

# TUMSAT-OACIS Repository - Tokyo

University of Marine Science and Technology

(東京海洋大学)

養殖ブリ類のストレス応答に関する生化学的研究

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2020-06-22 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 安藤, 仁 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="https://oacis.repo.nii.ac.jp/records/1913">https://oacis.repo.nii.ac.jp/records/1913</a>

修士学位論文

養殖ブリ類のストレス応答に関する生化学的研究

2019 年度

(2020 年 3 月)

東京海洋大学大学院

海洋科学技術研究科

海洋生命資源科学専攻

安藤 仁



修士学位論文

養殖ブリ類のストレス応答に関する生化学的研究

2019 年度

(2020 年 3 月)

東京海洋大学大学院

海洋科学技術研究科

海洋生命資源科学専攻

安藤 仁

## 目次

緒言	1
材料と方法	9
結果	13
考察	17
謝辞	21
文献	22
FIGURE LEGENDS	30
Figure	32

## 緒言

ストレスは、環境からの要求 (environmental demand) によって引き起こされた生体の普遍的な生理学的反応およびプロセスであり、環境からの要求をストレッサーと呼んだ<sup>1)</sup>。Selye はストレス刺激の種類によらず非特異的に全身に起きる反応があり、これを汎適応症候群と名付けた<sup>2)</sup>。ストレス刺激が加わってからの持続時間によりストレス反応が変化することから、急性反応が生じる警告期、ストレス刺激に対して適応性ができた抵抗期および抵抗力が落ちた疲労期の3段階から構成されることを示した<sup>2)</sup>。

ストレス応答に関する細胞機能として、ストレスタンパク質 (HSP, heat shock protein) が誘導され、分子シャペロンとしてストレスに対する防御に関与すると考えられる<sup>3-6)</sup>。これらのタンパク質は、バクテリアから哺乳類まで生物に広く分布しており、熱ショック、化学物質、紫外線などの環境ストレスに応じて著しく誘導される<sup>5-11)</sup>。HSP70 (70 kDa 熱ショックタンパク質) と HSC70 (70 kDa 熱ショック同族タンパク質) は、ATPase ドメインおよびペプチド結合ドメインを介して、折り畳ま

れていないタンパク質およびペプチドに結合するシャペロン機能を有している<sup>5)</sup>。

熱誘導性の HSP70 は、ストレスを受けた細胞における変性タンパク質凝集体の可溶化を調節し、変性タンパク質の再生を促進して機能を回復させ、不可逆的に損傷したタンパク質を分解して、オルガネラおよびプロテアソームへの移行を促進すると考えられる<sup>12)</sup>。したがって、HSP70 ファミリーメンバーの発現の構成的または誘導的な調節は、正常およびストレス下の細胞条件下での細胞生存にとって重要である<sup>12)</sup>。

魚類の発生研究において、熱ストレスによるアポトーシスの研究が従来から行われている<sup>13)</sup>。熱ストレスは、発生、成長、組織の分化および器官形成に障害をもたらすだけでなく、不妊化、性転換などの生殖生理の機能にも影響することが知られている<sup>14)</sup>。ゼブラフィッシュ胚をモデルとして 37 °C で高温処理した時、体節数が減少するとともに、体節が萎縮した<sup>15)</sup>。このように、環境ストレスによる生物影響として、形態・組織観察、核酸比、消化酵素活性および代謝酵素活性が測定されている<sup>13)</sup>。アポトーシス研究は、Kerr らの細胞・組織の形態観察から始まり、その特

徴的な細胞死はアポトーシスと呼ばれるようになった<sup>16)</sup>。アポトーシスはその作用メカニズムが明らかにされることにより、現在ではプログラム細胞死とほぼ同義で用いられる<sup>13)</sup>。魚類細胞でのアポトーシスシグナル伝達経路は、主に三つの経路に大別される<sup>13)</sup>。第1の経路は熱、紫外線、 $\gamma$ 線や低酸素などのストレス誘導性の経路、第2は、Fasリガンド、骨形成因子 (bone morphogenetic protein, BMP) , 腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor, TNF) などのシグナル分子の刺激によって誘導される膜レセプターを介する経路、変態に伴う甲状腺ホルモンによって誘導される経路が知られている<sup>13)</sup>。第3は、オートファジーによる膜の形成を伴う成長と飢餓に関わる経路である<sup>13)</sup>。これらの3経路のアポトーシスの分子メカニズムがゼブラフィッシュ、ヒラメ、ブリなどの培養細胞を使って解析された<sup>13)</sup>。ゼブラフィッシュ胚を熱ショック、紫外線または $\gamma$ 線で処理すると、染色体DNAの断片化が生じるので、Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling (TUNEL)法を用いるホルマウント染色によってアポトーシスが生じた細胞の分布を観察した<sup>13)</sup>。その結果、多数の細胞が原腸胚期の被層で、体節の形成期から孵化



期の脊髄，膜鱗，心臓および脳で観察された<sup>17)</sup>。また，ヒラメ胚への熱ショックあるいは紫外線処理によっても，心臓および膜鱗で著しいアポトーシスが観察された<sup>18)</sup>。合成基質 acetyl-DEVD methylcoumarylamide (ac-DEVD-MCA) を用いるカスパーゼ活性の測定によって，ストレス強度に対して依存的に活性が上昇した<sup>13)</sup>。これらのことから，熱，紫外線， $\gamma$  線によって誘発されるアポトーシスはカスパーゼの活性化を介して生じること，この合成基質を用いることによって，ストレス刺激によるアポトーシスの誘導を定量的に測定することが可能となった<sup>13)</sup>。

カスパーゼはその構造と機能からイニシエーター（始動）タイプ（カスパーゼ-8，-9，-10 など）とエフェクター（実行）タイプ（カスパーゼ-3，-6，-7 など）の2つのタイプに大別され，それらによるカスケード反応が誘導される<sup>13)</sup>。上流に位置するニシエーターカスパーゼはアポトーシスシグナルを受け取ると自己活性化し，下流のエフェクターカスパーゼをプロセッシングにより活性化させる<sup>13)</sup>。活性化したエフェクターカスパーゼによって各カスパーゼの基質としての切断点をもつ細胞構成成分が加水分解され，アポトーシス小体の形成，核の凝縮，染色体 DNA の断片化，

細胞膜の崩壊などのアポトーシス特有の細胞構造の崩壊と細胞形態の変化が引き起こされる<sup>13)</sup>。カスパーゼ-3は、主要なエフェクターカスパーゼである<sup>13)</sup>。魚類細胞や魚類胚でアポトーシスの誘導能をもつカスパーゼ-3がクローン化された<sup>19)</sup>。ゼブラフィッシュ胚へ過剰発現させた結果、アポトーシスが生じ、成熟酵素へのプロセッシングが観察された<sup>19)</sup>。このことから、カスパーゼ-3がアポトーシスを実行する本質的な分子であり、アポトーシスの誘導を分析する<sup>19)</sup>。

Yabu et al. は、ブリ培養細胞を樹立し、高温でのストレス条件において HSC70 および HSP70 が遺伝子レベルで誘導され、シャペロン介在性オートファジーに関与し、リソソームでのタンパク質分解を促進することを明らかにした<sup>12)</sup>。熱ストレスの条件下の 32 °C 以上では、ブリ培養細胞ではストレス応答が生じて、細胞分画のリソソーム画分に HSC70 および細胞内酵素のアルドラーゼがリソソーム酵素のカテプシン L とともに検出された<sup>12)</sup>。このことから、ストレス条件下の ATP が枯渇した状態では解糖系酵素群がシャペロン介在性オートファジーの基質として細胞内のタンパク質分解に利用されること<sup>20-22)</sup>、ストレス状態であるヤケ肉や産卵期の魚介類

の肉質軟化など品質劣化の現象はシャペロン介在性オートファジーが重要な役割を果たすことが考えられた<sup>12)</sup>。

魚肉の品質劣化をもたらす主要因として、産卵期や飢餓に伴う生理的変化が重要である<sup>23)</sup>。産卵期のサケやサバ類、ブリ類などの魚類では、筋肉におけるカテプシン L などリソソームプロテアーゼ群が活性化することが報告されている<sup>23, 24)</sup>。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<sup>123)</sup>。産卵期サケ筋肉では、カテプシン L によるタンパク分解が生じた結果、著しい筋肉の軟化が生じた<sup>23)</sup>。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貪食細胞が分布し、カテプシン L が発現していた<sup>23, 26)</sup>。産卵期サケの筋肉の異常な軟化は、筋細胞に隣接した貪食細胞が、筋肉構造タンパク質や細胞小器官をエンドサトーシスによって貪食し、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<sup>23, 25)</sup>。ヒラメの異常軟化肉<sup>27)</sup>や産卵期のアユ<sup>28)</sup>、サバ類などで強いカテプシン 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タンパク質分解経路が誘導

された<sup>23)</sup>。オートファジーは生体の恒常性維持に関与し、飢餓応答に関与する細胞内タンパク分解経路である<sup>23,25)</sup>。オートファゴゾームと呼ばれる膜構造が、細胞質やオルガネラの一部を囲い込み、そこに消化酵素を含むリソソームが融合して分解が起こる<sup>30)</sup>。富栄養条件下では、インスリンなどの同化ホルモンやアミノ酸のシグナルによってオートファジーは抑制されるが、その中枢で働くのは mTOR (mammalian target of rapamycin) キナーゼを中心とする TORC1 複合体である<sup>31)</sup>。TORC1 は下流の S6-kinase や 4EBP1 を活性化してタンパク質合成や細胞増殖を正に調節する一方、オートファジーを起動する ULK1 複合体をリン酸化して不活性化する<sup>31,32)</sup>。オートファジーは、マクロオートファジー、ミクロオートファジー、シャペロン介在性オートファジーに大別される<sup>25)</sup>。魚類細胞では栄養飢餓および熱ストレスによってオートファジーが誘導されることが確認されている<sup>25)</sup>。

