

鶏の筋細胞におけるユビキチン局在の組織化学的検討

関川 三男・山本みわこ・島田謙一郎・三上 正幸・福島 道広・石川 稔矩*

帯広畜産大学生物資源科学科, 帯広市 080-8555

*日本大学松戸歯学部生物学研究室, 松戸市 271-0061

Demonstration of ubiquitin in chicken muscle cell by histochemical study

M. SEKIKAWA, M. YAMAMOTO, K. SHIMADA,
M. MIKAMI, M. FUKUSHIMA and T. ISHIKAWA*

Department of Bioresource Science, Obihiro University of Agriculture and
Veterinary Medicine, Obihiro 080-8555

*Laboratory of Biology, Nihon University of School of Dentistry at Matsudo, Matsudo 271-0061

キーワード: ユビキチン, 鶏肉, 熟成, 免疫組織化学

Key words: ubiquitin, chicken muscle, conditioning, immunohistochemistry

要 約

鶏骨格筋の筋細胞におけるユビキチンの局在を組織化学的に検討した。屠殺直後および熟成させた浅胸筋を抗ユビキチン抗体を用いて免疫染色を行った。凍結切片の作成に先だって加熱処理を行うと、ユビキチンの染色性が向上した。熟成が完了した試料においても屠殺直後と同様の局在が認められた。これらの結果から、鶏骨格筋筋漿画分で電気泳動的に確認されたユビキチンは、筋細胞に本来的に存在し、さらに熟成後の試料でも加熱処理によって組織化学的に検出し得ることが示唆された。

緒 言

ユビキチンは、原核生物から人まであらゆる細胞に存在する分子量 8,600, アミノ酸 76 残基からなるタンパク質で、その一次構造は進化的に高く保存されている。ユビキチンの生体内での役割は、主に分解すべきタンパク質に結合し細胞内タンパク質分解系の一つであるプロテアソーム系へ提示・認識させるマーカーとしての特性や細胞周期の制御あるいは熱ストレスへの抵抗などが挙げられている (Fang *et al.*, 1995; 田中ら, 1996)。

筋細胞においてもユビキチンは存在し、飢餓や無重力など特殊な状況下で筋原線維を分解することが報告されている (Taillandier *et al.*, 1996)。しかし、家畜を屠殺してから得られる食肉に関しては、ユビキチンの存否あるいは役割、プロテアソーム-ユビキチン系

の関与など、ほとんど研究されていない。また、ユビキチンは筋細胞や赤血球など身体を構成するほとんど全ての細胞に存在するため、筋漿画分で確認されたユビキチンが (Sekikawa *et al.*, 1998)、筋細胞由来であることを組織化学的に確認する必要がある。そこで本実験では、屠殺後の筋細胞におけるユビキチンの局在を組織化学的に検討することを目的とした。

材料および方法

屠殺した鶏の浅胸筋からユビキチンを電気泳動的に確認するための筋漿画分を調製した。筋漿画分を調製するに当たり、夾雑タンパク質の除去およびプロテアーゼの失活を目的として加熱処理を行った。すなわち、屠殺直後 (30 分以内) および冷蔵 (4℃, 6 時間) した浅胸筋を細切し、この 2 倍重量の沸騰させた蒸留水に懸濁し、5 分間加熱した後、室温まで放冷した。これを均質化し、遠心分離 (0℃, 6,000×g, 30 分間) を行い、上澄液を濾過した後、蒸留水に対し透析し、内液を凍結乾燥した。得られた凍結乾燥品を筋漿画分とし、これを既報 (Sekikawa *et al.*, 1998) に従い電気泳動、ニトロセルロース膜への転写および免疫染色を行った。なお、電気泳動の試料は筋漿画分 5 mg/ml の濃度とし、各レーンには 5 μl を添加した。免疫染色は、一次抗体としてユビキチン抗血清 (Sigma) を、二次抗体としてペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギ IgG (BIO-RAD) を用いた。

浅胸筋の凍結切片は、筋漿画分と同様に屠殺直後および冷蔵 (4℃, 24 時間) したのものから作成した。ユビキチンの染色性と加熱温度との関係を明らかにするため加熱条件の検討を行った。加熱処理は、約 7 mm

