

地球環境下で抗重力筋を維持する分子シャペロン α B-crystallin のダイナミクスと宇宙での変化

藤田恵理¹, 桜井隆史², 跡見順子³

1 東京大学情報理工学系研究科、2 東京大学大学院総合文化研究科、3 東京大学サステナビリティ学連携研究機構

Dynamics of molecular chaperone alpha B-crystallin, which maintains the anti-gravity muscle on the ground, and the change in the space.

Eri FUJITA¹, Takashi SAKURAI², Yoriko ATOMI³

1 The University of Tokyo, Graduate School of Information Science and Technology, 2 The University of Tokyo, Graduate School of Arts and Sciences, 3 The University of Tokyo, Department of Integrated Research System for Sustainability Science (IR3S), 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-8654, Japan,
E-mail: atomi@bio.c.u-tokyo.ac.jp

Abstract: Disuse-muscle atrophy, especially both in space and in aged peoples on the 1G earth, is severe problems not only to keep cell survival in our body working in activity-dependent fashion, but also to maintain whole body activities. Alpha B-crystallin, one of small heat shock proteins, is constitutively expressed in heart and slow skeletal muscles, both express slow myosin with high oxidative metabolism, resulting in creating high endurance, and functions as molecular chaperone necessary for endurance. During stress, such as heat, oxidative, and mechanical stresses, alpha B-crystallin protects proteins from stress-induced denature and aggregate, in consequence, improves the cell survival. It has been reported that alpha B-crystallin is involved in the stabilization and the regulation of cytoskeleton, such as intermediate filament, actin and tubulin/microtubule, especially their free forms. Two cytoskeleton systems of actin and tubulin/MT, which are called as “treadmilling” or “dynamic instability”, are maintained dynamic condition with chemical equilibrium of free and polymerized forms, at least in proliferating cells. Recently it has been reported that alpha B-crystallin displays a very distinct cross-striated sarcomeric staining after severe heat shock (45°C). Since alpha B-crystallin does not associate with free tubulin of soleus muscle cells under 4°C but under 37°C by immunoprecipitation analysis shown in our previous work. From these results, conditions of inner environment in our mammalian body are workable in narrow conditions to produce homeostasis, which is kept with molecular chaperone essential for protein homeostasis. The purpose of the present study is to investigate the dynamic view of alpha B-crystallin in living beating myocardial cells under both normal temperature and heat shock conditions by the use of time-lapse imaging system. We used green fluorescent protein (GFP) fused with alpha B-crystallin and it was expressed in rat neonatal myocardial cells. GFP-alpha B-crystallin transiently expressed in beating cardiac myocyte showed a striated pattern under normal condition. In contrast, GFP alone did not show a striated pattern in the same condition. Moreover, to investigate dynamic property of alpha B-crystallin in cardiac myocytes, fluorescent recovery after photobleaching (FRAP) analysis and fluorescent loss in photobleaching (FLIP) analysis of GFP-alpha B-crystallin indicated that the mobility of GFP-alpha B-crystallin in normal state is faster than during heat shock. These results demonstrated that the function of alpha B-crystallin is to work as molecular chaperone for structural proteins constituting of Z-bands of sarcomere and/or cytoskeleton, which should be also dynamically regulated during normal continuous beating. Beating itself under body temperature may be associated with folding/unfolding of Z-band proteins including the cytoskeleton. Both antigravity soleus and heart muscles highly express three proteins of tubulin, alpha B-crystallin and slow (α/β myosin).

One of factors to induce atrophy in space will be related to convection, which may influence the changes of protein dynamic, typically shown in cytoskeleton systems. Changes of sHSPs including α B-crystallin may good indicator to assume subtle and difficult mechanism to understand gravity-relating mechanism of our dynamic animal organism in space.

1. はじめに

宇宙環境に長期滞在する宇宙飛行士(そして重力の存在する地球上においても高齢者)にとっては、廃用性の筋萎縮は人間のからだ全体や細胞の活動を維持するために深刻な問題である。地球上では重力に抗して立位の姿勢を維持するためヒラメ筋を代表とする遅筋からなる抗重力筋が発達し、持続的に張力発揮をしているが、宇宙環境では重力に抗する必要がないために、機械的な刺激が減少することにより遅筋線維において顕著な萎縮が認められる。本稿では遅筋線維を維持するメカニズムについての考察と宇宙実験との関わりについて述べる。