国内では年間にブリ類15万トン、クロマグロ1万トン、マダイ5.6万トンの養殖魚が生産されているが、機能性素材の活用によって、養殖魚のストレス条件を緩和し、高品質化が実現すれば、養殖魚の需要の増大や価格向上に貢献することができ

る。また、養殖魚の安定生産において、代替タンパク質への転換による低コスト化やクロマグロやブリ類に適した配合飼料の開発が期待されており、ストレス応答やオートファジーによるタンパク質分解を制御する技術開発も期待されている。

クロマグロやマサバ、ブリで見られる異常軟化肉「ヤケ肉」は、漁獲時の酸欠によるストレス条件で、ストレス応答およびオートファジーが誘導され、細胞死が生じて、肉質が劣化する現象であると推定される<sup>33,34)</sup>。セレノネインは、ヘモグロビンやミオグロビンなどヘムタンパク質に結合することによって、ヘムの自動酸化を抑制し、低酸素環境への耐性を担うと考えられる<sup>35,36)</sup>。

セレンは、免疫能や生体抗酸化作用を担う必須の微量元素であることから、セレンが不足すると、過酸化による酸化障害が生じる<sup>37)</sup>。食事からのセレン摂取について、マグロ類の組織<sup>38,39)</sup>や鯨肉<sup>40)</sup>がセレンを最も高濃度に含むことが知られている。肉類、乳類、卵類などもセレン含量が比較的高く、野菜類や果実は一般に少ない<sup>41-44)</sup>。魚介類の可食部には0.12-01.27 ppm程度のセレンが含まれている<sup>45)</sup>。魚類組織に含まれる低分子量のセレン化合物としてセレノネイン

(2-selenyl- $N_{\alpha}$ ,  $N_{\alpha}$ ,  $N_{\alpha}$ -trimethyl histidine)が見出された<sup>46)</sup>。セレノネインは、セレノケトン構造を有するイミダゾール化合物である<sup>47)</sup>。抗酸化物質としてすでに実用化されている硫黄化合物のエルゴチオネインと比べて、さらに強いラジカル消去活性を有していた<sup>37)</sup>。セレノネインは特異的なトランスポーター(organic cation/carnitine transporter 1, OCTN1)によって細胞内へ取り込まれ、メチル水銀の排出と無機化を促進した<sup>48)</sup>。これらのことから、魚肉由来のセレノネインは、OCTN1 トランスポーターを介して生体内に取り込まれて、セレンレドックス回路を強化し、ラジカルスカベンジャーとして活性酸素種(ROS)の発生を抑制すると推定される<sup>35, 48)</sup>。

養殖ブリの筋肉中のセレン含量は天然魚のそれと比べて低いことから、養殖魚はセレン欠乏になりやすいと推定される<sup>34)</sup>。血中のセレン含量が低いマサバではヤケが生じた<sup>34)</sup>。クロマグロのヤケ肉が生じた変質した筋肉の部位では、正常な部位と比べて、セレン含量が低かった<sup>34)</sup>。これらのことから、産卵期の飢餓条件や栄養障害によって、セレン欠乏となると、低酸素条件に対する適応能が低下するため、ヤ

ケ肉が生じやすいと推定された<sup>34)</sup>。養殖魚の肉質は、飼料の質によって大きく変化することが知られている<sup>37)</sup>。配合飼料と生餌との肉質への影響を比較した研究から<sup>49)</sup> 飼料が異なるヒラメの体成分組成に差違があり、配合飼料の飼育条件では、血中や肝臓の過酸化物質含量が増大することが明らかにされた<sup>49)</sup>。また、養殖ブリの血合筋の褐変の抑制は、抗酸化物質の Trolox の灌流投与によって抑制された<sup>50)</sup>。肉質が軟弱化したヤケ肉では、プロテアーゼ活性が上昇していた<sup>51)</sup>。ヤケ肉は、セレン欠乏の栄養状態のときに、漁獲時のストレス条件が加わって発生することが推定された<sup>34)</sup>。クロマグロおよびマサバでは、漁獲後のアポトーシスとオートファジーは血中セレン濃度が低い(<1 mg/kg)魚で起こりやすいことが報告されている<sup>34)</sup>。一方、ラットではセレン欠乏は溶血を誘発することが知られている<sup>52)</sup>。家畜の白筋症はセレン欠乏で発生することから、<sup>41, 53)</sup> ヤケ肉も白筋症と類似した現象であると考えられる<sup>37)</sup>。これらのことから、魚類におけるセレン欠乏は、セレノネイン含量の減少による生体抗酸化作用の低下と、酸化ストレスによって生理的障害が生じることが考えられた<sup>37)</sup>。

養殖魚への環境によるストレスにより、肉質が劣化すると考えられている。網ですくうといった基本的な作業をはじめ<sup>54)</sup>、様々なストレスを受けていると考えられる。ヤケ肉の発生の頻度から、発生の要因としては、産卵成熟および夏期の高水温にかかわる生理的变化が関与し、ストレス耐性の欠如した一部の少数の個体で、漁獲時の取り扱いによって、強いストレスが生じることが考えられる<sup>17)</sup>。この発現メカニズムには高温ストレスによって誘導されるオートファジー（細胞内自食作用）が原因となると考えられる<sup>17)</sup>。また、飢餓状態で遡上するベニザケは筋肉中のグリコーゲン、脂質の順に消費し、その後、タンパク質を分解して生じたアミノ酸を使用し、エネルギーに変換している<sup>55)</sup>。この際、タンパク質分解酵素も著しく増加している<sup>55,56)</sup>。魚類は飢餓耐性が非常に強いが、飢餓に伴って著しい生理的变化が生じる<sup>56,57)</sup>。飢餓状態の進行には年齢、魚種などの差が関係している<sup>58-61)</sup>。山崎はコイを用いて125日間の飢餓試験を行った<sup>62)</sup>。脂肪、タンパク質の減少が著しく体重は試験開始日から約25%減少した<sup>62)</sup>。また、藤谷らはハマチを用いて1ヶ月におよぶ飢餓実験を行った<sup>59)</sup>。肉重量、肝臓重量の減少が著しく、最終的に肉質が変化し



たことを報告した<sup>59)</sup>。魚類の筋肉や肝臓では、飢餓に伴ってタンパク質分解酵素活性が上昇し、タンパク質はエネルギー源として利用される<sup>63-65)</sup>。産卵期サケの回遊は、筋肉と肝臓においてアミノ酸からの糖新生が活性化される<sup>66)</sup>。したがって、オートファジーによるタンパク質分解は、魚の重要な適応メカニズムであると考えられる<sup>68, 69)</sup>。

以上のように、養殖魚のストレス応答やオートファジーの誘導には飢餓条件や熱ストレスが主要因であると考えられることから、カンパチの飼育試験を行い、飢餓の条件におけるストレス応答およびオートファジーの誘導をカテプシンLやカスパーゼ-3を生化学的バイオマーカーとして用いて解析した。その結果、カンパチ稚魚において、飢餓条件3日以降にオートファジーおよびアポトーシスが生じて、シャペロン介在性オートファジーを伴う著しいタンパク質分解が筋肉で生じることを明らかにした。すなわち、本研究では、養殖ブリ類の筋肉で認められたオートファジーによるタンパク質分解系の誘導機構を解析した。

## 材料と方法

### 試料魚

カンパチ *Seriola dumerili* (体長約 2 cm) は宮崎県栽培漁業協会から購入した。

国立研究開発法人水産研究・教育機構水産大学校の敷地内にある屋内水槽において市販配合餌料（林兼産業株式会社マリン 3 号）を給餌し、体重約 30 g になるまで 2 ヶ月間飼育した。

### 飼育方法

対照区（給餌区）および飢餓試験区を設定し、平均体重  $24.0 \pm 5.1$  g の魚を屋内の 1 トン水槽に収容し、流水で 8 月 4 日から試験を開始し、8 月 18 日まで飼育した。対照区はそれぞれ平均体重  $24.0 \pm 5.1$  g の 1 % の餌を、午前 9 時と午後 9 時の 2 回、計 2 % を毎日給餌した。飢餓試験開始時に 10 尾を採取した。試験に使用した試料は 2 日目、4 日目、6 日目、8 日目、10 日目、12 日目および 14 日目に各試験区から 5 尾ずつ採取した試料魚を用いた。体長、体重および肝重量を測定し、普通筋を採取して  $-50$  °C で凍結保存した。

## 銅 Folin 法による水溶性タンパク質および塩溶性タンパク質の定量

タンパク質抽出 凍結保存 (-50 °C) した普通筋約 0.1 g を秤量し、1.5 mL チューブに入れた。採取した普通筋の 3 倍量の超純水を加えてホモジナイザーペッセルを用いて組織片をよくホモジナイズした。試料を 10000×g で 30 分間遠心分離をした後、上清を回収し、超純水で 100 倍に希釈した。これを水溶性タンパク質抽出液として分析に用いた。その後、沈殿の 3 倍量の 50 mM 塩化ナトリウム水溶液 (50 mM NaCl 水溶液) を加えてホモジナイザーペッセルを用いて沈殿をよくホモジナイズした。遠心機を用いて 10000 g×30 分間遠心分離を行った。この行程を計 2 回行った。その後、沈殿に採取した量の 5 倍量の 2 %w/v 炭酸ナトリウム/0.1 M 水酸化ナトリウム水溶液 (C 液) を加えて沈殿を溶かし、その後、さらに C 液で 100 倍に希釈した。これを塩溶性タンパク質抽出液として分析に用いた。

タンパク質定量 試験管に各タンパク質抽出液 0.2 mL を測りとり、これに 2 %w/v 酒石酸ナトリウム水溶液 (A 液)、1 %w/v 硫酸銅水溶液 (B 液)、C 液をそれぞれ 1:1:100 で混合した試薬 (アルカリ銅液) 2 mL を加えてよく混ぜ、室温で 30 分間静

