

宇宙航空研究開発機構研究開発報告

JAXA Research and Development Report

平成17年度
ISS科学プロジェクト室細胞生物研究プロジェクト
研究開発報告

ISS科学プロジェクト室
細胞生物研究プロジェクトチーム

2006 年 3 月

宇宙航空研究開発機構

Japan Aerospace Exploration Agency

序 文

本研究開発報告は、宇宙航空研究開発機構宇宙科学研究本部 ISS 科学プロジェクト室で実施されている、ライフサイエンス系細胞生物研究プロジェクトの平成 17 年度作業の成果報告書である。本プロジェクトは、以下に挙げる二つの研究課題により構成されている。

1. 線虫 *C. elegans* を用いた宇宙環境における RNAi とタンパク質リン酸化
2. ユビキチンリガーゼ Cbl-b による筋萎縮の新規メカニズム

第 1 章は、モデル生物である線虫を用いた宇宙実験の地上予備実験および準備状況についての活動報告である。本課題は 2004 年に実施された第 5 回ライフサイエンス国際公募においてフライト候補テーマとして選定され、実施に向けた準備を進めている。また、同じく 2004 年に実施された線虫国際共同実験 (ICE-First: International *C. elegans* Experiment-1) に関する研究成果についても含めて報告する。

第 2 章では、培養細胞を用いた筋萎縮の新規メカニズムを提唱し実証を目指した研究課題であり、2000 年に実施された第 4 回ライフサイエンス国際公募でフライト候補研究課題として選定された。本課題についても ISS/JEM でのフライト実験に向けた地上予備実験等が実施されたので、進捗状況について報告する。

いずれの課題についてもスペースシャトルおよび ISS の計画変更により、当初の準備予定の変更を余儀なくされたが、準備は順調に進んでおり、実験供試体開発着手に向けた実験計画のベースライン制定を目指し作業を展開している。

ISS 科学プロジェクト室
細胞生物研究プロジェクトチーム

東谷 篤志 (東北大学大学院生命科学研究科, JAXA プロジェクト共同研究員)
二川 健 (徳島大学医学部, JAXA プロジェクト共同研究員)
東端 晃 (宇宙航空研究開発機構宇宙科学研究本部)
石岡 憲昭 (宇宙航空研究開発機構宇宙科学研究本部)

第1章

線虫 *C. elegans* を用いた宇宙環境における RNAi とタンパク質リン酸化

東谷 篤志*, 東端 晃**, 石岡 憲昭**

RNA interference and protein phosphorylation in space environment using the nematode *Caenorhabditis elegans*

By

Atsushi HIGASHITANI*, Akira HIGASHIBATA**, Noriaki ISHIOKA**

Abstract: It is important for human life in space to study the effects of environmental factors during spaceflight on a number of physiological phenomena. In the ICE-first experiment (International *Caenorhabditis elegans* Experiment-1, Mission DELTA, April 2004), we found that (1) both pachytene-checkpoint apoptosis and physiological apoptosis in germ cells occurred normally under spaceflight conditions and (2) certain genes related to signaling pathway of G-protein coupled receptor protein and to locomotory behavior tended to decrease in the spaceflown *C. elegans*. (3) In the hypergravity condition, we determined that the most susceptible aspect in the life cycle of this organism is the oocyte meiotic division for exclusion of polar bodies and the anterior-posterior polarization shortly after fertilization. (4) We also found several genes specifically responding to environmental stresses such as radiation by transcriptome analyses of entire genome using DNA microarray in several mutants and RNA interference (RNAi) animals. Since these phenomena and the identified genes are highly conserved in mammalian systems, the model experiments using this organism are useful to study the effects of space environment on human life. We are now attempting to study the RNAi effect, signal transduction, adaptation and evolution responding to space environment in future space experiments using the nematode *C. elegans*.

Keywords: *Caenorhabditis elegans*, transcriptome, proteome, signal transduction, RNAi, adaptation, evolution

概 要

本研究では、モデル生物の一つである線虫 *C. elegans* を用いて、微小重力や宇宙放射線をはじめとする複合的な宇宙環境ストレスが生物に及ぼす影響について調べることを目的としている。(1) 我々はこれまでに、国際宇宙線虫実験 ICE-first (2004 年 4 月フライト) に参画し、宇宙で成長した線虫においても地上の対照区と同様に、減数分裂チェックポイント制御下のアポトーシスならびに卵母細胞成熟に伴う発生制御下のアポトーシスがともに正常に行われること、(2) 筋肉関連の幾つかの遺伝子群ならびにタンパク質が発現レベルで顕著に低下することを見出してきた。(3) また、過重力による影響は受精直後の卵核の減数第 1・第 2 分

* Tohoku University, Graduate School of Life Sciences
** JAXA

裂に最も影響を及ぼすことを証明してきた。(4) さらに、様々な環境ストレス（放射線など）の生物影響について、各種突然変異体やRNA干渉法（RNA interference: RNAi）による特異的な遺伝子発現の抑制体とDNAマイクロアレイを用いることにより、ゲノムワイドな分子モニターができることを明らかにしてきた。これらの結果から、複合的な宇宙環境ストレスが個体レベルに及ぼす分子影響を解析する上で、モデル生物の線虫が大変有効であることが示唆された。今後は、第一に宇宙環境におけるRNA干渉機構（RNAi）の効果を検証し、RNAiによりDNA損傷のチェックポイント制御を抑制した場合における細胞内での諸変化について調べる。さらに、アクチンや細胞骨格の再構築を介し、重力感受にも関わる可能性が想定されるRho-guanine nucleotide exchange factor (RhoGEF)の一変異体である*unc-73*と野生株N2との遺伝子およびタンパク質発現の変化を比較し、シグナル伝達を含めたタンパク質のリン酸化に対する宇宙環境の影響について明らかにしたい。また、宇宙環境下で長期間、連続的な世代交代を通して生じる適応と変異・進化の方向性について明らかにすることを次なる研究課題として位置づけている。

