



ISSN 1349-113X
JAXA-SP-06-034

宇宙航空研究開発機構特別資料 JAXA Special Publication

平成18年度 ISS科学プロジェクト室
細胞生物学プロジェクト 研究開発報告

ISS科学プロジェクト室 細胞生物学プロジェクトチーム

2007年 3月

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

序 文

本研究開発報告は、宇宙航空研究開発機構宇宙科学研究本部 ISS 科学プロジェクト室で実施されている、ライフサイエンス系細胞生物学プロジェクトの平成18年度作業の成果報告書である。本プロジェクトは、以下に挙げる二つの研究課題により構成されている。

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

第1章は、モデル生物である線虫を用いた宇宙実験の地上予備実験および準備状況についての活動報告である。本課題は2004年に実施された第5回ライフサイエンス国際公募においてフライト候補テーマとして選定され、実施に向けた準備を進めている。

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

いずれの課題についても、年度目標としていた実験計画のベースライン化作業を終了し、実験供試体の開発フェーズへと進み、準備は順調に進んでいる。実験供試体フライトモデル開発着手に向けた各種適合性試験などが計画され、その実施に向けた作業を展開している。

ISS 科学プロジェクト室

細胞生物学研究プロジェクトチーム

東谷 篤志（東北大学大学院生命科学研究科、JAXA プロジェクト共同研究員）

二川 健（徳島大学医学部、JAXA プロジェクト共同研究員）

東端 晃（宇宙航空研究開発機構宇宙科学研究本部）

石岡 憲昭（宇宙航空研究開発機構宇宙科学研究本部）

第1章

細胞生物研究プロジェクト「線虫 *C. elegans* を用いた宇宙環境における RNAi とタンパク質リン酸化」平成18年度活動報告

東谷 篤志*、東端 晃**、石岡 憲昭**

Annual Report of “*Caenorhabditis elegans* RNA interference in space experiment (CERISE)” in FY18

By

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

Abstract: This study is a candidate experiment for International Space Station (ISS). On ground-based studies, RNA interference (RNAi) for specific gene silencing has been established in *Caenorhabditis elegans*. However, there is no evidence that RNAi works in a microgravity environment as same as in a normal gravity condition. We are investigating the effect of microgravity on phosphorylation processes, signal transduction and muscle declination. In this annual report, we mention the results of ground based studies in FY18; (1) the effect of radiation and magnetic fields, (2) the effects of hypergravity on RNAi, (3) adaptation to gravity changing, (4) detection of the stage that is the most sensitive to hypergravity.

Key words: *C. elegans*, RNAi, phosphorylation

概 要

本研究では、モデル生物の1つである線虫 *C. elegans* を用いて、微小重力や宇宙放射線をはじめとする複合的な宇宙環境ストレスが生物に及ぼす影響について調べることを目的としている。2004年にフライト候補テーマとして選定されて以来、線虫国際共同実験（ICE-First: International *C. elegans* Experiment-1、2004年4月実施）の結果を踏まえ実験計画の詳細化作業を行ってきた。この作業結果について実験計画のベースライン化審査会を開催し、開発フェーズへの移行が承認された。

また、地上予備実験として、擬似微小重力や過重力下における RNAi マシナリーへの影響評価や、過重力が受精直後の卵核の減数第1・第2分裂に最も影響を及ぼすことを実験的に証明した。さらに、各種突然変異体や RNA 干渉（RNA interference: RNAi）により特異的な遺伝子発現の抑制体を用いて、様々な環境ストレス（放射線や磁場など）の生物影響を DNA マイク

* Graduate School of Life Sciences, Tohoku University

** JAXA

ロアレイによるゲノムワイドな分子モニターができることを確認した。

今後は、宇宙環境における RNA 干渉機構 (RNAi) の効果についてコントロールとなる、GFP を導入した線虫を用いた実験手法を検証するとともに、RNAi を用いた筋関連の分子群の遺伝子発現と表現系への影響、また、宇宙環境がシグナル伝達を含めたタンパク質リン酸化の変動に及ぼす影響について明らかにしたい。また、宇宙環境下で長期間、連続的な世代交代を通して生じる適応と変異・進化の方向性について明らかにすることを次なる研究課題として位置づけている。