置した。その後、超純水で2倍に希釈したフェノール試薬 (D液) 0.2 mL をさらに加え、D液が沈殿しないように激しく混ぜて、室温で30分間静置した。分光光度計 (Hitachi ダブルビーム分光光度計 UH5300) を用いて750 nm の波長で吸光度を測定した。ウシ血清アルブミン水溶液を用いて検量線を作製し、タンパク質濃度を定量した。

### タンパク質分解酵素の測定

タンパク質の抽出 凍結保存 (-50 °C) した普通筋約 0.1 g を秤量し、1.5 mL チューブに入れた。採取した普通筋肉の3倍量の超純水を加えてホモジナイザーペッセルを用いて組織片をよくホモジナイズした。遠心機を用いて 4 °C, 10000×g で30分間遠心分離をした後、上清を抽出液として回収した。

カテプシン L 活性の測定 反応には 0.1 M リン酸二水素カリウム, 1 mM ジチオトレイトール, 1 mM EDTA 二ナトリウムおよび 0.005 w/v% ポリオキシエチレン (23) ラウリルエーテルを含む 0.1 mM クエン酸緩衝液 (pH 5.6) に基質 (Z-Phe-Arg-MCA) を終濃度 2 μM になるように混和した。基質溶液 200 μL に対して抽出液を 20 μL 加

えて、37 °Cで30分間反応させた。分光蛍光光度計を用いて励起光波長370 nmおよび蛍光波長440 nmの蛍光強度で測定した。活性は37 °CでZ-Phe-Arg-MCAを1 μmolを分解する酵素活性を1 unitとした。

カスパーゼ3活性の測定 反応には50 mM塩化カリウム、250 mM塩化マグネシウム、1 mMジチオトレイトールおよび75 mMスクロースを含む20 mM HEPES緩衝液(pH7.5)に基質(ac-Asp-Glu-Val-Asp-MCA)を終濃度2 μLになるように混和した。

基質溶液200 μLに対して抽出液を20 μL加えて、37 °Cで30分反応させた。分光蛍光光度計を用いて、励起光波長370 nmおよび蛍光波長440 nmで測定した。活性は37 °CでAc-Asp-Glu-Val-Asp-MCAを1 μmol分解する酵素活性を1 unitとした。

### SDS-PAGE およびウエスタンブロット

タンパク質の抽出のため、凍結保存(-50 °C)した14日目の普通筋約0.05 gを秤量し、1.5 mLチューブに入れた。採取した普通筋の3倍量の超純水を加えてホモジナイザーペッセルを用いて普通筋をよくホモジナイズした。遠心機を用いて4 °C、10000×gで30分間遠心分離を行った後、上清を回収し、水溶性タンパク質を回収

した。沈殿に対して3倍量の50 mM NaCl 水溶液を加えてホモジナイザーペッセルを用いてホモジナイズした。遠心機を用いて4 °C, 10000×g で30分間遠心分離を行った。この行程を計2回行った。これを塩溶性タンパク質抽出液として分析に用いた。

電気泳動の緩衝液は、0.125 M 2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパノールジオール塩酸塩 (Tris-HCl), 4 %w/v ドデシル硫酸ナトリウム (SDS), 20 %w/v グリセロールおよび5 %w/v ジチオトレイトールを含む2×サンプルバッファーを水溶性タンパク質抽出液に等量に加えた。塩溶性タンパク質抽出液には2×サンプルバッファーを1 mL 加えた。これらを95 °Cで5分間加熱処理をした。その後、8 M 尿素水溶液を水溶性タンパク質抽出液に3 μL, 塩溶性タンパク質抽出液に30 μL それぞれ加えた。電気泳動には10%ゲルを用いた。クマシーブリリアントブルー R-250を用いて染色した。ウェスタンブロットティングにはセミドライ式ブロットティング装置に25 mM Tris, 192 mM グリシンおよび20 %v/v メタノールを含む転写バッファーに浸したろ紙, 親水処理したポリフッ化ビニリデン膜 (PVDF 膜)、電気泳動後の10%

ゲル，転写バッファーに浸したろ紙の順に重ね合わせた。20 V，80 mA で90分ブロッキングを行った。その後、PVDF 膜をブロッキングバッファー (Thermo Scientific StartingBlock™{TBS}Blocking Buffer) に浸して1時間振盪した。その後、PVDF 膜を20 mM Tris-HCl および150 mM 塩化ナトリウムを含むトリス緩衝生理食塩水 (TBS pH7.4) で1000倍希釈した一次抗体に浸して1時間または一晩振盪させた。一次抗体には、Heat Shock Protein 70 mouse monoclonal antibody (Sigma SAB4200714)，を用いた。その後、PVDF 膜をTBS に浸して、1時間振盪させた。その後、PVDF 膜をTBS で1000倍希釈した標準二次抗体 (Thermo Scientific Goat anti-mouse IgG Cross adsorbed secondary Antibody, HRP) に浸して1時間振盪させた。その後、PVDF 膜をTBS に浸して、1時間振盪させ、DAB 発色試薬 (Thermo Scientific Metal Enhanced DAB Substrate Kit )を用いて発色した。

## 結果

### 飢餓に伴う体長，体重，肥満度および肝重量の変化

対照区の体長はそれぞれ開始日 12.2 cm, 2 日目 13.3 cm, 4 日目 13.2 cm, 6 日目 14.2 cm, 8 日目 14.2 cm, 10 日目 14.5 cm, 12 日目 14.4 cm, 14 日目 15.2 cm であった。飢餓試験区の体長はそれぞれ開始日 12.8 cm, 2 日目 12.5 cm, 4 日目 12.7 cm, 6 日目 13.0 cm, 8 日目 13.4 cm, 10 日目 13.2 cm, 12 日目 12.8 cm, 14 日目 12.8 cm であった (Fig. 1A)。対照区では開始日の平均体長 12.2 cm から 14 日目には平均体長 15.2 cm と 25 %増加し, 成長していた (ANOVA,  $P < 0.05$ )。

対照区の体重はそれぞれ開始日 24.0 g, 2 日目 29.0 g, 4 日目 27.2 g, 6 日目 33.2 g, 8 日目 32.6 g, 10 日目 34.0 g, 12 日目 37.0 g, 14 日目 42.4 g であった。飢餓試験区の体重はそれぞれ試験開始初日 28.0 g, 2 日目 22.6 g, 4 日目 22.6 g, 6 日目 23.0 g, 8 日目 23.4 g, 10 日目 23.8 g, 12 日目 21.8 g, 14 日目 21.6 g であった (Fig. 1B)。対照区と飢餓試験区との間では差違が認められた (ANOVA,  $P < 0.05$ )。対照区の体重は増加し, 成長した。一方, 飢餓試験区の体重は, 開始日の



28.0 g から 14 日目には 28 %減少し, 平均体重は  $21.8 \pm 5.5$  g であった (ANOVA,  $P < 0.05$ )。

対照区の肥満度はそれぞれ開始日 1.3, 2 日目 1.2, 4 日目 1.2, 6 日目 1.2, 8 日目 1.2, 10 日目 1.1, 12 日目 1.3, 14 日目 1.2 となった。飢餓試験区の肥満度はそれぞれ開始日 1.3, 2 日目 1.2, 4 日目 1.0, 6 日目 1.1, 8 日目 1.0, 10 日目 1.0, 12 日目 1.1, 14 日目 1.1 となった (Fig. 2A)。対照区と飢餓試験区との間では差違が認められた (ANOVA,  $P < 0.05$ )。飢餓試験区では開始日の平均肥満度 1.3 から 14 日目には平均肥満度 1.1 と 13 %減少した (ANOVA,  $P < 0.05$ )。

対照区の肝重量体重比はそれぞれ開始日 1.4, 2 日目 1.1, 4 日目 1.3, 6 日目 1.2, 8 日目 1.2, 10 日目 1.2, 12 日目 1.6, 14 日目 1.2 であった。飢餓試験区の肝重量体重比はそれぞれ開始日 1.3, 2 日目 0.8, 4 日目 0.7, 6 日目 0.7, 8 日目 0.6, 10 日目 0.6, 12 日目 0.6, 14 日目 0.5 であった (Fig. 2B)。対照区と飢餓試験区との間では差違が認められた (ANOVA,  $P < 0.05$ )。飢餓試験区の肝重量体重比では開始日の 1.3 から 14 日目の 0.5 と 61 %減少した (ANOVA,  $P < 0.05$ )。

## 普通筋の水溶性タンパク質および塩溶性タンパク質の定量

対照区の普通筋 1 g あたりの水溶性タンパク質含量は開始日 45.0 mg, 2 日目 47.1 mg, 4 日目 45.5 mg, 6 日目 45.9 mg, 8 日目 45.0 mg, 10 日目 40.0 mg, 12 日目 43.1 mg, 14 日目 50.7 mg であった。飢餓試験区の普通筋 1 g あたりの水溶性タンパク質含量は開始日 47.3 mg, 2 日目 44.8 mg, 4 日目 42.2 mg, 6 日目 45.7 mg, 8 日目 36.0 mg, 10 日目 33.9 mg, 12 日目 32.1 mg, 14 日目 34.8 mg であった (Fig. 3A)。

飢餓試験区の普通筋の水溶性タンパク質含量は, 飢餓に伴って減少し (ANOVA,  $P < 0.05$ ), 対照区との間に差違が認められた (ANOVA,  $P < 0.05$ )。

対照区の普通筋 1 g あたりの塩溶性タンパク質含量は開始日 117.4 mg, 2 日目 121.2 mg, 4 日目 122.0 mg, 6 日目 115.3 mg, 8 日目 116.4 mg, 10 日目 113.7 mg, 12 日目 114.8 mg, 14 日目 115.1 mg であった。飢餓試験区の普通筋 1 g あたりの塩溶性タンパク質含量は開始日 114.3 mg, 2 日目 126.1 mg, 4 日目 119.3 mg, 6 日目 114.8 mg, day8 114.7 mg, 10 日目 108.3 mg, 12 日目 105.4 mg, 14 日目 108.3 mg であった (Fig. 3B)。対照区と飢餓試験区の普通筋の塩溶性タンパク質含量に差