1. は じ め に

ISSの運用や月面基地、火星探索など、ヒトが長期間宇宙に滞在することがまさに現実となり、次なる宇宙ライフサイエンス分野の課題として、地上と大きく異なる宇宙環境がヒトをはじめとする多細胞生物の継世代に及ぼす影響と、その適応・進化の方向性を解明することが挙げられる。モデル生物の線虫は、その世代交代に要する期間が5日間程度と比較的短く、また全ゲノム遺伝子の情報も既に解読され、その約4割はヒトに共通な遺伝子であること、様々な突然変異系統が分離されており、分子遺伝学的な解析が可能な実験材料であり、このような特徴を活かして、線虫国際共同実験ICE-first（2004年4月フライト）が企画され、日本からはJAXA石岡を研究代表者とした4テーマの宇宙実験が実施された。

ICE-first以前にも、何度か線虫を用いた宇宙実験が行われている。なかでもNelsonらは、線虫が宇宙環境下で世代交代を正常に行えること、雄個体との交雑も可能であること、ならびに宇宙放射線の影響により、欠損などの比較的激しい突然変異が導入されることなどを報告している[1, 2]。一方、これらの先行研究では、餌となる大腸菌を塗布した寒天培地上で線虫を飼育した状況でのフライト実験であり、その結果、表面張力の影響を無視できず、實際上線虫が微小重力状況下に置かれたとは考えにくい。計算上、線虫にかかる表面張力は、 10^4G ともいわれている。そこで、NASAのConleyらは大腸菌を餌として用いない完全な合成液体培地（*C. elegans* Maintenance Medium: CeMM）を線虫の宇宙実験に用いて、表面張力の影響がない飼育条件下での宇宙環境の影響を調べることを提唱している[3]。そこで、ICE-firstではCeMMを飼育液に用いた国際共同実験が行われた。

プログラム細胞死（アポトーシス）は、後生動物の発生過程や細胞・組織のホメオスタシスに重要な役割を果たし、特徴的なヌクレオソーム間での染色体断片化と最終的にphagocytosisによる死細胞の貪食が生じる[4, 5]。また、放射線や紫外線などの照射により、激しいDNA損傷が生じた際に、細胞はそれら損傷をもはや修復することなく、チェックポイント制御機構によるアポトーシスを誘発し、細胞死に向かわせることも知られている。

雌雄同体の線虫の発生過程においても、体細胞1090のうち131の細胞においてアポトーシス（プログラム細胞死）が生じ、また成虫の生殖細胞では約300の細胞においてアポトーシスが実行されることが知られている[6-8]。さらに、減数第一分裂前期パキテン期の核において、DNA損傷に依存したチェックポイント制御機構によるアポトーシスも観察することができる[9]（図1）。これらアポトーシスの実行に関わる分子としてEGL 1, CED 9, CED 4, CED 3（カスパーゼ）、ならびに死細胞の貪食に関わる分子としてCED 1, CED 6, CED 7とCED 2, CED 5,

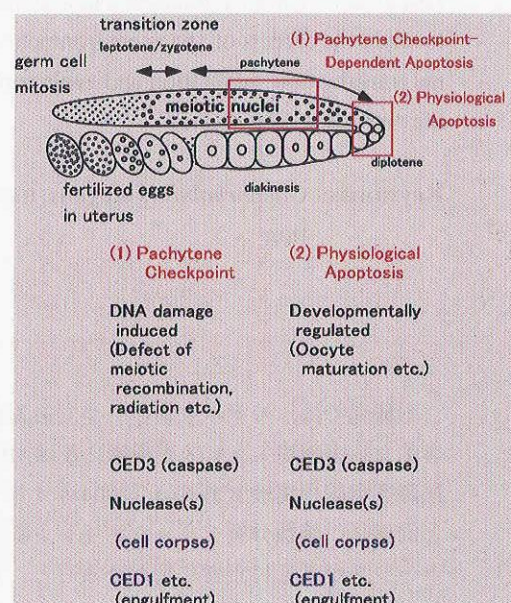


図1 雌雄同体線虫生殖腺にみられるアポトーシス (1) 減数分裂パキテン期のチェックポイント依存的なアポトーシスと (2) 卵母細胞の成熟に伴う発生・生理的なアポトーシス

CED 10 の 2 つのグループが知られている [10, 11] (図 2)。またチェックポイント制御機構としては, MRT 2, RAD 5, HIM 7, ATL 1 ならびにがん抑制遺伝子 p53 の相同遺伝子 CEP 1 などが知られている。これらは, ヒトにおいても高く保存された分子として見出されている [9, 12, 13]。

そこで本研究では, 線虫の特に生殖腺にみられる 2 種類のアポトーシス, チェックポイント依存的なアポトーシスと発生・生理的なアポトーシスとが, 宇宙環境下でも正常に行われるか明らかにすること, ならびに宇宙環境が減数分裂をはじめとする生殖細胞の発生に及ぼす影響についての研究を行った。

また, 宇宙環境下における全ゲノム遺伝子発現について, DNA マイクロアレイを用いて解析を実施した。これらの結果について, 以下に報告するとともに, 今後の線虫を用いた宇宙実験の提案概要についても本稿で報告する。

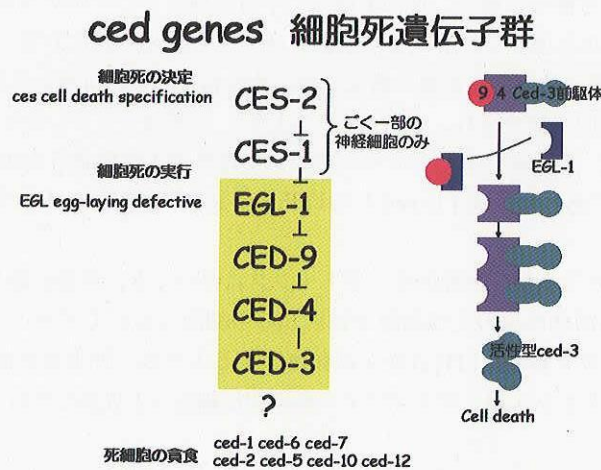


図 2 線虫のアポトーシス関連遺伝子群と相互作用。

2. 成果 の 概 要

2.1. 宇宙環境におけるアポトーシス

2.1.1. 材料および方法

雌雄同体の野生型 N 2 と *ced-1* (e1735) 変異株 CB 3203 [11] とを用いて, アルカリブリーチ法で無菌的に卵を調整し, 20°C で約 1 か月間, CeMM を用いて前飼育した。それらミックスステージの線虫をそれぞれ約 10⁴ 匹ずつ (in 2.5 ml, CeMM) 通気性のバックに入れヒートシール後, 合計 40 ml 分 (2.5 ml x 16 など) を biorack Experimental Container type 1: EC-1 に入れ飼育した (図 3)。宇宙フライトに用いた飼育器は, Kubik (cube in Russian, European Space Agency: ESA) を使用した。Soyuz による打ち上げまでは 12°C で 5 日間, その後 20°C で 2 日間飼育し, 打上げ後は 20°C で 9 日間飼育を行い, 地上に帰還後, 液体窒素フリーザーにより急速凍結し凍結状態を保ったまま研究室に搬送した。

