

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 downregulates the response of 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 an 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。

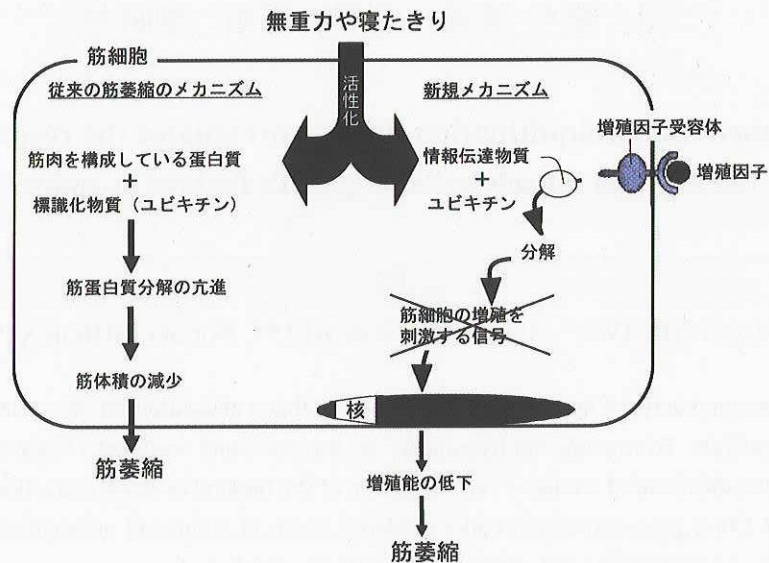


図1 本研究課題で提唱する筋萎縮の新規メカニズム。

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ズの 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 ± 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 L6 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., Sairyu, 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).