

無重力による筋細胞のシグナル・トランスダクション

内田 貴之(徳大)、安倍 知紀(徳大)、河野 尚平(徳大)、山下 結衣(徳大)、北畑 香菜子(徳大)、近藤 茂忠(徳大)、真板 綾子(徳大)、
小林 剛(名大院)、曾我部 正博(名大院)、嶋津 徹(JAXA)、東端 晃(JAXA)、矢野 幸子(JAXA)、石岡 憲昭(JAXA)、平坂 勝也(長崎大)、
二川 健(徳大)

*Takayuki Uchida¹, Tomoki Abe¹, Shohei Kohno¹, Yui Yamashita¹, Kanako Kitahata¹,
Shigetada Kondo¹, Ayako Ohno¹, Katsuya Hirasaka², Takeshi Kobayashi³, Masahiro Sokabe³,
Toru Shimazu⁴, Akira Higashibata⁴, Sachiko Yano⁴, Noriaki Ishioka⁴, Takeshi Nikawa¹.*

¹ Department of Nutritional Physiology, Institute of Health Biosciences, The University of Tokushima Graduate School, Tokushima, Japan, ² Graduate School of Fisheries Science and Environmental Studies, Nagasaki University, Japan, ³ Department of Cell Physiology and Biophysics/Bio-imaging, The University of Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya, Japan, ⁴ Institute of Space and Astronautical Science, Japan Aerospace Exploration Agency (JAXA), Tsukuba, Ibaraki, Japan
E-Mail: kamikazesenpu01081208@yahoo.co.jp

Abstract: Ubiquitin ligase casitas B-lineage lymphoma-b (Cbl-b) plays a crucial role in disuse-mediated muscle atrophy: Cbl-b caused ubiquitination and subsequent degradation of insulin receptor substrate 1 (IRS-1), resulting in skeletal muscle atrophy. Since Cbl-b in skeletal muscle is preferentially expressed under unloading conditions, we hypothesized that elucidating the regulation pathway of Cbl-b expression leads to the clarification of the sensing mechanism for unloading stress. Here we report the possible mechanism of sensing for microgravity, using rat or mouse skeletal myotubes cultured in microgravity or simulated microgravity conditions. First, we found that microgravity or simulated microgravity conditions significantly caused decrease in myotube diameter, indicating that skeletal muscle myotubes per se can sense microgravity stress. Furthermore, we also found that oxidative stress was accumulated in myotubes cultured under microgravity or simulated microgravity conditions. The luciferase assay and gel mobility shift assay of human Cbl-b promoter gene revealed that there was a potent oxidative stress responsive element from -110 to -60 bp of the Cbl-b promoter, and that early response genes (Egrs) 1 and 2 were interacted with this element. In contrast, metabolomic analysis for energy production showed that rat myotubes cultured under microgravity conditions contained higher amounts of cis-aconitic acid and lactate, and lower amounts of ATP, compared with those in myotubes cultured 1G control conditions, suggesting that aconitase, an oxidative stress-sensitive enzyme, in the TCA cycle was inhibited by microgravity conditions, while anaerobic glycolysis was activated. In fact, knockdown of aconitase gene induced the low ATP production and mitochondrial fission. We suggest that unloading stress, such as microgravity, induced muscle atrophy through oxidative stress-mediated ubiquitin ligase Cbl-b expression and mitochondria dysfunction.

Key words; Mitochondria, muscle atrophy, reactive oxygen species, ubiquitin ligase Cbl-b, unloading

1. はじめに

一般的に寝たきりや宇宙フライトにおいては骨格筋の筋萎縮が進展することが知られている。これまでの研究で、無重力ストレスによりユビキチンリガーゼ Cbl-b の発現が増大し、それが IRS-1 のユビキチ

ン化、分解を誘導し IGF-1 シグナルが阻害され筋萎縮が発生することを明らかにしてきた。しかし、筋細胞が無重力ストレスをどのように感知しているかは依然として不明なままである。この無重力ストレスの感知機構を明らかにするため、Myolab 宇宙実験と