凍結した宇宙フライトサンプルならびに同様の地上対象サンプルの一部を 0.2 % Triton X-100 を含む M 9 buffer で解凍し, 比較的若い成虫 (1 から数個の受精卵を子宮に保持している) の頭部をメスで切断後, 前方部の生殖腺を体外に出させた。その後, 2 % paraformaldehyde, 0.1 % Tween 20 を含む PBS 溶液中で, 4°C, 2 時間固定し, 0.1 % Tween 20 を含む

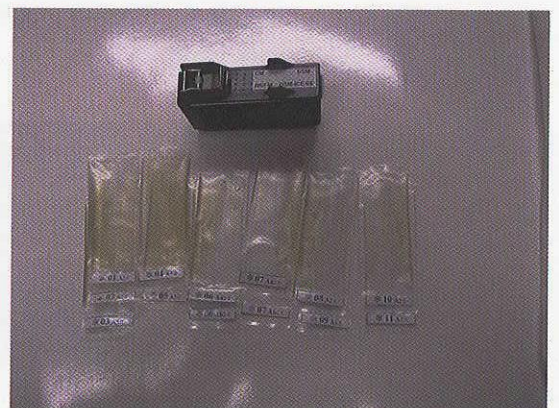


図 3 宇宙フライトに用いた EC-1 コンテナ (奥) と CeMM 飼育バック (手前)。

PBS 溶液で3回洗浄後, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DAPI 染色液を加え核の蛍光染色を行った. アポトーシスによる死細胞と染色体 DNA との観察ならびに画像処理は, 蛍光微分干渉顕微鏡, CoolSnap CCD カメラ (Roper Scientific) と MetaMorph Software (Universal Imaging) を用いて行った.

DNA マイクロアレイによるアポトーシス関連遺伝子群の解析は, 宇宙フライトサンプルならびに地上対象サンプルから total RNA を抽出し, それらを逆転写しプローブに用いた. Micro array チップとしては, Affymetrix 社の Gene Chip *C. elegans* Genome Array (22,150 遺伝子) を用いて行った.

2.1.2. 結果

今回の宇宙フライト期間において, 野生型 N2 と *ced-1* (e1735) 変異株 CB 3203 の線虫は, それぞれ約2倍以上増加しており, また, 地上帰還直後のビデオカメラによる観察で生存も確認された. したがって, 宇宙フライトの間, 正常に CeMM の中で生育していたといえる. また, 今回, 解析に用いた比較的若い成虫 (1 から数個の受精卵を子宮に保持している) は, 10 日間のフライト期間を考慮した場合, 世代を通して宇宙空間において卵から発生し成虫に至ったものと推定される. そこで, これら凍結サンプルを用いて, 解凍後, 頭部をメスで切断し, 減数分裂パキテン期の核におけるチェックポイント依存的なアポトーシス細胞 (死細胞) の数を測定した. その結果, 地上対照区において, 野生型 N2 の1つの生殖腺あたり平均 0.63 ± 0.74 個の死細胞が観察され, また *ced-1* (e1735) 変異株では1つの生殖腺あたり平均 4.1 ± 2.0 個の死細胞が観察された. *ced-1* (e1735) 変異株ではアポトーシスによる死細胞の貪蝕活性が低下することが既に報告されており [11], その結果と一致するものであった. 図4に *ced-1* (e1735) 変異株の宇宙フライトサンプルに見出された減数分裂アポトーシス像を示した.

また, 卵母細胞の成熟過程における発生・生理的なアポトーシスについても, 同様に野生型 N2 と *ced-1* (e1735) 変異株の比較により解析を行った. 雌雄同体成虫の生殖細胞では約 300 の細胞においてアポトーシスが実行される. これらは, 生殖腺が折れ曲がった部位, パキテン期の出口付近から高頻度に生じるため, 野生型生殖腺の折れ曲がり以降は, 一つずつ生殖細胞の核がならんでディアキネシス期, ディプロテン期の卵母細胞へと成熟して行くのが観察される. 一方で, *ced-*

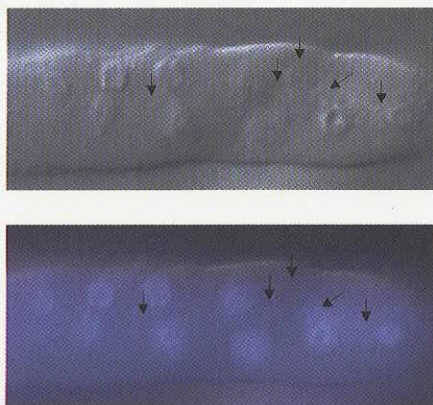


図4 宇宙環境下で卵から成虫に生育した *ced-1* 変異体の生殖腺に見出された細胞死 DIC 像 (上段) と DIC と DAPI 核染色像 (下段). DNA が分解消失した死細胞の残骸を矢印で示す. 文献[14]から一部改変.

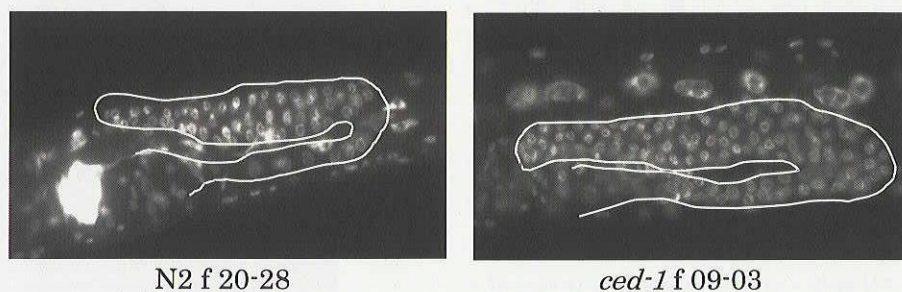


図5 宇宙フライトサンプルにみられる野生型 N2 と *ced-1* (e1735) 変異株との生殖腺パキテン期以降の発生・生理的なアポトーシス 文献[14]から一部改変.

