



ISSN 1349-1113
JAXA-RR-04-049

宇宙航空研究開発機構研究開発報告

JAXA Research and Development Report

重力感受応答に関わる細胞内外の分子実体および重力刺激の
生体内信号への変換と伝達過程の解明

東端 晃・行徳 淳一郎・鎌田 源司・石岡 憲昭

2005年 3月

宇宙航空研究開発機構
Japan Aerospace Exploration Agency

目 次

	頁
概 要	2
第1章 骨芽細胞を用いた力学刺激の細胞内生体信号への変換過程の研究	3
I. 骨芽細胞における細胞内シグナル伝達・遺伝子発現に及ぼす重力の影響	3
1. 目的と背景	3
2. 研究の概要	3
3. 成果の概要	4
4. まとめ	6
II. 国際公募選定テーマ研究を含む「力学刺激の細胞内生体信号への変換過程の研究」	7
1. 目的と背景	7
2. 研究の概要	7
3. 成果の概要	7
4. まとめ	13
第2章 血管内皮細胞等を利用した重力感受・応答機構の解明	14
1. 研究の目的, 意義等	14
2. 文献調査による国内外の研究状況	15
3. 研究の内容	17
4. まとめ	25
第3章 植物の重力応答に機能する分子のプロテオミクス研究	27
1. 研究の目的, 意義等	27
2. 研究の状況	28
3. まとめ	34
結 論	38
参考資料	39

重力感受応答に関わる細胞内外の分子実体および重力刺激の 生体内信号への変換と伝達過程の解明

東端 晃, 行徳 淳一郎, 鎌田 源司, 石岡 憲昭

Studies on the molecular mechanisms of gravity sense and response in cells

By

Akira HIGASHIBATA, Junichiro GYOTOKU, Motoshi KAMADA, Noriaki ISHIOKA

Abstract : In previous space flight experiments, the effects of microgravity on living organism were observed. The molecular mechanisms of microgravity effect, however, have not been cleared. In order to elucidate the detail of the gravity sense and response mechanisms on life, we focused the three topics as follows: 1) the transferring mechanisms of mechano-stress into innercellular signal in osteoblast cells, 2) cytoskeleton and small G proteins involved in gravity sense and response in endothelial cells, 3) proteomic approaches of gravitropic-related molecules in higher plants.

In each topic, we could find that the common signal pathways functioned as gravity response in various species. We could advance greatly the studies how gravity signals were transferred into biochemical reactions and what molecules are important on the transferring process.

概 要

本研究は、旧宇宙開発事業団宇宙環境利用研究システムで実施されていた先導的研究、「力学刺激の細胞内生体信号への変換過程の研究」、「血管内皮細胞等を利用した重力感受・応答機構の解明」、「植物の重力応答研究」を、平成15年10月の独立行政法人宇宙航空研究開発機構の発足に伴い、宇宙科学研究本部ISS科学プロジェクト室のISS/JEM利用科学プロジェクト研究として、「重力感受応答に関わる細胞内外への分子実体および重力刺激の生体内信号への変換と伝達過程の解明」という表題のもと、実施した。

本研究では、生体における個体、組織、細胞レベルでの重力感受と応答機構の解明を目標として、特に、重力感受分子実体の同定、細胞骨格系と重力感受機構との関連性、重力刺激情報の伝達機構の分子的解明を目指した。本稿の構成を以下に示す。

1. 骨芽細胞を用いた力学刺激の細胞内生体信号への変換過程の研究
2. 培養細胞の重力ベクトル変化環境下における細胞骨格系への影響
3. 植物の重力応答に機能する分子のプロテオミクス研究

第1章では、宇宙滞在による骨量減少のメカニズム、特に骨形成や骨吸収の現場で機能する個々の細胞が、重力環境情報を取得し応答する機構について、分子レベルでの研究を進めた。第2章では、機械的刺激の受容応答機構に関する研究が進んでいる血管内皮細胞を用い、細胞レベルでの重力感受応答機構について微小管やアクチンファイバーなどの細胞骨格系とその形成にかかわる低分子量Gタンパク質を中心に解析した。第3章では、植物における重力応答反応において、重力の変化によって発現が変化するタンパク質を網羅的に解析した。

各テーマはそれぞれ異なる切り口から重力感受応答メカニズムの解明を進めているが、細胞骨格系と生体内信号伝達における重力影響や力学刺激の細胞内外の情報伝達系との関連、プロテオミクス解析による細胞骨格やホルモン制御タンパク質の発現変化などが明らかされ、種の違いを超えた、生物に共通な生体物質にそれぞれ焦点が絞られてきており、重力刺激情報の生体内信号への変換とその情報伝達の分子実体と伝達経路の解明に向けて大きく前進した。

第1章 骨芽細胞を用いた力学刺激の細胞内生体信号への変換過程の研究

はじめに

宇宙ステーション等の地球低軌道上と圧環境に置かれた地上生物は、その著しい特徴である微小重力環境を認識し、様々な適応応答を開始する。宇宙環境への典型的な適応応答の一例に宇宙飛行士の骨量減少がある。本研究の目標は骨量減少のメカニズム、特に骨形成や骨吸収の現場で機能する個々の細胞が、どのようにして重力環境情報を取得し応答しているのかを明らかにすることである。この目標に向けて課題研究 (I) 骨芽細胞における細胞内シグナル伝達・遺伝子発現に及ぼす重力の影響と、更にその成果を発展させた国際公募選定テーマ研究を含む (II) 力学刺激の細胞内生体信号への変換過程の研究を進めてきた。またNASDAからJAXAへと組織が再編され、研究領域の重点化により本研究課題を「骨芽細胞を用いた力学刺激の細胞内生体信号への変換過程の研究」とした。

I. 骨芽細胞における細胞内シグナル伝達・遺伝子発現に及ぼす重力の影響

1. 目的と背景

本研究は、平成9年10月から平成14年9月まで実施された。欧州で行われたロケット実験やTR-IA6号機実験等で観察された、増殖因子刺激に対する初期応答遺伝子発現が微小重力下で遅延する現象に着目し、その分子機構の解析を目標に課題研究として開始した。

回転により重力方向を時間的に分散できるクリノスタット装置を用いた培養法や、過重力遠心下での培養法を用いて、重力環境の変化に対して培養細胞がどのような応答を引き起こすかを調べた (平成10～11年度)。平成11年11月に国外の専門家を含む外部評価委員による中間評価を実施した。その勧告「研究目標は適切であるが、より絞り込んだ課題に集中すべきである」を受けて、初期応答遺伝子等の上流にある制御領域の働きに研究目標を絞り込み、種々の異なる重力条件下における遺伝子発現の差を調べることを計画した。重力応答への関与が想定される遺伝子として初期応答遺伝子の*c-fos*と破骨細胞分化因子であるRANKL (Receptor activator of NF- κ B ligand)に焦点を当て、それらの上流の遺伝子転写制御領域をクローニングした。クリノスタット培養下での遺伝子転写制御領域の働きを、レポーター法によって解析した (平成12～13年度)。

2. 研究の概要

2. 1. TR-IA6号機による微小重力実験と地上実験* (平成10年度)

骨芽細胞 (MC3T3-E1) の増殖動態ならびに上皮増殖因子 (EGF) 等で誘導される細胞内シグナル伝達分子、増殖関連遺伝子等の発現に対する微小重力の影響を調べた。

本研究は平成9年度に開始され、一部は東京医科歯科大学難治疾患研究所、理化学研究所およびテキサス大学ヘルスサイエンスセンターとの共同研究として行われた。

2. 2. 骨代謝制御に対する重力の影響 (平成11～13年度)

EGFで誘導される細胞内シグナル分子であるERK (extracellular signal-regulated kinase) の細胞内局在、*c-fos*の発現、骨の改造を調節する生理活性物質の一つであるプロスタグランジンE2の産生、およびプロスタグランジン

合成酵素であるシクロオキシゲナーゼ (COX) 1, 2の遺伝子発現に及ぼす重力の影響をクリノスタット培養あるいは遠心培養により調べた。さらに骨芽細胞が重力環境に応じてRANKL産生や破骨細胞形成抑制因子(OPG: Osteoprotegerin)産生を変化させるかに着目し、RANKLおよびOPG遺伝子発現とその遺伝子発現変化をもたらす作用機序を検討した。

3. 研究成果の概要

3. 1. TR-IA6号機による微小重力実験と地上実験

骨芽細胞株MC3T3-E1をTR-IA6号機に搭載し、0時間回収・無処置・EGF処置・フォルスコリン (Forskolin) 処置の4条件で薬剤処理を行った。帰還した細胞融解液について*c-fos*発現量をRT-PCR法で、またERKのリン酸化状態をウェスタンブロッティング法で検索した。地上対照群では*c-fos*遺伝子発現はEGF刺激で有意に上昇していたが、飛行群では*c-fos*の上昇が抑制された。フォルスコリン刺激の場合には地上対照群と飛行群とで差は認められなかった(図1)。EGF投与により誘起されるERKのリン酸化は地上対照群と飛行群とで差がなかった。ヒト表皮癌細胞A431細胞で既に報告されているが、骨芽細胞においても微小重力下で*c-fos*遺伝子発現が抑制されることを確認した。これらの結果から微小重力が影響するのはERKのリン酸化以降であることが示唆された。また遠心培養(60G)下でのEGF刺激による*c-fos*遺伝子の発現は、静置培養より早期に上昇していた。さらに、遠心培養では静置培養より細胞数が約25%増加していることが認められた。

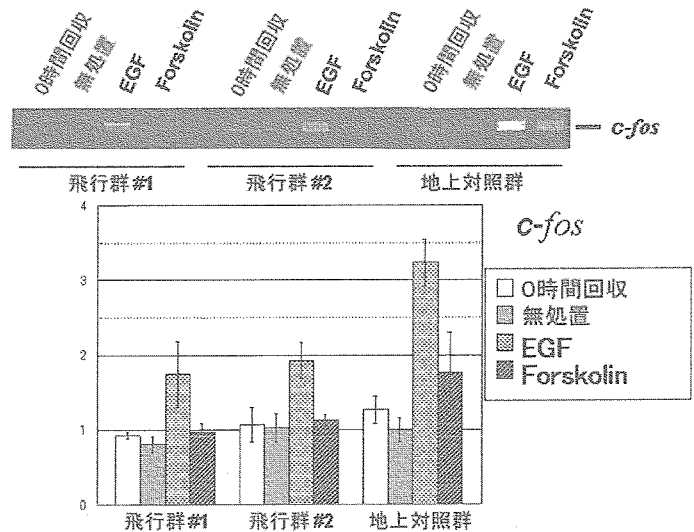


図1. TR-IA 6号機による微小重力下での*c-fos*遺伝子発現
(A.Sato et al.1999)

3. 2. 骨芽細胞の細胞内シグナル伝達・増殖関連遺伝子発現に及ぼす微小重力の影響

3. 2. 1. 細胞内シグナル伝達分子の活性および局在

クリノスタット培養および遠心培養(10分間)後の細胞内シグナル伝達分子ERKの細胞内分布を蛍光像および微分干渉像を共焦点蛍光顕微鏡により観察した。その結果、クリノスタット培養においてはERKおよびリン酸化型ERKの局在に対して顕著な変化は見られなかったが、遠心培養によって核内の全ERKが僅かに増加する傾向があった。しかし、クリノスタット培養、遠心培養および静置培養した細胞の細胞質画分および核画分中のERK活性レベル、あるいはウェスタンブロット解析によるリン酸化型ERKの割合やERKの細胞質と核の局在に有意な差は検出されず、ERKシグナル伝達経路が関与する可能性は低いと考えられた。

3. 2. 2. 増殖関連遺伝子*c-fos*発現およびプロスタグランジン E_2 合成等への重力の影響

骨芽細胞を24時間クリノスタット培養(15, 30, 60 rpm)あるいは遠心培養(5, 10, 20 g)し、培養液に放出

されるプロスタグランジン E_2 を酵素免疫法により測定した。単に回転することによる非特異的影響の可能性を除外するために、水平回転対照を置いた。クリノスタット、遠心培養ともに培養液中のプロスタグランジン E_2 濃度が上昇していたことから、通常の 1 g 環境からの重力環境変化がプロスタグランジン E_2 の産生と放出に関与している可能性が示唆された。そこで、アラキドン酸からのプロスタグランジン合成に働くシクロオキシゲナーゼ COX-1 および COX-2 の mRNA 発現を調べた。クリノスタット培養・遠心培養群の COX-1 の発現は 3 時間培養までは僅かな増加傾向があった。誘導型 COX-2 の発現は 1.5 時間で静置対照群の 3.5 倍に上昇した。重力変化は誘導型 COX-2 の発現を介して、プロスタグランジン E_2 の産生と分泌を促進することが示唆された。

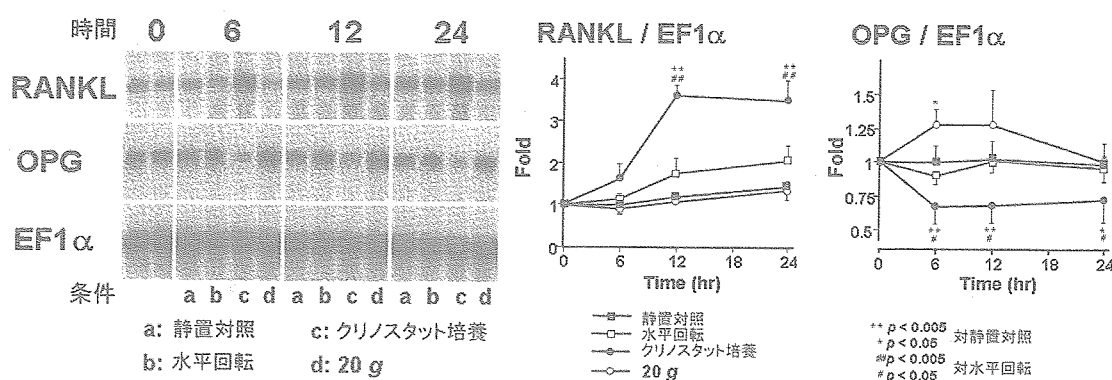


図2. クリノスタット培養による RANKL / OPG 遺伝子発現変化 (M. Kanematsu *et al.* 2002)

3. 2. 3. 骨髄基質細胞における RANKL, OPG 遺伝子発現に及ぼす重力の影響

骨量維持は骨形成を担う骨芽細胞・骨髄基質細胞と骨吸収を担う破骨細胞との平衡関係によって調節されている。そこで、骨髄基質細胞の骨形成機能が重力環境変化によって変化するかを調べた。骨髄由来基質細胞株 ST2 をクリノスタットで 24 時間培養し、RANKL および OPG 遺伝子の発現をノザンプロット法で測定した (図2)。左図はノザンプロットの結果、右図は遺伝子発現量を定量化したものである。対照は静置 (a, ■) および水平回転状態 (b, □) による培養とした。クリノスタット培養 (c, ●) 群では RANKL 遺伝子発現の増加と OPG 遺伝子発現の減少が見られた。一方、20G 遠心培養群 (d, ○) では両遺伝子発現に有意な変化は見られなかった。これらの結果から、宇宙環境などの無重量状態において、骨芽細胞/骨髄基質細胞による RANKL 産生が高まり、OPG 産生が抑制されることで、破骨細胞形成が促進している可能性が示唆された。

クリノスタットによる RANKL および OPG 遺伝子発現の変化にどのようなシグナル伝達経路が関与しているかを調べるために、細胞内のアデノシン環状リン酸 (cAMP) 量を測定したところ、静置培養群と比較しクリノスタット培養群では約 1.5 倍に上昇することが分かった。

クリノスタットによる RANKL および OPG 遺伝子発現の変化はタンパク質キナーゼ A 阻害剤 H89 によって阻害され、一方シクロオキシゲナーゼ阻害剤のインドメタシンは影響がなかった。アデニルシクラーゼ活性化剤のフォルスコリンおよび cAMP 供与体は RANKL 遺伝子発現を上昇させ、OPG 遺伝子発現を低下させることが報告されていることから、クリノスタット培養による RANKL 遺伝子発現の増加と、OPG 遺伝子発現の低下は cAMP 経路を介していると考えられる。

次に、重力環境変化による RANKL 遺伝子の発現調節機構を詳細に解析するためにルシフェラーゼレポーター法

を用いた解析を行った。まずRANKL遺伝子の5'側上流にあると考えられる調節領域のクローニングを行った。塩基配列の解析を進め、RANKL遺伝子5'側隣接領域第+21～-2014塩基対の配列を決定し、ジーンバンクに登録した。また、レポーター測定用ベクターとして、RANKL遺伝子5'側隣接領域+21～-2014塩基対、+21～-816塩基対、+21～-429塩基対をBglIIIサイトで挿入したpGL3-basicvectorを作成した。

ST2細胞を予め1日予備培養した後、ルシフェラーゼレポーター遺伝子を含むRANKLプラスミドDNAをリポフェクションした。標準化指標としてpRL-SV40を含むウミシイタケルシフェラーゼレポーター遺伝子を同時に加えた。細胞を更に2日間培養した後クリノスタット培養を行った。クリノスタット上で18時間培養後のRANKLレポーター遺伝子の発現を図3に示す。ルシフェラーゼ活性はクリノスタット培養で有意に上昇した。ルシフェラーゼ活性の上昇は、H89によって抑制された。フォルスコリンおよびcAMP供与体 (Db-cAMP) の添加によるルシフェラーゼ活性の上昇とH89による阻害は、ノザンプロットの結果と同傾向で整合していた。

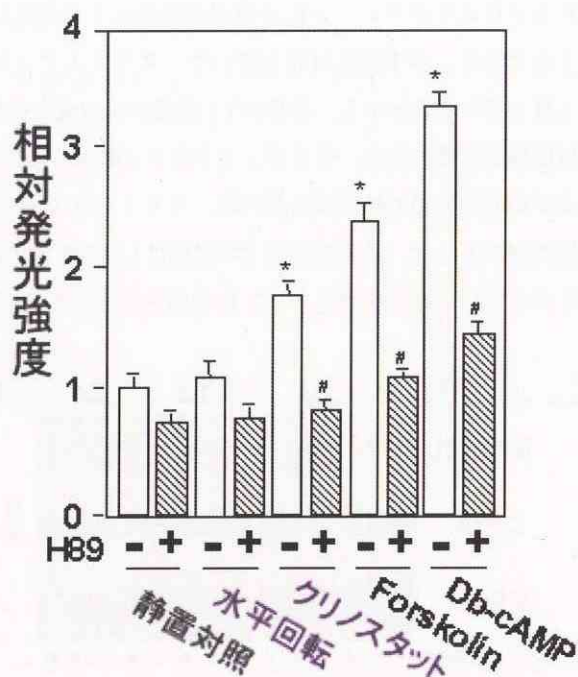


図3. RANKLプロモーター活性測定
(M. Kanematsu et al. 2002)

4. まとめ

骨改造系の制御機構に対する重力の影響を分子レベルで検討した。TR-IA6号機実験における微小重力環境では、EGF刺激で誘起される*c-fos*発現を抑制したが、これに対して地上実験における過重力は促進させるという興味ある知見が得られた。EGF応答する*c-fos*遺伝子の発現抑制に関連してリン酸型ERKの核内分布を組織学的に検討したが、重力によるリン酸型ERKの細胞内分布の顕著な変動は見られなかった。自己分泌による制御に関しては、細胞増殖に対し抑制および促進作用を有するプロスタグランジン合成酵素 (COX-1, COX-2) 遺伝子発現を検討し、COX-2がクリノスタット培養開始後誘導され、培養液中に放出されたプロスタグランジンE₂が極大となる6時間以降は、抑制されることが明らかとなった。さらに、傍分泌による破骨細胞の分化制御に関しては、微小重力環境では骨髄基質細胞並びに骨芽細胞からのRANKL産生が高まり、OPG産生が抑制されることにより、破骨細胞形成が亢進している可能性が示唆された。RANKLは成熟破骨細胞の骨吸収活性を増強することから、成熟破骨細胞の骨吸収活性も高まっていることが示唆される。また、クリノスタット培養によるRANKL, OPGの遺伝子発現変化は、cAMP経路を介していることを明らかにした。RANKL遺伝子発現変化に関しては、RANKL遺伝子転写制御領域を組み込んだベクターを用いたレポーター法によっても整合する結果が得られた。