地上の模擬微小重力モデル実験を行った。

2. 結果

まず、宇宙サンプルのメタボローム解析を行ったところ、酸化ストレスの蓄積と ATP 産生に関わる代謝産物の変化が見られた。

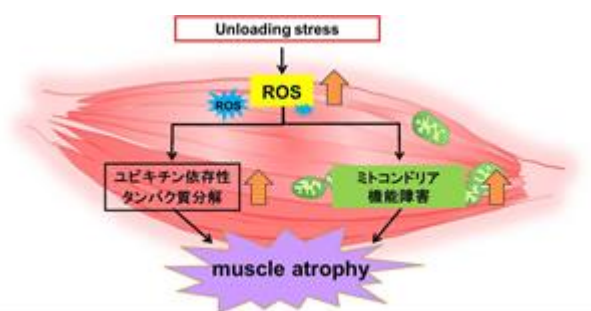
次に、3D-clinorotation モデル細胞を用いて酸化ストレスの経時的な変化を解析した。そして、このような酸化ストレスの発生源として我々はミトコンドリアに着目した。3D-clinorotation に供した筋細胞のミトコンドリアの形態及びミトコンドリア断片化の主要なマーカー因子である Drp1 のリン酸化を調べた。その結果、Drp1 のリン酸化を伴うミトコンドリアの分裂は、酸化ストレスの亢進の後に見られる可能性が示唆された。続いて我々は 3D-clinorotation によってどのようにミトコンドリアの断片化が誘導されるかを検討した。宇宙サンプルを用いたメタボローム解析の結果では、TCA サイクルの中間生成物であるシスアコニット酸の蓄積が見られたため、これを触媒する酵素アコニターゼに着目した。アコニターゼはまた、酸化ストレスに高い感受性を持ち容易に不活化される。実際にアコニターゼのノックダウンによりミトコンドリアの断片化が誘導された。このことは、TCA サイクル上の酵素であるアコニターゼの障害により好氣的呼吸が阻害され ATP 産生が低下したことや、膜電位が変化したためだと考えられる。また、メタボローム解析の結果から乳酸の蓄積(解糖系の活性化)が見られたこと、TCA サイクル(好氣的呼吸)が障害されていたことを合わせて考慮すると、宇宙環境における遅筋の速筋化現象は、転写因子の変化によるものではなく無重力環境に適応するための代謝変化である可能性が示唆される。我々は本研究で、筋細胞に無重力ストレスが加わると酸化ストレスの増大し、アコニターゼの不活化を通してミトコンドリアの形態異常や ATP 産生の低下を引き起こすことを示した。このことはミトコンドリアが無重力ストレスを感知し、そのエネルギー代謝の変化により Cbl-b を介した筋萎縮を誘導する可能性を示唆する。

3. 今後の展望

廃用性筋萎縮は、ミトコンドリアの断片化およびその結果誘導される酸化ストレスが重要な働きをしていると考えられてきた。ところが、我々は今回の実験で酸化ストレスの増大よりもミトコンドリアの断片化が先に起こることを発見した。すなわち、ミトコンドリアの断片化によって酸化ストレスが誘導されるのではなく、酸化ストレスの増大によってミトコンドリアの断片化が誘導されると考えた。このように我々は、無重力環境ではまず酸化ストレスの増大が起こり、種々の作用を引き起こすことを示してきた。しかし、この酸化ストレスの増大が引

き起こされるメカニズムは依然不明である。この点を検討するため、我々はさらなる宇宙実験を行う予定である。

図 無重力におけるシグナル・トランスダクション
筋細胞が無重力ストレスを受けるとまず酸化ストレスが増大し、Cbl-b の増大とミトコンドリア障害を引き起こす。



参考文献

- 1) Ikemoto, T et al. Space shuttle flight (STS-90) enhances degradation of rat myosin heavy chain in association with activation of ubiquitin-proteasome pathway. *FASEB J* 15(7):1279-81 (2001).
- 2) Nikawa, T et al. Skeletal muscle gene expression in space-flown rats. *FASEB J*. 10.1096 (2004)
- 3) Nakao, R et al. Ubiquitin ligase Cbl-b is a negative regulator for insulin-like growth factor 1 signaling during muscle atrophy caused by unloading.: *Mol Cell Biol*. 29:4798-811 (2009).
- 4) Sandri, M et al. Mitochondrial fission and remodelling contributes to muscle atrophy. *EMBO J*. 19;29(10):1774-85 (2010).