1 (e1735) 変異株では、この生理的なアポトーシスによる死細胞の貪食活性が低下するために、折れ曲がり以降においても生殖細胞の核が複数ならんだ状態で、成熟した大きな核とアポトーシスにより分解がはじまり凝縮した核も多数存在し、生理的なアポトーシスの遅延がみられる。宇宙フライトサンプルにおいても、地上対照区と同様に、野生型 N2 では規則正しく卵母細胞が成熟し、*ced-1* (e1735) 変異株では生理的なアポトーシスによる死細胞の貪食活性が低下し、アポトーシスの遅延がみられた (図5)。

また、図5にみられるように、減数第一分裂前期の染色体ダイナミクスについても、地上対照サンプルと宇宙フライトサンプルでは、ほぼ変わりなく同様に進行することが明らかになった。

約2万の線虫全ゲノム遺伝子に対するマイクロアレイ解析により、これらアポトーシス関連遺伝子の発現レベルについて、地上対照サンプルと宇宙フライトサンプルとの間で比較した。その結果、宇宙フライトサンプルでの発現が、1/2 以下に低下した遺伝子が計199遺伝子、2倍以上に増加した遺伝子が計48遺伝子存在した。これら発現が低下した遺伝子には、Gタンパク質関連のシグナル伝達系の受容体遺伝子や筋肉タンパク質など運動様式に関わる遺伝子群などが確認された。一方で、表1に抽出したDNA損傷のチェックポイント制御、アポトーシス、ならびにDNA組換え修復に関わる遺伝子群は、宇宙環境下でも地上対照サンプルと同程度に発現していることが確認された。

2.2. 線虫において過重力の影響を最も受けやすい時期の特定

2.2.1. 材料および方法

線虫の生活環において、過重力に最も影響を受けやすい時期を特定する目的で、野生型 N2 を NGM OP-50 寒天培地上で育成させ、それらを遠心機内 (ベックマン Allegra 25 R TJ 25 スイングロータ) に入れ 8 G, 47 G, 100 G, 200 G の各過重力下で育成調査を行った。

2.2.2. 結果

雌雄同体野生型を 100 G 以上の過重力下で成虫にまで育成させた場合、その卵の孵化率が顕著に低下することが確認された。一方で、1 G 下で受精し数細胞期にまで発生した初期胚に対して、その後、200 G の過重力を加えても正常に胚発生が完了し、全てが孵化することが示された。以上の結果から、成虫における次世代の生殖細胞形成から受精までの時期が過重力により感受性であることが示唆された。

そこで、次に、100 G 下で育成させた成虫 (*histone H2B::GFP* 株) の生殖腺卵母細胞の成熟過程について、核染色体像と MAPK の卵成熟にともなう活性化について調べた。その結果、100 G 下でも正常に卵母細胞形成が行われていることが確認された。一方で、100 G 下では受精後に生じる母方染色体の減数第1分裂、第2分裂に異常を来し、正常な極体が放出されないこと、その結果、初期胚では高頻度に染色体異常が生じることが確認された (図6)。

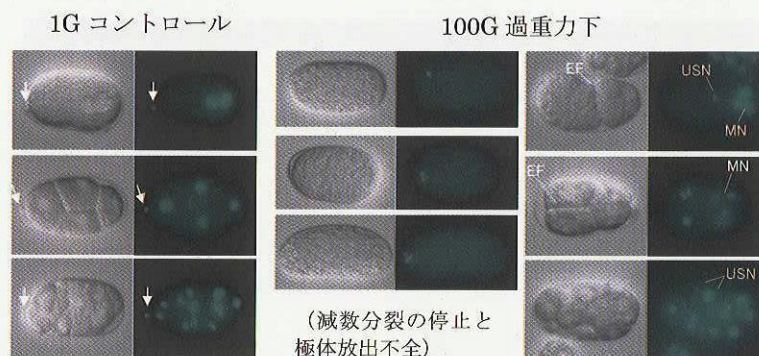


図6 100 G の過重力下では、母方染色体の減数分裂の停止と極体放出不全、その結果みられる初期胚での各種染色体異常。AZ 212 *histone H2B::GFP* 株を用いて、左パネル矢印が初期胚にみられる正常極体と右パネルでは初期胚にみられる各種異常。USN: 核の不均等分配, MN: 多核化, EF: 異常な分裂溝。文献[15]から一部改変。

2.3. 放射線影響を分子レベルでモニターするための線虫

2.3.1. 材料および方法

野生型 N2 ならびにアポトーシスを過剰に誘導する *abl-1* 変異体、細胞周期のチェックポイント制御に関わる *atl-1* 遺伝子の RNAi による発現抑制個体[12]を用いて、Co60 による γ 線照射が線虫の網羅的な遺伝子発現におよぼす影響について、Affymetrix 社の Gene Chip for *C. elegans* Genome Array (22,150 遺伝子) を用いて調べた。

2.3.2. 結果

マイクロアレイの結果により、 γ 線照射後 3 時間、12 時間、24 時間経過した集団の遺伝子発現を、 γ 線非照射の集団をコントロールとして比較し、パターンごとに組分けした。まず、コントロールと比較して発現の値が上昇している遺伝子群であるが、全時間帯を通じて上昇しているもの（以後 class 1 I）が 7 遺伝子、3-12 時間後に上昇しているもの（同 class 2 I）が 10 遺伝子、3 時間後のみ上昇しているもの（同 class 3 I）が 98 遺伝子、12-24 時間後に上昇しているもの（同 class 4 I）が 4 遺伝子、24 時間後のみ上昇しているもの（同 class 5 I）が 265 遺伝子検出された。次に、コントロールと比較して発現の値が低下している遺伝子群であるが、全時間帯を通じて低下しているもの（以後 class 1 D）が 5 遺伝子、3-12 時間後に低下しているもの（同 class 2 D）が 11 遺伝子、3 時間後のみ低下しているもの（同 class 3 D）が 135 遺伝子、12-24 時間後に低下しているもの（同 class 4 D）が 9 遺伝子、24 時間後のみ低下しているもの（同 class 5 D）が 1200 遺伝子検出された。アポトーシス関連の遺伝子では、*egl-1*、*ced-13* が class 1 I に含まれ一貫したパターンを示している。近年、*egl-1*、*ced-13* はアポトーシスの活性化因子であることが報告されており、本実験系において放射線状況下で確実にアポトーシスの誘導が活性化されていることが示唆される。