II. 国際公募選定テーマ研究を含む「力学刺激の細胞内生体信号への変換過程の研究」（平成14年10月～平成17年3月）

1. 目的と背景

宇宙実験では複雑な実験操作や不安定な物質の取扱いに制約が多い。そこで目的とする遺伝子転写制御領域に、安定で検出が容易なレポータータンパク遺伝子を繋いで発現させるレポーター法は、宇宙実験の制約を受け難い点に着目した。これにより、複雑な実験操作を省き、冷凍庫に保管された実験後の細胞を地上に回収してから解析することが可能になる。そこで、複雑な骨代謝調節機構の中で、骨髄基質（ストローマ）細胞による破骨細胞分化誘導機能が微小重力下で変化するかの一点に注目した宇宙実験計画を立案した。第4回ライフサイエンス国際公募に「RANKL遺伝子制御領域内の重力感受エレメントの同定」を提案し、平成14年1月に宇宙実験候補テーマとして選定された。これに対応するため、従来の課題研究を収束させて、新たな研究課題「力学刺激の細胞内生体信号への変換過程の研究」を平成14年4月に設定した。力学的な環境情報が細胞の生体内信号に変換される現場、すなわち重力センサー分子の存在を想定し、その実体を解明することに集中した研究課題となっている。また機械刺激に対する細胞の感受機構への理解を深めるため、機械刺激を加える一連の細胞培養手技そのものが細胞に影響を与える環境要因となるのをさげなければならない。新たな実験手法を開発し、機械刺激に対する細胞の感受機構解明を図る。

2. 研究の概要

宇宙実験の目的は地上クリノスタット実験で観察されたRANKL遺伝子の発現上昇が、宇宙の無重量状態で同様に起きるかどうかなを確認し、遺伝子転写制御領域内で特に重要な働きをしている部分を明らかにすることである。評価パネルの指摘に基づき、(a) 研究体制の整備、(b) ターゲットとする転写エレメントの絞込み、(c) 宇宙実験を行うための技術的課題への確認、(d) 実験装置等、に留意しながら研究を進展させている。現在までに宇宙環境で細胞を培養する保水型細胞培養容器の試作品を完成させ、宇宙実験条件設定等の予備実験に使用している。また、重力などの力学的な環境情報が生体内信号に変換される過程を調べるために、細胞膜表面上に存在するインテグリンとイオンチャネル関連タンパクに着目し、インテグリンにより制御される骨芽細胞分化メカニズムの解析や、力学刺激受容に関連する新規タンパク質の探索を行っている。

3. 研究成果の概要

3. 1. 力学刺激の細胞内生体信号への変換過程の研究（国際公募選定テーマ研究を含む）

3. 1. 1. 保水型細胞培養容器開発

平成14年度より、宇宙実験および地上実験で共通して使用できる細胞培養容器の開発・製作に着手した。微小重力下と地上重力、更にはクリノスタット回転や過重力遠心培養等に共通して使用するためには、ガス交換可能な水密構造である一方で、気泡の混入を防止する必要がある。そのため、ガス透過性を確保しつつ培養液水分の蒸発を減じるための工夫を施した。保水型細胞培養容器の外観写真を図4に示す。また、濡れ性を利用して微小重力下でも容器内で空気と培養液の置換が容易な培養部形状を採用した。本容器はJEMライフサイエンス実験に向けて詳細設計を終えている細胞培養実験供試体（CEU1）に組み込むことが可能な接続部仕様とした。試作品は平成14年度末に完成し、市販の培養フラスコに比べて遜色のない細胞培養ができることや保水機構が顕微鏡観察を妨げな

いこと等を確認した。現在、本容器を用いて、さらに検討を要する技術的な課題および改良点等の抽出を行っている。



図4. 保水型細胞培養容器

3. 2. 細胞外マトリクス情報および力学刺激情報に対する細胞応答の研究

コラーゲンのような細胞外マトリクスと細胞表面上インテグリンとの結合状態が細胞機能発現に重要であることは広く知られている。しかしながら、力学刺激存在下でこの結合が影響を受けるかどうかについては明らかにされていない。そこで、骨芽細胞を材料として用い、インテグリン-コラーゲン結合を減弱させた時に影響を受けるシグナル伝達分子を明らかにし、力学刺激によりこれらがどのような影響を受けるかを調べることから力学刺激受容機構の解明に迫ることを目的とした。さらに、細胞外マトリクス-インテグリン系以外に力学刺激を細胞が直接認識する機構を備えている可能性を検索するために、最近、線虫 (*C.elegans*) で力学刺激関与遺伝子として同定された MEC-2 の動物細胞における相同遺伝子の探索を試みた。

3. 2. 1. 細胞外マトリクス-インテグリン結合により制御される骨芽細胞分化機構

骨芽様細胞株 MC3T3-E1 細胞は細胞間の接着状態が密になった時期 (3日目) から alkaline phosphatase (ALP) 活性 (骨分化マーカー) が上昇するのを確認した。この ALP 活性上昇は、DGEA (I型コラーゲン配列ペプチド)、および、U0126 (ERK活性化阻害剤) それぞれの単独添加により抑制され、コラーゲン-インテグリン結合および ERK 活性化が骨芽細胞分化に関与していることを確認した。細胞表面に発現しているインテグリン α_2 および β_1 タンパク量変化をフローサイトメトリーで調べたところ、分化進行に伴い細胞表面上のインテグリン α_2 および β_1 のタンパク発現量が減少することを見出した (図5左)。さらに、DGEA, U0126 の処置はインテグリンの細胞表面タンパク発現量の分化進行に伴う減少に抑制作用があることを明らかにした。これらの結果より、骨芽細胞の分化進行とインテグリンの細胞表面発現量変化が逆相関であり、密接な関係があることが示唆された。また、骨芽細胞分化に重要な役割を果たしている ERK 活性化状態の時間推移をウェスタンブロッティング法で解析したところ、培養期間を通し持続的な ERK 活性化が検出された (図5右)。

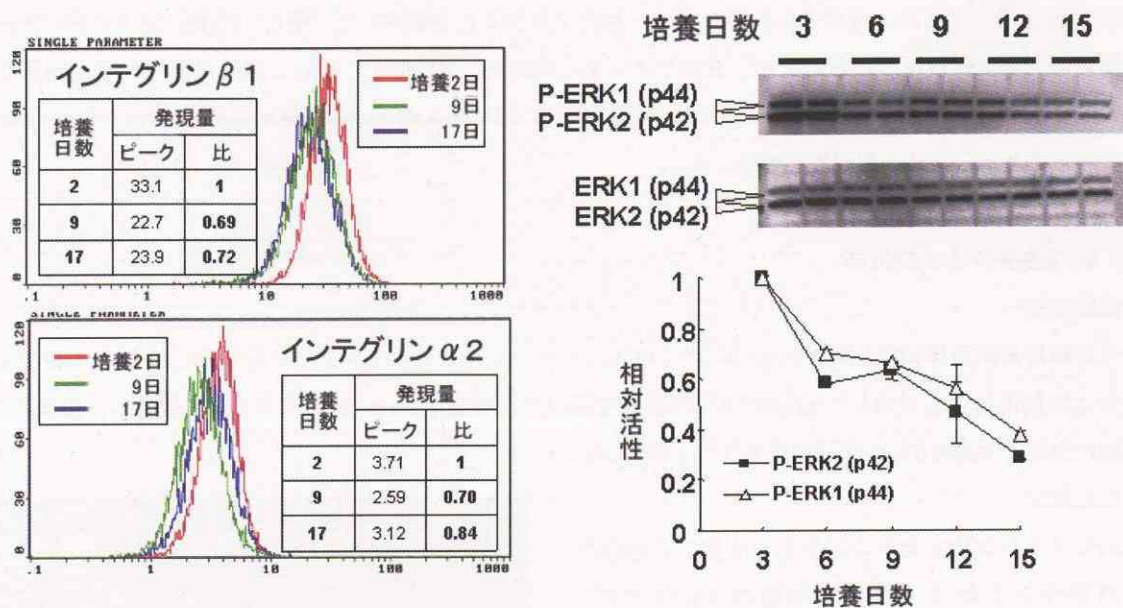


図5. 細胞表面インテグリン発現量 (左) と ERK 活性化の時間推移 (右)

3. 2. 2. MEC-2様遺伝子の探索

感覚神経細胞で力学刺激受容に関与が示唆されている MEC-2 に類似した遺伝子が骨芽細胞にも発現している可能性を調べるため、degenerate PCR による cDNA クローニングを試みた。 *C. elegans* MEC-2 およびその相同遺伝子であるマウス stomatin と相同性の高いアミノ酸配列部分に対応させた2種類の変質プライマーを作製した。一方は MEC-2 のアミノ酸配列 113-120 番目および 299-236 番目の部位に対して設計し (stomatin のアミノ酸配列 26-33 番目および 212-219 番目の部位に相当)、他方は MEC-2 のアミノ酸配列 234-240 番目および 270-277 番目の部位に対応させた (stomatin のアミノ酸配列 147-153 番目および 193-200 番目の部位に相当)。この方法により現在までに stomatin そのものがクローニングされることを確かめ、引き続き関連する類似遺伝子を探索している。

3. 3. 機械刺激による骨芽細胞の *c-fos* 遺伝子活性化機構

骨量減少は微小重力環境適応の過程で観察される顕著な現象の一つである。地上では長期臥床あるいはラットやマウスの尾部懸垂等でも観察される。この現象は骨が加重を検出するための何らかのセンサーを有すること、および加重や機械刺激が骨代謝の制御因子として働くことを示唆している。しかしながら、骨代謝に関わる細胞がどのようにして機械刺激を検出するのか、その分子レベルのメカニズムは不明である。

骨組織で想定される機械刺激には、外力による硬組織の変形その他、間質液による液流等がある。しかし、機械的な刺激に対する細胞の応答機構に関する知見は極めて乏しい。この細胞の機械刺激に対する感受機構への理解が進まない主な理由の一つは、有効な研究手法がないことであると考えられる。とくに機械刺激の実験を成立させるために重要な各実験群の環境条件を揃えるところに多くの課題がある。機械刺激を加える一連の細胞培養手技そのものが細胞に影響を与える環境要因となるのを避けなければならない。このため機械刺激感受機構解明を目的とした新たな実験手法を開発し洗練させなければならない。

本報告では、骨芽様培養細胞株 MC3T3-E1 細胞が培養フラスコのシーソー振とうによって生じた液流にตอบสนองして

c-fos 遺伝子を発現すること、またその発現亢進は一過性であることを観察した。更に、培養フラスコ内の培養液温度を簡便な方法で保持することにより、液流だけでなく培養液の温度低下に対して細胞が応答して *c-fos* 遺伝子を発現することも観察した。また、腎上皮細胞で液流の検知に働く一次繊毛が骨芽様培養細胞株 MC3T3-E1 細胞上にも存在することから、その類似性を考察した。

3. 3. 1. 実験材料および方法

(1) 細胞培養

骨芽様培養細胞株 MC3T3-E1 細胞（理化学研究所・バイオリソースセンター）の培養には10%の牛胎児血清および抗生物質を添加した alpha-MEM 培養液を用いた。細胞は25cm²培養フラスコに播種し、温度37℃、二酸化炭酸ガス濃度5%の湿潤環境条件下で培養した。

(2) 温度測定

培養フラスコ内培養液の温度変化を精密に感度良く計測するために、微小な熱電対（K-タイプ、Termocoax社）を用いた。外径0.5mmのシース内に収められた熱電対の測温部が25cm²フラスコ中の培養液に浸るようにシリコンゴム栓を介して培養フラスコ内部中央に挿入した（図6）。測定温度はデータロガー（Agilent社、34970A）により記録した。

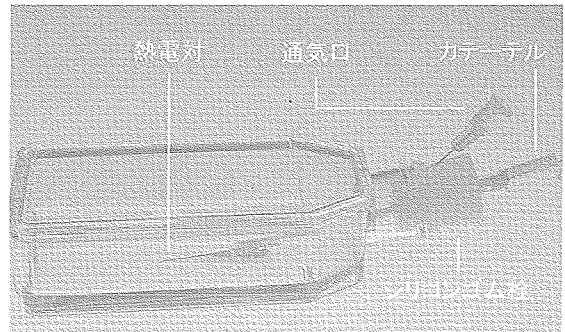


図6. 熱電対を装着したフラスコ

(3) 培養液の温度維持

細胞を播種した培養フラスコは37℃に設定した一般の炭酸ガスインキュベーター中で培養するが、培養環境変化の要因となるドアの開閉による培養液の温度低下を防ぐため以下のように温度保持を図った。培養フラスコはインキュベーター内に設置した発泡スチロールの箱の中に静置した。箱の底には市販保冷剤1個（重量約200g）を置き、アルミ板を介して培養フラスコを置いた。さらに保温した保冷剤をフラスコ上に載せた。なお保冷剤と箱は37℃で一晩以上保温した後に使用した。

(4) RT-PCR

細胞からの全RNAをQiagen RNeasy Mini kit マニュアルの手順（Qiagen社製）に従い抽出した。cDNAはそれぞれの全RNA試料1 μgからRNA PCR kit（TaKaRa社製）の手順に従い、抽出した。プライマーの配列はつぎのとおりである。

c-fos forward ; 5'-CACTCCAAGCGGAGACAGATCAAC-3'

c-fos reverse ; 5'-CAGTCTGCTGCATAGAAGGAACCG-3'

18srRNA forward ; 5'-GAACGTCTGCCCTATCAACT-3'

18srRNA reverse ; 5'-CCAAGATCCAACACTACGAGCT-3'

指数関数的にPCR反応が増幅する領域で停止させるためにPCRサイクル条件は18s rRNAでは16サイクル、*c-fos*ではサイクル数を22とした。得られたPCR産物（5 μl）はTBE緩衝液を用いて、50Vで30分間アガロースゲル担体（濃度1.0%）による電気泳動をした。半定量的RT-PCR法における全てのデータで各実験群はトリプレケートとし、18s rRNAを内部標準分子として補正した。

(5) 一次繊毛の可視化

MC3T3-E1細胞上の一次繊毛の染色にはLab-Tek IIチャンバースライド上で2日間培養した細胞を供した。10%ホルマリンで10分間固定した後に0.1%Triton X-100で可溶化した。固定液および可溶化溶液にはPHEM緩衝液を用いた。可溶化処理後の細胞に対してFITC-抗マウスIgGを二次抗体として抗アセチルチュブリン抗体を用いた免疫抗体染色法により一次繊毛を可視化した。

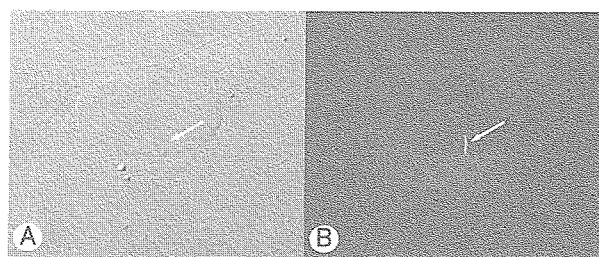


図7. MC3T3-E1細胞の一次繊毛(矢印)
A: MC3T3-E1細胞の微分干渉像, B: 抗アセチル α チュブリン抗体による染色像

3. 3. 2. 結果

(1) MC3T3-E1細胞の一次繊毛

腎上皮細胞上に認められる一次繊毛と同様に骨芽様培養細胞株MC3T3-E1細胞でも、抗アセチルチュブリン抗体により、コンフルエント状態の細胞のおよそ半数で一次繊毛が観察された(図7AおよびB)。

腎上皮細胞表面上の一次繊毛で抗アセチルチュブリンとともに共局在するとの報告があるが、骨芽様培養細胞MC3T3-E1細胞上の一次繊毛ではPKD2との共局在は不明瞭であった。

(2) 温度低下あるいは振とうによる細胞の活性化

ほ乳動物細胞実験では、ウォータージャケット方式の炭酸ガスインキュベーターで37°Cに温度を維持するのが一般的である。一方、動物細胞を取扱う際、実験者はクリーンベンチ内で作業をするが、作業場所は室温である。この温度変化に加えて、炭酸ガスインキュベーター内に持ち込まれる培養フラスコは庫内に静置されるまで機械刺激を受け続けることになる。さらに炭酸ガスインキュベーターのドアを開けると温められた庫内の湿潤な空気は庫外へ抜け、湿度や温度の低下は避けられない。インキュベータードアの開閉から庫内温度が回復するには10分間程度を要する。培養フラスコを発泡スチロール製の箱の中に入れ、保温のために市販の保冷剤を積載すると、温度低下を最小限に抑えることが可能であった。

遠心力のような機械刺激が培養細胞に加わると細胞内の*c-fos*遺伝子発現は誘導されるかどうかを調べた。試料を遠心機に設置するには数分間を要するため、一連の操作に対する対照実験群を置いた。操作の対照実験群は遠心実験終了後、炭酸ガスインキュベーター中に戻した。RNAを採取後、18s rRNAを内部標準分子としてRT-PCR法により*c-fos*遺伝子発現を評価した。

遠心実験に供した細胞と同等に操作の対照実験群で*c-fos*遺伝子発現の亢進が観察された。このことから遠心力よりむしろ一連の持ち運び操作により*c-fos*遺伝子発現が誘導されていると考えられた(図8)。

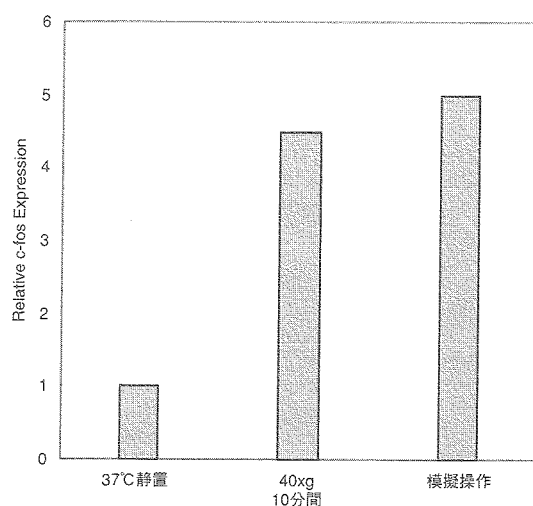


図8. 培養フラスコ取扱操作による*c-fos*遺伝子発現の亢進

遠心は37℃、遠心機への設置は室温での作業となる。これらの観察結果から温度低下あるいは培養液の液流により*c-fos*遺伝子発現が亢進すると考えられた。

そこで、振とう刺激と低温化による*c-fos*遺伝子の発現を分けて観察した。前述の簡易装置により温度を一定にして振とう刺激を与えた実験群では静置対照実験群より4~5倍程度、*c-fos*遺伝子発現の亢進がみられた(図9A)。また温度を一定にした状態で一方のみ4℃の保冷剤を1分間、培養フラスコに積載したフラスコでは対照実験群の約1.5倍、*c-fos*遺伝子の発現量が増加した(図9B)。

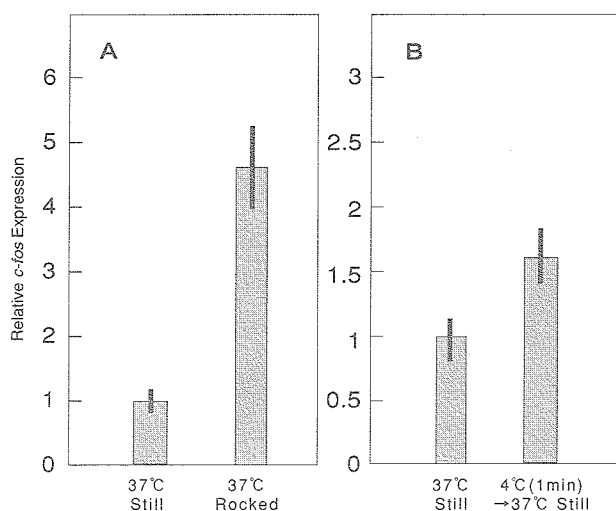


図9. (A) 振とう刺激あるいは (B) 低温化による*c-fos* 遺伝子発現亢進

3. 3. 3. 考察

(1) 液流および温度低下による*c-fos* 遺伝子の発現亢進

MC3T3-E1細胞において、培養フラスコの振とう、あるいはわずかな温度低下に反応して*c-fos*遺伝子が発現した。細胞は振とうによって生じた液流に反応したと考えられるが、温度低下に対する反応については現時点では説明がつかない。一つの可能性としてactin fiberにおけるエントロピー依存弾性の関与等も考慮すべきであろう。

液流と温度低下の2種類の刺激に対する反応の様相は類似していた。阻害剤U0126では温度低下および振とう刺激の両方とも同様に阻害された。温度低下および振とう刺激による細胞反応の両者ともにERK経路が関与していることが、U0126による部分的な抑制から示唆された。骨芽細胞での液流の影響は数多く報告されており、骨のリモデリングの主要な制御因子であると考えられている。しかし、温度変化が骨の形成や骨代謝に影響するとの報告は見当たらないため、ここで観察した現象が生理学的なものか否かについてはさらに研究を重ねなければならない。