2. ストレス応答と分子シャペロン

筋線維の収縮により、筋線維の細胞骨格系への機械的刺激や筋内の代謝物環境の変化、筋線維周辺の酸素動態の変化、温度の上昇など、様々な変化がおこっている。このような変化に反応して、細胞の状態を元に戻し、あるいは環境に応じて細胞を再構築するシステムを細胞は持っている。それがストレスタンパク質である。細胞の機能を生み出すのはほとんどがタンパク質の機能である。その機能は構造に依存する。ストレスタンパク質の機能は他のタンパク質の形の保持やケアである。その証拠に、運動直後にはさまざまな種類のストレスタンパク質の発現が認められる(Harris and Starnes, 2001)。

生体は常に様々なストレスを受けている。たとえば、高温や寒冷な温度、紫外線や放射線などの物理的ストレス、酸素や pH、有害化学物質などの化学的ストレス、心理的ストレス、その他に栄養物質の欠乏または過剰、虚血などのストレスは生体を脅かす。生物はその進化の過程でこれらのストレスから自らを守るために、様々な仕組みを発達させてきたと考えられる。これらのストレスの中でもっとも基本的なストレスの1つと考えられる高温ストレスに対して個体は細胞レベルである種のタンパク質の合成を行うことが明らかになった。このタンパク質は熱ショックにより誘導されることから、熱ショックタンパク質(heat shock protein: HSP)と呼ばれている。その後、熱ショック以外のストレスでも類似のタンパク質が合成されることが明らかになり、これら一群のタンパク質はストレスタンパク質と総称されるようになった。

HSPはストレス誘導性に発現が亢進するが、ストレス状態でのみ発現するのではない。HSPはあらゆる細胞で構成的に発現しておりタンパク質の‘かたち’を保持する働きをしている。タンパク質はアミノ酸が連結されたいわば一本のひも様の構造物として合成されるので、新たに合成されるときその折り畳みを助けるという、細胞内で機能を生み出すタンパク質の根幹を支える必須の役割を果たしている。このような役割から、タンパク質の介添え役

(シャペロン)として働いているのでHSPは分子シャペロンとも呼ばれている(‘シャペロン’の語源は貴婦人が社交界にデビューする時の介添え役の意味)。HSPは種による差が小さく、進化の過程においても非常によく保存されており、HSPが生物にとって必須のタンパク質であることが示唆される(Hunt and Morimoto, 1985)。HSPは、ストレスから生体を守るだけではなく、生存する中でエントロピーが増大した細胞内環境を正常な状態に戻しホメオスタシスを維持する機能を果たしていると考えられる。したがって、生命システムを持続させていくために、ストレスタンパク質が恒常的に発現することが必要不可欠である。

HSPの中で低分子量(分子量 15-30 kDa)のものを低分子量ストレスタンパク質(small Heat Shock Protein: sHSP)と呼ぶ(Kappe et al., 2002)。ヒトにおいてはHSP27(HSPB1)、MKBP(HSPB2)、HSPB3、 α A-crystallin(HSPB4)、 α B-crystallin(HSPB5)、p20(HSPB6)、cvHsp(HSPB7)、H11(HSPB8)、HSPB9、HSPB10の10種類が存在している(Kappe et al., 2002)。sHSPファミリーは骨格筋や心筋細胞で構成的に発現するものが多い。

α B-crystallinは目のレンズ以外の組織においても構成的に発現しており、心筋、骨格筋(遅筋)などの代謝活性の高い組織で発現量が高く、腎臓、肺などで中程度、脳、脾臓でも少量発現している(Atomi et al., 1991b; Dubin et al., 1989; Iwaki et al., 1989; Klemenz et al., 1993; Nagineni and Bhat, 1989)。筋組織中ではZ帯に局在しており、その発現は筋線維タイプ依存的であり、遅筋線維で発現量が高く、速筋線維では低い(Atomi et al., 2000; Atomi et al., 1991b)。

3. α B-crystallin と細胞骨格タンパク質との関係

sHSPの機能の特徴は、細胞骨格タンパク質の再構築を担う点である。 α B-crystallinと細胞骨格への相互作用についても、これまでにいくつかの報告がなされている。 α B-crystallinはラットの後肢懸垂による萎縮した遅筋ヒラメ筋で特異的に減少し(Atomi et al., 1991a)、骨格筋サルコメアのZ帯に局在すること(Atomi et al., 1991b)、心筋ではI帯の中心部(Z帯)に desmin フィラメントとの分布が一致することから(Bennardini et al., 1992)、細胞骨格との関連が示唆されている。またレンズ組織の抽出液に対する免疫沈降の実験から、 α B-crystallinは(GFAP) glial fibrillary acidic protein、vimentin、filensin などの中間径フィラメントタンパク質に結合し、さらに *in vitro* の実験で GFAP や vimentin の重合が α B-crystallin の ATP 非依存的な効果により抑制される(Nicholl and Quinlan, 1994)。これらのことより、 α B-crystallinは中間径フィラメントに対して結合するだけでなく、ストレスがかかったフィラメントに分子シャペロンとして機能していることが示唆さ