1. はじめに

ISS の運用や月面基地、火星探索など、ヒトが長期間宇宙に滞在することがまさに現実となり、次なる宇宙ライフサイエンス分野の課題として、地上と大きく異なる宇宙環境がヒトをはじめとする多細胞生物の継世代に及ぼす影響と、その適応・進化の方向性を解明することがあげられる。モデル生物の線虫は、その世代交代に要する期間が5日間程度と比較的短く、また全ゲノム遺伝子の情報も既に解読され、その約4割はヒトに共通な遺伝子であること、様々な突然変異系統が分離されており、分子遺伝学的な解析が可能な実験材料である。このような特徴を活かして、線虫国際共同実験 ICE-First が企画され、実施された。また、ICE-First 以前にも何度か線虫を用いた実験が行われており、世代の交代や放射線の影響に関する研究が行われている。

現在我々が準備を進めているフライト実験候補テーマでは、近年その有効性が示されている RNAi の効果についての検証と、その技術を用いた宇宙環境が与える筋肉への影響の評価および生体内のイベントで重要な役割を担うリン酸化過程への影響を検証することを計画している。

今年度作業の大きな目標としては、実験計画の詳細化作業を踏まえた実験計画書 (ベースライン版) を制定し、実験供試体の開発フェーズへの移行を掲げていた。この作業については、平成18年7月28日に開発フェーズへの移行前審査会を実施し承認された。この承認を受けて、フライト実験に用いる供試体の検証モデルの製作および適合性試験の計画作成に着手した。

また、フライト実験に向けた地上での予備実験として、宇宙で想定される放射線や磁場の影響検討、過重力への影響評価の結果と今後の線虫を用いた宇宙実験の提案概要についても本稿で報告する。

2. 成果の概要

2.1. 実験計画のベースライン化作業

本フライト実験候補テーマは、2004年にフライト候補テーマと選定されて以来、フライト実験に向けた実験計画の詳細化作業を行ってきた。この詳細化作業では、実験を行うにあたっての科学的技術課題の抽出とそれに伴う地上予備実験での確認、科学達成に必要な諸条件の設定、解析方法の検討確認、実験に必要な供試体の要素検討、実験コンフィギュレーションの設定など、宇宙実験を行うために必要な項目を実験計画書として設定するためのさまざまな検討が行われた。この作業結果を踏まえ実験計画書 (ベースライン版) の案を作成し、実験供試体への開発フェーズへの移行に関して平成18年7月28日に審査会を開催した。

この審査会では、ISS 科学プロジェクト室長を中心とした宇宙環境利用科学委員会委員および外部専門家によって構成された審査委員が、詳細化作業で行った作業および次に挙げる (1) 科学的技術課題が克服されているか、(2) 科学的要求を満たす要素技術が確立されているか、(3) 運用性にクリティカルな課題がないか、(4) 安全性にクリティカルな問題はないか、という4点を踏まえて審査が行われた。

審査の結果、科学的・技術的実現性について十分検討されていると評価でき、問題なく開発フェーズに移行で

きることが確認された。

2.2. 地上予備実験の実施

フライトに向けた地上予備実験として、以下の項目について実施した。

2.2.1. 放射線および磁場による遺伝子発現への影響評価

宇宙環境はさまざまな環境因子の複合環境であるため、想定される放射線および磁場の影響について、地上での人工的な環境下で生育させた線虫の遺伝子発現の網羅的な変化を DNA マイクロアレイにより評価した。

2.2.1.1. 試料および方法

大腸菌 OP-50 を餌として NGM 寒天培地上で同調的に成育させた野生型雌雄同体 N2 株の成虫に対して、⁶⁰Co の γ 線 100Gy を照射し、照射後 3 時間目、12 時間目、24 時間目でそれぞれサンプリングし、全 RNA を抽出精製した。また同じく成虫のサンプルに対して、東北大学金属材料研究所の 6TCSM 装置を用いて、3T ならびに 5T の直流強磁場を付与し、4 時間ならびに 24 時間の継続的な曝露後のサンプルに対して全 RNA を抽出精製した。これらそれぞれの全 RNA を鋳型に逆転写反応による cDNA プローブを作成し、Affymetrix *C. elegans* Genome Array (22,150 gene species, 22,500 element array, Affymetrix, Santa Clara, CA) を用いて、全ゲノム遺伝子の網羅的な発現解析を実施した。

2.2.1.2. 結果

100Gy の γ 線照射後、3 時間目で 353 個の遺伝子が有意に発現上昇することが観察された。これらの内、12 時間後、24 時間後まで通じて発現上昇が見られるものは 78 個で、*egl-1* や *ced-13* など放射線被曝に伴う DNA 損傷に依存したアポトーシスの誘導因子が含まれていることが明らかになった。一方、3T または 5T の直流強磁場を付与した後、4 時間目では 0T のコントロール区と比較して、両 T 区で共通に 958 個の遺伝子が有意に発現上昇することが観察されたが、それらの多くは一過的な発現上昇であり、24 時間継続して曝露を続けた場合はコント