(2) 一次繊毛

MC3T3-E1細胞には腎上皮細胞と同様に一次繊毛が発現していた。腎臓細胞では一次繊毛上に局在するTRPチャンネルスーパーファミリー分子に属するpolycystin-1 (PKD1) とPKD2が液流の検知に関与することが示されている。MC3T3-E1細胞でもPKD2は発現しているが、一次繊毛への局在は腎臓細胞における程には顕著ではなかった。このことは腎臓細胞と骨芽細胞では液流の検知には一部異なる機構、例えばpolycystin以外の分子が関与するような可能性もあることを示唆している。

(3) 液流によるせん断応力と流体抵抗

骨芽細胞上の一次繊毛の役割は、細胞による液流の検知に寄与すると推測されているものの、いまだに明らかではない。液流は一次繊毛に対して流体抵抗を生じ、効果的に曲げモーメントを生じるが、平らな細胞表面

上での液流によるせん断応力は小さい。およその推定によると、一次繊毛の基部では、滑らかな表面の50倍の応力を同じ流速から受けることになる。

4. まとめ

4. 1. 国際公募選定テーマ研究を含む力学刺激の細胞内生体信号への変換過程の研究

クリノスタット培養によるRANKL遺伝子発現変化を宇宙環境で検証するために、第4回ライフサイエンス国際公募に提案し、宇宙実験候補テーマとして採択された。宇宙実験で使用する保水型細胞培養容器の試作品を開発・製作し、その細胞培養能などを検証した。現在、同容器を用いて地上予備実験を行っている。

細胞が外環境変化を認識する機構を明らかにするために、細胞膜表面上のタンパク質に着目した。骨芽細胞分化進行には持続的なERK活性化が存在することを見出し、このERK活性化状態とインテグリン細胞表面発現量が培養期間とともに減弱することから、インテグリン-コラーゲン結合がERK活性化状態を調節していることを示唆した。今後は、様々な力学刺激状態下においてインテグリン-コラーゲン結合がどの程度影響を受けるかを明らかにし、力学刺激の細胞応答機構として一般化させる。また、力学刺激関連分子として知られる *C.elegans* MEC-2遺伝子を基にマウス骨芽細胞における候補遺伝子を探索した結果、現在までに取得した遺伝子はすべてstomatin遺伝子であった。これらの遺伝子の機能が相互に関連することが想像できるものの、骨芽細胞、骨髄基質細胞におけるstomatinや関連タンパクの役割は完全には解っていない。分化進行における発現の経時的変化観察や、RNAiを用いた発現抑制等を手掛かりにして、それらの機能の解析を進めなければならない。

4. 2. 機械刺激による骨芽細胞の*c-fos* 遺伝子活性化機構

本研究では、液流や温度低下により、骨芽細胞様培養株において*c-fos* 遺伝子発現が一過性に亢進することを観察した。このような刺激は、通常の細胞培養操作の過程では避けられないことであるが、一般的な生理活性の測定実験であれば、対照群もほぼ同様に刺激されているとみなすことができるため、特に大きな問題とはならない。しかし機械刺激に対する応答を調べる実験では、各実験群を、別々に取り扱わざるを得ないため、温度・炭酸ガス濃度・湿度といった環境条件履歴の同一性を保障することが極めて困難になる。特に、宇宙実験において飛行搭載試料と地上対照試料を比較しようとする場合は培養環境条件の制御を特に厳密に行う必要があると言える。

第2章 血管内皮細胞等を利用した重力感受・応答機構の解明

1. 研究の目的, 意義等

1. 1. 目的

生物は地球環境下で発生・進化を遂げてきたが, 人類をはじめとした生物は, 科学技術の進歩に伴い宇宙開発が進むことをうけて, まさに宇宙空間へ進出しようとしている。生体の宇宙空間への適応, 特に微小重力環境が与える生体への影響については, これまでの有人宇宙飛行や宇宙実験において生体への微小重力影響が観察されており, 個体, 組織など様々なレベルでの重力感受と応答の機構解明を目的とした研究が進められている。しかしながら重力感受と応答プロセスの中心となる分子の同定には至っていない。

本研究では, 生化学的および分子生物学的手法アプローチによって, 重力の感受・応答機構を細胞レベルにおいて解明すること, 特に生化学・分子生物学的手法を用いて重力刺激の細胞への作用点を明らかにすることを目的とし, 特に細胞骨格系と関連するGタンパク質に注目し, 重力感受分子の実体を追究した。

1. 2. 血管内皮細胞の利用について

血管内皮細胞は血管組織の内面に単層で存在し, 血液と他の組織を隔てる役割を担っているが, 血管内皮の機能は単なるチューブではなく, 血流確保のための抗凝固機能, 組織損傷時の血液凝固機能, 抗物質透過性の調節, 平滑筋収縮・弛緩物質産生による血管張力の調節, 種々の増殖因子産生, 免疫担当細胞との接着および反応部位への誘導など重要かつ多彩な機能を有しており, これらは血流による直接的な刺激(ずり応力, 圧力, 伸展張力)の影響を受ける。

血管内皮細胞の重力応答という視点からの研究は現時点ではないが, 高血圧や動脈硬化などの循環器系疾患への対策・予防などに関して, あるいは血管内皮組織形成にも関与するとして, 特にずり応力と機械的刺激応答に関して多くの研究が成されている。また, 細胞骨格や膜骨格のシミュレーション解析から, ランダムに配置した内皮細胞が血流からのずり応力に応じて移動し, 血流方向に配向・変形することが示されている。機械的刺激の細胞応答解析のために, ずり応力負荷を目的としたフローセル型の細胞培養容器や細胞伸展刺激のための培養面積可変型培養容器が一般に使用されており, これまでに血管内皮の機能に関わる多数のタンパク質や遺伝子発現, 細胞内シグナル伝達経路について解析が行われてきた。その結果, ずり応力刺激に反応して発現量が変動するタンパク質の多くはその遺伝子上に特徴的な塩基配列からなるSSRE (Shear Stress Responsive Element) が存在し, 細胞変形における機械的刺激の受容や応答に深く関わっていると考えられている。また, 血管内皮細胞においては, 機械的刺激によって活性化されるチャンネル (src: stress activated channel) が同定され, 機械刺激によってチャンネルが開閉することによって細胞内のカルシウム濃度が変化し, 環境に応じた細胞内シグナル伝達を引き起こされることが報告されている。

このように, 血管内皮細胞は機械的刺激の受容と応答という観点から広く研究されているため, 本研究においては重力による刺激をひとつの機械的刺激として捉え, これまで蓄積された研究手法, 解析方法を細胞に対する重力感受・応答機構の解明に導入することで, 効率的に重力感受・応答機構の解明に役立てることが十分可能であると考え, 本研究に血管内皮細胞を用いることとした。

1. 3. 作業目標と内容

本研究は、平成11年第3四半期から、宇宙開発事業団・宇宙環境利用研究システムの調査研究として開始した。また、本研究を開始するにあたり作業目標と内容を以下のように設定した。

- (1) 宇宙実験を視野に入れた研究課題を設定する。
- (2) 方法や測定対象等の絞り込みに必要な調査・検討を行う。
- (3) 上記で絞り込んだ解析対象候補に関する情報伝達経路あるいは分子の同定を目指して実験計画を作成し、地上研究を実施する。また、さらに飛行実験を目指した研究計画を検討する。
- (4) 研究結果について学会への外部発表などを行い、重力効果と機械的刺激応答との相関を中心に研究の多様性、発展性を検討する。また、検討結果を本研究の方向性に反映させる。

1. 4. 意義

本研究は、宇宙開発事業団ライフサイエンス専門委員会が策定した「宇宙環境利用研究におけるライフサイエンス研究シナリオ」や、宇宙開発事業団宇宙環境利用研究委員会で検討された、宇宙環境利用研究における重点課題研究分野の領域「重力環境変化が発動する生体内反応カスケードの解明」に合致するものであり、宇宙環境利用研究を推進する上で解明しなければならない基礎的な知見を与えるものと位置づけられる。また、本研究からのアウトプットは、重力刺激が影響を与える細胞内分子反応の解明のみならず、機械的刺激（物理的刺激）を生体分子反応（化学反応）に変換させる部位または分子の同定とそのメカニズムの本質に迫る成果が期待できる。また、細胞レベルでの分子機序の解明は、これまで観察されている重力の生体への影響に対する対策、さらに医学分野で取り上げられている循環器系疾患への対策に資するものとなることが期待できる。

2. 文献調査による国内外の研究状況

2. 1. 文献調査

2. 1. 1. 文献調査概要

本研究を立ち上げるにあたり以下の点に注目し、周辺研究の文献調査を実施した。

(1) 各種機械的刺激研究の現状

これまでにずり応力、圧力、伸展等による機械的刺激の実験が報告されている。血管内皮細胞の他、筋細胞、歯根膜細胞、内耳有毛細胞等でも積極的に研究が進められており、大腸菌や線虫では細胞膜の伸展で活性化するタンパク質（機械的刺激応答チャンネル）がすでに単離・同定されている。これらの機械刺激研究の現状を細胞応答形式から調査を実施した。

(2) SSRE等の機械的刺激応答性遺伝子エレメント

細胞変形（機械刺激）に応答する遺伝子群、特に、遺伝子上の転写（mRNA合成）調節領域に存在するずり応力応答配列（SSRE）について、SSREを持つ遺伝子群、およびこれらと相互作用をする転写調節因子群をゲノムデータベースにて検索・分類を行った。

(3) 血管内皮細胞の特性

生理的な細胞変形で発現量の変化する血管内皮細胞の遺伝子について、他の機械的刺激や液性因子等による発現変動の有無を調査し、遺伝子の応答特異性について分類を行った。

2. 1. 2. 国内外における機械的刺激受容応答機構に関する文献調査結果

調査概要に従い文献調査を主に、学会およびセミナー等から得られた情報を基に重力感受の分子メカニズムを考察した。環境からの様々なストレス（ずり応力、機械的刺激、化学刺激も含む）に応答してMAP（mitogen-activated protein）キナーゼカスケードが働き、最終的に遺伝子発現に影響する。近年において、機械的刺激、特に膜伸張刺激では、SAチャンネルが開きCa²⁺の細胞内流入が促進され、カルシニューリンの活性化からカスケード的にSrc（MAPキナーゼの一種）の活性化とそれに続くFAK、PAXのリン酸化が起こりfアクチン、インテグリンの再構成を促し細胞形態の変化をもたらすことが明らかにされている。一方、cAMPの上昇、プロテインキナーゼA（PKA）およびプロテインキナーゼC（PKC）の活性化、細胞内Ca²⁺の初期上昇などの知見が得られている。これらの知見は、Gタンパク質群による細胞内シグナル伝達系の関与を強く示唆していた。これらの文献調査により、機械的刺激の受容・応答に関与する細胞内シグナル伝達には大きく分けてCa²⁺依存性SAチャンネルを介する系とGタンパク質を介する（MAPキナーゼカスケードも含む）系の2つのパスウェイに焦点を絞られそうであること、特にGタンパク質系は応答としての遺伝子発現にも直接繋がることから重要と考えられた。さらに、機械的刺激の受容・応答機構に関与すると思われる細胞内シグナル伝達の上流部から中間部に位置するであろうと思われる経路について調査を行った結果、細胞骨格の形成に関与するタンパク質群、特にRho、Rac、Cdc42などのGタンパク質が、重力感受・応答のシグナル伝達に関与している可能性が示唆された。

2. 2. これまでの国内外における宇宙実験の実施状況

これまでの有人宇宙飛行や宇宙実験において生体への微小重力影響が観察されており、個体、組織など様々なレベルでの重力感受と応答の機構解明を目的とした研究が進められている。血管内皮細胞を用いた宇宙実験はこれまで行われていないが、生体の最小単位である“細胞”については分子レベルでの重力感受・応答機構の解明が期待され、これまでの宇宙実験やロケット実験、また地上での過重力実験や模擬微小重力実験から重力影響を受ける細胞内の反応経路について様々な検討がなされている。しかしながら、重力感受と応答の中心となる分子の同定には至っていない。一方、分子レベルでの重力感受・応答機構を理解する上で生物学的解析手法と同時に細胞への力学的解析も欠かせない。重力感受を担う細胞内の部位あるいは分子（重力センサー）では力学的な重力刺激が生体分子反応としての細胞応答に変換されていると考えられるが、これらに関する明確な解答は得られていない。しかし、重力感受・応答機構の分子機構を知るためには、重力センサーの探索だけでなく、その下流に位置するシグナル伝達機構を解明が必須となる。つまり、物理学的手法による上流（刺激側）からの解析と生物学的手法による下流（応答側）からの解析という両面からのアプローチによる重力影響の理解が必要である。

3. 研究の内容

2. 項で示した文献調査を基に、培養細胞（血管内皮細胞）を用いて、細胞レベルでの重力に対する感受応答を細胞の形態、タンパク質および遺伝子レベルから解析することにより、重力感受・応答機構の解明を目指す。特に、細胞骨格系と関連する低分子Gタンパク質に注目し、重力感受分子の実態を追究するため、以下の項目を実施した。

- (1) 重力ベクトル変化の環境下における血管内皮細胞の増殖と細胞骨格系を中心とした免疫染色による細胞の形態観察
- (2) 重力ベクトル変化環境下におけるタンパク質レベルでの変化
- (3) 重力ベクトル変化環境下における遺伝子レベルでの変化

3. 1. 重力ベクトル変化の環境下における血管内皮細胞の増殖と細胞骨格系を中心とした免疫染色による細胞の形態観察

本項に限らず、以下に行った実験では、正常ウシ脳毛細血管内皮細胞（CS-2BB3-C75）およびCS-C培地（Cell systems, Kirkland, WA）を使用した。

3. 1. 1. 小型クリノスタットの製作

実験を行うにあたり、CO₂インキュベーターに収納可能な、小スケールの細胞培養を行うための二軸クリノスタットを設計し、製作した。製作は、都立高等専門学校の研修プログラムの一環として、研修生の参加のもと実施した。現在までに4台製作し、実験で使用している。



図1. 制作したクリノスタット（左）。CO₂インキュベーターに設置することが出来る。

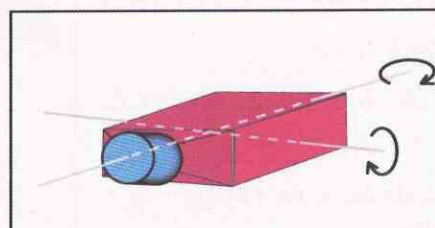


図2. (上) フラスコおよびスライドチャンバーはCS-C培地で満液化し、クリノスタットに搭載する。同様にフラスコおよびスライドチャンバーを満液化し、静置したもの1G対照群とした。

3. 1. 2. 各培養条件における細胞の生育について

本研究では、重力ベクトルの向きを変化させた環境が培養細胞に与える影響について、クリノスタットを用いて実験を行うことから、培養系は常にフラスコあるいはスライドガラスチャンバー内を培地で満液状態にして行った（図2）。従って、そのコントロール群も通常的气体交換環境とは違い、満液状態とした。図3は、各培養条件下で

の血管内皮細胞の生育の状況を示したものである。クリノスタットでの重力ベクトルを変化させた環境（以下クリノスタット培養という）下では、細胞の育成がコントロールに比べて80%程度に押さえられるものの、核のHoechst染色によるアポトーシスの確認やトリパンブルーを用いて死細胞を観察した結果、アポトーシスなどによる細胞死はほとんど認められなかった。従って、コントロール群との比較においてクリノスタット培養での細胞数が少ないのは、細胞死によるものではなく、増殖の速度か細胞周期に影響を与えていることが示唆された。

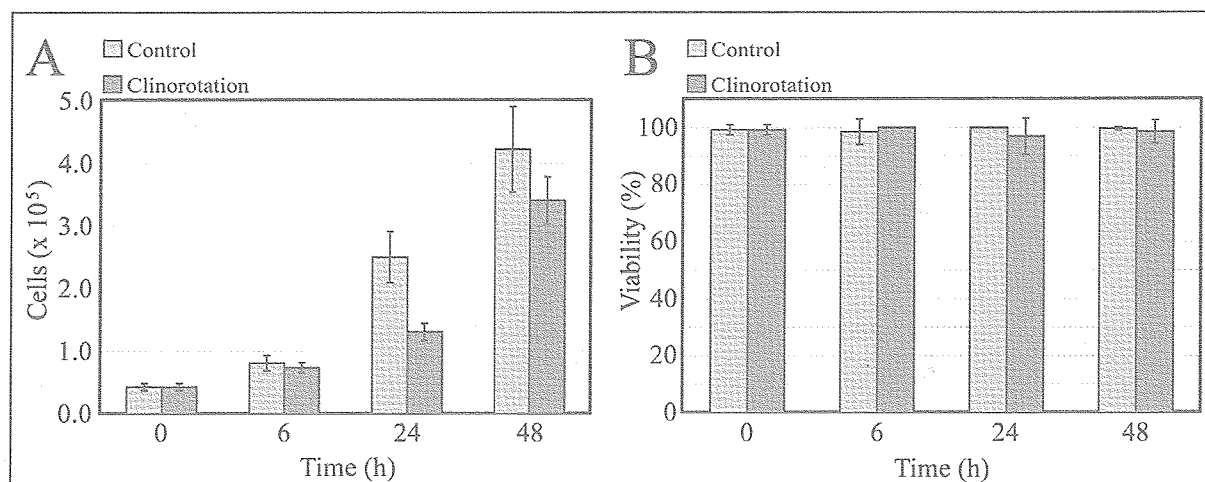


図3. 血管内皮細胞の増殖 (A) と、生存率 (B). 血管内皮細胞を静置およびクリノローテーションの環境下で6, 24, 48時間それぞれ培養し、剥離した細胞等を取り除いた後、PI染色し蛍光顕微鏡により細胞数を測定した。細胞の増殖はクリノローテーションにおいて80%程度抑制されていたが、細胞死はどちらにおいてもほとんど観察されなかった。

3. 1. 3. 静置培養とクリノスタット培養による細胞形態の観察比較

通常静置培養およびクリノスタット培養により重力方向を変化させたウシ脳毛細血管内皮細胞の形態観察を行った。

文献調査の結果を反映させて、細胞骨格関連タンパク質（アクチン、チューブリン、MAP (Microtubule Associate Protein)) およびGタンパク質 (Rho, Rac, Cdc42など) の各種抗体を用いて蛍光像を観察した。

(1) 微小管と関連タンパク質MAP

チューブリン α 抗体で各培養条件の細胞を免疫染色したところ、コントロールでは中心体をはっきりと確認されたが、クリノローテーションでは、70~80%の細胞で中心体の形成をはっきりと確認されなかった。また、クリノスタット培養

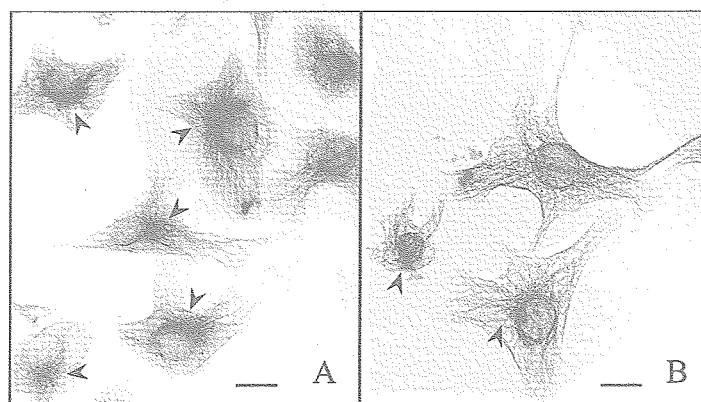


図4. 微小管 (チューブリン) の免疫染色による顕微鏡観察像 ((A) 静置培養, (B) クリノスタット培養). クリノスタット培養では、静置培養に比べ繊維の密度が薄く、中心体の形成も不全である。これは、STS-76で観察されたJurkat細胞におけるフライト実験結果と同様であった。図中の矢印は微小管の中心体を示す。

培養時間：24時間

標識：anti-tubulin α (Alexa 488)

倍率：400倍

スケールバー：50 μ m

では、微小管繊維の密度がコントロールに比べて薄かった。さらに、微小管繊維を束ねる役割を担うMAP2の抗体で染色した結果、コントロールでは核の周囲にクラスターが形成されていることが確認されたが、クリノローテーションでは確認されなかった。これらのことから、重力ベクトル変化がチューブリンの形成に影響を与えていることが分かった(図4,5)。