違は認められなかった。

### 普通筋のタンパク質分解酵素活性

対照区の普通筋のカテプシンLの活性は開始日 9.9 unit/mg, 2日目 8.6 unit/mg, 4日目 9.9 unit/mg, 6日目 10.4 unit/mg, 8日目 8.3 unit/mg, 10日目 10.1 unit/mg, 12日目 8.8 unit/mg, 14日目 9.0 unit/mg であった。飢餓試験区のカテプシンL活性は開始日 8.9 unit, 2日目 11.6 unit/mg, 4日目 10.6 unit/mg, 6日目 11.0 unit/mg, 8日目 11.9 unit/mg, 10日目 11.5 unit/mg, 12日目 13.3 unit/mg, 14日目 13.1 unit/mg であった (Fig. 4A)。飢餓の進行に伴って普通筋のカテプシンL活性は増加したことから, 対照区と飢餓試験区では差違が認められた (ANOVA,  $P < 0.05$ )。

対照区の普通筋のカスパーゼ-3の活性は開始日 5.2 unit/mg, 2日 7.5 unit/mg, 4日目 6.7 unit/mg, 6日目 7.6 unit/mg, 8日目 8.5 unit/mg, 10日目 8.6 unit/mg, 12日目 7.2 unit/mg, 14日目 6.3 unit/mg であった。飢餓試験区のカスパーゼ-3の活性は開始日 6.8 unit, 2日目 7.3 unit/mg, 4日目 7.4 unit/mg, 6日目 9.5

unit/mg, 8日目 12.4 unit/mg, 10日目 11.2 unit/mg, 12日目 12.4 unit/mg, 14日目 11.1 unit/mg であり, 飢餓に伴って増加した(ANOVA,  $P < 0.05$ , Fig. 4B)。対照区と飢餓試験区では活性に差違が認められた(ANOVA,  $P < 0.05$ )。飢餓試験区では普通筋のカスパーゼ-3 活性は開始日の 6.8 unit/mg と 14日目の 11.1 unit/mg と比較して 39 %増大した(ANOVA,  $P < 0.05$ )。

## HSC70 の発現

試験開始 14 日目の普通筋の水溶性タンパク質のクマシーブリリアントブルー R-250 による SDS-PAGE では 54k では対照区にはないバンドが飢餓試験区で確認された。また 28k では対照区に比べて飢餓試験区のバンドが細く, 減少していることが確認された (Fig. 5A)。14 日目の普通筋の水溶性画分のウェスタンブロットティングでは, 飢餓試験区では HSC70 発現量が高かった (Fig. 5B)。試験開始 14 日目の普通筋の塩溶性タンパク質のクマシーブリリアントブルー R-250 による SDS-PAGE では差違は見られなかった (Fig. 6)。

## 考察

飢餓に伴ってカンパチ稚魚の体重、肥満度および肝重量比は減少し、軽時的に飢餓状態が進行していると考えられた。一方、対照区は体長、体重、肥満度および肝重量比がいずれも増加したことから、本研究の給餌条件（1日当たり体重の2%）で稚魚は成長した。飢餓試験区での肝重量体重比は、試験開始2日目に、対照区と比較して減少したことから、飢餓に伴って筋肉や肝臓の成分が栄養源として利用されていることが考えられた。本研究の飢餓条件14日間では死亡個体は見られず、致死的な飢餓条件ではなかった。

山下らはサケ *Oncorhynchus keta* の稚魚を試料魚に23日間の無給餌試験を行い、筋肉の水溶性タンパク質含量を調べたところ、筋肉の水溶性タンパク質は試験開始日から試験開始23日後には66%まで減少していた<sup>56)</sup>。飢餓試験区のカンパチの普通筋の水溶性タンパク質は開始日から試験14日目には74%まで減少した。水溶性タンパク質の減少が著しいことから、水溶性タンパク質をエネルギー源として、生存していたと考えられる。この飢餓条件では産卵期サケと同様にグルコースや脂質

がすでに枯渇したのち、分解されたと考えられる<sup>44)</sup>。ゼブラフィッシュの24時間の飢餓が平均体重を $347 \pm 42$  mg から  $336 \pm 3$  mg に減少し、48時間の飢餓が平均体重を $347 \pm 42$  mg から  $327 \pm 7$  mg に減少した。体重の減少は開始24時間後に始まり、48時間後にピークを達した<sup>69)</sup>。内因性MAP1-LC3Bのウェスタンブロット分析で骨格筋および肝臓では、内因性MAP1-LC3B-Iが飢餓時にMAP1-LC3B-IIに変換されることが示された<sup>69)</sup>。高レベルのMAP1-LC3B-IIは、36時間の飢餓後の骨格筋で観察された<sup>69)</sup>。MAP1-LC3B-IIは、摂食条件下で36時間以内に肝臓で検出され、48時間の飢餓後に消失した<sup>69)</sup>。したがって、MAP1-LC3B-IIは飢餓によって誘発され、MAP1-LC3B-Iは主にMAP1-LC3B-IIに変換されることが分かった<sup>69)</sup>。

カテプシンLは、細胞内のタンパク質をリソソームに取り込み、酵素的に加水分解するシャペロン介在性オートファジーを担う<sup>57)</sup>。飢餓試験区では開始日の8.9 unit/gと14日目の13.1 unit/gと比較して68%増大した。このことからカンパチは飢餓ストレスによってシャペロン介在性オートファジーが誘導され、HSC70によってアルドラーゼ、クレアチンキナーゼなどの細胞質のタンパク質がリソソームに取

り込まれ、筋肉タンパク質が利用されたと考えられる。また、カテプシンLは死後の魚肉の pH を弱酸性下で作用することで肉質を軟化させることから<sup>57)</sup>、飢餓条件でのカテプシンL活性の上昇は、肉質軟化の要因としてヤケ肉の発生との関連性が考えられる。

アポトーシスはストレスによって誘発され、細胞・組織が崩壊する現象である<sup>34)</sup>。魚類におけるアポトーシスの中心的な役割を担う<sup>34)</sup>カスパーゼ群は通常、細胞内では不活性前駆体として存在するが細胞がストレス刺激を受け、カスパーゼ-3 が活性化するとその活性化によって細胞内の筋肉の特定の基質タンパク質が加水分解されアポトーシスが実行される<sup>34)</sup>。飢餓試験区では普通筋のカスパーゼ-3 の活性は開始日の 6.8 unit/g と比較して 14 日目の 11.1 unit/g と 61 %増大した。このことからカンパチは、筋肉において飢餓ストレスによって、リソソームの活性化を伴うシヤペロン介在性オートファジーが誘導されたのち、アポトーシスが生じることが考えられた。

カスパーゼ-3 とカテプシンLの酵素活性両方が増大した結果から、カンパチ稚魚

は 14 日間の飢餓ストレスによって、タンパク質分解が著しく誘導され、筋肉組織が崩壊し、産卵期サケ<sup>44)</sup>と同様に肉質が劣化することが考えられた。

試験開始 14 日目の普通筋の水溶性タンパク質の SDS-PAGE では 63k では対照区にはないバンドが飢餓試験区で見られた。また 28k では対照区に比べて飢餓試験区のバンドが細く、減少していることが確認された。飢餓ストレスによって筋肉タンパク質の分解が進むことが考えられた。Nakagawa et al.<sup>70)</sup>によって魚肉の水溶性タンパク質が同定されており、電気泳動パターンから グリセロアルデヒド三リン酸脱水素酵素 GAPDH であると推定される。ウエスタンブロット、活性測定およびトリプシン消化ペプチドの質量分析によって、このタンパク質が GAPDH であることを確認する必要がある。飢餓のオートファジーによって筋肉において分解され、アミノ酸栄養に利用されることが考えられた。

飢餓 14 日目の普通筋の塩溶性タンパク質の SDS-PAGE では差違は見られなかった。このことから、14 日間の飢餓では普通筋の水溶性タンパク質が優先して分解されることがわかった。試験日 14 日目の普通筋の水溶性画分のウエスタンブロッティング



では飢餓試験区では HSC70 の発現が増大していた。このことからリソソーム内で生じているシャペロン介在性オートファジーが誘導され、タンパク質を分解することが考えられた。ブリ細胞では熱ストレスによる筋肉でのシャペロン介在性オートファジーでは MAP-LC3 がオートファゴソームに取り込まれることから、マクロオートファジー誘導の分子マーカーとして知られている<sup>46)</sup>。飢餓によっても熱ストレスと同様にシャペロン介在性オートファジーが誘導されることが考えられる。ストレス条件によってグリコーゲンや ATP など筋肉におけるエネルギー物質が枯渇したのち、シャペロン介在性オートファジーおよびマクロオートファジーが誘導され、ストレス条件に伴って不要となったアルドラーゼなど水溶性タンパク質である解糖系酵素群が HSC70 によってリソソームに輸送され、タンパク質分解が進行し、アミノ酸をエネルギー源とする代謝経路が活発化することが推定された。高水温条件や酸欠条件で飼育した実験魚や実際に肉質軟化した魚体を材料として、筋肉や肝臓からリソソーム画分を回収し、リソソーム内のタンパク質をウエスタンブロットや質量分析によって検出することによって、オートファジーの誘導を確認することができる