の厚さに切った試料を酸素不透過性フィルムで密封し、これを 65, 75 および 85°C に設定した恒温槽に入れ試料の内部温度が設定温度に達してから 5 分間保持した。これを水道水で冷却後、開封し約 5 mm 角に切り出し、液体窒素で凍結し、7 μ m の凍結連続切片を作成した。これを Hematoxylin-Eosin (HE) 染色, Gomori's trichrome, 鍍銀染色, NADH-tetrazolium reductase (NADH-TR) 染色に供し観察した。また、ユビキチンに対する免疫染色は、一次抗体としてユビキチン抗血清 (Sigma) を用い、avidin-biotin peroxidase complex method (ABC 法) (Vectastain ABC Kit, Vector 社) で発色させ光学顕微鏡で観察した。

結 果

図 1 は、今回、調製した筋漿画分を SDS-PAGE に供し、転写膜上でアミドブラック 10 B 染色 (A) および抗ユビキチン血清による免疫染色 (B) を行った結果である。個体間での差は少なかったので代表例を示した。すなわち、アミドブラック染色像では屠殺直後 (30 分) から 6 時間目にかけて 17 kDa 以下のバンドの染色性が強くなった。また、免疫染色像ではユビキチンに相当するバンドが屠殺後の時間経過にかかわらず認められたが、6 時間目のものは染色性が低下した。

図 2 は、加熱の有無による組織への影響を HE 染色

で比較したもので、差は主に細胞間隙で認められた。すなわち、加熱により細胞の外形が規則性を失い、さらに細胞間隙が拡大していた。しかし、これに比べ細胞内では、加熱処理による影響が少なく、特に核の染色性は未処理と同様であった。NADH-TR 染色では、加熱処理を行うと染色性が著しく低下し、Gomori's trichrome 染色では加熱処理により細胞周辺部で変性タンパク質に由来すると考えられる赤紫色の染色体が観察された。鍍銀染色では加熱処理によって細胞膜の崩壊像が観察された (光顕像省略)。

図 3 は、屠殺 6 時間後の試料における抗ユビキチン血清による免疫染色像で、加熱処理により細胞質に顆粒状の構造が明瞭となり、さらに温度が高くなるにつれてこれらの染色強度が増大する傾向が認められた (a-d)。また、図 4 は、屠殺後 24 時間目の試料 (加熱温度 75°C) の免疫染色像で、屠殺 6 時間後のものに比べ核の染色性は低下しているが、細胞質の顆粒状の染色像は屠殺 6 時間後のものと同様の特徴を示した。

考 察

食肉の熟成に伴い細胞質 (筋漿画分) の遊離アミノ酸や低分子量のペプチドが増加することは多くの報告で一致し (Field *et al.*, 1971; Mikami *et al.*, 1994), この傾向は、今回、示した SDS-PAGE (図 1) の結果

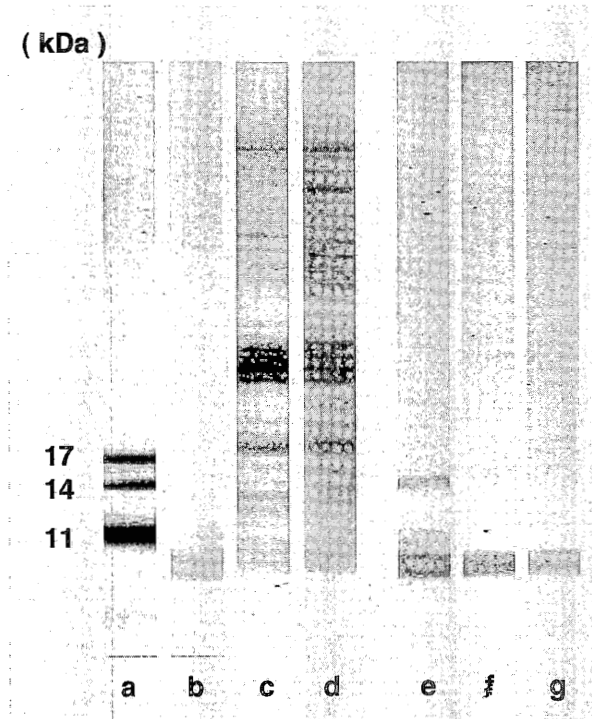


図 1 筋漿画分におけるユビキチンの同定

屠殺直後 (c, f) および 6 時間後 (d, g) の浅胸筋から調製した筋漿画分 25 μ g を 15% SDS-PAGE で分離し、ニトロセルロース膜へ転写した後、アミドブラック 10 B による染色像 (a-d) および抗ユビキチン血清による免疫染色像 (e-f) を示す。a は分子量マーカー、b および e はユビキチンを示す。