(2) アクチンストレスファイバーと低分子量Gタンパク質Rho

アクチンファイバーは細胞の構造維持や移動などにおいて重要な役割を果たしており、これらのアクチンファイバーの形成には低分子量Gタンパク質であるRhoファミリーが関与している(図6)。特にアクチンストレスファイバーは、細胞にストレスが負荷されることによって細胞内に顕著に形成されることが観察されている。そこで、クリノローテーションにより細胞にかかる重力ベクトルを変化させることにより、ストレスファイバーの形成の変化を観察した。

微小管の観察と同様に、細胞を静置およびクリノローテーションの環境下で培養し、ローダミン-ファロイジンでアクチンファイバーを染色したところ、静置培養ではストレスファイバーが形成されているが、クリノローテーションではストレスファイバー形成がコントロールに比べて少なく、異なる形態を示した。これは、アクチンの再構成に重力ベクトル変化が影響を与えていることを示している。一方、ストレスファイバー形成に関与すると考えられるRhoAの抗体で染色

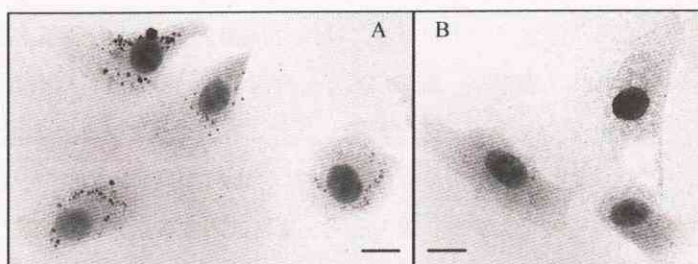


図5. MAP2の免疫染色による顕微鏡観察像 ((A) 静置培養, (B) クリノスタット培養). MAP2は微小管繊維を束ねる役割を担うと報告されており、静置培養においては核の周囲にクラスター状に集中して分布しているが、クリノスタット培養では確認されなかった。微小管繊維の十分な形成への影響が考えられる。

培養時間：24時間

標識：anti-MAP2 (Alexa 488)

倍率：400倍

スケールバー：50 μ m

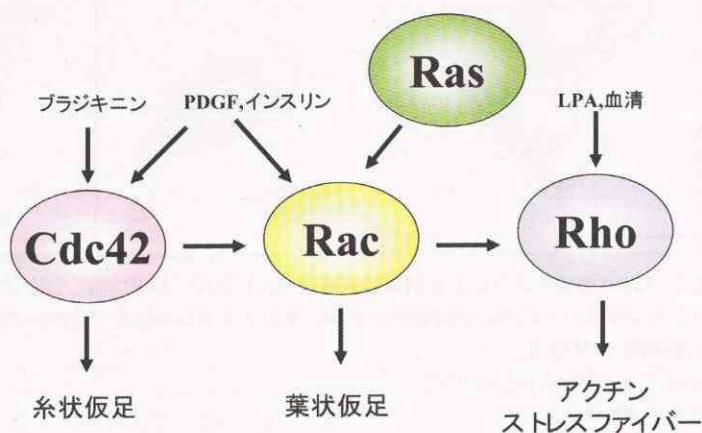


図6. 低分子量Gタンパク質Rhoファミリーとアクチンファイバー。Rhoファミリーは、細胞骨格においても特にアクチンのファイバー形成に関与していることが多数報告されている。Cdc42が活性化により糸状仮足、Racの活性化により葉状仮足、Rhoの活性化によりアクチンストレスファイバーの形成がそれぞれ促進される。

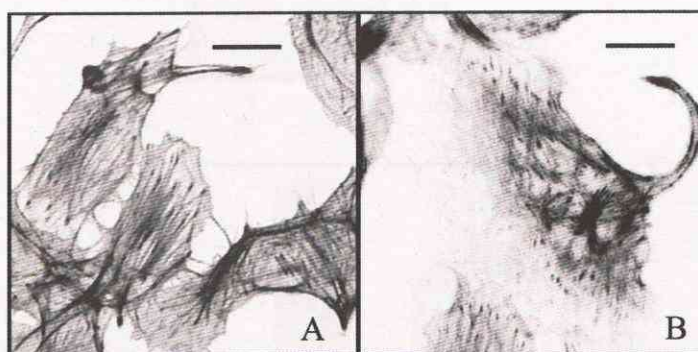


図7. アクチンストレスファイバーの蛍光顕微鏡観察像 ((A) 静置培養, (B) クリノスタット培養). 静置培養ではストレスファイバーの形成が確認できるが、クリノスタット培養ではその形成が不全になる。重力ベクトル変化が、アクチンストレスファイバーの再構成に影響を与えている。

培養時間：24時間

標識：rhodamine-phalloidon

倍率：400倍

スケールバー：50 μ m

したところ、コントロールでは核の周囲にRhoタンパク質が局在していたが、クリノスタット培養では細胞全体に幅広く存在し、量的にも多く発現しているように観察された (図7, 8)。Rhoの発現量については、ウェスタンブロッティングで確認したところ、クリノスタット培養で1.5倍程度増加していた (図9)。また、同じRhoファミリーであるCdc42およびRasにおいては変化が見られなかった。

これらのことから、重力感受・応答に関するシグナル伝達において低分子量Gタンパク質ファミリーとそれに続く細胞骨格形成が深く関与しており、特にクリノスタット培養では、ストレスファイバーの形成が不全になるにもかかわらず、その形成を活性化するRhoの発現量は上昇したので、Rhoの活性化に関する機構が重力ベクトル変化の影響を受けている可能性が示唆された。

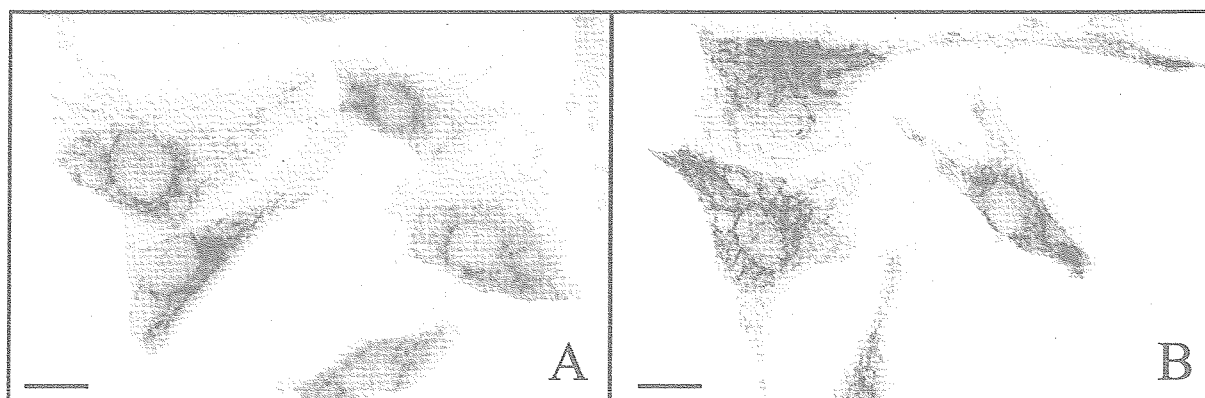


図8. RhoAの免疫染色による顕微鏡観察像 (上) ((A) 静置培養, (B) クリノスタット培養)。Rhoの活性化によりアクチンストレスファイバーの形成が促進されるが、クリノスタット培養ではRhoの発現自体は上昇しているように観察された。

培養時間：24時間

標識：anti-RhoA (Alexa 546)

倍率：400倍

スケールバー：50 μ m

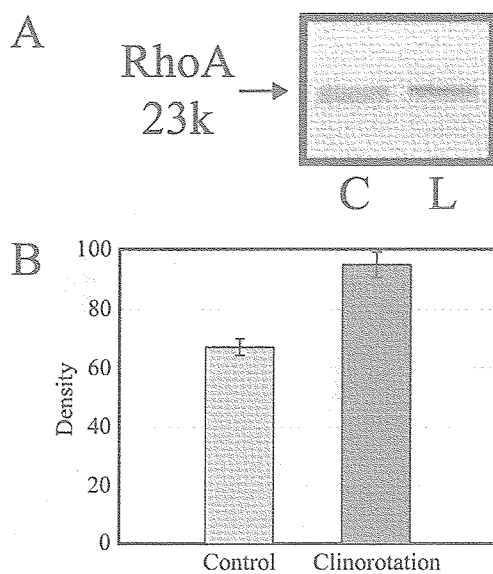


図9. RhoAの発現量変化 (ウェスタンブロッティング) (左)。Rhoの発現量は形態観察で得られた結果を支持するように、クリノスタット培養において、発現の上昇が確認された。

3. 2. 重力変化にตอบสนองするタンパク質の検討

重力ベクトル変化にตอบสนองするタンパク質を同定するため、通常静置培養およびクリノスタット培養におけるタンパク質の発現変化を確認した。各培養条件で培養した細胞を超音波により破碎し、細胞質成分について2次元電気泳動を行った。その結果、発現に差が生じているタンパク質が数十種類検出された(図10A)。特に酸性タンパク質においては、クリノスタット培養で発現量が増えているタンパク質が多く存在するなど、顕著な差が見られた(図10B)。しかし、これら発現に差が生じたタンパク質についての同定までには至っておらず、今後プロテインシーケンスやマスマスペクトロメトリーなどによって解析し、タンパク質の同定、機能および重力変化応答性について明らかにする必要がある。

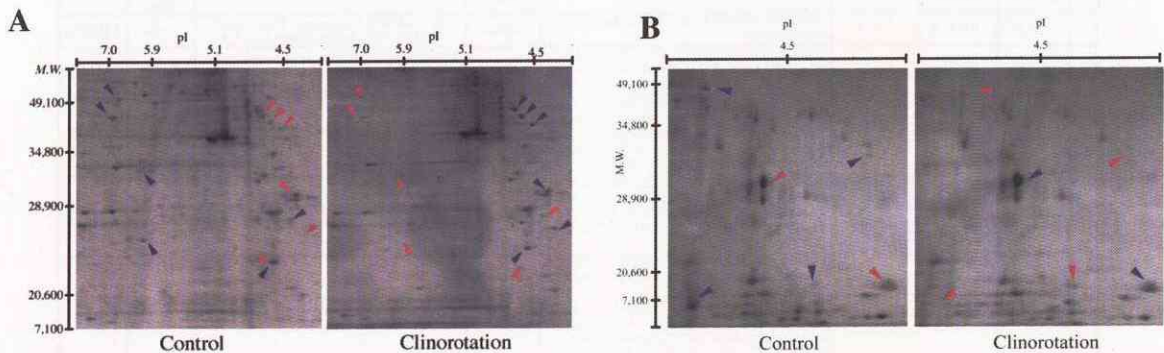


図10. 2次元電気泳動によるクリノスタット培養でのタンパク質発現への影響検討。タンパク質は細胞を超音波破碎処理して調整した。Aは広域pH領域(3.5-7.0)、Bは酸性領域(3.5-5.0)での泳動像を示している。青矢印のスポットは対照となる赤矢印のスポットよりも発現量が多いことを示す。

3. 3. 重力変化によって変化する遺伝子の解析

3. 3. 1. Differential Display による変動遺伝子の探索

重力ベクトル変化の環境が与える影響について、遺伝子レベルでの変化を確認するため、通常静置培養およびクリノスタット培養した血管内皮細胞のmRNAのレベルでの動態変化を比較分析した。クリノスタット、静置培養細胞をそれぞれ回収し、細胞数を計測後、ISOGEN(日本ジーン)を用いて全RNAを抽出した。mRNAフィンガープリンティングキット(和光)により全RNA中のmRNAのRT-PCRを行ってcDNAを調整した後、電気泳動法(Differential Display)によるパターンの比較解析を行った。プライマーには3'側に3種類のアンカープライマー、5'側に2種類のアービタリープライマーを用いた。この結果、明らかに培養条件の違いにより遺伝子発現に差が生じる断片(図11: 楕円枠で囲まれた

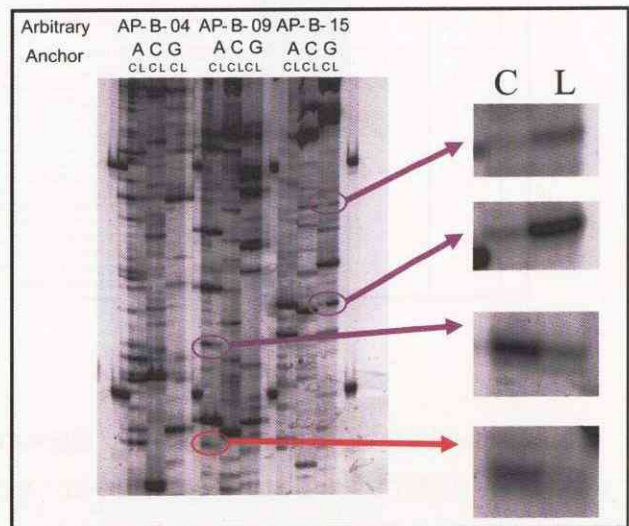


図11. cDNAの電気泳動像(Differential Display)。各培養条件で培養した血管内皮細胞から全RNAを抽出し、フィンガープリンティングキットでcDNAを調整した。調整したcDNAのうち、クリノスタット培養下で発現が上昇する遺伝子断片が35種類、発現が抑制される遺伝子断片が27種類確認された。赤い矢印はLARGの断片を示す。

部位) が少なくとも50~60の断片が確認された。また、差が生じた一部の断片については、その部分配列の決定し相同性検索を行った、その結果を表1に示す。

この結果、Rho GEF (Rho guanine nucleotide exchange factor) のひとつである LARG (leukemia associated RhoGEF) の発現量がクリノスタット培養において減少し、ALCAM (activated leukocyte cell adhesion molecule) の発現量がクリノスタット培養で増加するなど、細胞のリモデリングに重要な役割を果たす細胞骨格系および細胞接着系分子に関連した遺伝子に変化が生じていることが明らかとなった。

表1. クリノローテーションにより発現に差を生じた遺伝子断片の部分配列と相同性検索結果

Anchor Primer	Arbitrary Primer	Expression	Arrangement	Length (bp)	Definition	Whole length (bp)	Score	
1	GT15C	AP-B-4	C>CL	AGAGGTGATAGTGCACCTTTATTAACAAAACA AAACAATAC	39bp	Human DNA sequence from clone 201D17 on chromosome XP11.4	99342	100%
2	GT15A	AP-B-9	C>CL	AGATAGTTCACGATTCTCTTAAAAGTAAT TCTGTTAAAGAGTAGTACATGATTGTACGG TGAACAAGGAAAATAAAATGCTCTAGTA	88bp	Homo sapiens Rho guanine nucleotide exchange factor(GEF)12 (ARHGEF12), mRNA	9501	91%
3	GT15A	AP-B-4	C>CL	TCGATTAGTTTARAAGAACCAAGAATTTA TTTACAAAATTCCTTACTTGACTGGTGGT TGAACCAACAACCATCACTAAGACCCCA CCAATGGTCTTCAAGCCAGTTACACAAAT AGAACAACCACTGTAGTTTNGATAATTAG	150bp	Homo sapiens, hypothetical protein, clone MGC:874 IMAGE:3528586	1214	93%
4	GT15G	AP-B-9	C>CL	ACTTTATCTCCTTCATAATAACCTTGAAT CCCTCCTTCTCCTGTTTGAGAAAGGGGT CAAGAGAAGCAAGAGTAGCCTTGGTCTCT TAAGTCTCCAGAAAGCCCTCCCAACCCCA TCTTAT	126bp	Homo sapiens BAC clone RP11-82K13 from 2	165373	100%
5	GT15A	AP-B-15	C>CL	CAACTTGACTAAAGTGTCTTCAACTAAGCA CTCCTAGTTCAAATGTTCTTGGATAAAAT CAAACCTCAAAGTTTAAACAGCATACTTGA AGTGTCTCAGAGCATACTGGAAGAAAGTG CAGGCTACAGAATATTTTAACTATTTT ATATAACTAAATTAAGCAAGAAAGAAA GCCATGCTTTGTTGCTCTGGTTTCGAA TCGA	214bp	Homo sapiens genomic DNA, chromosome 21q, section 16/105	340000	89%
6	GT15G	AP-B-15	C>CL	TTTTCTCCATATTACCAAGGTCCTTGT ACATAGTTTGTAGCAGTCTTGTATTTCT CATGTATAGCCAATAGACGACACCAAGCA TAGGGCAGCAGGAGGAGACCAACAACAA TCCACAAATAGTTTTCCTGGTCAATTA CTTTCTTTGTTTTCATCACTTATCTCGT TGCTCATCGTGTCTGGAATACTATAGC AGAGACATCAAGGAGTTACTGTCTCTC CAG	243bp	Bos taurus mRNA for ALCAM/CD166, complete cds.	1752	99%
7	GT15G	AP-B-15	C>CL	CCCTTAACTTCAGCTAGACCAACAGTATG CTGTGCTTGAGAAATCAGAAAAGCAGCCACA CACAGTACAATTAAGGAATGGTGTGCTA ACCCTTCAAGGTAACATAACCAAGTAA CCGCCAGGACAGCCATCCGTCTCTGATC TCTGCTGGATCTACAGCCGATGACAGCCAC TTGTATACNTGACTGACCAATGTGACTA TGGAAATTAAGTGTACACTGCTCTTTA TGTGATTGGATTAGGGGGGTTTATAG TTATATTAATGTTGCAACTAATTCAGCAGT GTTCTTTCATAATTAAGTGCNAGTAA	327bp	Homo sapiens clone H41 unknown mRNA	3346	84%
8	GT15G	AP-B-10	C>CL	GTGGTGTGTTGAGCTTCTGGGATCTAGTT TCCGAGCCAGGATTTACTCTGCTNTGG CAGTGAAGTACTAATCTTAACCTCTGGA CCTCCAGGGCAAATCCCAAAATTTAAAG TGAGTTGTGATCCTACCATACAAAAATAAT CACAGTTAATATGAAGGTAACACCTTCT TCCTTCAAACAGCATCATATATATAT TGTTTGTCTGGAAGCAGTTGTTATATTT AGCAGCATACCATAAATCCTTGCATATG ATCTTAATGACTATGTTGGTTCATTTAC AGATGATATAAATTAACCAACCAATTGTC TATTATTCCAGATTNTGCTACTATAAACA AATAATTCCTATCCTTTATTTTTTAAT AGACTACTTTTTAAAGCCTCCACTGAATTT TACRAATTTCTCTGTTATATGTTTTTT TNTTTTTTGGCANGGAAGTGTGG	476bp	Homo sapiens chromosome 15 clone CTD-3247H4 map 15q21	193703	93%

3. 3. 2. Rho活性化因子 (RhoGEF) のアミノ酸配列の決定

RhoGEFは、非活性型であるGDP結合型RhoのGDPをGTPの交換する機能を持ち、それによってRhoはGTP結合型の活性化Rhoとなり、アクチンストレスファイバーの形成を促進する(図12)。LARGはRhoGEFの一つであり、Rhoタンパク質のうちRhoAを活性化するとされている。

上記に示したとおり、Differential DisplayによってLARGの遺伝子レベルでの発現が減少されることが示唆され

たので、この遺伝子断片がLARGの断片であることを確認するため、そのオープンリーディングフレームの塩基配列およびアミノ酸配列を決定した。総アミノ酸数は1527残基であり、ヒトLARGのアミノ酸数1546残基とほぼ同じであった(図13, 次頁)。また、すでに報告されている各種RhoGEFに見られるような特異的なドメイン構造について調べたところ、図14に示すとおりヒトLARGやその他のRhoGEFに含まれるドメイン構造と高い相同性を保ちながら構成されていた。このようにアミノ酸配列においてヒト

LARGとの相同性が90.9%であることや、RhoGEFに特異的なドメイン構造をとっていることから、クリノスタット培養で発現が抑制されていた遺伝子断片の一つはLARGであることが確認できた。また、塩基配列を元にDNAプローブを作成し、リアルタイムPCRで確認したところ、クリノローテーションによりLARGの発現が60%程度に抑制されていることも確認できた(図15)。

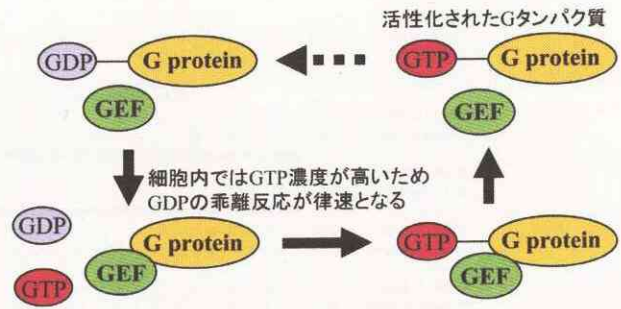


図12. Rho活性化因子によるRhoの活性化。RhoGEFは、非活性化型であるGDP結合型RhoのGDPをGTPの交換する機能を持ち、それによってRhoはGTP結合型の活性化Rhoとなり、アクチンストレスファイバーの形成を促進する。

