 2003: Macroautophagy is required for multicellular development of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *J.Biol.Chem.*, **278**, 17636-17645.
- Scott R. C., Schuldiner O., Neufeld T. P., 2004: Role and regulation of starvation-induced autophagy in the *Drosophila* fat body. *Dev.Cell*, **7**, 167-178.
- Toyohara H., Kinoshita M., Ando M., Yamashita M., 1993: Elevated activity of cathepsin L-like protease in jellied meat of Japanese flounder. *Nippon Suisan Gakk.*, **59**, 1909-1914.
- Tsukada M., Ohsumi Y., 1993: Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.*, **333**, 169-174.
- Yabu T., Imamura S., Yamashita M., (submitted) : Characterization of microtubule-associated protein 1-light chain 3 (MAP1-LC3) from zebrafish; involving regulation of cell division cycle gene 48 (CDC48/VCP/p97) in amino acids starvation-induced autophagy
- Yabu T., Imamura S., Mohammed M. S., Minami M., Terayama M., Yamashita M., (submitted) : Differential gene expression of three members of the stress protein HSP70/HSC70 family in response to heat shock and chaperone-mediated autophagy (CMA) in marine teleost yellowtail cultured cells.
- Yamashita M., Nakano H., Konagaya S., 1990: The elevation of catheptic activity in muscle and liver of ayu *Plecoglossus altivelis* during maturation. *Ibid*, **56**, 1157.
- Yamashita M., Konagaya S., 1990: High activities of cathepsins B, D, H, and L in the white muscle of chum salmon in spawning migration. *Comp. Biochem. Physiol.*, **95B**, 149-152.
- Yamashita M., Konagaya S., 1991: Hydrolytic action of salmon cathepsins B and L to muscle structural proteins in respect of muscle softening. *Nippon Suisan Gakk.*, **57**, 1917-1922.
- Yamashita M., Konagaya S., 1991: Proteolysis of muscle proteins in the extensively softened muscle of chum salmon caught during spawning migration. *Nippon Suisan Gak.*, **57**, 2163.
- 山下倫明, 1994: 産卵期サケの肉質軟化機構に関する研究. 日水誌, **60**, 439-442.
- 山下倫明, 鈴木満平, 1996: 飢餓に伴うサケ稚魚の筋肉におけるカテプシン活性の上昇. 中央水研報, **8**, 29-34.