abl-1 (ok171) のマイクロアレイの結果に関しては、 γ 線を照射した同変異体の集団との比較対象として、非照射の変異体の集団、それに加えて N2 の γ 線照射・非照射の集団を用いた。これらの比較により、変異体に γ 線を照射して 3 時間後に発現が上昇する遺伝子は 1307 検出され、その内 398 遺伝子は N2 の γ 線照射区の集団と比較して有意に上昇していた。また、同じく変異体に γ 線を照射して 3 時間後に発現が低下する遺伝子は 661 遺伝子であり、その内 169 遺伝子は N2 の γ 線照射区の集団と比較して有意に低下していた。

atl-1 の RNAi 株のマイクロアレイの結果に関しては、 γ 線を照射した RNAi 株の集団との比較対照として、非照射の RNAi

表 1 宇宙フライトサンプルと地上対象区とのチェックポイント制御、アポトーシス、DNA 組換え修復に関わる遺伝子群の発現比較 カラム右端の log 値が 1 の際、宇宙フライト区での発現が 2 倍に増加し、-1 の際、1/2 倍に減少したことを示す。今回抽出した遺伝子群の発現は、全て、1/2 倍から 2 倍の範囲内に入っていた。文献[14]から一部改変。

Probe_ID	Probe_name	Base_Sig	setII-Exp-Sig: Flight/Gr	log-ratio
ced-1				
CEG.02001	173720.at	132.3	118.3	0.1
CEG.17608	189327.s.at	133.9	143.8	-0
ced-2				
CEG.04093	175812.at	480.2	626.9	0.4
CEG.04094	175813.s.at	258	213.1	0.2
ced-3				
CEG.22418	194137.at	27.6	31.5	0.3
CEG.02555	174274.at	34.7	60.9	0.7
ced-4				
CEG.16838	188557.at	126.7	132.4	0.1
ced-9				
CEG.22145	193864.at	26.9	20.5	-0.5
CEG.03197	174916.at	105.2	94	-0.1
egl-1				
CEG.04126	175845.at	11.9	9.8	-0.1
nuc-1				
CEG.15071	186790.at	823.2	866.1	-0
atl-1				
CEG.17985	189704.s.at	308.3	259	-0.2
mrt-2				
CEG.16460	188179.at	45.3	59.4	0.4
rad-5				
CEG.04440	176159.s.at	225.2	263.9	0.2
rad-51/rdh-1				
CEG.21335	193054.s.at	455.1	537.1	0.3
cep-1				
CEG.06156	177875.at	225.6	306.5	0.2

株の集団, それに加えて N2 の γ 線照射・非照射の集団を用いた. これらの比較により, RNAi 株に γ 線を照射 3 時間後と 12 時間後において共に発現が上昇する遺伝子は 445 遺伝子であり, その内 178 遺伝子は N2 の γ 線照射区の集団と比較して有意に上昇していた. また, RNAi 株に γ 線を照射して 3 時間後に発現が低下する遺伝子は 1421 であり, その内 613 遺伝子は N2 の γ 線照射区の集団と比較して有意に低下していた. この 613 遺伝子の内, 8 割強に当たる 526 遺伝子はミトコンドリアの低下が観察される *PAR2.1* の RNAi 株においても, 同様に発現が低下していた. その結果, *atf-1* RNAi によるチェックポイント経路の抑制下での放射線影響とミトコンドリア障害に, 網羅的な遺伝子発現のレベルで強い共通性が存在することが示唆された.

上記で検出された遺伝子群には現時点で機能未知のものも多いが, それらの中には放射線に対する応答で *abl-1* の下流因子としてアポトーシスの調節に, *atf-1* の下流でチェックポイント機構の因子として機能しているものなどが含まれていると考えられる. また既知のものでも, 今まで知られていなかったアポトーシスやチェックポイント機構など放射線影響に関わる機能を併せもっている可能性が示唆される. 今後, 個別の遺伝子に注目してより詳細な機能解析を行っていくことで, さらなる成果が挙げられるものと期待される.

3. ま と め

以上, これまでのモデル生物の一つである線虫を用いた宇宙実験, その他, 私たちが行った関連する実験結果について述べてきた. そのなかで特記すべきこととしては, これまでに分離されている多数の各種突然変異体や RNA 干渉法 (RNA interference: RNAi) により特異的な遺伝子発現の抑制体を用いて, また, 全ゲノム遺伝子に対応する DNA マイクロアレイによる網羅的な遺伝子発現の解析研究などが行える点があげられる. その結果, 「複合的な宇宙環境ストレスが個体レベルで, かつ世代を超えた長期にわたる生活環に及ぼす分子影響の研究」を今後遂行する上で, 同じく線虫がモデル系として大変有効であることを示唆された. そこで今後は, 第一に宇宙環境における RNA 干渉機構 (RNAi) の効果を検証し, RNAi により DNA 損傷のチェックポイント制御を抑制した場合における細胞での諸変化について調べる. さらに, アクチンや細胞骨格の再構築を介し, 重力感受にも関わる可能性が想定される Rho-guanine nucleotide exchange factor (RhoGEF) の一変異体である *unc-73* と野生株 N2 との遺伝子およびタンパク質発現の変化を比較し, シグナル伝達を含めたタンパク質のリン酸化に対する宇宙環境の影響について明らかにしたい. この研究課題は 2004 年の国際公募課題として選定され準備を進めている. さらに, 複合的な宇宙環境は地上とは大きく異なり, これらが地上の生物に及ぼす影響について, 特に, 宇宙環境での連続的な世代交代を通して生じる生物の適応と変異・進化の方向性について, 明らかにすることを究極の研究目標とした次なる研究課題を, 引き続き提言していきたい.