れる。

4. 細胞骨格・チューブリンと α B-crystallin の関わり

tubulin／微小管と α B-crystallin の関係については我々のグループが中心に研究を進めてきた。*in vitro* で、 α B-crystallin は変性した tubulin へのシャペロン活性をもつ(Arai and Atomi, 1997)。このフリーの tubulin へのシャペロン効果は、sHSP がC末に共通にもつ” α -crystallin domain”による(Ohto-Fujita et al., 2007)。C6 glioma 細胞に薬剤により微小管を脱重合させると、 α B-crystallin 発現量は増加する(Kato et al., 1996)。電子顕微鏡観察により α B-crystallin が微小管に結合していること、および、微小管脱重合剤やカルシウムにより誘導される微小管の脱重合に対して α B-crystallin が抵抗性を示すことを明らかにしてきた(Fujita et al., 2004)。

また、骨格筋の萎縮時にチューブリンも減少するかを調べたところ、遺伝子レベルではほとんど変化しないが、チューブリンはタンパク質レベルで減少することを明らかにした(Sakurai et al., 2005)。分子シャペロンである α B-crystallin の減少がチューブリンの減少に先立ったことは重要である。遅筋の緊張性収縮は細胞骨格の動的特性を維持させ、 α B-crystallin の構成的な発現を引き起こしているのかもしれない。連続的な機械的ストレスは骨格筋で α B-crystallin の発現を誘導する(Neuffer and Benjamin, 1996)。 α B-crystallin は、重力を含む機械的刺激時の細胞骨格の動的なリモデリングに寄与する因子であると考えられる。

α B-crystallin の発現量の高い心筋、遅筋では常に張力が発生し、微小管にとってもストレス負荷がかかっていると考えられる。特に細胞内で動的に重合、脱重合を繰り返している微小管・tubulin はその構造から引っ張りや曲げ張力に対して弱いと考えられる。tubulin の重合体である微小管に対しても α B-crystallin は MAPs (microtubule associated proteins)を介して結合し、微小管脱重合剤やカルシウム誘導性の微小管の脱重合に対して抵抗性を示す(Fujita et al., 2004)。 α B-crystallin は MAPs を結合した微小管や遊離の tubulin 二量体に結合する。このように骨格筋内の微小管を維持することは収縮機能を維持する上で重要であるが、細胞骨格の再構築へ役割を果たしている α B-crystallin の tubulin への作用メカニズムの解明が必要であると考えられる。

5. 宇宙実験を行う必要性

ヒラメ筋、心筋、横隔膜や舌などの遅筋では持続的な筋収縮を維持することが重要であるが、 α B-crystallin は機械的刺激への筋の適応に重要な因子と考えられる。骨格筋に高発現する α B-crystallin は、筋収縮活動時に動的に筋細胞構造を維持している細胞骨格のケアシステムを担っているのかもしれない。

このような背景の下に、 α B-crystallin が細胞骨格ダイナミクスを維持するメカニズムの解明のために、持続的収縮刺激に対する応答機構としての α B-crystallin の心筋でのダイナミクスを可視化した例を示す。

α B-crystallin の心筋細胞収縮時の挙動を時間的・空間的に調べた結果、GFP- α B-crystallin は生心筋細胞内で横紋構造を示し(図1)、 α B-crystallin は収縮という機械的刺激の過程でZ帯に存在することから、細胞骨格系タンパク質と動的に相互作用する可能性がある。生細胞内での α B-crystallin を可視化し、FRAP 分析・FLIP 分析により、収縮中の心筋細胞の横紋構造に α B-crystallin が非常に速い速度で相互作用することを示した。 α B-crystallin は、恒常的に機械的刺激を受けている生心筋細胞内でZ帯に存在するタンパク質とダイナミックに相互作用している可能性が示唆され、骨格筋の収縮過程には細胞骨格系タンパク質の再構築が必須であると推察される。 α B-crystallin の発現が高い心筋、骨格筋などにおいては、収縮機能を発揮する上で重要なその動的構造を維持するために、3種類の細胞骨格の遊離型のいずれとも相互作用する α B-crystallin のシャペロン機能が必要とされるのであろう。細胞骨格はフリーフォームと重合体の間の化学平衡で重合が調節されている。フリーフォームを微小管の近辺にキープしておくことが微小管の動的平衡を維持するためには必須である。

