

食肉の肉質決定因子が形成する ゲノムワイド機能ネットワークの解明

所属：国立大学法人東海国立大学機構

名古屋大学大学院生命農学研究科 応用生命科学専攻

助成対象者：灘野 大太

概要

柔らかさといった食肉の肉質は単一の因子・遺伝子によって絶対的に決定されるものではなく、むしろ多数の因子の複雑な相互作用によって最終的に決まってくるものと推察される。しかしながらその実態の多くはいまだ未解明のままである。我々は独自のオーム研究によりその候補遺伝子を見出しており、肉の品質を決定するネットワーク、さらには世界的な需要の高まりを示す高品質食肉の遺伝的指標の確立を目指してきた。本助成における研究のひとつとしてそのネットワークのキーと推定されるタンパク質に関して解析を進め、新たな機能を発見し原著論文として発表した。ここでは本助成に関する謝意を込めて主にその内容について報告したい。

abstract

It is assumed that meat quality, such as tenderness, is not absolutely determined by a single factor or gene, but rather is ultimately determined by the complex interaction of many factors. However, many of these factors remain unexplored. We have identified candidate genes through our own “omics” research and have been trying to establish a network that determines meat quality, as well as genetic determinants of high-quality meat, which is in increasing demand worldwide. As one of the studies under this grant, we have analyzed a protein that is presumed to be the key to the

network, discovered a new function, and published the results in an original research paper. Here, we would like to report on the study with our gratitude for this grant.

研究内容

世界の人口は開発途上国を中心に現在も増加し続けており、それに伴って世界全体の食肉需要も今後も伸びる見通しである（農林水産省：世界の食料需給動向）。食肉には当然生存に必要な栄養摂取という重要な側面がある一方で、肉を含む食事で大切な点の一つとしておいしいものを食べるといういわば満足感・幸福感があげられ、それは生活の質（quality of life）とも密接な関係にある。おいしさは味覚や香りなどの化学的特性とならんで食感（テクスチャー）、外観、温度などの物理的特性によって決定される。ここで本研究の主対象である食肉に焦点をあてると、食肉は動物の筋肉を主体とする食品であり、その肉質は骨格筋を構成する筋繊維によって左右される。加工した肉の場合、物性測定装置を用いて測定可能な食感パラメーターとして、柔らかさ：肉を破断したときの圧縮応力、柔軟性：噛んだ時のしなやかさ、噛み切り硬さ：噛みごたえの指標、もろさ等が挙げられる。市販の物性測定装置を用いて、食肉の質について正確かつ簡便に定量化が可能になった一方で、そもそもの食肉の素材自体の品質を決定づける牛・豚・鶏等の内在性因子の種類と重要度については残念ながら未だ不明な点が多いと言わざるを得ない。そこで食肉の肉質決定因子が形成するネットワークの理解を目指して我々は解析を進めてきた。この過程でそのネットワークの構成因子として推定されている遺伝子 *Ccser2* に関して、その翻訳産物の新たな機能を明らかにしたので以下報告する。

我々は以前、*Ccser2*（旧名 *Gcap14*）を mRNA レベルでマウス乳腺において同定し、このタンパク質が細胞内で微小管（MT）と特異的に結合し、また *in vitro* で MT 結束能を示すことを報告した[1]。*Ccser2* と肉質との関係から、このタンパク質の解析を進めた。

MT の細胞内動態は、様々な MT 結合タンパク質によって制御されている。上記のとおりマウス *Ccser2* は MT 結合タンパク質のひとつである。その機能をさらに調べるために、*Ccser2* の cDNA 挿入した哺乳類細胞用発現ベクターを培養細胞に一過性に導入し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。高発現の場合、*Ccser2* は MT にほぼ一様に共局在し、かつ多くの MT は再編成されて太くなった。これらのデータは、以前細胞で観察されたもの

[1]と基本的に同じであった。MTの再構成は、上記のこのタンパク質によるMT結束活性によると推定された。しかしながら、Ccser2の発現が比較的低いと思われる細胞において、Ccser2はMT末端に付着したドット状の構造を示した。この観察像は、細胞内のMT伸長末端集積因子(MT-plus-end-tracking protein, +TIP)の場合に類似していた。+TIPsはMT結合タンパク質の一群で、伸長するMTの先端に局在する[2]。緑色蛍光タンパク質を融合させたCcser2(GFP-Ccser2)を低レベルで発現している細胞のライブイメージングから、このタンパク質がコメット状の構造を形成しながら細胞周辺に移動していることが示され、Ccser2が新しい+TIPであることが推察された。