4. 成 果 発 表

- [1] Higashitani, A., Higashibata, A., Sasagawa, Y., Sugimoto, T., Miyazawa, Y., Szewczyk, N.J., Viso, M., Gasset, G., Eche, B., Fukui, K., Shimazu, T., Fujimoto, N., Kuriyama, K., Ishioka, N. "Checkpoint and physiological apoptosis in germ cells proceeds normally in spaceflown *Caenorhabditis elegans*." *Apoptosis* **10**, 949–954 (2005)
- [2] Sasagawa, Y., Saito, Y., Shimizu, M., Takahashi, H. and Higashitani, A. "Perturbation of oocyte meiotic division by hypergravity in *Caenorhabditis elegans*." *Biol. Sci. Space* **19**, 155–162 (2005)
- [3] Higashitani, A., Higashibata, A., Sasagawa, Y., Sugimoto, T., Miyazawa, Y., Szewczyk, N.J., Viso, M., Gasset, G., Eche, B., Fukui, K., Shimazu, T., Fujimoto, N., Kuriyama, K., Ishioka, N. "Checkpoint and physiological apoptosis in germ cells proceeds normally in spaceflown *Caenorhabditis elegans* on the ICE first experiment.", 15th International *C. elegans* Meeting, June 2005, Los Angeles.
- [4] Ishioka, N., Higashibata, A., Higashitani, N., Seki, M., Sato, M., Szewczyk, N.J., Viso, M., Gasset, G., Eche, B., Fujimoto, N., Kuriyama, K., Fukui, K., Shimazu, T., Higashitani, A. "Microgravity-dependent alteration of protein and gene expression in *Caenorhabditis elegans* on the international *C. elegans* space experiment-first (ICE-first).", 15th International *C. elegans* Meeting, June 2005, Los Angeles.
- [5] Higashitani, A. "Apoptosis in Space" (Organizer: Johnsen, B. Workshop "Worms in Space-ICE-First and the Future"), 15th International *C. elegans* Meeting, June 2005, Los Angeles.
- [6] Higashitani, A. "RNA interference and protein phosphorylation in space environment using the nematode *Caenorhabditis ele-*

gans.”, ARC Seminar, NASA, June 2005, CA.

- [7] 東谷篤志, 東端晃, 他 12 名 “線虫のチェックポイントならびに生理的なアポトーシスは宇宙環境下でも正常に生じる”, 日本宇宙生物科学会 第 19 回大会, 9 月 2005, 東京
- [8] 東谷篤志, 東端晃, 石岡憲昭 “モデル生物線虫を用いた ICE-first 宇宙実験の成果と今後の展開について”, 第 22 回宇宙利用シンポジウム 1 月 2006, 東京

5. 参 考 文 献

- [1] Nelson, G.A., Schubert, W.W., Kazarians, G.A., Richards, G.F., Benton, E.V., Benton, E.R., and Henke, R. “Radiation effects in nematodes: results from IML-1 experiments” *Adv. Space Res.* **14**, 87–91 (1994 a).
- [2] Nelson G.A., Schubert, W.W., Kazarians, G.A., and Richards, G.F. “Development and chromosome mechanics in nematodes: results from IML-1” *Adv. Space Res.* **14**, 209–214 (1994 b).
- [3] Szewczyk, N.J., Kozak, E., and Conley, C.A. “Chemically defined medium and *Caenorhabditis elegans*” *BMC Biotech.* **3**, 19 (2003).
- [4] Wyllie, A.H. “Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation” *Nature* **284**, 555–556 (1980).
- [5] Wyllie, A.H., Kerr, J.F.R., and Currie, A.R. “Cell death: the significance of apoptosis” *Int. Rev. Cytology* **68**, 251–306 (1980).
- [6] Sulston, J.E. and Horvitz, H.R. “Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*” *Dev. Biol.* **56**, 110–156 (1977).
- [7] Sulstone, J.E., Schierenberg, E., White, J.G., and Thomson, N. “The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*” *Dev. Biol.* **100**, 64–119 (1983).
- [8] Gumieny, T.L., Lambie, E., Hartwig, E., Horvitz, H.R., and Hengartner, M.O. “Genetic control of programmed cell death in the *Caenorhabditis elegans* hermaphrodite germline” *Development* **126**, 1011–1022 (1999).
- [9] Gartner, A., Milstein, S., Ahmed, S., Hodgkin, J., and Hengartner, M.O. “A conserved checkpoint pathway mediates DNA damage-induced apoptosis and cell cycle arrest in *C. elegans*” *Mol. Cell* **5**, 435–443 (2000).
- [10] Ellis, R.E., Jacobson, D.M., and Horvitz, H.R. “Genes required for the engulfment of cell corpses during programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*” *Genetics* **129**, 79–94 (1991).
- [11] Zhou, Z., Hartwig, E., and Horvitz, H.R. “CED-1 is a transmembrane receptor that mediates cell corpse engulfment in *C. elegans*” *Cell* **104**, 43–56 (2001).
- [12] Aoki, H., Sato, S., Takanami, T., Ishihara, T., Katsura, I., Takahashi, H., and Higashitani, A. “Characterization of *Ce-atl-1*, an ATM-like gene from *Caenorhabditis elegans*” *Mol. Gen. Genet.* **264**, 119–126 (2000).
- [13] Stergiou, L and Hengartner, M. “Death and more: DNA damage response pathways in the nematode *C. elegans*” *Cell death and differentiation* **11**, 21–28 (2004).
- [14] Higashitani, A., Higashibata, A., Sasagawa, Y., Sugimoto, T., Miyazawa, Y., Szewczyk, N.J., Viso, M., Gasset, G., Eche, B., Fukui, K., Shimazu, T., Fujimoto, N., Kuriyama, K., Ishioka, N. “Checkpoint and physiological apoptosis in germ cells proceeds normally in spaceflown *Caenorhabditis elegans*.” *Apoptosis* **10**, 949–954 (2005).
- [15] Sasagawa, Y., Saito, Y., Shimizu, M., Takahashi, H. and Higashitani, A. “Perturbation of oocyte meiotic division by hypergravity in *Caenorhabditis elegans*.” *Biol. Sci. Space* **19**, 155–162 (2005).