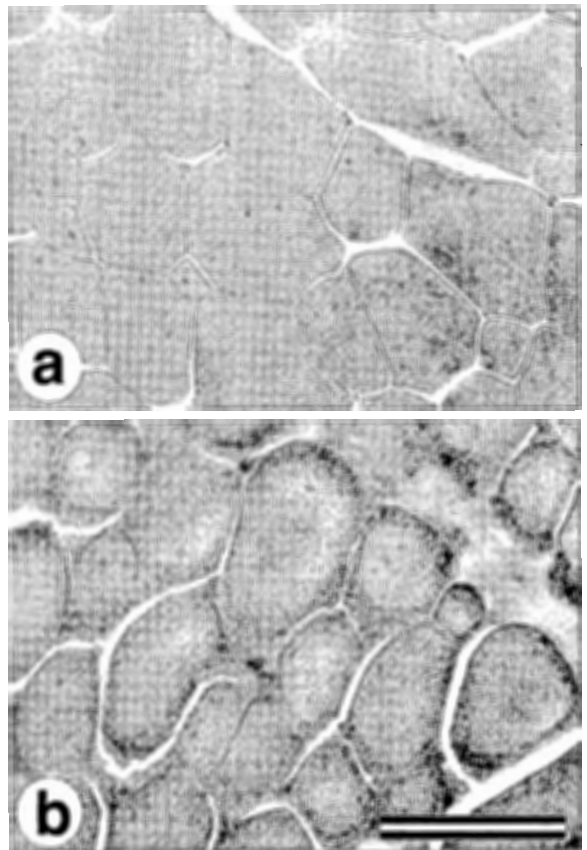


図 2 屠殺 6 時間後の鶏浅胸筋の HE 染色像

a : 非加熱, b : 加熱処理 (75°C)
スケールバーは 100 μ m を示す

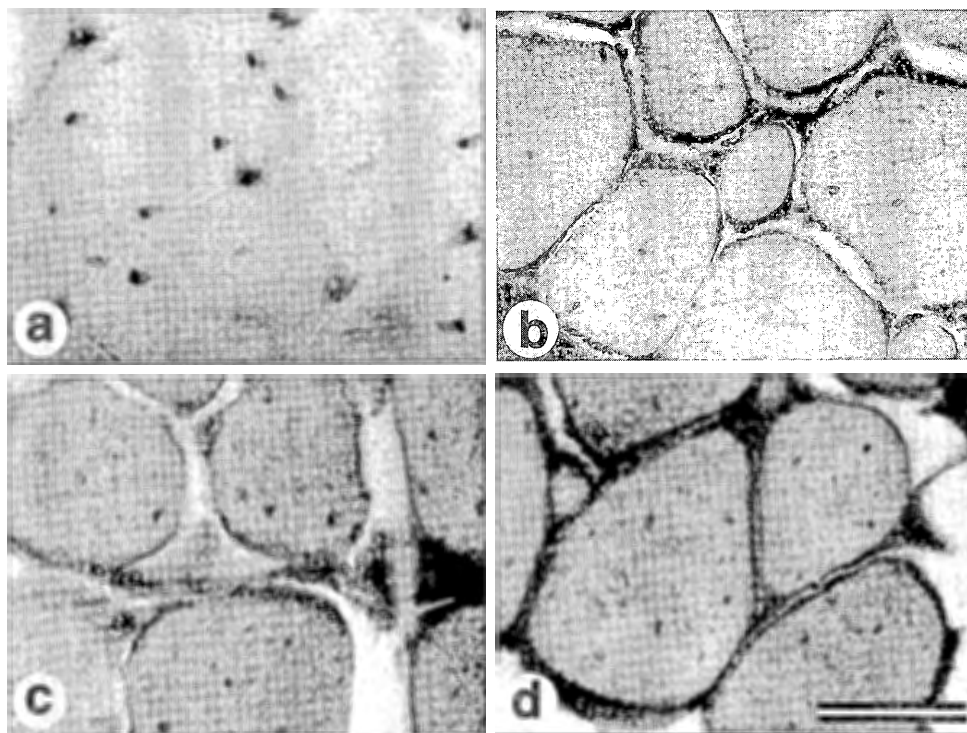


図3 ユビキチンの染色性におよぼす加熱処理の影響
 a：非加熱，b：加熱 65°C，c：加熱 75°C，d：加熱 85°C
 スケールバーは 50 μm を示す

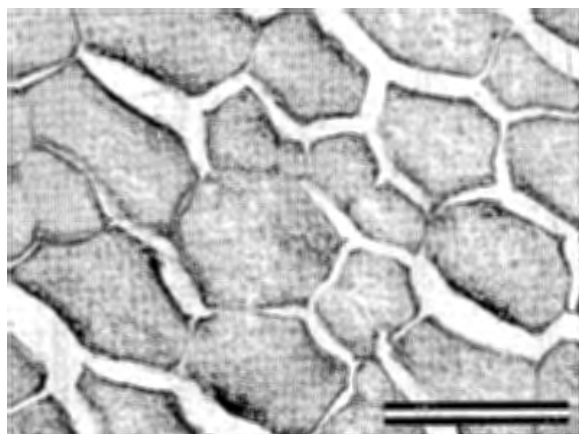


図4 屠殺 24 時間後の抗ユビキチン血清による免疫染色像
 加熱処理 75°C
 スケールバーは 100 μm を示す

からも明らかである。すなわち、ミオグロビンに相当する 17 kDa 以下のバンドの経時的増加が認められる(図 1)。この増加は、主にカルパインやカテプシンあるいはアミノペプチダーゼ等のタンパク質分解酵素によるものと考えられているが (Etherington *et al.*, 1990; Dransfield, 1994; Koohmaraie, 1994; Sekikawa *et al.*, 1998), 近年, これらの酵素以外に細胞内タンパク質分解系としてプロテアソーム-ユビキチン系が注目されている。この系は、飢餓や無重力状態で筋原線維を分解することが報告されている (Taillandier *et al.*, 1996)。

ユビキチンは生体のほとんどの細胞に存在し、細胞内のタンパク質分解や細胞分裂の制御あるいはストレス抵抗性等の機能が知られている。細胞内において寿命の短いタンパク質や異常タンパク質は、選択的にプロテアソーム系で分解されるが、ユビキチンはその標識として機能している。また、ユビキチン自体はストレスタンパク質の一種で、熱ショックにより誘導される (Fang *et al.