と考えられる。マクロオートファジーの指標である MAP-LC-II, シャペロン介在性オートファジーの指標である HSP70, 水溶性タンパク質のアルドラーゼやクレアチンキナーゼ, GAPDH などを検出する手法が利用できる。これら複数のオートファジーの機構がどのようなステージの飢餓条件で誘導されたかを調べて, 海産魚の栄養代謝におけるオートファジーの役割を理解することが可能であると考えられる。本研究の結果から, カンパチの飢餓 8 日以降の極度の飢餓条件では, 筋肉の水溶性タンパク質分解がシャペロン介在性オートファジーによって進行することが推定された。陸上動物がグルコースをエネルギー源として利用することに対して, 筋肉におけるオートファジーがアミノ酸栄養の供給源となって利用することによって, 魚類が 2 週間以上の長期間の飢餓条件で生存可能であることが考えられた。

## 謝辞

本研究の遂行にあたり終始多大なるご指導，ご鞭撻を賜った山下倫明教授に深甚な謝意を表す。また，本研究に適切な助言をいただいた廣野育生教授，魚類飼育法をご指導いただいた近藤昌和教授に感謝する。

## 文献

- 1) 新名理恵, 坂田成輝, 弥富直美, 本間 昭. 心理的ストレス反応尺度の開発.  
日本心身医学会誌 1990, 30, p. 29-38.
- 2) 尾仲達史. ストレス反応とその脳内機構. 日本薬理学雑誌 2005, 126, p.  
170-173.
- 3) Lindquist, Susan. The heat-shock response. *Annu Rev Biochem* 1986, 55, p.  
1151-1191.
- 4) Lindquist, Suzan, and Craig, Elizabeth A. The heat-shock proteins. *Annu  
Rev Genet* 1988, 22, p. 631-677.
- 5) Welch, William J. Heat shock proteins functioning as molecular chaperones:  
their roles in normal and stressed cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol  
Sci* 1993, 339, p. 327-333.
- 6) Wu, Carl. Heat shock transcription factors, structure and regulation.  
*Annu Rev Cell Dev Biol* 1995, 11, p. 441-469.

- 7) Amin, J, Ananthan J, Voellmy R. Cis-acting elements involved in the regulated expression of a human hsp70gene. *Mol Cell Biol* 1988, 8, p. 3761-3769.
- 8) Xiao H, Lis JT. Germline transformation used to define key features of heat-shock response elements. *Science* 1988, 239, p. 1139-1142.
- 9) Ojima N, Yamashita M. Cloning and characterization of two distinct isoforms of rainbow trout heatshock factor 1. Evidence for heterotrimer formation. *Eur J Biochem* 2004, 271, p. 703-712.
- 10) Zafarullah M, Wisniewski J, Shworak NW, Schieman S, Misra S, Gedamu L. Molecular cloning and characterization of a constitutively expressed heat-shock-cognate hsc71gene from rainbow trout. *Eur J Biochem* 1992, 204, p. 893-900.
- 11) Yamashita M, Hirayoshi K, Nagata K. Characterization of multiple members of the HSP70 family in platyfish culture cells: molecular evolution of

- stress protein HSP70 in vertebrates. *Gene* 2004, 336, p. 207-218.
- 12) Yabu T, Imamura S, Mohammed MS, Touhata K, Minami T, Terayama M, Yamashita M. Differential gene expression of HSC70/HSP70 in yellowtail cells in response to chaperone-mediated autophagy. *Febs J* 2011, 278(4), p. 673-685.
- 13) 藪 健史. 魚類胚におけるストレス誘導性アポトーシスの分子機構に関する研究. 日本水産学会 2006, 72(5), p. 819-822.
- 14) Strussmann CA, Saito T, Takashima F. Heat-induced germ cell deficiency in the teleosts *Odontesthes bonariensis* and *Patagonina hatcheri*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 1998, 119, p. 637-644.
- 15) Roy MN, Prince VE, Ho RK. Heat shock produces periodic somatic disturbances in the zebrafish embryo. *Mech Dev* 1999, 85, p. 27-34.
- 16) Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972, 26, p. 239-257.

- 17) Yabu T, Todoriki S, Yamashita M. Stress induced apoptosis in zebrafish embryo by heat shock and UV and gamma-ray irradiation detected by increased caspase activity and whole mount TUNEL staining. *Fish Sci* 2001, 67, p. 333-340.
- 18) Yabu T, Ishibashi Y, Yamashita M. Stress induced apoptosis in larval embryo of Japanese flounder. *Fish Sci* 2003, 69, p. 1218-1223.
- 19) Yabu T, Kishi S, Okazaki T, Yamashita M. Characterization of zebrafish caspase-3 and induction of apoptosis through ceramide generation in fish FHM cells and zebrafish embryo. *Biochem J* 2001, 360, p. 39-47.
- 20) Chiang HL, Terlecky SR, Plant CP, Dice JF. A role for a 70-kilodalton heat shock protein in lysosomal degradation of intracellular proteins. *Science* 1989, 246, p. 382-385.
- 21) Reggiori F, Klionsky DJ. Autophagy in the eukaryotic cell. *Eukaryot Cell* 2002, 1, p. 11-21.

- 22) Cuervo AM, Dice JF, Knecht E. A population of rat liver lysosomes responsible for the selective uptake and degradation of cytosolic proteins. *J Biol Chem* 1997, 272, p. 5606-5615.
- 23) 山下倫明. 産卵期サケの肉質軟化機構に関する研究. 日水誌, 1994, 60, p. 439-442.
- 24) Yamashita M, Konagaya S. High activities of cathepsins B, D, H, and L in the white muscle of chum salmon in spawning migration. *Comp Biochem Physiol* 1990, 95B, p. 149-152.
- 25) 藪 健史, 山下倫明. 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. 水研センター研報 2008, 26, p. 23-38.
- 26) Yamashita M, Konagaya S. Hydrolytic action of salmon cathepsins B and L to muscle structural proteins in respect of muscle softening. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1991, 57, p. 1917-1922.



- 27) Toyohara H, Kinoshita M, Ando M, Yamashita M. Elevated activity of cathepsin L-like protease in jellied meat of Japanese flounder. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1993. 59, p. 1909-1914.
- 28) Yamashita M, Nakano H, Konagaya S. The elevation of catheptic activity in muscle and liver of ayu *Plecoglossus altivelis* during maturation. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1990, 56, p. 1157.
- 29) 坊垣暁之, 渥美達也. オートファジーと自己免疫疾患. 日本免疫臨床学会誌 2014; 37(3): 125-132.
- 30) 天野敦雄. 細菌感染とオートファジー. モダンメディア 細菌 2011; 57(6): 159-165.
- 31) 上野隆. 哺乳類マクロオートファジーの基礎と病体. 化学と生物 2014; 52(5): 321-327.
- 32) Hosokawa N, Hara T, Kaizuka T, Kishi C, Takamura A, Miura Y, Iemura S, Natume T, Takehana K, Yamada N. *Mol Biol Cell* 2009, 20, p. 1981.

- 33) 小長谷史郎. ジェリーミートとヤケ肉. 食工誌 1982; 29, p. 379-388.
- 34) 山下倫明. 漁獲ストレスと生体反応. 「生鮮マグロ類の高品質管理 漁獲から流通まで」(紺野久仁彦, 落合芳博, 福田裕編) 恒星社厚生閣. 東京. 2010, 6, p. 81-94.
- 35) 山下倫明, 今村伸太郎, 藪 健史, 石原賢司, 山下由美子. 水産物由来のセレン: セレノネインの栄養生理機能. *Biomedical Research on Trace Elements* 2013, 24(4), p. 176-184.
- 36) Yamashita Y, Yamashita M. Identification of a novel selenium-containing compound, selenoneine, as the predominant chemical form of organic selenium in the blood of bluefin tuna. *J Biol Chem* 2010, 285, p. 18134-18138.
- 37) 山下由美子, 鈴木珠水, 原竜朗, 今村伸太郎, モハメド A. ホセイン, 藪健史, 東畑 顕, 山下倫明. セレン含有抗酸化物質セレノネインの静脈投与によるブ  
リ血合筋のメト化抑制. 日水誌 2013, 79(5), p. 863-868.
- 38) 武田道夫, 上田正. マグロ類の水銀およびセレン含有に関する研究 VII. キハ

- ダ筋肉およびマグロおよびカシキ類の肝臓・脾臓の水銀セレン量. 水産大学校  
研究報告 1978, 26, p. 267-279.
- 39) 農林水産技術会議事務局・水産庁. 132. 魚肉中の微量 必須元素に関する食品学  
的研究. 「平成 10 年度農林水産 試験研究年報水産編」東京. 1999, p. 83.
- 40) 有馬郷司, 長倉克男. 歯クジラ類の水銀およびセレン含量. 日水誌 1979, 45, p.  
623-626.
- 41) Combs GF Jr, Combs SB. The Role of Selenium in Nutrition. Academic Press,  
NewYork, 1986.
- 42) 吉田宗弘. 日本人のセレン摂取と血中セレン濃度. 日本栄養・食糧学会誌 1992,  
45, p. 485-494.
- 43) 姫野誠一郎. セレン. 「ミネラル/微量元素の栄養学」(鈴木継美, 和田攻編) 第  
一出版, 東京. 1994, p. 423-445.
- 44) 鈴木泰夫編, 田主澄三. 「食品の微量元素含量表」 第一出版, 東京. 1993.
- 45) Yamashita Y, Yamashita M, Iida H. Selenium content in seafood in Japan.

Nutrients 2013, 5, p. 388-395.

- 46) Yamashita M, Yamashita Y, Ando T, Wakamiya J, Akiba S. Identification and determination of selenoneine, 2-selenyl-N $\alpha$ ,N $\alpha$ ,N $\alpha$ -trimethyl-L-histidine, as the major organic selenium in blood cells in a fish-eating population on remote Japanese islands. *Biol Trace Elem Res* 2013, 156, p. 36-44.
- 47) Yamashita M, Yamashita Y, Suzuki T, Kani K, Mizusawa N, Imamura S, Takemoto T, Hara T, Hossain MA, Yabu T, Touhata K. Selenoneine, a novel selenium-containing compound, mediates detoxication mechanisms against methylmercury accumulation and toxicity in zebrafish embryo. *Marine Biotech* 2013, 15, 559-570, 2013
- 48) Yamashita Y, Yabu T, Yamashita M. Discovery of the strong antioxidant selenoneine in tuna and selenium redox metabolism. *World J Biol Chem* 2010, 1, p. 144-150.