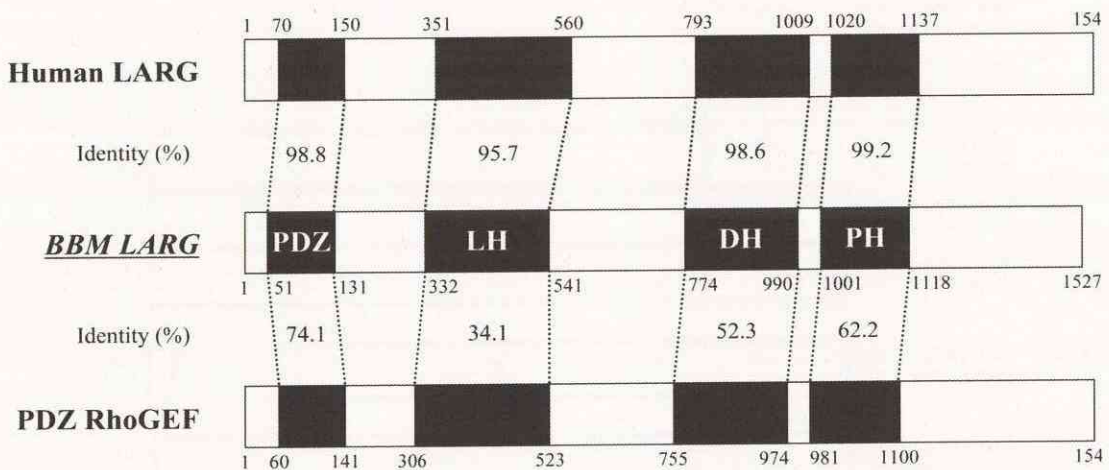


図14. ウシRho活性化因子(LARG)におけるヒトLARGおよびPDZ RhoGEFとの相同性。Rho活性化因子は特異的なドメイン構造を含んでおり、ウシLARGのドメイン構造について他のRhoGEFと比較した。ヒトLARGとの比較においては、PDZドメインで98.8%、LHドメインで95.7%、DHドメインで98.6%、PHドメインで99.2%の高い相同性を示した。

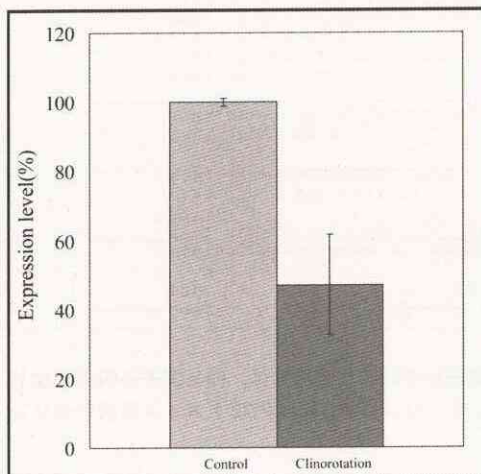


図15. 重力ベクトル変化によるLARGの発現の変化。決定した塩基配列を基にプライマーを設計し、リアルタイムPCRによって、各培養条件下におけるLARGの発現量を定量した。クリノスタット培養下では、LARGの発現量は約50%程度に抑制されており、Rhoの活性化が抑制されることが示唆された。このことにより、クリノスタット培養下では、LARGの発現が抑制されることによりRhoの活性化が抑制され、それに伴いアクチンストレスファイバーの形成が不全になることが考えられる。

BBM LARG	1	APMSGTQSTITDRFPLKKPIRHGSLNRESPTDKKQKVERSTSHDFDPTDSSSKKTKSSS	49
HumanLARG	1	APMSGTQSTITDRFPLKKPIRHGSLNRESPTDKKQKVERIASHDFDPTDSSSKKTKSSS	60
PDZ domain			
BBM LARG	50	EESRSEIYGLVQRQCVITQKDDNGFGLTVSGDNVVFVQSVKEDGAAMRAGVQTGDRILIKVN	101
HumanLARG	61	EESRSEIYGLVQRQCVITQKDDNGFGLTVSGDNVVFVQSVKEDGAAMRAGVQTGDRILIKVN	120
BBM LARG	102	GTLVTHSNHLEVVKLIKSGSYVALTVQGRPFSSQIPLADSEVEPSVTGHMSPIMTSPHS	161
HumanLARG	121	GTLVTHSNHLEVVKLIKSGSYVALTVQGRPFSSQIPLADSEVEPSVIGHMSPIMTSPHS	180
BBM LARG	162	FGASGNMERITSPVLMGEENNVDHNQKVEILRKMLQKEQERIQLLQEDYNRTPAQRLLKE	221
HumanLARG	181	FGASGNMERITSPVLMGEENNVDHNQKVEILRKMLQKEQERIQLLQEDYNRTPAQRLLKE	240
BBM LARG	222	IQEAKERIPQLQEQLSKATGSAQDGAVVTSKPLADGLAVGECEADFGDGLGRIDCGSGD	281
HumanLARG	241	IQEAKKHIPQLQEQLSKATGSAQDGAVVTFPSRFLGDTLTVSEAEEDFGDGLGRIDCGSGD	300
LH domain			
BBM LARG	282	ASRFGSDSADSPKSGLKERIYLEENPEKSEAIQDDTQSLVGSFSTRVASHIIGAEDDDI	341
HumanLARG	301	ASRFPSSDNADSPKSGPKERIYLEENPEKSETIQDDTQSLVGSFSTRVASHIIGAEDDDI	360
BBM LARG	342	GSEHEQINGQCSCFQSIELIKSRPAHLAVFLHHVVSQFDPATLLCYLYSDLYKQTNKSET	401
HumanLARG	361	GTEHEQINGQCSCFQSIELIKSRPAHLAVFLHHVVSQFDPATLLCYLYSDLYKHTNSKET	420
BBM LARG	402	RRVFEFHQFFLDRSAHLKVSQVPEETSVDLEKRRLELIPEDLHRHYIQTMQERVHFEVQR	461
HumanLARG	421	RRVFEFHQFFLDRSAHLKVSQVPEEMSADELEKRETEIPEDLHRHYIQTMQERVHFEVQR	480
BBM LARG	462	HLDFRQKRSMGLTLAESELTIKLDVERDKDRITLEKERACAEQIVAKIEEVLMTAQAVEE	521
HumanLARG	481	HLDFRQKRSMGLTLAESELTIKDAERDKDRITLEKERTCAEQIVAKIEEVLMTAQAVEE	540
BBM LARG	522	EKSSTMQYVILNMYMKHLEGVYKEPRNLEHKKRIGIFLPIKIKQSMKKDREGEEKGKRRGPT	581
HumanLARG	541	DKSSTMQYVILNMYMKHLEGVYKEPRNLEHKKRIGIFLPIKIKQSMKKDREGEEKGKRRGPT	600
BBM LARG	582	SILGPPRRPSRHDNSAIGRAMELQKQRHFKHLSTFSSVSPFPQDSAKLRQSGSASEGADT	641
HumanLARG	601	SILGPPRRPSRHDNSAIGRAMELQKARHFKHLSTFSSVSPFPQDSAKLRQSGLANEGTDA	660
BBM LARG	642	GYPANSTSSMVAGATLSQEGGKENDMGSKQAGETPASGDSLDGTFRTFNTIFDPPPPPL	701
HumanLARG	661	GYPANSMSSVASGASFSQEGGKENDTGSKQVGETSAPGDTLDGTFRTLNTVFDPPPPPPL	720
BBM LARG	702	DQVQEEWEVERVTEHGTPEKPKPKEDSIAFGESQSEDEQFENDLETPFNWQQLVSRVE	761
HumanLARG	721	DQVQEEVEVERVTEHGTPEKPKPKEDSIAFGESQSEDEQFENDLETPFNWQQLVSRVE	780
DH domain			
BBM LARG	762	LGKPKCEIKRQEVINEDFYTERAHVRTLKVLQVYQVRSPEGILSPSELKRIKFNLED	821
HumanLARG	781	LGKPKCEIKRQEVINEDFYTERAHVRTLKVLQVYQVRSREGILSPSELKRIKFNLED	840
BBM LARG	822	LQHLIQLNEQMKAIRKRNETSVIDQIGEDLLWFSGGEEKIKHAAATFCSNQPPALEMI	881
HumanLARG	841	LQHLIQLNEQMKAVRKRNETSVIIDQIGEDLLWFSGGEEKIKHAAATFCSNQPPALEMI	900
BBM LARG	882	KSRQKKDSRFQTFVQDAESNFKRRLQKLDLIPQMQRLTKYPLLEDNIKAKTEWPTERE	941
HumanLARG	901	KSRQKKDSRFQTFVQDAESNFKRRLQKLDLIPQMQRLTKYPLLEDNIKAKTEWPTERE	960
DH domain PH domain			
BBM LARG	942	KVKAADHCRQILNYVNAVKAEENKQRIEDYQRRLDTSNLKLGEPNVEELRNLDLTER	1001
HumanLARG	961	KVKAADHCRQILNYVNAVKAEENKQRIEDYQRRLDTSNLKLGEPNVEELRNLDLTER	1020
PH domain			
BBM LARG	1002	KMIHEGFLVWVNRDKTIDLYTLLEDEIVLLQKQDDREVIKCHSKILASTADSKHTFS	1061
HumanLARG	1021	KMIHEGFLVWVNRDKTIDLYTLLEDEIVLLQKQDDREVIKCHSKILASTADSKHTFS	1080
BBM LARG	1062	VIKLNTVLRQVATDNKALFVISMSDNGAQTVELVAQTVSEKTVWQDLICRMAASVYKQS	1121
HumanLARG	1081	VIKLNTVLRQVATDNKALFVISMSDNGAQTVELVAQTVSEKTVWQDLICRMAASVYKQS	1140
BBM LARG	1122	TKPIPLPQPPPCRGDNDDEEFPKRLKVEHHDISVTGLQSPDRDLGLESPIMSSKQSHSLG	1181
HumanLARG	1141	TKPIPLPQSTPGEGDNDDEEFPKRLKEEQHGISVTGLQSPDRDLGLESPISSKQSHSLG	1200
BBM LARG	1182	TSGKSEVDDLFAERQFAKEQHADGTLKEVGVNYQVTIFDPHLPSEERWALDALRNIGL	1241
HumanLARG	1201	TSGKSEVRDLFAERQFAKEQHTDGTLEKVGEDYQIAIFDSHLPVSEERWALDALRNIGL	1260
BBM LARG	1242	LKQLLVHQGLTEKSTQEDWEHPPRCRTASLGVDSDSGTQNPENIKACHPVEAQMPFRFG	1301
HumanLARG	1261	LKQLLVQQGLTEKSVQEDWQHFFRYRTASQGPQTDSDVIQNSENIKAYHSGEGHMPFRFG	1320
BBM LARG	1302	TGDIATCYSPRTSTESSAFRDSVVLAFQESQASDILIMDHMIMTFEMPPQEPGGLDESG	1361
HumanLARG	1321	TGDIATCYSPRTSTESFAPRDSVGLAFQDSQASNILVMDHMIMTFEMPTMEPEGGLDDSG	1380
BBM LARG	1362	EHFFDAREAHSDDNFSEGDGAVKKEEKDNLRTSGTYLILDGYDFVQESSTDDEVASFFP	1421
HumanLARG	1381	EHFFDAREAHSDENPSEGDGAVNKEEKDNLRTSGTYLILDGYDFVQESSTDDEVASSLT	1440
BBM LARG	1422	LQFGAGIPSLDSGHQQQPSFQNAHSDGAVSFFNPELLVQQRWGAMEDSCFEIQSFACAD	1481
HumanLARG	1441	LQPMTGIPAVESTHQQQHSFQNTHSDGATISPTPEPLVQQRWGAMESVSCFEIQSFSSCAD	1500
BBM LARG	1482	SQSQIMEYIRKIEADLEHLKKEVESYTIICQRLAGSALTDKHSKDS	1527
HumanLARG	1501	SQSQIMEYIHKIEADLEHLKKEVESYTIICQRLAGSALTDKHSKDS	1546

図13. ウシ脳毛細血管内皮細胞のRho活性化因子 (LARG) のアミノ酸配列。太線で囲まれた部分は、RhoGEFに特異的なドメイン部分を示す。すでに報告されているヒトLARGとの相同性は90.9%であった。ウシLARGにはPDZドメインの前のセリン残基を多く含む領域の欠損が確認された。

4. まとめ

過去のフライト実験 (STS-76) では、微小重力環境に曝露されたJurkat細胞において、微小管繊維およびその中心体形成が明らかに抑制されることが観察されている。また、その他の宇宙実験においてもアクチンストレスファイバーの形成などにも影響を与えると報告されている。細胞骨格系は、機械的刺激の感受受容機構という観点からも、細胞に負荷された機械的な刺激を細胞内シグナル伝達といういわば化学的な反応に変換する過程において重要な役割を果たしていることが指摘されている。本研究においては、地上における重力ベクトル変化の環境をクリノスタットを用いて創出し、細胞レベルでの重力に対する感受応答機能について、生化学的、分子生物学的手法を利用してタンパク質および遺伝子レベルから解析を行った。特に、細胞骨格形成に与える諸影響と関連する低分子量Gタンパク質に着目して研究を進めた。

重力ベクトルが変化する環境 (クリノローテーション) では、血管内皮細胞の生存率に影響は見られなかったが、増殖の程度は抑えられていた。つまり、アポトーシスなどのような細胞死を引き起こすことはないが、細胞周期など増殖に関連する機構に影響を与えることが示唆された。

細胞の形態観察においては、クリノスタット培養下において微小管および微小管中心体の形成が不全になった。このことは、先にも述べた宇宙実験で得られている結果と一致する。さらに微小管繊維を束ねる機能を持つMAP2の局在に差が見られた。この結果、重力の変化によって微小管形成の機構に何らかの影響を受けていることは明らかであり、この点においては、地上でのクリノスタットを用いた実験手技は、微小重力環境を模擬していると考えられる。

また、アクチンの形成においても、クリノローテーションでは回転による流れの発生など外部要因 (shear stress) による強いストレスファイバーの形成が予想されたが、コントロールと比べて形成が抑制され、フォーメーションが明らかに異なっていた。

アクチンファイバー形成に関与する低分子Gタンパク質であるRhoは、コントロールでは核の周辺に局在していたが、クリノスタット培養では細胞膜のあたりまで幅広く存在し、量的にも多く発現しているように観察された。さらにRhoの発現量について定量的に解析するためウェスタンブロットティングを行ったが、その結果からクリノスタット培養下では量的にも発現が上昇していた。つまり、重力ベクトルが変化する環境下ではRhoの発現が上昇するにもかかわらず、アクチンストレスファイバーの形成は抑えられるという結果が得られた。Rhoの活性化に伴ってアクチンストレスファイバー形成が促進されることが数多く報告されていることから、Rhoの発現量が増加するクリノスタット培養下では、アクチンストレスファイバーの形成が促進されることが予測されるが、実際にはアクチンストレスファイバーの形成が抑制されていた。そこで、遺伝子レベルでの発現影響を調べたところ、Rho活性化因子の一種であるLARGの発現がクリノスタット培養下で抑制されることがDifferential Display、その後のアミノ酸配列決定やリアルタイムPCRから確認できた。

以上のことから、重力変化に応答する細胞内のイベントとして、細胞骨格形成がその一つとして挙げられることが本研究において確認できた。特に、アクチンストレスファイバーでは、Rhoを中心としたシグナル伝達系が重力変化に応答し、ファイバーの形成の変化を引き起こしていた。アクチンファイバーは細胞内において細胞を支持するための裏打ち構造をとっており、そのアンカー部には、インテグリンなどの細胞接着に関連する分子が存在する。これらの分子は細胞の接着という機能と合わせて、外部からの刺激を受容する機構に大きく関与していると考えら

れており、機械的刺激的受容器としての可能性も示唆されている。また、Rhoの活性化に関連したパスウェイが重要であることが明らかになったが、重力感受分子の実体として、Rho活性化因子の発現に関わる転写因子、あるいはシグナル伝達の上流に位置する三量体Gタンパク質について今後詳細に検討する必要があると考えられる。

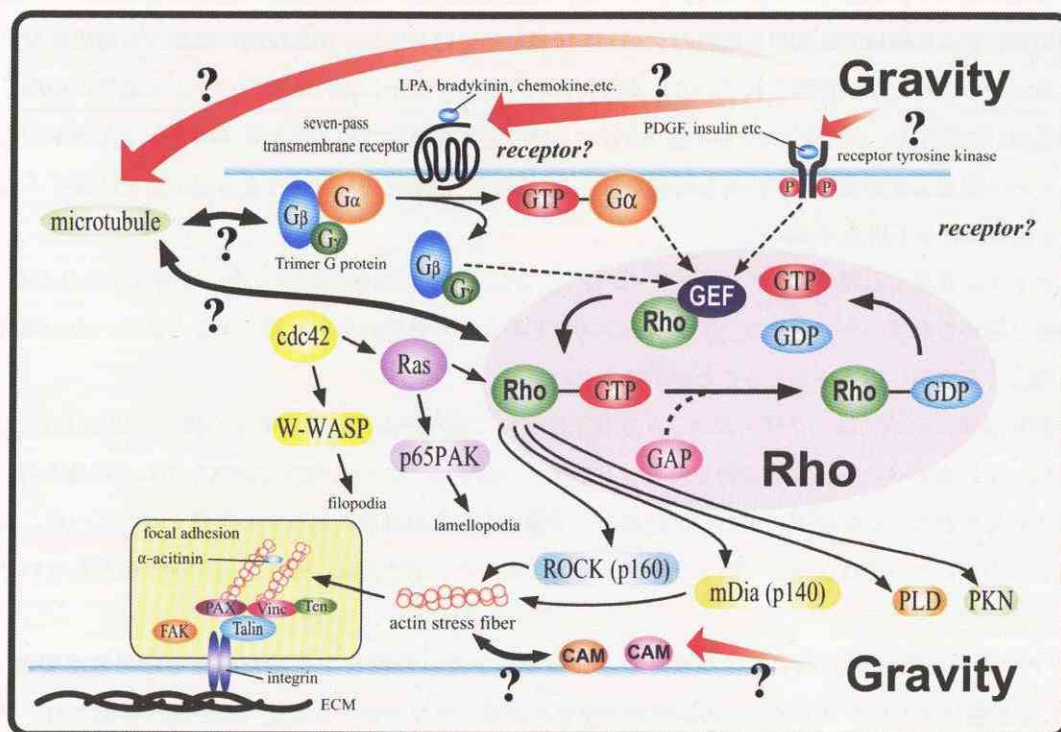


図16. Rhoを中心とした細胞内シグナル伝達経路。本研究において、Rhoの活性化の機構が重力にตอบสนองしていることが明らかになったが、今後、それらに関連する転写因子、あるいは情報伝達の上流に位置する三量体Gタンパク質の挙動について検討することが課題の一つとして上げられる。

第3章 植物の重力応答に機能する分子のプロテオミクス研究

1. 研究の目的, 意義等

1. 1. 目的

現在まで、植物の重力応答の分子機構をマイクロアレイ・DNAチップなどを用いて、遺伝子レベルで解析した例は、多く報告されている。しかし、タンパク質レベルで解析した例は、ほとんど報告されていない。例外として、オートムギにおいて重力刺激処理5分後に50KDaのタンパク質が脱リン酸化修飾を受けることが示されているが、このタンパク質の同定および重力応答における役割の解明までは行なわれていない。植物を用いた発現タンパク質の網羅的解析であるプロテオミクス（プロテオーム）研究は、ゲノムプロジェクトの終了したシロイヌナズナおよびイネまたはESTの整備された種にほぼ限られており発生ステージや組織ごとに焦点を当てた研究例が、少なからず報告されている状況である。

ヒト・マウスのバイオ細胞や酵母などでは、ストレスを与えたときに、遺伝子発現は変化しないものの、翻訳量・分解（ターンオーバー）速度の違いによって生じるタンパク質の発現量の相違、または、翻訳後のタンパク質修飾の相違によって、シグナル伝達系が制御される結果がプロテオーム解析により報告されている。