*, 1995; 山尾, 1997)。さらに、ユビキチンは生体における反応ばかりではなく個体死直後に外界からの強い熱刺激 (高温, 低温) や虚血などによっても細胞質や核に誘導される (Fang *et al.*, 1995; Shimizu *et al.*, 1997)。しかし、死後の時間経過に伴い熱刺激が加えられてもユビキチンは発現しないことが示されている (池田ら, 1992)。牛骨格筋においても、屠殺直後および 24 時間後に調製した筋漿画分でユビキチンが確認され、その後 10 日間の冷蔵により消失することが示唆されている (Sekikawa *et al.*, 1998)。今回の結果においても、屠殺直後および 6 時間冷蔵した鶏骨格筋の筋漿画分にユビキチンを電気泳動的に確認できた(図 1)。すなわち、鶏肉および牛肉において屠殺後数時間は、筋漿画分にユビキチンが存在するものと考えられる。

ユビキチンは筋細胞ばかりではなく赤血球にも存在する。一般に、筋肉内の血液は屠殺時の放血で 80-90% 除去されるが、10-20% は残存する。このため均質化された筋試料には必ず血液由来の成分が混入すると考えられ、電気泳動的に確認されたユビキチンが血

液由来の可能性も推定される。そこで、凍結切片を作成し抗ユビキチン抗体を用いた免疫染色を行い、筋漿画分で確認されたユビキチンが、筋細胞由来であることを確認するために組織化学的観察を行った。その結果、筋細胞の凍結切片上で陽性反応が認められたが、加熱処理を行わなかったものの染色性は著しく低かった(図3)。さらに、染色強度は加熱温度が高くなるにつれ増加する傾向が認められた。このことは、今回、用いたポリクロナール抗体が熱変性を受けたユビキチンをより認識し易いこと、あるいは筋細胞内で加熱処理によりユビキチンあるいはその抗原決定部位が露出する頻度が高くなったこと、などの可能性が考えられるが、詳細は不明である。