表 1 ICE-First 宇宙フライト、100Gy の γ 線照射、直流強磁場が線虫全ゲノム遺伝子の発現に及ぼす影響について一部データを抜粋

Probe ID	ICE-First		Magnetic Fields								Radiation							
	FC Log Ratio	Change	3T 4hr		5T 4hr		3T 24hr		5T 24hr		100Gy 3hr (test1)		100Gy 3hr (test2)		100Gy 12hr		100Gy 24hr	
			ExpC Log Ratio	Change	ExpC Log Ratio	Change	ExpC Log Ratio	Change	ExpC Log Ratio	Change	ExpC Log Ratio	Change	ExpC Log Ratio	Change	ExpC Log Ratio	Change	ExpC Log Ratio	Change
CEG_00001	-0.2	NC	0.4	NC	0.7	NC	0.2	NC	0.4	NC	0.1	NC	-0.6	NC	-0.3	NC	-0.1	NC
CEG_00002	-0.3	NC	0.5	NC	0.5	NC	0.4	NC	0.1	NC	-0.1	NC	-0.3	NC	-0.3	NC	-0.1	NC
CEG_00003	0.1	NC	0.2	NC	0.3	NC	0.4	NC	0.3	NC	0	NC	-0.3	NC	-0.3	NC	-0.6	NC
CEG_00004	-0.1	NC	0.3	NC	0.2	NC	0	D	0.1	NC	0.2	NC	-0.2	I	-0.2	NC	-0.3	NC
CEG_00005	0.3	I	0.1	NC	0.3	NC	0.3	NC	0.4	NC	0	NC	-0.5	NC	-0.2	NC	-0.7	NC
CEG_00006	-0.4	D	-0.7	D	0.1	D	-0.4	D	0.2	NC	-0.8	D	-0.1	NC	0.5	I	-0.7	D
CEG_00007	-0.3	NC	0.6	NC	0.6	NC	0.2	NC	0.3	NC	0.3	NC	-0.7	NC	-0.1	NC	0.3	I
CEG_00008	-1.1	NC	3.8	I	2.6	I	1.3	NC	1.2	NC	2.6	NC	-2.2	D	-1.1	NC	1.3	I
CEG_00009	-0.2	NC	1.1	I	1	MI	0.5	NC	0.6	NC	0	NC	-1.7	D	-0.9	D	1.3	I
CEG_00010	0.1	NC	0.4	NC	0.6	NC	0.4	NC	0.3	NC	-0.2	NC	-0.6	NC	-0.2	NC	-0.3	NC
CEG_00011	-0.6	D	0.9	NC	0.8	NC	0.8	NC	-2.6	NC	0.8	NC	-0.1	NC	-2.2	NC	0.1	NC
CEG_00012	-0.1	NC	0.4	NC	0.4	NC	0.3	NC	0.3	NC	0.2	NC	-0.4	NC	-0.1	NC	0	NC
CEG_00013	0.4	I	0	D	0.2	MD	0.6	NC	0.5	NC	-0.2	NC	-0.4	NC	0	NC	0.2	NC
CEG_00014	-0.3	NC	0	D	0.2	NC	0.6	NC	0.2	NC	0.3	I	0.2	I	0.3	I	0.1	I
CEG_00015	0	NC	0.3	NC	0.3	NC	0.4	NC	0.2	NC	0	NC	-0.4	NC	-0.2	NC	-0.2	NC
CEG_00016	-0.4	D	-0.4	MD	0.3	NC	-0.1	NC	0	NC	-0.4	NC	-0.6	NC	-0.1	NC	-1.7	D
CEG_00017	-0.1	NC	0.2	NC	0.5	NC	0.2	NC	0.3	NC	-0.2	NC	-0.3	NC	0.2	I	-0.2	NC
CEG_00018	-0.1	NC	0.8	I	0.7	NC	0.9	I	0.2	NC	-0.1	NC	-0.9	D	-0.2	NC	0.1	I
CEG_00019	-0.2	NC	1.1	I	0.9	I	0.6	NC	0.2	NC	-0.3	NC	-1.4	D	-0.4	NC	0.5	I
CEG_00020	-0.2	NC	0.1	NC	0.6	NC	0.6	NC	0.1	NC	0.3	NC	-0.5	NC	-0.3	NC	0.9	I
CEG_00021	-0.9	D	0.5	NC	0.8	I	0.3	NC	0	NC	0.3	NC	-0.3	NC	0	NC	-0.4	NC
CEG_00022	0.1	NC	0.2	NC	0.3	NC	0.2	NC	0.2	NC	0	NC	-0.3	NC	-0.1	NC	-0.3	NC