したがって、植物の重力応答も、一種のストレスからの回避のための応答として考えれば、植物の重力応答にも、遺伝子の発現レベルではなく、タンパク質の発現・翻訳レベルで制御されている分子機構が存在する可能性は十分に考えられるため、シロイヌナズナを材料として、これを検証し、植物の重力応答に機能する分子を網羅的に探索することを目的とした。

1. 2. シロイヌナズナについて

1990年以降、植物の分子生物学的・遺伝学的研究が進展すると、シロイヌナズナを用いた突然変異株の分離が急速に行なわれるとともに、遺伝子解読もさかんに行なわれた。このような中、ゲノムサイズが高等植物では最小の125Mbであるシロイヌナズナ（イネの約30%サイズ）は、2000年末に高等植物としてはじめて全ゲノム配列が解読された。ゲノムの解読結果からシロイヌナズナには25498個の遺伝子が存在すると考えられる。現在は、すべての遺伝子を1個ずつ破壊して、すべての遺伝子の生体における機能を明らかにしようとするプロジェクトが開始されている。

シロイヌナズナは他の植物に比較して、小型で栽培が容易である（その結果として、実験室内で多数の植物体を観察することができる）、世代交代も短い（種子発芽から開花・種子形成までの期間は1～2か月）、遺伝子導入が容易なため突然変異体を作成しやすい、重力屈性異常突然変異体が数多く分離されているなどのメリットを有しており、本研究の遂行にも植物材料としてシロイヌナズナを用いることにした。

1. 3. 意義

現在までに、植物の重力応答に機能する分子の網羅的な探索の多くは、DNAチップ、DNAマイクロアレイ、ディフュージョンディスプレイ法を中心とした遺伝子レベルの解析（ゲノミクス解析）に留まっている。その結果、多くの新規遺伝子が重力に反応するときに発現変化を起こしていることが見出されているが、その遺伝子の本質的

な機能は不明なものが多い。

ゲノムプロジェクトの終了した生物における次世代の解析方法として着目されている解析方法として、プロテオミクス（プロテオーム）解析が挙げられる。プロテオーム（proteome）とは、タンパク質（protein）の集団（ome）という意味で、特定の生物（細胞）が特定の条件下に置かれたときに、その生物内に発現（存在）する全タンパク質のことを指す。ゲノム（遺伝子の集団）は、単なる情報にすぎず、そのままでは何の働きも持たない。このゲノム情報に基づいて酵素、受容体、調節因子など様々なタンパク質が翻訳（合成）・修飾を受けて、初めて生命活動に必要な機能が発揮できるようになる。すなわち、このときに発現する全タンパク質の動態を統括的に捉えた解析方法が、プロテオミクス（プロテオーム）解析である。プロテオーム解析は、主に動物を供試した研究で進展しており、植物材料を供試したプロテオーム解析は、発生ステージや組織ごとの解析、細胞膜やオルガネラなど、細胞内コンパートメントに着目した解析が少なからず報告されている。

プロテオミクス解析とその応用によって、タンパク質の翻訳後修飾、タンパク質間相互作用、代謝速度、阻害作用、会合、酵素活性、生理活性など生体におけるタンパク質挙動変化の重要な情報が解明されうる。植物の重力応答制御の解明において、このようなタンパク質機能の解明は必須のものであり、植物の重力応答に機能する分子を解明していく上で、タンパク質の挙動変化に関する研究は、とくに重要であると考えられる。

本研究は、平成15年度より、宇宙開発事業団・宇宙環境利用研究システム（宇宙3機関統合により、宇宙航空研究開発機構・ISS科学プロジェクト室）・特別研究員による先導的ライフサイエンス研究として開始した。

2. 研究の状況

2. 1. シロイヌナズナの栽培

野生型シロイヌナズナ（Columbia）種子を0.5xMS寒天培地上に無菌播種し、4℃、暗黒下で2日間種子への吸水を行った後、23℃、光条件下で1週間、生育させた。シロイヌナズナの成長に対する重力ベクトルの影響を調べるために、静置条件またはクリノスタット条件下で芽生えを生育させた（図1）。また、重力屈性発現時における重力刺激の影響を調べるために、シロイヌナズナを生育した寒天培地を根が90度水平（横）になるように倒した。植物体の回収は、植物試料の受ける環境の変化によるタンパク質の発現、分解、修飾などを避けるために、液体窒素にて急速凍結し、回収した。

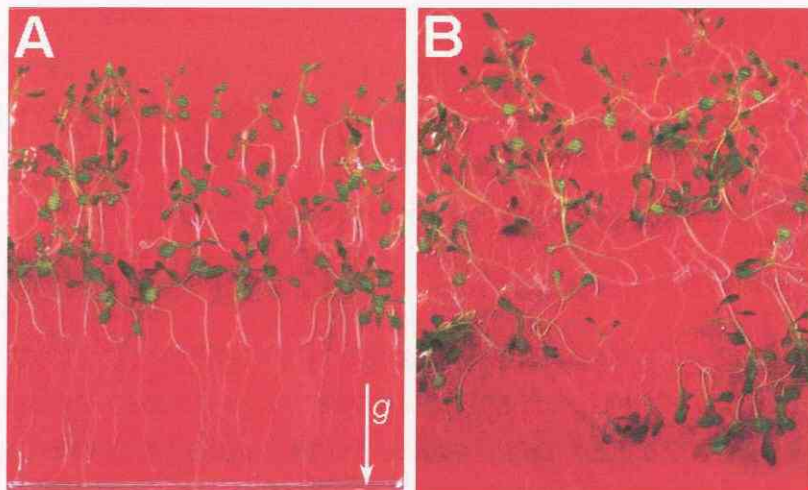


図1. 静置（A）および擬似微小重力下（クリノスタット、B）で生育させたシロイヌナズナ芽生え

2. 2. タンパク質の分離・精製

液体窒素にて回収した植物体より、全タンパク質を7 M Urea, 2 M Thiourea, 界面活性剤として1% (w/v) ASB-14を含む40 mM Tris緩衝液(pH8.0)を用いて抽出した。さらに、抽出液中に含まれる核酸・糖・脂質・塩を除去するために、Ready Prep 2-D clean up kit (Bio-rad)を用いてタンパク質の精製を行った。精製後、2D Quant kit (Amersham)を用いてタンパク質の定量を行なった。

2. 3. 2次元電気泳動

100 μ gのタンパク質を一次元目として、等電点幅3-10または5-8のIPG stripゲル (Bio-Rad)を用いて等電点電気泳動を行い、二次元目として、10-20%濃度勾配ゲル (第一化学薬品)を用いて電気泳動した。泳動終了後、ゲルをCBB染色に供しタンパク質を検出した。その後、エプソンスキャナーを用いてゲルの画像を取り込み、PDQuest software (Bio-rad)により、スポット解析を行った。

まず、シロイヌナズナ芽生えに含まれるタンパク質の分離度に対する等電点電気泳動の影響を解析するために、等電点幅3-10および5-8の等電点ストリップを用いて、分離能を比較した (図2)。その結果、シロイヌナズナ芽生えに含まれるタンパク質は、主に中性よりもやや酸性側に多く分布しており、3-10の等電点ストリップよりも5-8の等電点ストリップを用いた方が、より高い分離能を示した。したがって、以降の解析からは、主に、5-8の等電点ストリップを用いることにした。

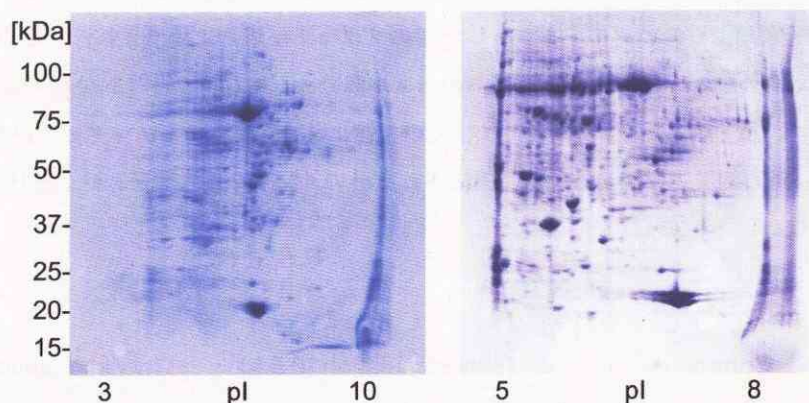


図2. シロイヌナズナ芽生えのタンパク質の分離能に対する等電点電気泳動の影響
左：等電点幅3-10, 右：等電点幅5-8

最初に、静置条件下および擬似微小重力 (クリノスタット) 条件下で生育させたシロイヌナズナ芽生えを供試した実験では、約300個のタンパク質スポットを検出し、うち発現量に関して、再現性を含めて差異がみとめられたタンパク質スポットに関しては14個であった。うち、クリノスタット条件下に比較して静置条件下で発現量の多いタンパク質スポットは5個 (37kDa/pI5.7, 41kDa/pI6.3, 49kDa/pI6.7, 65kDa/pI7.1, 68kDa/pI6.7), 逆に、クリノスタット条件下でより多く発現がみられたタンパク質スポットは9個 (27kDa/pI5.2, 45kDa/pI6.0, 47kDa/pI6.2, 55kDa/pI7.6, 74kDa/pI7.5, 94kDa/pI8.0, 97kDa/pI7.8, 100kDa/pI7.9, 120kDa/pI7.2) であった (図3)。

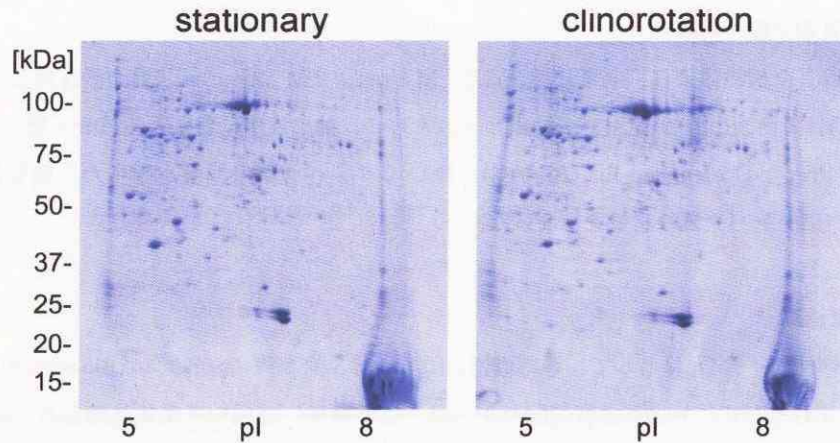


図3. 静置および擬似微小重力下で生育させたシロイヌナズナ芽生えの2次元電気泳動像

一方、シロイヌナズナ根に重力刺激を与えたときに発現するタンパク質の経時的な比較解析実験では、約800個のタンパク質スポットを検出し、とくに、重力刺激を与えた直後（30分）では、無処理区に比較して多くのタンパク質が発現していることが分かった（図4）。スポット解析の結果、重力刺激処理により発現量の増加するスポットは12個、逆に減少するスポットは4個であった。さらに、詳細なスポット解析を行なうと、分子量の異なるタンパク質が一過性的に発現していることも分かった（図5）。図5上段Aのパネル群では、重力刺激処理前（0 h）と重力刺激処理3時間後では、a1のタンパク質スポットが検出されるが、重力刺激処理30分後では、a1のスポットは消失する反面、分子量のより低いシフトダウンしたa2のスポットが新たに検出された。このスポットは、重力刺激処理3時間後にはほぼ消失していた。図5中段Bのパネル群では、重力刺激処理30分後では、検出されるb1のタンパク質スポットが、重力刺激処理3時間後では、b2の位置に分子量がシフトアップしていた。さらに、図5下段Cのパネル群では、重力刺激処理30分後では、検出されるc1のタンパク質スポットが、重力刺激処理3時間後では、c2の位置に分子量がシフトアップしていた。

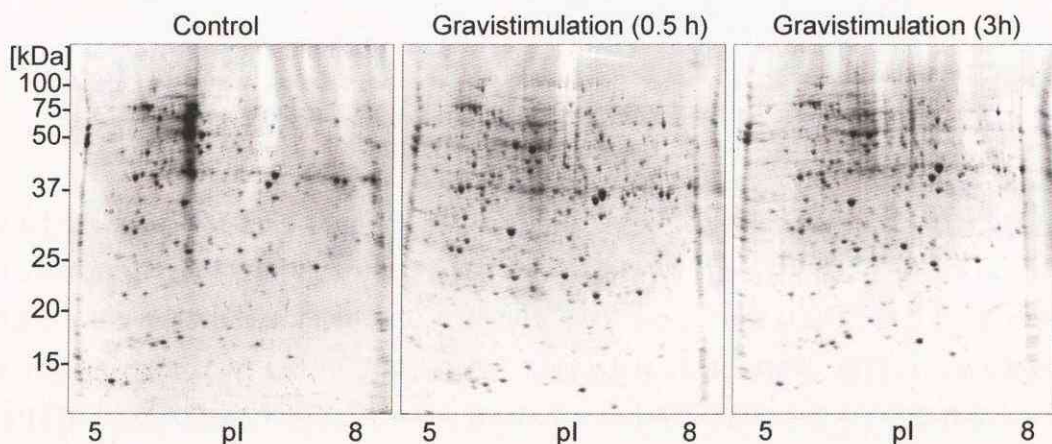


図4. シロイヌナズナ根に重力刺激を与えたときのタンパク質発現の経時的変化

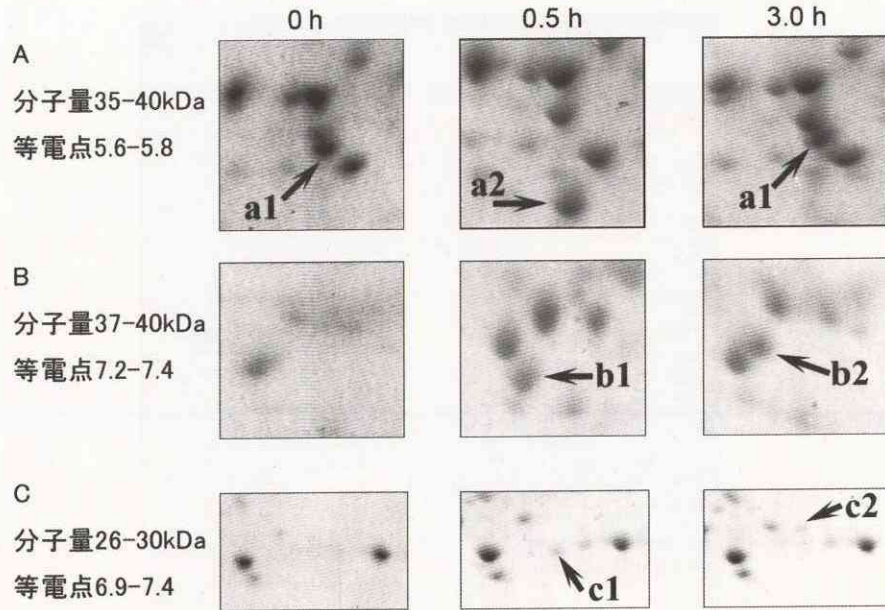
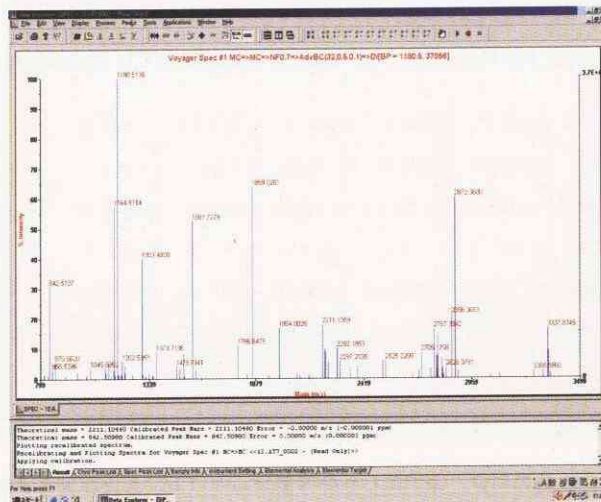


図5. 重力刺激処理によるシロイヌナズナ根のタンパク質発現の分子量変化

2. 4. TOF-MS/PMF解析

スポット解析により、差異の認められたタンパク質を同定するために、タンパク質スポットを含むゲル片を切り出した。まず、30%アセトニトリル/25 mM 重炭酸アンモニウムに続いて、50%アセトニトリル/25 mM 重炭酸アンモニウムで処理し、ゲル片を脱色した。ゲル内のタンパク質を修飾トリプシン (Promega) によりペプチド断片へと消化し、C18樹脂を充填したZip Tipピペットチップ (Millipore) を用いてサンプルを調製した。

次に、Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight (MALDI-TOF) 型分子質量計, Voyager-DE - STR (Applied Biosystem) を用いて、試料を測定・解析し、得られたデータをトリプシン自己消化ピークを用いてキャリブレーションした後、Protein Prospectorホームページ (<http://prospector.ucsf.edu/>) のMS-Fitプログラムによりシロイヌナズナデータベースとの検索を行い、peptide mass fingerprinting (PMF)解析を行った (図6, 7, 8)。



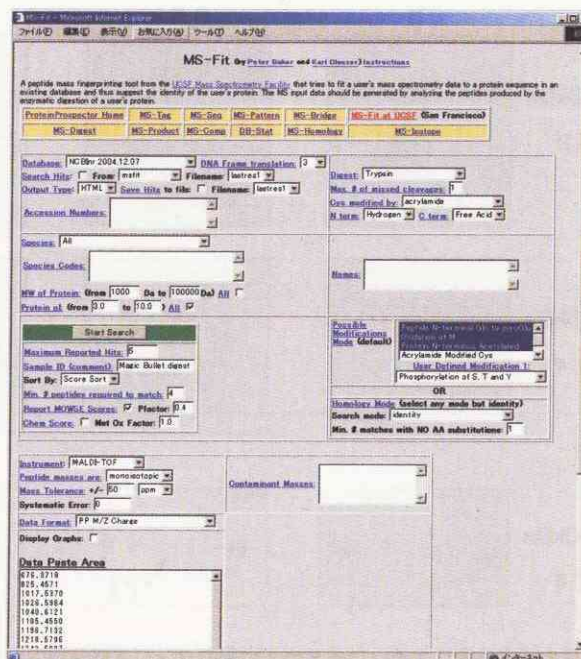


図7. PMF解析用プログラムMS-Fitホームページ

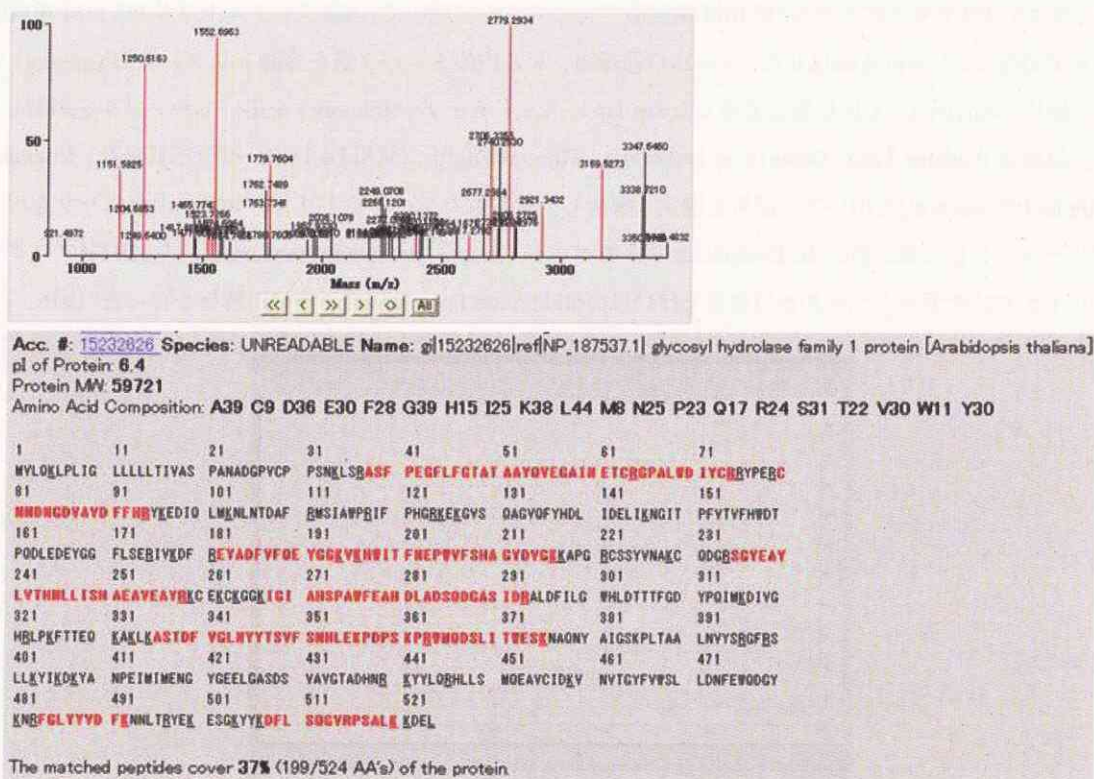


図8. PMF解析によるタンパク質の同定。赤で示した分子量ピーク（上）およびアミノ酸配列（下）が、データベース内タンパク質と一致している。

静置条件下および擬似微小重力（クリノスタット）条件下で生育させたシロイヌナズナ芽生えを供試した実験で得られた差異のある14個のタンパク質スポットのTOFMS/PMF解析の結果、すべてのタンパク質の同定に成功した（表1）。うち興味深いクローンとして、擬似微小重力条件下において細胞骨格に関連すると推測されるputative cytoskeletal protein、糖の代謝に関連するglycosyl hydrolase family1の発現が多いことが示唆された。一方、静置条件下で高発現のみられた5個のスポットのうち、4個は光合成に機能するRubisco関連タンパク質のスポットであった。さらに、植物にのみ特異的に見出されている機能未知の転写因子、CHP-rich zinc finger proteinは、静置および擬似微小重力下で、異なる分子種がより多く発現していることが示唆された。タンパク質のゲル上での分子量および等電点が、理論値よりもずれている分子は、翻訳後修飾の影響であると考えられる。また、Rubisco関連タンパク質が多く見出されたのは、芽生え全体を供試したためであると考えられる。事実、Rubiscoタンパク質は、植物の地上部に発現する全タンパク質の40%を占めることが報告されている。