α B-crystallin はストレス時の細胞骨格を維持する。ストレス時には細胞骨格が破壊されやすく、熱、浸透圧、酸化、薬剤により特に actin フィラメント、中間径フィラメント構造は影響を受けやすい。同時にシャペロンも多く誘導される。虚血再灌流傷害時には α B-crystallin が actin と結合しZ帯やインターカレートディスクに移動する。一方、微小管はこれらのストレスにはむしろ強いが、筋収縮時の機械的刺激時に微小管の崩壊が予想される。 Ca^{2+} 濃度の上昇により微小管は脱重合が促進する(Fujita et al., 2004)。さらにカルモジュリンなどの存在により Ca^{2+} に対する感受性が上昇する(Keller TC 3rd et al., 1982)。また tubulin の精製に用いる緩衝液:PIPES, MESなどで微小管の重合は促進するするが、フリーの tubulin は変性が促進される(未発表データ)ので、活動性の高い細胞内の溶液条件なども影響を与えているのかもしれない。 α B-crystallin は、このような Ca^{2+} シグナル応答が主要な機械的収縮がある心筋・骨格筋での発現が多いことから考えると、恒常的な機械的刺激をうけている組織、心筋・骨格筋(とくに持続的収縮をおこす遅筋)で、機械的刺激に弱い微小管のような構造がいつどこで破壊されてもフリーのチューブリン分子を結合して空間的に保持しつつでも微小管再構築のために供給できるようにキープしているのかもしれない。微小管は分裂期の細胞では MTOC から伸張するが、MTOC ではない場所(たとえば MAP4) (Itoh and Hotani, 2004)からも伸張することが報告されており、筋細胞でもこのようなかたちで機能している可能性もある。他の組織の細胞と違い、心筋や遅筋はダイナミックな構造維持そのものが機能を生み出している。ともすれば忘れがちな幾層もの動的な状態(遺伝子の読み出し、タンパク質の合成/分解、重合/脱重合等)の維持のために α B-crystallin は機能している可能性がある。

適度に細胞(構造)を安定化しながら動的性質を保持し続けることは、細胞外からのストレスシグナルに構造までも含めてダイナミックに応答することで可能になる。こ

のように細胞のストレス応答系(ストレスタンパク質発現)はストレス応答時に機能するだけではなく、非ストレス時においても細胞の生存を維持するのに必須である。細胞の形態や運動を構成する細胞骨格系タンパク質は細胞内で固定された状態ではなく動的な骨格構造をもつとともに運動する性質を持つ。仮にその動的性質が失われると細胞は死に至る。ストレスタンパク質 α B-crystallin はその細胞骨格の動的特性を安定化しているのだろう。

Tabony らは一貫してチューブリン・微小管システムが重力応答することを報告してきた。対流のない微小重力下では、微小管ダイナミクス維持のためのフリーのチューブリンの供給が重力下とは異なる可能性があり、形成される微小管の構造に影響を与えることが報告されている (Tabony and Job, 1992)。チューブリンに限らずアクチンについても同様な現象があるのかもしれない。分化した組織内の細胞における細胞骨格は、安定化の様々な工夫が成されていることが報告されているが、活動的に生きている動物個体内では実験モデルで提起されているよりもはるかに動的であることが予想され、事実、ヒト及びマウスを対象に生きている状態で収縮させた骨格筋内のサルコメア長は、同じ筋線維の中でも大きなばらつきがあることが最近報告された (Llewellyn et al, 2007)。

細胞内は沢山のタンパク質及びそれらの複合体によって大変混み合っているので、「対流」の有無がどれだけタンパク質分子の相互作用に影響するかは分からないが、 α B-crystallin の発現や遺伝子レベルでは調節されていないチューブリンの量や局在を調査する宇宙実験を行うことは、1G の重力下で進化してきた生物、動物のシステム原理をあきらかにすると同時に、宇宙環境下で変化する環境因子が生物(動物)細胞内や身体内で、どのように変化するのかについても推論を行う貴重な資料を提供することになると考えられる。以前提案し却下された温熱ストレスのような人工的に地球重力下で受ける環境因子が代替因子として機能するかどうかについても研究が必要であり、複数のストレスに同時に応答して機能する分子シャペロンにフォーカスして研究することは、熱と力と形を見事に連動させて、修復系をうまく利用しながら構築してきた地球生物システムとその適応可能性についてあきらかにする重要な研究であると考えている。