- 49) 井岡 久, 山中英明. 餌料の異なる養殖ヒラメの品質評価. 日水誌 1997, 63, p. 370-377.
- 50) Sohn J, Ushio H, Ishida N, Yamashita M, Terayama M, Ohshima T. Effect of bleeding treatment and perfusion of yellowtail on lipid oxidation in post-mortem muscle. *Food Chem.* 2007, 104, p. 962-970.
- 51) Liang X, Yoshida A, Osatomi K, Wang Y, Cao MJ, Hara K. Degradation of myofibrils in cultured yellowtail *Seriola quinqueradiata* burnt meat: effects of a myofibril-bound EDTA-sensitive protease. *Fish Sci* 2012, 78, p. 147-153.
- 52) Rotruck JT, Pope AL, Ganther HE, Swanson AB, Hafeman DG, Hoekstra WG. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science* 1973, 179, p. 588-590.
- 53) Hatfield DL, Berry MJ, Gladyshev VN. *Selenium: Its Molecular Biology and Role in Human Health* (2nd ed). Springer, New York. 2006.

- 54) 橋口健太郎, 川合研兒, 今城雅之, 大嶋俊一郎. 日本の主要海産養殖魚の各刺激に対するストレス応答. 水産増殖 2014, 62, p. 385-392.
- 55) 会田勝美, 潮秀樹: 代謝. 「増補開拓板 魚類生理学の基礎」(会田勝美, 金子豊二編), 恒星社厚生閣 2013, 10, p. 204-215.
- 56) 山下倫明, 鈴木満平. 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 1996, 8, p. 29-34.
- 57) Yamashita M, Konagaya S. High activities of cathepsins B, D, H and L in white muscle of chum salmon in spawning migration. *Comp Biochem Physiol* 1996, 95B, p. 149-152.
- 58) BC イヴレフ. 「魚類の栄養生理学」(児玉康雄, 吉原友吉訳) 新科学文献刊行会 1965, p. 165-186.
- 59) 藤谷超, 塚原宏子. 養殖魚の研究-第 VIII 報 飢餓魚に現れた症状, 南西海区水研報告 1972, 1, p. 63-69.
- 60) Inui Y, Oshima Y. Effect of starvation on metabolism and chemical

- composition of eels. *Bull Jap Soc Sci Fish* 1966, 32(6), p. 492-501.
- 61) 示野貞夫. 4. 魚類の淡水化物代謝 とくに酵素の分布と代謝調節について, 水産増殖 1972, 20(4-5), p. 263-275.
- 62) 山崎耿二郎. 絶食時の代謝研究(1) コイの体成分変化と物質代謝について, 水産増殖 1972, 20(3), p. 127-136.
- 63) Larsson A, Lewander K. Metabolic effects of starvation in the eel, *Anguilla anguilla* L. *Comp Biochem Physiol* 1973, 44, p. 367-374.
- 64) Moon TW, Johnston IA. Starvation and enzyme activities in the skeletal muscles and liver of a teleost fish. *Biochem Soc Trans* 1979, 7, p. 1045-1046.
- 65) Patterson S, Johnston IA, Goldspink G. The effect of starvation on the chemical composition of red and white muscles in the plaice (*Pleuronectes platessa*). *Experientia* 1973, 30, p. 892-894.
- 66) French CJ, Hochachka PW, Mommsen TP. Metabolic organization of liver during

- spawning migration of sockeye salmon. *Am J Physiol* 1983, 245, p. 827–830.
- 67) Shimeno S, Kheyyali D, Takeda M. Metabolic adaption to prolonged starvation in carp. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1990, 56, p. 35–41.
- 68) Mommsen TP. Salmon spawning migration and muscle protein metabolism: the August Krogh principle at work. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Bio* 2004, 139, p. 383–400.
- 69) Yabu T, Imamura S, Mizusawa N, Touhata K, Yamashita M. Induction of autophagy by amino acid starvation in fish cells. *Marine Biotech* 2012, 12, p. 491–501.
- 70) Nakagawa T, Watabe S, Hashimoto K. Identification of three major components in fish sarcoplasmic proteins. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1988, 54, p. 999–1004.



## FIGURE LEGENDS

**Fig. 1.** Changes in body length (A) and body weight (B) for 14 days during feeding and starvation experiments. Open circle and triangle indicate the values for the control and starvation feed respectively. Asterisk indicates the statistical significance between the control and the treated fish during the feeding and starvation experiments ( $*P < 0.05$ ).

**Fig. 2.** Changes in hepatosomatic index (A) and condition factor (B) for 14 days during feeding and starvation experiments. Open circle and triangle indicate the value for the control and starvation feed respectively. Asterisk indicates the statistical significance between the control and the treated fish during the feeding and starvation experiments ( $*P < 0.05$ ).

**Fig. 3** Changes in water-soluble protein contents (A) and salt-soluble protein

contents (B) for 14 days during feeding and starvation experiments. Open circle and triangle indicate the values for the control and starvation feed respectively. Asterisk indicates the statistical significance between the control and the treated fish during the feeding and starvation experiments ( $*P < 0.05$ ).

**Fig. 4** Changes in cathepsin L activity (A) and caspase-3 activity (B) for 14 days during feeding and starvation experiments. Open circle and triangle indicate the values for the control and starvation feed respectively. Asterisk indicates the statistical significance between the control and the treated fish during the feeding and starvation experiments ( $*P < 0.05$ ).

**Fig. 5** SDS-PAGE pattern of water-soluble protein fractions in the white muscle of the Coomassie Blue staining (A) and HSC70 expression detected with the anti

HSC70 (B) of the day 14 of the feeding and starvation experiments. A 10 % gel was used. The lane numbers indicate individual numbers. The letter M stands for molecular weight protein marker. The arrow and the asterisk indicate the components absent of feeding and starvation.

**Fig. 6** SDS-PAGE pattern of salt-soluble protein fractions in the white muscle of the day14 of the feeding and starvation experiments. A 10 % gel was used. The lane numbers indicate individual numbers. The letter M stands for molecular weight protein marker.