表1. 静置および擬似微小重力条件下で発現差異のみられたタンパク質の同定

Exp. MW	Exp. pI	Relative intensity*	Arabidopsis Protein Name	Theo. MW	Theo. pI
<i>More abundance expression in stationary grown seedlings</i>					
37000	5.7	0.82	Rubisco large subunit	52956	5.9
41000	6.3	0.90	Rubisco large subunit	52956	5.9
49000	6.7	0.82	Rubisco large subunit	47494	6.1
65000	7.1	0.71	Rubisco large subunit	47494	6.1
68000	6.7	0.83	CHP-rich zinc finger protein	76918	6.5
<i>More abundance expression in clinorotated grown seedlings</i>					
27000	5.2	1.16	hydroxymethyl transferase	66294	8.0
45000	6.0	1.28	chloroplast chaperonin 21 protein	26802	8.9
47000	6.2	1.24	putative cytoskeletal protein	87598	6.2
55000	7.6	1.19	glycosyl hydrolase family 1	59721	6.4
74000	7.5	1.54	CHP-rich zinc finger protein	74070	6.3
94000	8.0	1.40	pentatricopeptide (PPR) repeat containing protein	142335	8.6
97000	7.8	1.24	disease resistance protein (CC-NBS-LRR class)	98474	5.6
100000	7.9	1.25	glycine hydroxymethyl transferase	57401	8.1
120000	7.2	1.50	glycosyl hydrolase family 1	59721	6.4

*無処理区発現量を1.00としたときの擬似微小重力区発現量の相対強度

一方、シロイヌナズナ根に重力刺激を与えたときに発現するタンパク質の経時的な比較解析実験において、TOFMS/PMF解析の結果、すべてのタンパク質の同定に成功した（表2）。興味深いクローンとして、重力刺激処理により発現量の増加したタンパク質として、細胞骨格のACT7、TUA6が見出された。また、オーキシン結合関連のタンパク質も見出され、植物の重力応答におけるオーキシンの不均等分布および細胞伸長の制御のための細胞骨格系の関与がプロテオミクス解析により検証された。さらに、解糖系・クエン酸回路などのエネルギー生産に機能する酵素も重力刺激処理により発現量差異がみとめられた。

さらに、重力刺激後の経過に伴って一過性的に発現のみられた分子量の異なるタンパク質のPMF解析によって、図5上段Aのパネル群でみられたa1、a2のスポットは、ともに、生体内のエネルギー（ATP）を合成する代謝経路、クエン酸回路に機能するpyruvate dehydrogenase E1 component beta subunitであることが分かった。中段Bのパネル群でみられたb1、b2のスポットは、ともに、解糖系に機能するfructose-bisphosphate aldolaseであった。c1、c2のスポットは、ともに、ユビキチン化されたタンパク質の分解系に関与する20S proteasome beta subunit E1

(PBE1)であった。これらを考察すると、重力刺激を与えて短時間のうちに3種のタンパク質の分子量が減少するのは、重力刺激感受に伴い重力応答時に、これらのタンパク質が活性化または不活性化により、エネルギー合成を担う解糖系、タンパク質分解を担うプロテアソーム系に、ダイナミックな動きがある可能性が示唆される。今後は、これらのタンパク質の動態変化と、植物の重力応答機構の相関を解析する必要がある。

表1. 静置および擬似微小重力条件下で発現差異のみられたタンパク質の同定

Increased by gravistimulation***12clones	Function
actin 7 (ACT7)	cytoskeleton
tubulin alpha-6 chain (TUA6)	cytoskeleton
Glutathione S-transferase PM24 (24 kDa auxin-binding protein) (GST class-phi)	energy/auxin
alcohol dehydrogenase class III	energy
aspartate aminotransferase, cytoplasmic isozyme I	energy
ATP synthase beta chain 1, mitochondrial	energy
glycine hydroxymethyltransferase	energy
isocitrate dehydrogenase	energy
quercetin 3-O-methyltransferase 1	energy
vitamin-B12-independent methionine synthase	energy
heat shock cognate 70 kDa protein 2 (HSP70-2)	storage
Ca ²⁺ -dependent membrane-binding protein annexin	messenger?
Decreased by gravistimulation***4clones	
fructose-bisphosphate aldolase	energy
Lipase/Acylhydrolase with GDSL-motif family	energy
malate dehydrogenase	energy
elongation factor 1-alpha	transcription

3. まとめ

3. 1. 考察

まず、前述の実験により同定されたタンパク質の役割・機能を、過去に報告されている知見と関連させながら、とくに、重力刺激処理によって、ダイナミックな発現変化のみられた細胞骨格関連、オーキシン関連、エネルギー(ATP)合成関連、プロテアソーム、アネキシンの4つの意義を考察したい。

(1) 細胞骨格関連

植物細胞内におけるアクチンは、核や小胞体などの細胞内コンパートメントにつながっている。重力受容は、平衡細胞中に含まれるアミロプラストの重力方向の沈降により起こるが、このときに生じるアクチンフィラメントの張力変化(引っ張りなど)やアミロプラストの移動に伴うアクチンフィラメントの一時的切断などが重力の受容に本質的な意義を有するという仮説もある。さらに、近年では、アクチンフィラメント上に乗っているモータータンパク質がオーキシンキャリアを細胞膜に輸送するという知見も得られている。

植物が重力に応答し、成長する向き(方向)が変わるためには、細胞の伸長方向を変化させる必要がある。そのため、植物の細胞繊維の大部分を占めるセルロースフィラメントの沈着方向を変化させる必要がある。微小管の中でも、とくに細胞表面に存在する表層微小管の沈着方向に合わせて、新たに合成されたセルロース

フィラメントが沈着していく結果として、表層微小管は細胞の伸長方向制御に深く関与することが知られている。このことは、微小管の破壊剤であるオリザリンやコルヒチンなどの薬剤処理によって、細胞の伸長パターンが阻害される結果からも支持されている。

(2) オーキシン関連

植物が重力に応答し屈曲するとき、その屈曲の内側と外側で、不均等に分布する植物ホルモンとしてオーキシンが挙げられる。オーキシンによって、早期に発現が誘導される遺伝子ファミリーとして、*Aux/IAA*, *SAUR* (*small auxin up-regulated RNA*), *GH3*, *ACS* (*1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase*), *GST* (*Glutathione S-transferase*) などがある。今回の解析で得られたクローンは、GSTタンパク質ファミリーの1つであるphiクラスに分類される分子であり、このクラスのGSTは植物に特有である。GSTは、各種のストレスによって誘導されるマルチファンクショナルな分子であるため、今回同定されたタンパク質が、重力刺激処理によるオーキシン不均等分布の結果として、発現が誘導され、重力応答シグナルパスウェイの下流に、何らかのシグナルを伝達している可能性が示唆される。

(3) エネルギー (ATP) 合成関連

今回のプロテオミクス解析により、クエン酸回路、解糖系などATP合成系に機能する酵素タンパク質が多く見出された。ATPがどのように植物の重力応答に関与しているのかについて、現時点で絶対的な確証はない。しかし、ATPとオーキシン輸送に関する知見が報告されているのでそれを述べたい。植物の成長と発生のさまざまな過程には、茎頂分裂組織や若い葉など、植物の先端で合成される植物ホルモンオーキシンの下方への流出が関与している。茎におけるオーキシンの輸送方向は、オーキシン排出を制御するPIN1膜タンパク質が細胞膜の基底端に局在することで決まると考えられている。動物の多剤耐性腫瘍細胞中に特に多く存在するP糖タンパク質ABC (ATP binding cassette) 輸送体をコードする遺伝子に相同なシロイヌナズナの2種類の遺伝子に変異が生じると、シロイヌナズナの芽生えの胚軸におけるオーキシンの極性輸送が阻害されることが最近報告されている。この*mdr* (*multi-drug resistance*) 突然変異体では、一般的にオーキシンの方向(秩序)性を持った輸送が異常な変異体で予想される屈曲異常ではなく、正常な野生型と比較して、重力屈性および光屈性の促進がみられる。PIN1タンパク質は、本来なら細胞膜の基底端に沿って局在し、これが求基的なオーキシン輸送と結び付くが、*mdr*の表現型は、PIN1タンパク質の正常な局在が阻害された結果であることが示唆されている。その結果として、オーキシンの側方透過性は野生型に比較して相対的に大きくなり、屈性応答につながる成長の差が促進されると考えられている。

(4) プロテアソーム

ユビキチン化されたタンパク質の分解系に関与する20S proteasome beta subunit E1 (PBE1)が、今回のプロテオミクス解析により見出された。現在まで、植物の重力応答におけるユビキチン化あるいはタンパク質分解に関する知見は乏しい。しかし、オーキシンに対する反応が異常なシロイヌナズナの突然変異体として、*axr1* (*auxin resistant 1*) および *tir1* (*transport inhibitor response 1*) が知られている。AXR1は、ヒトや酵母のユビキチン活性化酵素 (E1) と高い相同性を示すタンパク質であり、TIR1は、ユビキチン化機能に関与するユビキチンプロテインライゲース複合体 (E3) と高い相同性を示すタンパク質である。そして、*axr1* と *tir1* の解析から、

ユビキチン化を介したタンパク質の分解系がオーキシシンシグナル伝達で重要な役割を果たすことが示唆されている。とくに、最近では、オーキシシンの増加による Aux/IAA タンパク質のユビキチン分解化の促進が、オーキシシンシグナル伝達に重要であると考えられている。したがって、PBE1 もまた、オーキシシンシグナル伝達系で重量な役割を果たす可能性が示唆される。

(5) アネキシン

アネキシンはカルシウムおよびリン脂質に結合するタンパク質ファミリーで、現在までに菌類を除くすべての真核細胞の植物および動物から 20 種類以上が見出されている。アネキシンは分子量 30~40kDa のタンパク質で、構造上大きな特徴がある。アミノ末端側ドメインはそれぞれのアネキシンに固有の配列 (11~196 残基) で、一方それに続くカルボキシ末端側のドメインはアネキシン間でよく保存されている約 70 アミノ酸残基からなる α ヘリックスが 4 回繰り返した構造である。カルシウム結合部位やリン脂質結合部位はカルボキシ末端側のドメイン上にある。ほとんどすべての種類の細胞がアネキシンファミリーのタンパク質を少なくとも 1 つは発現しており、同時に複数のアネキシンを発現している細胞も多く、発現量も比較的多い。アネキシンはリン脂質の中でもホスファチジルセリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルイノシトールに結合する。これらのリン脂質は細胞膜の内側に多く分布しており、正常な細胞表面にはほとんどない。一方、ホスファチジルコリン、スフィンゴミエリンは細胞表面に多いが、これらとはアネキシンは結合しない。このことは細胞内アネキシンについて提唱されている主にリン脂質と結合することで発揮される役割、ホスホリパーゼ A2 の活性を基質となるリン脂質を捕捉することにより抑制したり、小胞輸送、エンドサイトーシス、エキソサイトーシスなどに関与して機能することとよく合っている。アネキシンが細胞内でその局在部位を変えることはよく観察されており (細胞質から細胞膜)、これは小胞輸送などのダイナミックな動きに対応していることを想像させる。また、近年、植物の重力応答における早期段階で、ホスホリパーゼ A2 (SGR2) およびエンドサイトーシス (GRV2/SGR8) に関する知見も得られている。

3. 2. 今後の研究課題・計画

本研究によって同定したタンパク質と、重力応答機構の相関関係を明らかにする研究をまず行う。そのための研究手段として、(1) 重力屈性突然変異体から抽出したタンパク質を 2 次元電気泳動に供し、同定したタンパク質スポットの発現変化 (量的変化および分子量・等電点変化) を解析する。また、(2) 重力応答に重要な役割を担っている植物ホルモンのオーキシシンの輸送阻害剤および作用阻害剤、細胞骨格のアクチン・微小管の破壊剤などの阻害物質を同様の実験系に処理したときのこれらのタンパク質の動態変化を解析する。さらに、(3) 他研究機関からの同定したタンパク質をコードする遺伝子の突然変異種に分譲入手により、これらの突然変異種と重力応答における形態観察を行なうとともに、その時の他のタンパク質の動態変化も合わせて解析する。

一方で、今回、重力刺激処理により分子量が一過性的に変化するタンパク質を 3 種見出したが、この分子量変化が、重力刺激処理後に行なわれた翻訳によるものなのか、あるいは、処理前から存在するタンパク質のプロセッシングなどを受けたものなのかを、タンパク質翻訳を阻害するシクロヘキサミドあるいはプロテアソーム阻害剤を使用した実験系によって解析する予定である。

さらに、同定したタンパク質分子と相互作用する他分子も存在すると考えられるため、ツーハイブリッド法など

により、これらのタンパク質も明らかにしたい。

以上の解析を踏まえ、植物の重力応答に関与する一連の分子機構カスケードをプロテオミクスの観点から解明していく予定である。

結 論

JAXA移行後のISS科学プロジェクト室における地上プロジェクト地上研究として、新たに上記課題を設定し、テーマごとに以下の研究チームを組織して研究を実施してきた。

1. 研究チーム

- (1) 「骨芽細胞を用いた力学刺激の細胞内生体信号への変換過程研究」チーム
- (2) 「培養細胞の重力ベクトル変化環境下における細胞骨格系への影響研究」チーム
- (3) 「植物の重力応答に機能する分子のプロテオミクス研究」チーム

2. 各研究チームの研究成果概要

2. 1. 「骨芽細胞を用いた力学刺激の細胞内生体信号への変換過程研究」チーム

破骨細胞の分化制御に関しては、微小重力環境では骨髄基質細胞並びに骨芽細胞からのRANKL産生が高まりOPG産生が抑制される。RANKLは成熟破骨細胞の骨吸収活性を増強することから、成熟破骨細胞の骨吸収活性が高まっていることを示した。また、クリノスタット培養によるRANKL、OPGの遺伝子発現変化は、cAMP経路を介していることを明らかにした。RANKL遺伝子発現変化に関しては、RANKL遺伝子転写制御領域を組み込んだベクターを用いたレポーター法でも同様な結果が得られた。骨芽細胞様MC3T3-E1株は、液流や温度低下の刺激で*c-fos*を一過性に発現することを見出した。一過性*c-fos*応答にはERK経路が関与する。この細胞が外環境変化を認識する機構を明らかにするために、細胞膜表面上のタンパク質に着目した。骨芽細胞分化進行には持続的なERK活性化が存在することを見出し、インテグリン-コラーゲン結合がERK活性化状態を調節していることを示唆した。

2. 2. 「培養細胞の重力ベクトル変化環境下における細胞骨格系への影響研究」チーム

クリノスタットを使用した模擬微小重力下での培養はアポトーシスなどのような細胞死を引き起こすことは無いが、増殖の速度が遅くなることから細胞周期など増殖に関連する機構に影響を与えることが示唆された。一方、過去の宇宙実験で得られている結果と一致して、クリノスタット培養細胞の細胞骨格の再構成が不全になることを明らかにすると同時に、アクチンのストレスファイバー形成を活性化するRhoの発現量は上昇していることを見出し、Rhoの発現よりも、Rhoの活性化に関して重力ベクトル変化の影響を受けていることを明らかにした。さらに、重力ベクトル変化の環境下では、Rhoを活性化するRho活性化因子（Rho-GEF）のうちひとつであるLARGの発現が抑制され、Rhoの活性化が抑えられることによってアクチンストレスファイバーの形成が不全になることを遺伝子発現の解析から明らかにした。

2. 3. 「植物の重力応答に機能する分子のプロテオミクス研究」チーム

重力刺激処理により発現量の増加したタンパク質として、細胞骨格のACT7, TUA6が見出された。さらに、オーキシン関連のタンパク質も見出され、植物の重力応答におけるオーキシンの不均等分布および細胞伸長の制御のための細胞骨格系の関与をプロテオミクス解析により明らかにした。重力刺激処理により分子量変化が見られたタンパク質を同定し、pyruvate dehydrogenase E1 component beta subunit, fructose-bisphosphate aldolase, 20S

proteasome beta subunit E1 (PBE1)であることを明らかにした。

3. 今後の研究の主たる課題

- (1) 様々な力学刺激状態下においてインテグリン-コラーゲン結合が力学刺激の細胞応答機構として一般化させること。
- (2) 重力感受分子の実体として、細胞骨格と低分子Gタンパク質の発現に関わるシグナル伝達系物質（三量体Gタンパク質など）、転写因子などの解析。
- (3) 重力刺激処理により分子量の一過性的変化を起こすタンパク質が重力応答にどのように機能しているのかの解析。

4. 地上研究プロジェクトの進捗状況

各テーマの研究チームは異なる切り口から進めているが微小管やアクチンファイバーなどの細胞骨格系と生体内信号伝達における重力影響や力学刺激のインテグリン-コラーゲンを介した細胞内外の情報伝達系との関連、プロテオミクス解析による細胞骨格やホルモン制御タンパク質の発現変化などを明らかにしてきており、動物細胞、植物細胞の違いを超えた、生物に共通な生体物質にそれぞれ焦点が絞られてきている。研究課題の重力刺激情報の生体内信号への変換とその情報伝達の分子実体と伝達経路の解明に向けて大きく前進し、地上プロジェクト研究として順調に進められた。

5. 特記事項

今年度十分な研究成果と基礎データの蓄積がなされたので、論文としてその成果を広く研究コミュニティに展開し、今後の宇宙生命科学の発展に寄与する。

参考資料

1. 「骨芽細胞を用いた力学刺激の細胞内生体信号への変換過程の研究」外部発表

(1) 原著論文

1. Kanematsu, M., K. Yoshimura, K., Takaoki, M., Sato, A., "Vector-averaged gravity regulates gene expression of RANK ligand and osteoprotegerin in bone marrow stromal cells via cAMP/PKA pathway", *Bone*, **30**, 553, 2002.
2. Kanematsu, M., Sato, T., Takai, H., Watanabe, K., Ikeda, K., Yamada, Y., "Prostaglandin E2 induces expression of receptor activator of nuclear factor- κ B ligand/osteoprotegerin ligand on pre-B cells: implications for accelerated osteoclastogenesis in estrogen deficiency". *J. Bone Miner. Res.*, **15**, 1321, 2000.
3. Sato, A., Hamazaki, T., Oomura, T., Osada, H., Kakeya, M., Watanabe, M., Nakamura, T., Nakamura, Y., Koshikawa, N., Yoshizaki, I., Aizawa, A., Yoda, S., Ogiso, A., Takaoki, M., Kohno, Y., Tanaka, H., "Effects of microgravity on c-fos gene expression in osteoblast-like MC3T3-E1 cells." *Adv. Space Res.*, **24**, 807, 1999.