次に、+TIPとしての機能を下支えするメカニズムを調べた。Ccser2は、アミノ酸配列において既知の+TIPsと有意な相同性を示さない。しかし、このタンパク質に種間で保存され重要と考えられる2種類の潜在的に機能的な領域がある。(i)ポリペプチド鎖中央のコイルドコイル領域がこの構造の予測ソフトウェアによって示された。(ii)2つのSxIPモチーフ(コンセンサス、(S/T)-x-(I/L)-P)が存在し、このモチーフは、+TIPsのグループのひとつ、すなわちSxIPタンパク質のMT会合に必要である[3]。後者に関しては、SxIP配列に加えて、その周辺のアミノ酸残基もこの会合に含まれることが報告されている。+TIPとしての機能に対するこれらの領域の寄与を調べるために、まずコイルドコイル領域を欠失させたCcser2の変異体を作製し、細胞に発現させて顕微鏡下で観察した。しかし、この欠損はこのタンパク質とMT間の共局在化には影響しなかった。この領域は、伸長するMT末端の+TIPs間の相互作用に利用されているのかもしれない。次に、SxIPモチーフを含む2つの領域を調べた。両方の領域を欠失させると、欠失変異体はMTに結合しなくなり細胞質にほぼ一様に存在するようになった。2つの領域のうち一方を欠失させると、減少したとはいえいくつかのコメットが観察され、両方の領域がCcser2の+TIP機能を支えていることが示された。

SxIPタンパク質を含む多くの+TIPは、EB1と呼ばれるタンパク質に結合することで、MTの伸長末端と会合することができる。SxIPタンパク質は、EB1ホモダイマーの形成するC末端ヘリックスの束にSxIPモチーフを介してEB1に結合する[3]。この2つのタンパク質を過剰発現させた細胞におけるCcser2とEB1の相互作用を、MT脱重合条件下[4]での免疫沈降法で調べた。Ccser2とEB1の共沈が観察され、Ccser2がSxIPタンパク質に属することがこの実験からも支持された。

すでに記述したとおり筋肉のやわらかさは単一因子によってのみすべてが決まるのでは

なく、複数の多数因子が複雑に絡み合っ​​て最終的な食肉としての特性が決まるものと考えられる。換言すると Ccse2 は必要であ​​っても十分ではなく Ccser2 が形成する他の因子との相互作用、つまりネットワークが重要であろうということになる。今回 Ccser2 結合タンパク質として同定された EB1 は骨格筋形成に必要と報告されており [5]、Ccser2 ネットワークの重要性がここからも推察される。

引用文献

1. Hosono H, Yamaguchi N, Oshima K, Matsuda T, Nadano D: The murine Gcap14 gene encodes a novel microtubule binding and bundling protein. FEBS Lett. 2012, 586(10):1426-1430.
2. Gudimchuk NB, McIntosh JR: Regulation of microtubule dynamics, mechanics and function through the growing tip. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2021, 22(12):777-795.
3. Kumar P, Wittmann T: +TIPs: SxIPping along microtubule ends. Trends Cell Biol. 2012, 22(8):418-428.
4. Nadano D, Nakayama J, Matsuzawa S, Sato T, Matsuda T, Fukuda MN: Human tustin, a proline-rich cytoplasmic protein, associates with the microtubular cytoskeleton. Biochem. J. 2002, 364(3):669-677.
5. Zhang T, Zaal KJ, Sheridan J, Mehta A, Gundersen GG, Ralston E: Microtubule plus-end binding protein EB1 is necessary for muscle cell differentiation, elongation and fusion. J Cell Sci. 2009, 122(9):1401-1409.

本助成に関わる成果物

[論文発表]

Shirai, Y, Okuda, T, Oshima, K, Nadano, D: Characterization of human Ccser2 as a protein tracking the plus-ends of microtubules. BMC Res. Notes, 2023, 16 (1): 198 (article no, 7 pages).

本基金の助成を受けた旨をこの論文の謝辞”Funding”に記載した。