CEG_00023	0.4	NC	0	NC	0.2	NC	0.3	NC	0.1	NC	-0.2	NC	-0.1	I	0.1	I	-0.1	NC
CEG_00024	-0.3	NC	0.3	NC	0.4	NC	0.4	NC	0.3	NC	0	NC	-0.4	NC	-0.2	NC	-0.1	NC
CEG_00025	-0.1	NC	0.6	NC	0.7	NC	0.3	NC	0.2	NC	0.7	I	-0.5	NC	-0.5	NC	-0.9	NC
CEG_00026	-0.4	NC	1	NC	1.1	NC	-0.1	NC	0.2	NC	0.1	NC	-1.7	D	-1.6	D	-0.2	NC
CEG_00027	0	NC	0.9	I	0.4	NC	0.5	NC	0.1	NC	-0.5	MD	-1.5	D	-0.5	NC	0.6	I
CEG_00028	-2.4	NC	1.1	NC	1.2	NC	-0.1	NC	-2.4	NC	-0.5	NC	0.2	NC	0.5	NC	-0.5	NC
CEG_00029	-0.1	NC	0.2	NC	0.4	NC	0.1	NC	0.2	NC	0.1	NC	-0.4	NC	-0.1	NC	-0.2	NC
CEG_00030	0	NC	0.2	NC	0.4	NC	0.5	NC	0.4	NC	-0.5	NC	-1.1	D	-0.2	NC	0.1	NC
CEG_00031	-0.4	NC	0.9	NC	0.7	NC	0.5	NC	0.5	NC	0.4	NC	-0.9	D	-0.8	MD	0.7	I
CEG_00032	0.2	NC	0.4	NC	0.4	NC	0.4	NC	0.3	NC	-0.1	NC	-0.4	NC	-0.4	NC	-0.1	NC
CEG_00033	-0.1	NC	1.3	I	0.8	I	0.5	NC	0.3	NC	0.1	NC	-1.6	D	-0.9	D	0.5	I
CEG_00034	-0.2	NC	0.6	NC	0.7	I	0.6	NC	0.3	NC	-0.2	NC	-0.6	NC	-0.4	NC	-0.1	NC
CEG_00035	-0.3	NC	0.5	NC	0.4	NC	0.6	NC	0.2	NC	-0.2	NC	-0.9	MD	-0.4	NC	0.3	I
CEG_00036	-0.1	NC	0.4	NC	0.6	NC	0.1	NC	0.2	NC	0	NC	-0.3	NC	-0.2	NC	0.4	I
CEG_00037	-0.5	D	-0.5	D	0.2	NC	-0.2	D	0	NC	-0.4	NC	-0.3	NC	0.1	NC	-0.6	NC
CEG_00038	-0.1	NC	0.4	NC	0.6	NC	0.4	NC	0.2	NC	0.1	NC	-0.2	NC	-0.1	NC	0.5	I
CEG_00039	-0.2	NC	0.3	NC	0.4	NC	0	NC	0.4	NC	1	I	-0.4	NC	-0.1	NC	-2.6	D
CEG_00040	0.1	NC	0.3	NC	0.4	NC	0.4	NC	0.4	NC	0	NC	-0.5	NC	-0.2	NC	-0.1	NC
CEG_00041	0.1	NC	0.3	NC	0.4	NC	0.2	NC	0.2	NC	0	NC	-0.5	NC	-0.2	NC	0	NC
CEG_00042	0	NC	0.1	NC	0.3	NC	0.4	NC	0.3	NC	-0.1	NC	-0.4	NC	0	NC	0.2	I
CEG_00043	0.6	I	0.2	NC	0.3	NC	0.5	NC	0.4	NC	0.1	NC	-0.1	NC	0	NC	0.1	NC
CEG_00044	-2.1	NC	3	NC	1.6	NC	0.6	NC	0	NC	2.4	NC	-0.6	NC	-0.8	NC	0.5	NC
CEG_00045	-0.6	D	0.2	NC	0.5	NC	0.7	I	0.1	NC	-0.2	NC	-0.2	NC	0.3	NC	-0.5	NC
CEG_00046	-0.2	NC	0.2	NC	0.3	NC	0.4	NC	0.1	NC	0.4	I	-0.2	NC	-0.4	NC	-1	D
CEG_00047	-0.2	NC	0.4	NC	0.5	NC	-0.6	D	0.1	NC	0.7	I	0	NC	-0.1	NC	-3	D
CEG_00048	-1	I	0.1	NC	0.1	NC	0.2	NC	0	NC	2.2	I	-0.2	NC	-0.4	NC	-0.5	NC
CEG_00049	-0.6	D	-0.1	D	0.4	NC	-0.2	D	0.2	NC	-0.6	NC	-0.6	NC	0	NC	-0.8	NC
CEG_00050	-0.2	NC	0.5	NC	0.4	NC	0.7	I	0.5	NC	-0.6	D	-1	D	0.2	I	-0.2	NC