(2) 口頭発表、抄録、他

1. 行徳淳一郎, 村上直子, 高沖宗夫, 「機械刺激による骨芽細胞の活性化機構」, 口頭発表および抄録, 第21回宇

宙利用シンポジウム (2005年1月12日～13日, 日本学術会議, 投稿中)

2. Takaoki, M., Park, H., Murakami, N., Shiba, D., Gyotoku, J-I, "Possible involvement of fluid flow detection by osteoblasts in their activation process", 20th ASGSB Annual Meeting, Oral Session (Nov, 9-13, 2004, Marriotto hotel at the Brooklyn Bridge, New York, NY, USA).
3. 行徳淳一郎, 村上直子, 高沖宗夫, 「宇宙滞在中の骨量減少と骨芽細胞の働きについて」, 第3回サイエンス・フロンティアつくば, ポスター発表 (2004年11月14日, 筑波大学・大学会館)
4. 高沖 宗夫, 村上直子, 行徳淳一郎, 「骨芽細胞の機械刺激感受における一次繊毛の役割」, 日本宇宙生物科学会第18回大会 (2004年9月30日～10月2日, 藤田保健衛生大学)
5. Takaoki, M., Murakami, N., Gyotoku, J-I, "C-fos expression of osteoblast-like MC3T3-E1 cells induced either by cooling or by fluid flow", *Biol. Sci. Space*, **18**, 181-182, 2004.
6. 高沖宗夫, 村上直子, 行徳淳一郎, 「骨芽細胞の機械刺激感受における一次繊毛の役割」, 口頭発表, 日本宇宙生物科学会第18回大会 (2004年9月30日～10月2日, 藤田保健衛生大学)
7. Takaoki, M., Park, H., Murakami, N., Matsumoto, S., Gyotoku, J-I, Shiba, S., "Possible contribution of external fluid flow to mechanical sensation by osteoblast-like cells", 第16回国際解剖学会議 (2004年8月23日-27日, 国立京都国際会館)
8. Shiba, D., Gyotoku, J-I, Takaoki, M., "Modulation of osteoblast differentiation by sustained ERK activation which is independent of bone morphogenetic proteins", 第58回日本細胞生物学会 (2004年5月25日～28日, 千里ライフサイエンスセンター)
9. 高沖宗夫, 行徳淳一郎, 永瀬睦, 安藤登, 「保水型細胞培養容器の製作」, 特願2003-344093 (整理番号 P3206, 受付番号50301637876)
10. 高沖宗夫, 「ライフサイエンス分野の宇宙実験—生物の機械受容器研究への期待」, 日本機械学会誌, **107**, 251, 2004.
11. 向井千秋, 野田政樹, 砂川賢二, 高沖宗夫, 「宇宙環境と医学」, ヒューマンサイエンス, **15**, 4-17, 2004.
12. 高沖宗夫, 林恵卿, 松本聡, 芝大, 正木道子, 行徳淳一郎, 「細胞に加わる外力を生体信号に変換する過程に関与する分子の探索」, 第20回宇宙利用シンポジウム (2004年1月22日～23日, 宇宙航空研究開発機構)
13. Takaoki, M., Park, H., Matsumoto, S., Shiba, D., Masaki, M., Gyotoku, J., "Conversion of external force on cells into biological signals: A search for participating molecules", *Space Utilization Research*, **20**, 31-34, 2004.
14. 芝 大, 行徳 淳一郎, 高沖 宗夫, 「骨芽細胞分化と力学刺激: ERK活性化関与の視点から」, 第20回宇宙利用シンポジウム (2004年1月22日～23日, 宇宙航空研究開発機構)
15. Shiba, D., Gyotoku, J., Takaoki, M., "Osteoblast differentiation and mechanical stimuli: Possible involvement of ERK activation", *Space Utilization Research*, **20**, 24-25, 2004.
16. Shiba, D., Gyotoku, J., Takaoki, M., "Relationship between cell surface integrin and continuous ERK activation during osteoblast differentiation", *ASGSB Bulletin*, **17**, 38, 2004.
17. 芝 大, 行徳 淳一郎, 高沖 宗夫, 「骨芽様細胞株 MC3T3-E1 の分化過程における持続的ERK活性化の関与」, 生化学, **75**, 809, (2003年, 横浜パシフィコ)
18. 行徳淳一郎, 永瀬睦, 安藤登, 谷垣文章, 高沖宗夫, 「重力方向変化環境に対応可能な細胞培養容器の改良」,

第17回日本宇宙生物科学会大会抄録, 17, 194-195 (2003年, 東京大学会館)

19. 芝 大, ストレス応答と遺伝子発現 -細胞は宇宙環境を感じるか?, Wako筑波フォーラム (2003年2月21日, 筑波和光ホール)
20. Takaoki, M., "Cellular gravity sensing considered from the view point of experimental technique" COSPAR, (Oct, 2002, Houston, TX, USA).
21. 佐藤温重, 腎細胞写真掲載, 平成14年版小学校用国語教科書, 光村図書出版, 東京
22. 佐藤温重, 「無重力と骨代謝」, 第10回バイオフィジオロジー研究会 シンポジウム-異常環境下の生理学, 講演抄録集, 1-2, (2002年, 金沢医科大)
23. 高沖宗夫, 「宇宙環境利用(宇宙実験)について一宇宙での生物科学研究を中心に」, 繊維工学, 54, 408, 2001.
24. 安澤加代子, 吉村研二, 高沖宗夫, 「クリノスタットの有効性と限界」, 宇宙生物科学, 15, 234, 2001.
25. 高沖宗夫, 「重力の直接作用と間接影響」, 宇宙生物科学, 15, 139, 2001.
26. 佐藤温重, 「大型セントリフュージ計画の継続を要望する緊急特集の背景」, 宇宙生物科学, 15, 134, 2001.
27. 佐藤温重, 「教育プロジェクト構想, 特集宇宙生物科学教育の展望」, 宇宙生物科学, 15, 56, 2001.
28. Sato, A., Fujita, M., Kanematsu, M., Kamigaichi, S., Takaoki, M., Narato, M., Kumagai, H., Taniguchi, Y., "Effect of vector-averaged gravity on subcellular localization of mitogen-activated protein kinase in mouse osteoblast-like MC3T3-E1 cells", 17th ASGSB Annual Meeting, Poster Session (Nov, 7-10, 2001, Alexandria Hilton Mark Center, Alexandria, VA, USA).
29. Kanematsu, M., Yoshimura, K., Takaoki, M., Sato, A., "Vector-averaged gravity regulates gene expression of RANK ligand and osteoprotegerin in bone marrow stromal cells via cAMP/PKA pathway", 34th International Congress of Physiological Sciences, (2001, Christchurch, New Zealand).
30. 佐藤温重, 熊谷秀則, 樫戸みどり, 藤田叔宏, 兼松雅博, 高沖宗夫, 「細胞様MC3T3-E1細胞におけるPGE2産生およびCOX-1, COX-2のmRNA発現に及ぼすClinorotationの影響」, 宇宙生物科学, 14, 268, 2000.
31. 兼松雅博, 高井裕之, 高沖宗夫, 佐藤温重, 「クリノスタット培養による破骨細胞分化調節因子の遺伝子発現変化は, サイクリックAMP経路を介している」, 宇宙生物科学, 14, 266, 2000.
32. Takaoki, M., Yoshimura, K., Yasuzawa-Tanaka, K., "Usefulness and limitations of clinostats", 17th ASGSB Annual Meeting, (2001, Alexandria VA, USA).
33. Kanematsu, M., Takai, H., Takaoki, M., Sato, A., "Clinostat rotation culture modulates gene expression of osteoclastogenesis-regulating factors via a cyclic-AMP dependent mechanism", 16th ASGSB Annual Meeting, (2000, Montreal, Canada).
34. Sato, A., Fujita, M., Kanematsu, M., Kamigaichi, S., Takaoki, M., Narato, M., Kumagai, H., "Altered gravity increases PGE2 production through activation of COX-2 mRNA expression in mouse osteoblast like MC3T3-E1 cells", 16th ASGSB Annual Meeting, (2000, Montreal, Canada).
35. 藤田叔宏, 佐藤温重, 「培養骨芽細胞の増殖に及ぼす過重力の影響」, JASMAC-15 (1999年10月14-15日)
36. Kanematsu, M., Takai, H., Fujita, Y., Sato, A., "Gravity regulates gene expression of osteoclast differentiation factor and osteoclastogenesis inhibitory factor in bone marrow-derived stromal cell line ST2", *ASGSB Bulletin*, 13, 66, 1999.

37. 兼松雅博, 高井裕之, 藤田叔宏, 佐藤温重, 「骨髄由来ストローマ細胞における破骨細胞分子因子, 破骨細胞形成抑制因子発現におよぼす重力の影響」, 宇宙生物科学会第13回大会 (1999年9月17-18日)
38. 佐藤温重, 他13名 「骨芽細胞の増殖遺伝子などの発現に及ぼす微小重力の影響」, 宇宙開発事業団 航空機微小重力実験結果報告, 7, 1-6, 1997.

(3) 単行書

1. 佐藤温重, 「生命科学と宇宙利用」, 宇宙環境利用と材料バイオ開発普及版 (粟林一彦編) 第2章, 35-57, シーエムシー, 東京, 2001.
2. Sato, A., Hamazaki, T., "The cellular response of mouse osteoblast-like MC3T3-E1 cells to gravity changes", *Frontiers of Biological Science in Space - Molecular Mechanism of Gravity Response in Cells* (ed A.Sato), 106-115, Taiyo Printing Co. Ltd., Tokyo, 1997.
3. 佐藤温重, 「細胞は重力を感じるか」, 宇宙環境利用のサイエンス (井口洋夫監修), 141-152, 裳華房, 2000.

(4) GeneBankへの登録

1. Kanematsu, M., Yoshimura, K., Takaoki, M. "Mus musculus receptor activator of nuclear factor (κ B ligand (RANKL), 5'-flanking region. LOCUS nkit377251 2344 bp DNA.
2. Kanematsu, M., Narato, M., Sato, A., "Mus musculus c-fos gene, 5'-flanking region. LOCUS nkit377250 2017 bp DNA."

2. 「培養細胞の重力ベクトル変化環境下における細胞骨格系への影響」外部発表

(1) 口頭発表, 抄録, 他

1. 東端 晃, 佐藤 (今溝) 真理, 関 真也, 石岡 憲昭, 「血管内皮細胞における重力ベクトル変化に対する Rho 活性化因子の発現制御とアミノ酸配列」, 第21回宇宙利用シンポジウム (2005年1月12日~13日, 日本学術会議)
2. 東端 晃, 石岡 憲昭, ほか 研究班「宇宙環境ストレス応答の細胞生物学研究班WG活動報告」第21回宇宙利用シンポジウム (2004年1月12日~13日, 日本学術会議)
3. 佐藤 (今溝) 真理, 東端 晃, 関 真也, 石岡 憲昭, 「重力ベクトル変化による Rho 活性化因子の発現制御とアクチン・ストレスファイバー形成への影響」, 第27回日本分子生物学会年会 ポスターセッション (2004年12月8日~11日, 神戸ポートアイランド)
4. 佐藤 (今溝) 真理, 東端 晃, 関 真也, 石岡 憲昭, 「重力ベクトル変化による Rho 活性化因子の発現制御とアクチン・ストレスファイバー形成への影響」, 第27回日本分子生物学会年会講演要旨集, 2004.
5. 東端 晃, 佐藤 (今溝) 真理, 関 真也, 石岡 憲昭, 「2次元電気泳動による *C.elegans* 宇宙飛行サンプルの解析」, 第55回日本電気泳動学会総会 (2004年11月12日~13日, 野口英世記念会館)
6. 東端 晃, 佐藤 (今溝) 真理, 関 真也, 石岡 憲昭, 「2次元電気泳動による *C.elegans* 宇宙飛行サンプルの解析」, 生物物理化学, 48 suppl., 25, 2004.
7. Higashibata, A., Imamizo-Sato, M., Seki, M., Ishioka, N., "Two dimensional electrophoresis analysis of the proteins responsive to gravity in *Caenorhabditis elegans*", 20th ASGSB Annual Meeting, Poster Session (Nov, 9-13, 2004,

- Marriott hotel at the Brooklyn Bridge, New York, NY, USA).
8. Higashibata, A., Imamizo-Sato, M., Seki, M., Ishioka, N., "Two dimensional electrophoresis analysis of the proteins responsive to gravity in *Caenorhabditis elegans*", *ASGSB Bulletin*, **18**, 41, 2004.
 9. 東端 晃, 佐藤 (今溝) 真理, 関 真也, 笹川 洋平, 杉本 朋子, 太齋 久美子, 東谷 篤志, 石岡 憲昭, 「ICE-First (国際線虫共同実験) における *C. elegans* 宇宙飛行サンプルのタンパク質発現および生殖細胞系発生に与える影響の解析」, 日本宇宙生物科学会第18回大会 (2004年9月30日~10月2日, 藤田保健衛生大学)
 10. 東端 晃, 佐藤 (今溝) 真理, 関 真也, 笹川 洋平, 杉本 朋子, 太齋 久美子, 東谷 篤志, 石岡 憲昭, 「ICE-First (国際線虫共同実験) における *C. elegans* 宇宙飛行サンプルのタンパク質発現および生殖細胞系発生に与える影響の解析」, 日本宇宙生物科学会第18回大会プログラム・予稿集, 59, 2004.
 11. 東端 晃, 関 真也, 今溝 (佐藤) 真理, 石岡 憲昭, 「クリノスタット培養の細胞内アクチンストレスファイバー再構成への影響」, 第20回宇宙利用シンポジウム (2004年1月22日~23日, 宇宙航空研究開発機構)
 12. Higashibata, A., Seki, M., Imamizo-Sato, M., Ishioka, N., "Effects of clinorotation on actin reformation in cells", *Space Utilization Research*, **20**, 29-30, 2004.
 13. Higashibata, A., Seki, M., Imamizo-Sato, M., Ishioka, N., "Vector-averaged gravity environment affect on expression level of Pho and Pho related proteins", 19th ASGSB Annual Meeting, Poster Session (Nov, 12-16, 2003, Huntsville Marriott, Huntsville, AL, USA).
 13. Higashibata, A., Seki, M., Imamizo-Sato, M., Ishioka, N., "Vector-averaged gravity environment affect on expression level of Pho and Pho related proteins", *ASGSB Bulletin*, **17**, 64, 2003.
 14. Seki, M., Higashibata, A., Imamizo-Sato, M., Ishioka, N., "Rho-GEF gene expression responds to gravity vector changing", 19th ASGSB Annual Meeting, Poster Session (Nov, 12-16, 2003, Huntsville Marriott, Huntsville, AL, USA).
 15. Seki, M., Higashibata, A., Imamizo-Sato, M., Ishioka, N., "Rho-GEF gene expression responds to gravity vector changing", *ASGSB Bulletin*, **17**, 38, 2003.
 16. 東端 晃, 佐藤 (今溝) 真理, 石岡 憲昭, 「血管内皮細胞における重力ベクトル変化に対する細胞骨格系関連遺伝子の動態変化」, 第75回日本生化学会大会 ポスターセッション (2002年10月14日~17日, 国立京都国際会館)
 17. 東端 晃, 佐藤 (今溝) 真理, 石岡 憲昭, 「血管内皮細胞における重力ベクトル変化に対する細胞骨格系関連遺伝子の動態変化」, *生化学*, **74**, 1078, 2002.
 18. 佐藤 (今溝) 真理, 東端 晃, 石岡 憲昭, 「重力ベクトル変化が及ぼす血管内皮細胞骨格系への影響」, 第75回日本生化学会大会 ポスターセッション (2002年10月14日~17日, 国立京都国際会館)
 19. 佐藤 (今溝) 真理, 東端 晃, 石岡 憲昭, 「重力ベクトル変化が及ぼす血管内皮細胞骨格系への影響」, *生化学*, **74**, 1078, 2002.
 20. Higashibata, A., Sato-Imamizo, M., Ishioka, N., "Gravity Vector Variation Affects Cytoskeletal Organization of Endothelial Cells", 18th ASGSB Annual Meeting, Poster Session (Nov, 6-9, 2002, Radisson Resort at the Port, Cape Canaveral, FL, USA).
 21. Higashibata, A., Sato-Imamizo, M., Ishioka, N., "Gravity Vector Variation Affects Cytoskeletal Organization of

Endothelial Cells", *ASGSB Bulletin*, **16**, 42, 2002.

22. Sato-Imamizo, M., Higashibata, A., Ishioka, N., "Change of the gene expression related to a cytoskeleton cultured under gravity-vector changing", *Biol. Sci. Space*, **16**, 203-204, 2002.
23. 佐藤 (今溝) 真理, 東端 晃, 石岡 憲昭, 「重力ベクトルの変化による細胞骨格関連遺伝子の発現変化」, 日本宇宙生物科学会第16回大会 ポスターセッション (2002年11月7-8日, 国立京都国際会館)
24. Ishioka, N., Higashibata, A., "How do cells respond to gravity?", 6th Membrane Research Forum, Symposium (Nov, 7, 2002, Nagoya Garden Palace).
25. Higashibata, A., Imamizo, M., Ishioka, N., "Effects of gravity-vector changing for endothelial cells" *Biol. Sci. Space*, **15**, 204-5, 2001.
26. 東端 晃, 今溝 真理, 石岡 憲昭, 「血管内皮細胞における重力変化応答」, 日本宇宙生物科学会第15回大会 シンポジウム2「生命の重力応答と微小管ダイナミクス」(2001年9月29-30日, 東京大学駒場キャンパス視聴覚ホール)
27. Higashibata, A., Imamizo, M., Ishioka, N., Takaoki, M., "Effects of Vector-averaged Gravity on Endothelial Cells", 17th ASGSB Annual Meeting, Poster Session (Nov, 7-10, 2001, Alexandria Hilton Mark Center, Alexandria, VA, USA).
28. Higashibata, A., Imamizo, M., Ishioka, N., Takaoki, M., "Effects of Vector-averaged Gravity on Endothelial Cells", *ASGSB Bulletin*, **15**, 77, 2001.

(2) 総説

1. 佐藤 温重, 東端 晃, 「細胞内シグナル伝達と微小重力」, *JSUP 宇宙環境利用の展望*, 財団法人 宇宙環境利用推進センター, 100-109, 2001.

3. 「植物の重力応答に機能する分子のプロテオミクス研究」外部発表

(1) 口頭発表, 抄録, 他

1. 鎌田源司, 高沖 宗夫, 東谷 篤志, 石岡 憲昭, 「異なる重力環境下で生育させたシロイヌナズナ芽ばえのプロテオーム解析」, 第21回宇宙利用シンポジウム (2005年1月12日~13日, 日本学術会議)
2. 鎌田源司, 高沖宗夫, 石岡憲昭「2次元電気泳動を用いたシロイヌナズナおよびキュウリの重力応答に機能するタンパク分子の探索」日本宇宙生物科学会第18回大会 (2004年9月30日~10月2日, 藤田保健衛生大学)
3. 鎌田源司, 高沖宗夫「2次元電気泳動を用いた植物の重力応答に機能する新規分子の探索」第20回宇宙利用シンポジウム (2004年1月22日~23日, 宇宙航空研究開発機構)

(2) 報文

1. 鎌田 源司, 高沖 宗夫, 東谷 篤志, 石岡 憲昭, 「異なる重力環境下で生育させたシロイヌナズナ芽ばえのプロテオーム解析」, *Proceedings of The 21th Space Utilization Symposium*, 2005. (印刷中)
2. Kamada, M., Takaoki, M., Ishioka, "Gravity-regulated proteins of Arabidopsis and cucumber seedlings detected by 2-D electrophoresis", *Biol. Sci. Space*, **18**, 156-157, 2004.

3. 鎌田 源司, 高沖 宗夫 「2次元電気泳動を用いた植物の重力応答に機能する新規分子の探索」, *Space Utilization Research*, **20**, 110-113, 2004.

宇宙航空研究開発機構研究開発報告 JAXA-RR-04-049

発行日 2005年3月31日
編集・発行 独立行政法人 宇宙航空研究開発機構
〒182-8522
東京都調布市深大寺東町七丁目44番地1
TEL 0422-40-3000(代表)
印刷所 株式会社 フジプランズ
東京都大田区東海3-8-2 TSKビル

©2005 JAXA

※本書(誌)の一部または全部を著作権法の定める範囲を超え、無断で複写、複製、転載、テープ化およびファイル化することを禁じます。

※本書(誌)からの複写、転載等を希望される場合は、下記にご連絡ください。

※本書(誌)中、本文については再生紙を使用しております。

<本資料に関するお問い合わせ先>

独立行政法人 宇宙航空研究開発機構 情報化推進部 宇宙航空文献資料センター



宇宙航空研究開発機構
Japan Aerospace Exploration Agency