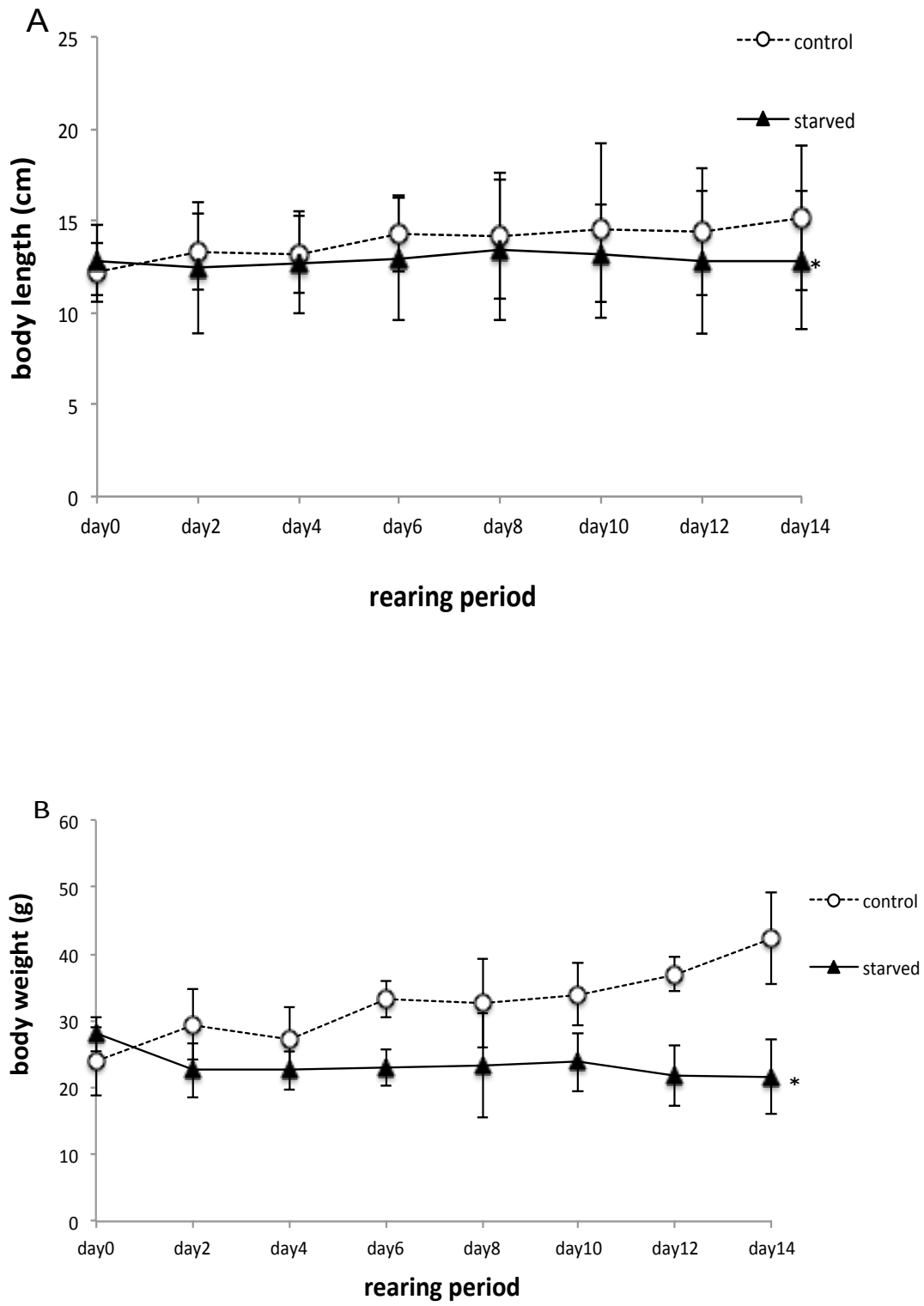


Fig. 1

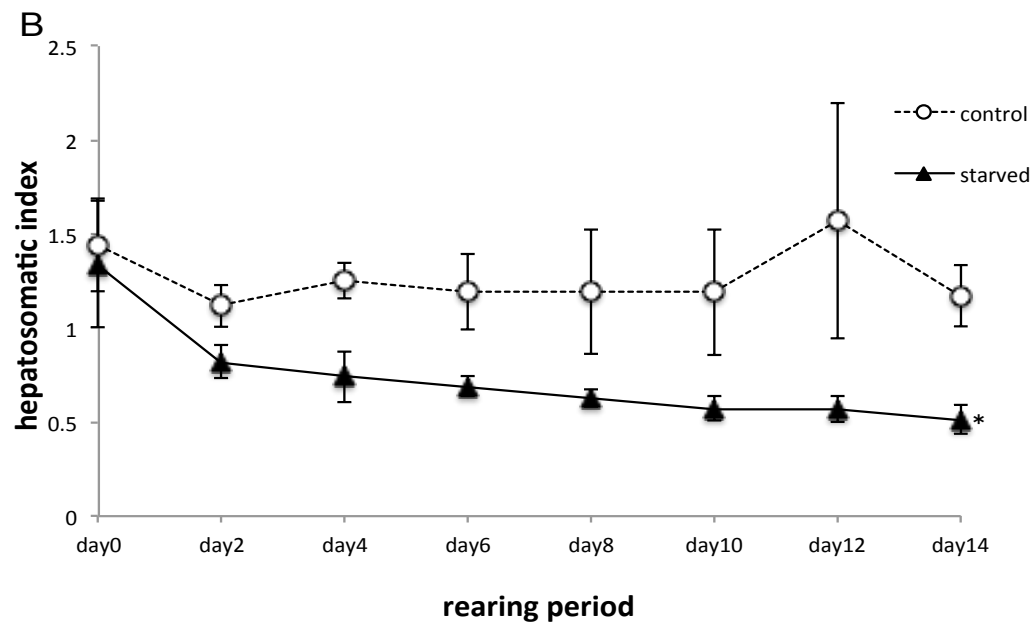
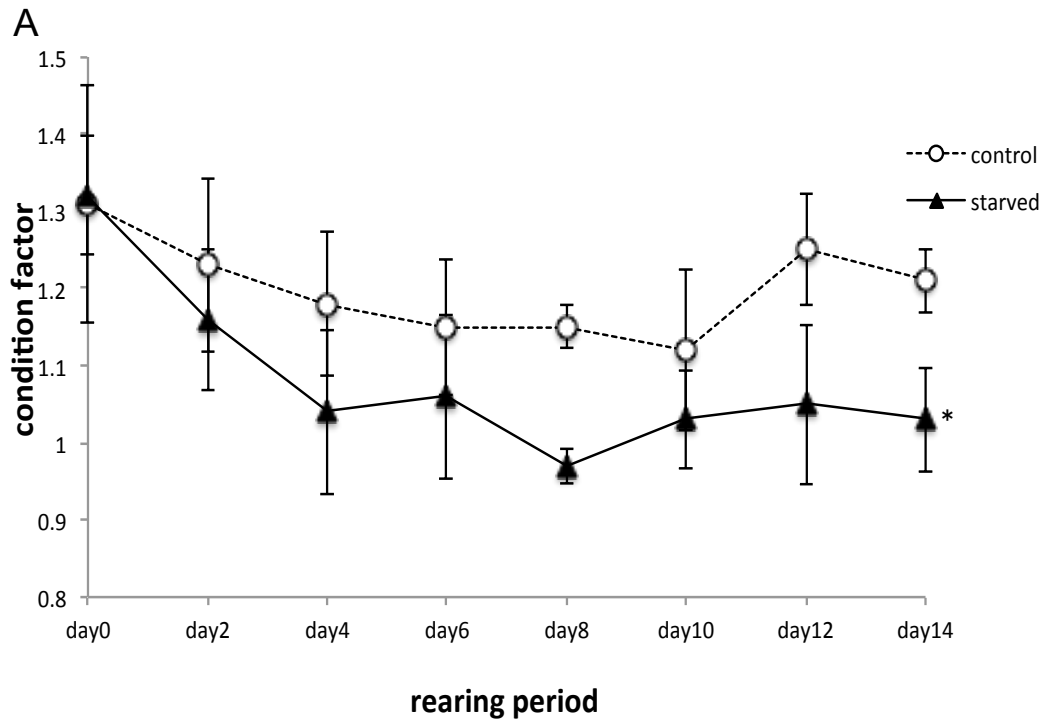


Fig. 2

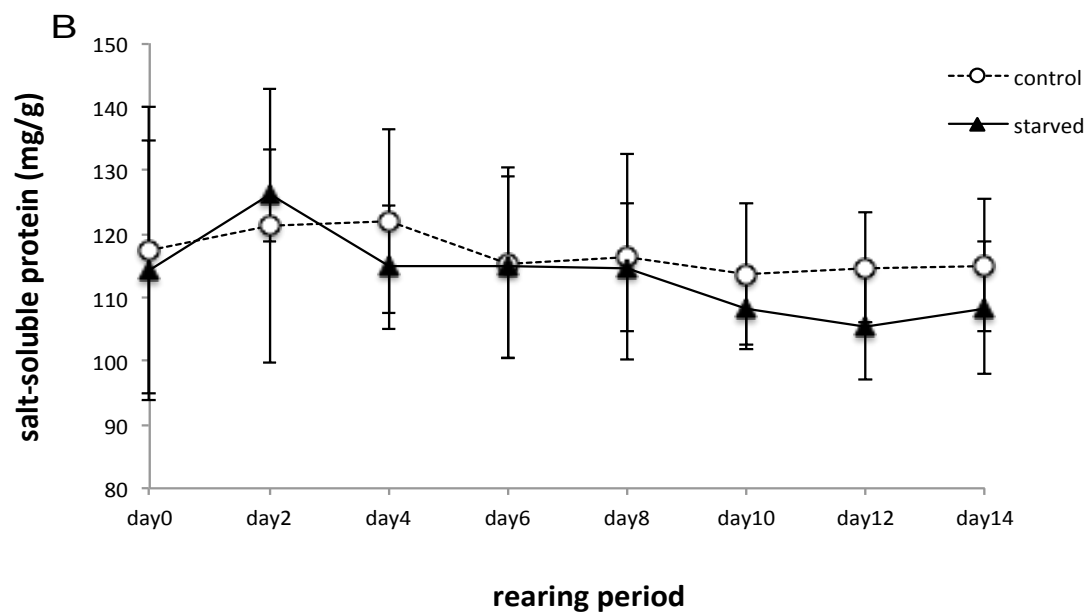
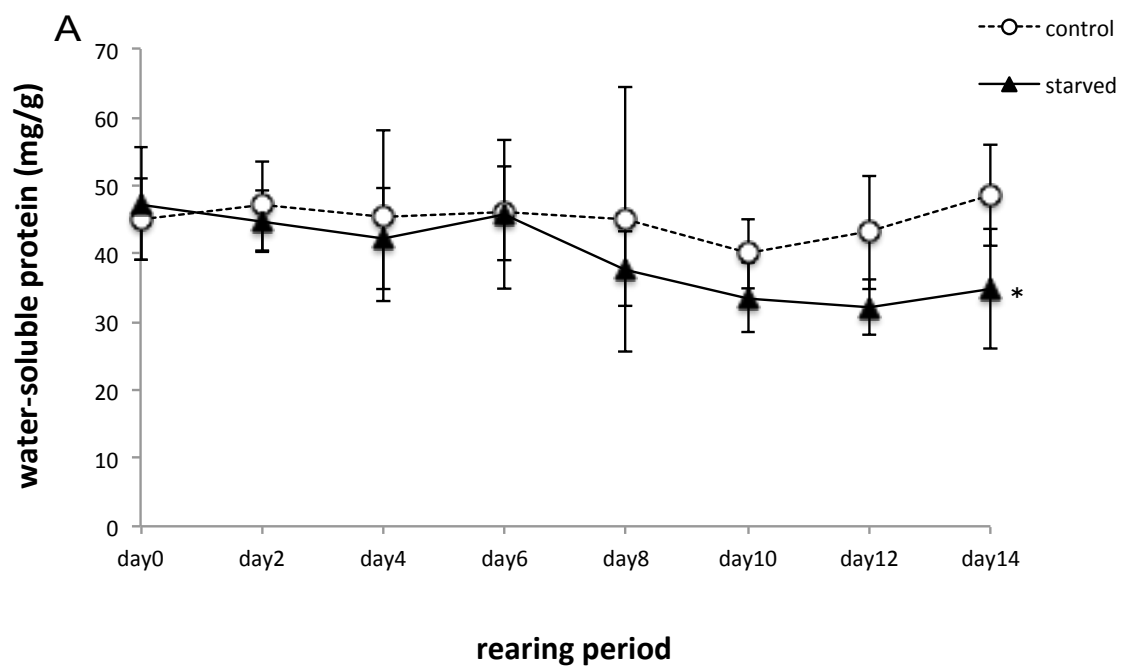