<参考文献>

- Atomi, Y., Yamada, S. and Nishida, T. (1991a). *Biochem Biophys Res Commun* **181**, 1323-30.
- Atomi, Y., Yamada, S., Strohman, R. and Nonomura, Y. (1991b). *J Biochem (Tokyo)* **110**, 812-22.
- Atomi, Y., Toro, K., Masuda, T. and Hatta, H. (2000). *J Appl Physiol* **88**, 1355-64.
- Bennardini, F., Wrzosek, A. and Chiesi, M. (1992). *Circ Res* **71**, 288-94.
- Dubin, R. A., Wawrousek, E. F. and Piatigorsky, J. (1989). *Mol Cell Biol* **9**, 1083-91.
- Fujita, Y., Ohto, E., Katayama, E. and Atomi, Y. (2004). *J Cell Sci* **117**, 1719-26.
- Harris, M. B. and Starnes, J. W. (2001). *Am J Physiol*

Heart Circ Physiol **280**, H2271-80.

- Hunt, C. and Morimoto, R. I. (1985). *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 6455-9.
- Iwaki, T., Kume-Iwaki, A., Liem, R. K. and Goldman, J. E. (1989). *Cell* **57**, 71-8.
- Kato, K., Ito, H., Inaguma, Y., Okamoto, K. and Saga, S. (1996). *J Biol Chem* **271**, 26989-94.
- Kappe, G., Leunissen, J. A. and de Jong, W. W. (2002). *Prog Mol Subcell Biol* **28**, 1-17.
- Keller, T. C. 3rd, Jemiole, D. K., Burgess, W. H., Itoh, T. J. and Hotani, H. (2004). *Biol Sci Space* **18**, 116-7.
- Klemenz, R., Andres, A. C., Frohli, E., Schafer, R. and Aoyama, A. (1993). *J Cell Biol* **120**, 639-45.
- Llewellyn, M. E., Barretto, R. P. J., Delp, S. L. and Schnitzer, M. J. (2007). *Nature* **454**, 784-788.
- Nagineni, C. N. and Bhat, S. P. (1989). *FEBS Lett* **249**, 89-94.
- Neufer, P. D. and Benjamin, I. J. (1996). *J Biol Chem* **271**, 24089-95.
- Nicholl, I. D. and Quinlan, R. A. (1994). *Embo J* **13**, 945-53.
- Ohto-Fujita, E., Fujita, Y. and Atomi, Y. (2007). *Cell Stress & Chaperone* **12**:163-71.
- Rebhun, L. I. (1982). *J Cell Biol*, **93**, 797-803.
- Sakurai, T., Fujita, Y., Ohto, E., Oguro, A. and Atomi, Y. (2005). *FASEB J* **19**, 1199-201.
- Tabony, J. and Job, D. (1992). *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 6948-52..

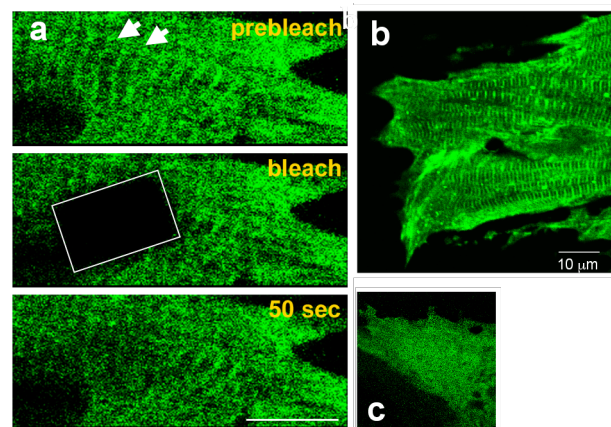


Fig. 1 GFP-alpha B-crystallin expressed in living myocardial cells. a: GFP-alpha B-crystallin in beating myocardial cells forms a striated pattern. After photobleaching, the bleached GFP-alpha B-crystallin recovers their fluorescence within 1 min. b: After heat shock GFP-alpha B-crystallin colocalizes with Z band, I band and M band, and the photobleached fluorescence does not recover in a few hours (figure not shown). c: GFP alone.