第2章 ユビキチンリガーゼ Cbl-b による 筋萎縮の新規メカニズム

二川 健*, 東端 晃**, 石岡 憲昭**

Cbl-mediated ubiquitination the downregulates the response the skeletal muscle cells to growth factors in space

By

Takeshi NIKAWA*, Akira HIGASHIBATA**, Noriaki ISHIOKA**

Abstract: In the present study, we hypothesize that Cbl-b mediated ubiquitination plays an important role of atrophy during spaceflight. To examine our hypothesis, we proposed and designed a flight experiment. In this section, we report that the result of studies 1) confirmation of the method of RNA extraction from flight samples, 2) analysis of Cbl-b gene expression under oxidative stress or simulated microgravity, 3) Cbl-b has a important function in bone atrophy mechanism not only muscle atrophy.

Keywords: ubiquitination, muscle atrophy, Cbl-b

概 要

本研究では、これまで多く指摘されている宇宙空間での筋萎縮に注目し、無重力による筋萎縮の新規メカニズムを実証し、その予防の可能性を探ることを目的としている。平成17年度では、ISSにおけるフライト実験実施に向けた実験計画のベースライン化を目指し、次に挙げる地上予備研究を行った。(1) 宇宙実験施行時に合わせたRNA回収条件を確立するため、ISOGENを用いた時とRNA Laterを用いた時の回収率の違いを検討、(2) 筋萎縮に重要なユビキチンリガーゼ Cbl-b の発現調節機構を明らかにするため、酸化ストレスと3Dクリノローションによる Cbl-b の発現調節を解析、(3) 骨芽細胞におけるユビキチンリガーゼ Cbl-b の機能として、ユビキチンリガーゼ Cbl-b が無重力による筋萎縮だけでなく、骨萎縮にも重要な働きをしていることを明らかにした。

1. は じ め に

長期間宇宙に滞在した宇宙飛行士の骨格筋は、帰還後自力で立てなくなるほど萎縮する。この無重力による筋萎縮は、今後人類が宇宙開発を進める上で必ず解決しなければならない重要な課題である。本研究課題の代表研究者らは、1998年に打ち上げられたスペースシャトル(STS-90)による実験で、無重力により萎縮したネズミの骨格筋では特殊な蛋白質分解経路(ユビキチン-プロテアソーム経路)だけが活性化することを発見した。この蛋白質分解経路は分解しようとする蛋白質をユビキチンというペプチドで標識する(ユビキチン化)という特徴があり、この宇宙フライトネズミの骨格筋でも

* Tokushima University, Department of Medicine
** JAXA

多くの蛋白質がユビキチン化され分解されていることがわかった。本研究課題では、ISSにおいて長時間培養したネズミの筋細胞は、細胞を増殖させる因子（増殖因子）を与えてもその信号を遺伝子（核）まで伝達する蛋白質（情報伝達物質）が高度にユビキチン化され分解されているため、全く増殖しないことを実証する（図参照）。さらに、無重力によりユビキチン化されやすい情報伝達物質とその反応を誘導する酵素も同定し、無重力による筋萎縮の新規メカニズムの全容を解明する予定である。

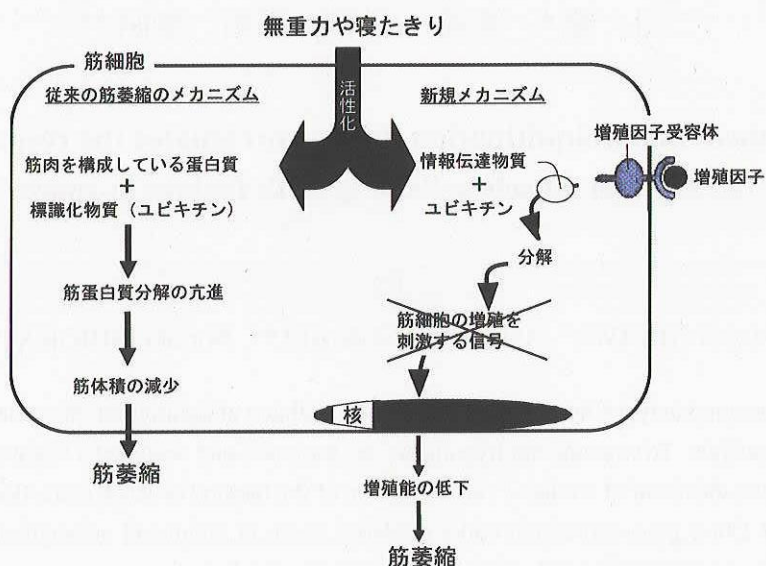


図1 本研究課題で提唱する筋萎縮の新規メカニズム。

2. 成果の概要

ISSにおけるフライト実験実施に向けた実験計画のベースライン化を目指し、地上予備研究を行った。また、ユビキチンリガーゼ Cbl の発現調節機構を研究することにより、Unloading sensing mechanism の一部を明らかにした。具体的には、下記の実験を行った。

(1) 宇宙実験施行時に合わせた RNA 回収条件の確立

ISOGEN を用いた時と RNA Later を用いた時の回収率の違いを検討した。

(2) 筋萎縮に重要なユビキチンリガーゼ Cbl-b の発現調節機構

酸化ストレスと 3D クリノローテーションによる Cbl-b の発現調節を解析した。

(3) 骨芽細胞におけるユビキチンリガーゼ Cbl-b の機能

ユビキチンリガーゼ Cbl-b が無重力による筋萎縮だけでなく、骨萎縮にも重要な働きをしていることを明らかにした。

2.1. RNA 回収実験

3D-クリノローテーションにかけた L6 細胞から 2 種類の RNA 回収試薬を用いて RNA を回収した。用いた RNA 回収試薬は日本ジーンの Isogen と Qiagen の RNA Later である。結果は、下記のとおり揮発性の有害物質が含まれる Isogen の方が回収率はよかった (50 ml T 型フラスコ 1 個当たりの平均 \pm 標準誤差 $30.9 \pm 4.5 \mu\text{g}$, $n = 6$)。RNA Later は有害成分が少ないものの、Isogen の回収率の約 75 % 程度であり、回収量にサンプルによるばらつきがあった (50 ml T 型フラスコ 1 個当たり $23.6 \pm 16.0 \mu\text{g}$, $n = 6$)。ただ、これはこれまで Isogen による回収を行ってきたため、熟練度の違いによるものである。今後、RNA Later による回収を頻回に行うことにより回収率を高めることができる。