Fig. 3

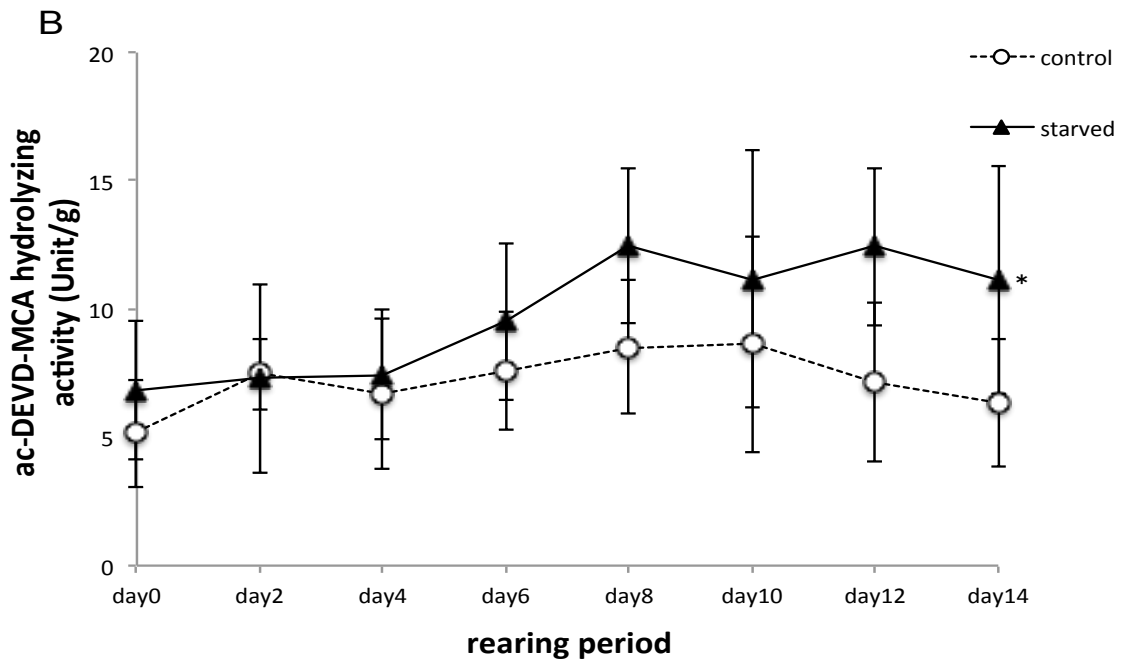
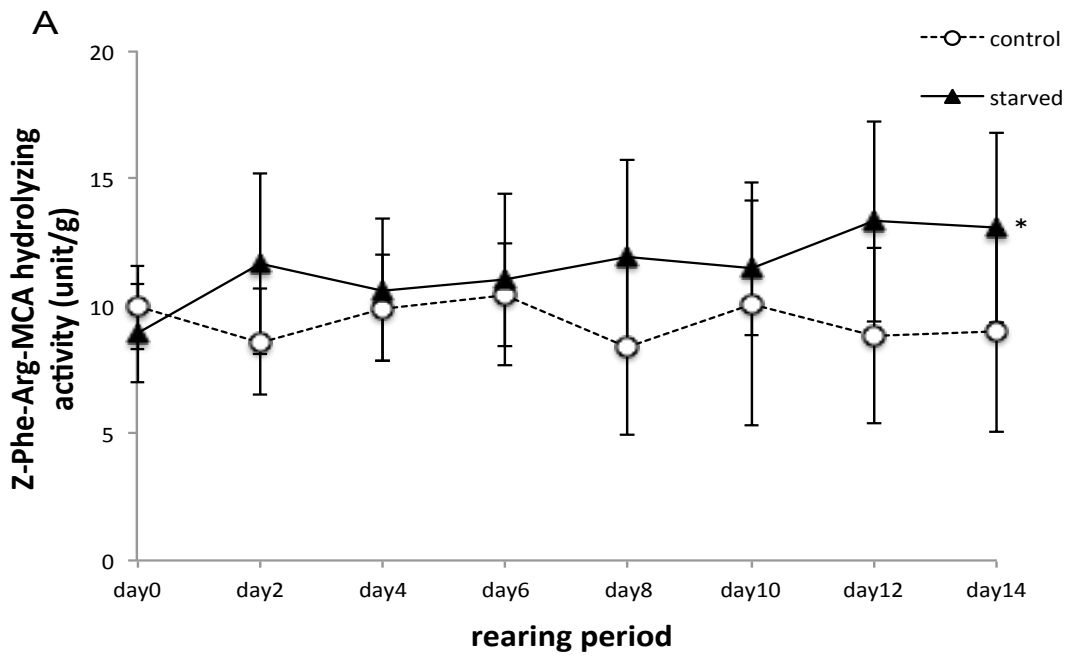


Fig. 4

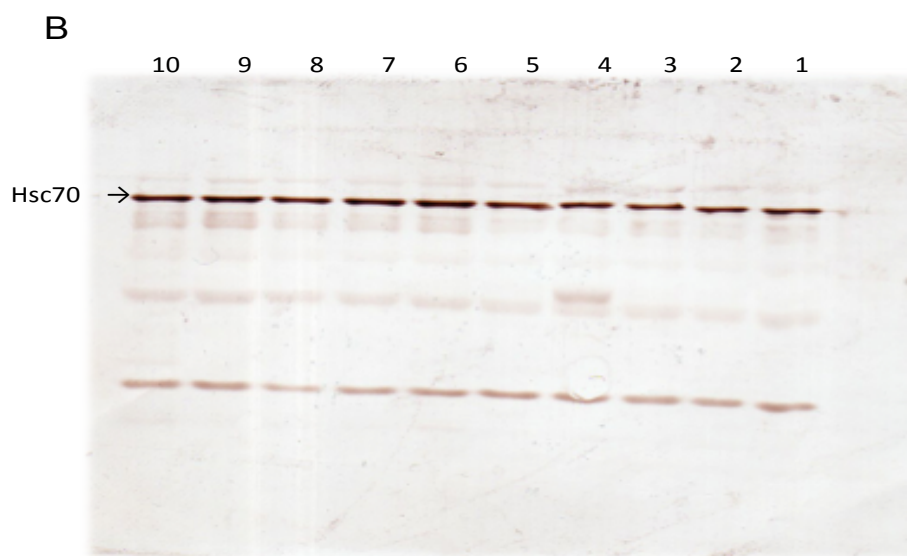
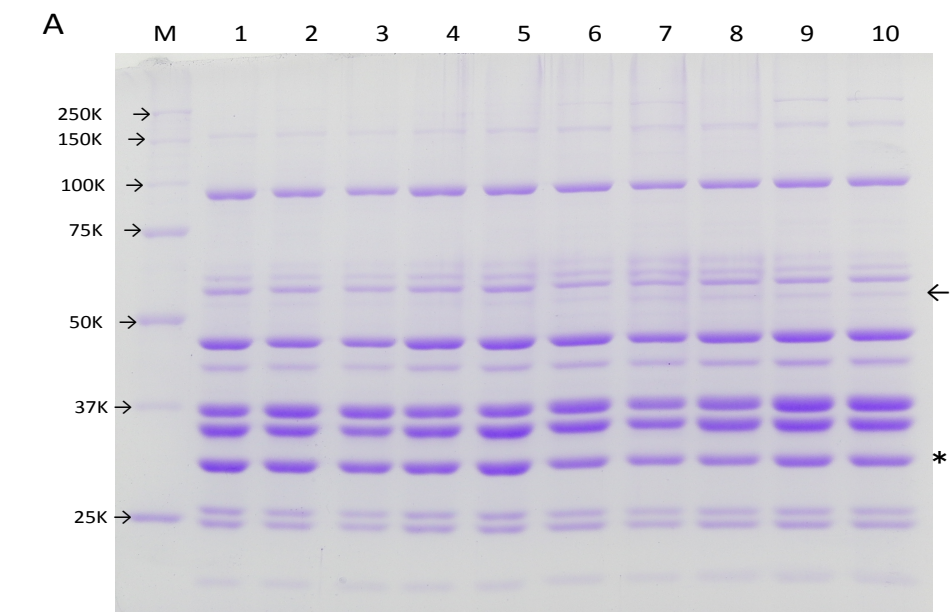


Fig. 5



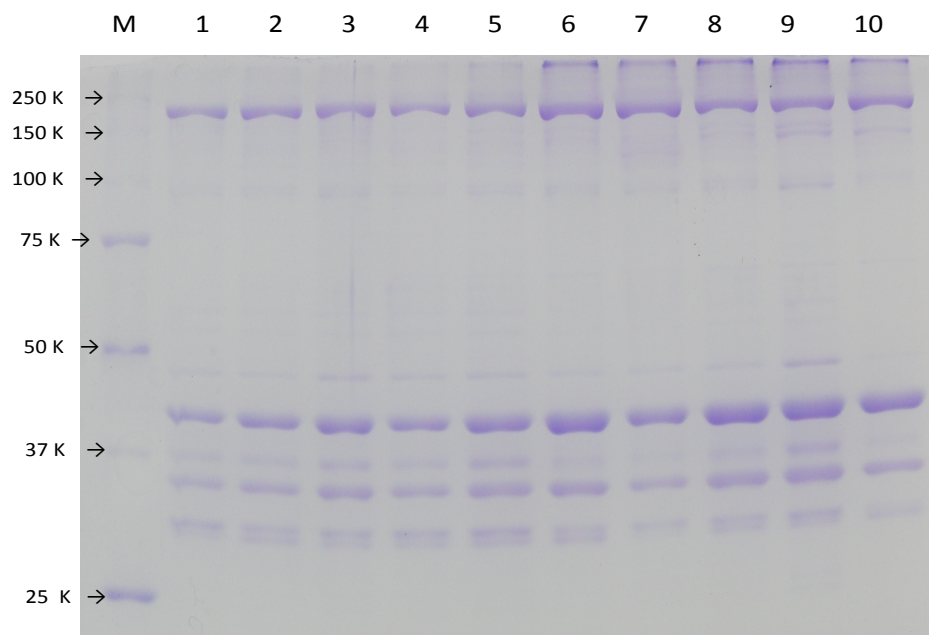


Fig. 6