池田ら(1992)は、法医学的見地からラットの肝臓および腎臓を摘出し、直ちに加温(50℃)すると免疫組織化学的にユビキチンが細胞核に認められるが、加温を1時間以上継続したり摘出後20分以上臓器を室温に放置すると検出不能となると報告している。このことは、個体死直後に組織への血液供給は止まるが、個々の細胞は、まだ生体における機能、すなわち熱刺激に対する反応系を保持していることを示唆する。今回、試料は断頭後30分以内に調製し、屠殺直後にユビキチンの存在を電気泳動的にも組織化学的にも確認することができた。これは細胞内でユビキチンが誘導された可能性も考えられるが、熟成完了後(屠殺後24時間、図4)の試料においても、屠殺直後と同様の染色像が得られており、屠殺あるいは加熱などの刺激で誘導されたものばかりではなく生体において恒常的に維持されていたものと推定される。

謝 辞

帯広畜産大学獣医学科病理学教室の松井高峯教授および古岡秀文助教授には免疫組織化学的手法をご教授頂いた。また、同大学家畜管理学科家畜育種学増殖学講座の三好俊三教授および中札内農協の松崎末太郎氏には鶏をご供与頂いた。ここに記して深謝する。なお、本研究の一部は文部省科学研究費(MS: # 10660253)によった。

文 献

DRANSFIELD, E.(1994) Optimisation of tenderisation, ageing and tenderness. *Meat Sci.*, **36**: 105-121.
ETHERINGTON, D. J., TAYLOR, M. A. J., WAKEFIELD, D. K., COUSINS, A. and DRANSFIELD, E.(1990)

Proteinase (cathepsin B, D, L and calpains) levels and conditioning rates in normal, electrically stimulated and high-ultimate-pH chicken muscle. *Meat Sci.*, **28**: 99-109.

FANG, C. H., TIAO, G., JAMES, H., OLGE, C., FISCHER, J. E. and HASSELGREN, P. O.(1995) Burn injury stimulates multiple proteolytic pathways in skeletal muscle, including the ubiquitin-energy-dependent pathway. *J. Am. Coll. Surg.*, **180**: 161-170.

FIELD, R. A., RILEY, M. L. and CHANG, Y.(1971) Free amino acid changes in different aged bovine muscle and their relationship to shear values. *J. Food Sci.*, **36**: 611-612.

池田卓也, 大谷静治, 渡邊俊文, 舟山真人, 森田匡彦(1992)熱ショック蛋白質ユビキチンの核内発現に関する実験的研究, *法医学の実際と研究*, **35**: 81-85.

KOOHMARAI, M.(1994) Muscle proteinases and meat aging. *Meat Sci.*, **36**: 93-104.

松本昌泰, 北川一夫, 鎌田武信(1994)虚血とシャペロン, *蛋白質 核酸 酵素*, **39**: 846-854.

MIKAMI, M., NAGAO, M., SEKIKAWA, M., MIURA, H. and HONGO, Y.(1994) Effects of electrical stimulation on the peptide and free amino acid contents of beef homogenate and sarcoplasm during storage. *J. Anim. Sci. Technol.*, **65**: 1034-1043.

SEKIKAWA, M., SENO, K., and MIKAMI, M.(1998) Degradation of ubiquitin in beef during storage. *Meat Sci.*, **48**: 201-204.

SHIMIZU, M., OHTANI, S., SIONO, H., FUKUYAMA, T. and SASAKI, M.(1997) Expression of ubiquitin in each organ at death from hypothermia. *J. Forensic Sci. Internat.*, **86**: 61-68.

TAILLANDIER, D., AUROUSSEAU, E., MEYNIAL-DENIS, D., BECHET, D., FERRARA, M., COTTIN, P., DUCASTAING, A., BIGRAD, X., GUEZENNEC, C., SCHMID, H. and ATTAIX, D.(1996) Coordinate activation of lysosomal, Ca²⁺-activated and ATP-ubiquitin-dependent proteinases in the unweighted rat soleus muscle. *Biochem. J.*, **316**: 65-72.

田中啓二(1996)ユビキチンとプロテアソーム, *細胞工学*, **15**: 888-896.

山尾文明(1997)ユビキチンによる翻訳後修飾システム, *蛋白質 核酸 酵素*, **42**: 2137-2144.