2.2. ユビキチンリガーゼ Cbl-b の発現調節機構

無重力による Cbl-b の発現調節機構は不明のままであった。我々は、無重力環境では骨格筋に酸化ストレスがかかることに注目し、Cbl-b 上流遺伝子 2 kbp をクローニングし酸化ストレス (H_2O_2) や 3D-クリノローテーションに対する反応性を解析した。その結果、転写開始点の上流 60 bp までに酸化ストレス応答領域が存在することを確認した。この領域には、機械的ストレスや酸化ストレスに反応し活性化するある転写因子のコンセンサス領域がある。酸化ストレスの場合、その転写因子が Cbl-b の主要な発現調節因子であることを確認した。現在、3D-クリノローテーションの場合について解析中である。興味深いことに、3D-クリノローテーションにかけた L6 筋芽細胞では、回転のごく初期にこの転写因子の著明な発現増大とその数時間後に続いて起こる Cbl-b の発現上昇が観察された。

2.3. 無重力による骨萎縮における Cbl-b の働き

無重力環境では、筋肉だけでなく骨も萎縮する。最近、骨と筋肉は（機械的ストレスに関する）情報交換システムが存在し、それを IGF-1 が仲介していることが明らかになりつつある。それゆえ、IGF-1 シグナルを減弱する Cbl-b は無重力による骨萎縮にも重要な働きがあると考えた。興味深いことに、Cbl-b のノックアウトマウスは坐骨神経切断に骨萎縮が起こらないことを見出した。Cbl-b は破骨細胞より骨芽細胞に多く発現しており、骨芽細胞における Cbl-b は骨芽細胞の骨形成能を調節する重要な遺伝子であることがわかった。つまり、Unloading になると強発現した Cbl-b が骨芽細胞の IRS-1 を分解し、骨芽細胞に IGF-1 に対する抵抗性を誘導した。その結果、Unloading 状態の骨芽細胞の骨形成能が著明に減少することがわかった。今回の結果は JBMR に採択され本年の 5 月号に掲載予定である。

2.4. Cbl-b ノックアウトマウスの糖代謝異常

現時点ではまだ論文がアクセプトされていないので詳細は略すが、本研究を遂行中に偶然 Cbl-b ノックアウトマウスが糖代謝異常をきたすことを見出した。現在、Diabetes に再投稿中である。

2.5. 課題とその対策

地上予備実験を含め現時点で行える準備は着々と進んでいる。今後は、実験供試体を利用した実験試料の適合性試験等を行い、フライトに向けた準備を進めていく予定である。

3. ま と め（来年度以降の研究計画と目標）

本年度は、フライト実験を想定した RNA の回収方法の検討、酸化ストレスや 3D-クリノローテーションなど、地上レベルで負荷できるストレスによる Cbl-b の発現調節機構の探索、Cbl-b ノックマウスを用いた骨代謝および糖代謝における Cbl-b の関与について研究を行い、新しい知見を得ることができた。

来年度は、本年度の実験を発展させて以下のような研究を行う予定である。

- (1) 今年度の研究結果を論文にまとめる。
- (2) Unloading stress の全容を明らかにする。Unloading stress の Input から Output までのすべてを明らかにする。あと少しの解析で、機械的ストレスの一つである Unloading が筋萎縮の原因遺伝子のユビキチンリガーゼの発現をどのように調節しているかが明らかになる。
- (3) 本研究の実験計画についてベースライン化を実現する。

4. 成 果 発 表

- [1] Suzue, N., Nikawa, T., Onishi, Y., Yamada, C., Hirasaka, K., Ogawa, T., Furouchi, F., Kosaka, H., Ishidoh, K., Gu, H., Kishi, K., Yasui, N., "The role of ubiquitin ligase Cbl-b in denervation-mediated osteopenia" *J. Bone Miner. Res.* 2006 in press
- [2] Sato, T., Yamamoto, H., Sawada, N., Nashiki, K., Tsuji, M., Nikawa, T., Arai, H., Morita, K., Taketani, Y., Takeda, E., "Immobilization decreases duodenal calcium absorption though a 1, 25-dihydroxyvitamin D dependent" *J. Bone Miner. Metab.* 2006 in press
- [3] Hirasaka, K., Nikawa, T., Yuge, L., Ishihara, I., Higashibata, A., Ishioka, N., Okubo, A., Miyashita, T., Suzue, N., Ogawa, T., Oarada, M., Kishi, K., "Clinorotation prevents differentiation of rat myoblastic L 6 cells in association with reduced NF- κ B signaling" *Biochim. Biophys. Acta* **1743**, 130–140 (2005).

- [4] Hirasaka, K., Nikawa, T., Asanoma, Y., Furochi, H., Onishi, Y., Ogawa, T., Suzue, N., Oarada, M., Shimazu, T., Kishi, K. "Short-term hypergravity does not affect protein-ubiquitination and proliferation in rat myoblastic cells" *Biol. Sci. Space* **19**, 3–7 (2005).
- [5] Ogawa, T., Nikawa, T., Furochi, H., Kosyoji, M., Hirasaka, K., Suzue, N., Sairyo, K., Nakano, S., Yamaoka, T., Itakura, M., Kishi, K., Yasui, N., "Osteoactivin upregulates expression of MMP-3 and MMP-9 in fibroblasts infiltrated into denervated skeletal muscle in mice" *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **289**, C 697–C 707 (2005).
- [6] Onishi, Y., Hirasaka, K., Ishihara, I., Oarada, M., Goto, J., Ogawa, T., Suzue, N., Nakano, S., Furochi, H., Ishidoh, K., Kishi, K., Nikawa, T., "Identification of mono-ubiquitinated LDH-A in skeletal muscle cells exposed to oxidative stress" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **336**, 799–806 (2005).

宇宙航空研究開発機構研究開発報告 JAXA-RR-05-033

発 行 平成 18 年 3 月 10 日

編集・発行 宇宙航空研究開発機構

〒182-8522 東京都調布市深大寺東町 7-44-1

URL : <http://www.jaxa.jp/>

印刷・製本 (株) 東京プレス

本書及び内容についてのお問い合わせは、下記にお願いいたします。

宇宙航空研究開発機構 情報システム部 研究開発情報センター

〒305-8505 茨城県つくば市千現 2-1-1

TEL : 029-868-2079 FAX : 029-868-2956

© 2006 宇宙航空研究開発機構

※ 本書の一部または全部を無断複写・転載・電子媒体等加工することを禁じます。