ロール区のレベルまで低下がみられた。

また、 γ 線照射後3時間目と3Tで4時間曝露とにおいて、共通に発現上昇が確認されたものは、36遺伝子あり、それらには様々なストレスに応答する低分子熱ショックタンパク質 *hsp-16* 遺伝子や *p450 monooxygenase cyp-35A* 遺伝子の他に、数種類の *oxidoreductase* 遺伝子が含まれていた。

ICE-First 実験において、宇宙フライトしたサンプルの全ゲノム遺伝子の網羅的な発現解析の結果と、今年度実施した放射線や直流強磁場の影響について比較解析した（表1に一部データを記す）。その結果、(1)放射線によるDNA損傷の修復やアポトーシスに関わる遺伝子群は、微小重力の宇宙環境下でも地上区と同様に発現していること、(2)ミオシン重鎖をはじめとする筋タンパク関連遺伝子群ならびにそれらの転写因子の発現が宇宙環境下で有意に低下すること、(3)放射線照射により特異的に発現誘導される遺伝子を見だし、(4)ICE-Firstの宇宙フライトサンプルではそれら遺伝子の有意な発現上昇は観察されず、ICE-FirstにおけるソユーズならびにISS船内での甚大な被曝はなかったこと、(5)宇宙環境と直流強磁場環境では共に、細胞の水チャネルアクアポリン遺伝子 *aqp-4* の発現が上昇すること、表皮コラーゲンに関与する3遺伝子の発現が低下することが明らかになった。

2.2.2. 過重力環境が及ぼす RNAi 効果への影響評価

RNAiの効果に対する重力変化の影響についての予備データを取得するため、過重力、擬似微小重力（3Dクリノローテーション）、宇宙環境（ICE-First）のそれぞれの環境下で生育させた線虫について、RNAiマシナリーに関する遺伝子の発現変動をDNAマイクロアレイによって解析した。

2.2.2.1. 材料および方法

本解析における線虫は野生株（Bristol N2）を用いて行われた。生育環境は、

過重力：10G 10日間

擬似微小重力：3Dクリノローテーション（回転速度 X軸：11rpm, Y軸：13rpm）

宇宙環境：10日間宇宙環境に曝露

とした。

各環境に曝露した後、ISOGEN（Nippon Gene）を用いてRNAを抽出し、処理をした後DNAマイクロアレイ（*C. elegans* whole genome array, Affymetrix）で発現解析を行った。

2.2.2.2. 結果

参考文献[1]をもとに、RNAiマシナリーに関連する遺伝子群を抽出し、各群の遺伝子発現変化を調べたところ、表2に示すように各群においてRNAiマシナリーに関する遺伝子群には、大きな発現変化は認められなかった。従って、重力が変化してもRNAiのマシナリーに関しては正常に機能し、宇宙環境でもRNAiが十分に機能することが予想される。

2.2.3 重力への適応と運動能力

宇宙環境（ICE-First）においては成育させた線虫は、地上対照区と比較して、筋タンパク関連遺伝子群の有意な発現低下が確認された。これらは、微小重力下で生じる宇宙飛行士の骨や筋の萎縮と同様に、微小重力下に適応した線虫においても、筋萎縮が生じていることを強く示唆するものであった[成果論文1]。つまり、恒常的な運動能力を発揮するために線虫の筋肉が、重力の影響により調整され、環境に適応する可能性が考察された。そこで、この可能性を検証するために、今年度はまず、緩衝液で薄く覆い浮力を生じさせた培地で成育成長させた線虫と、強い表面張力が存在する寒天培地上で成育成長させた線虫とを用いて、それぞれ成虫期に、新たな寒天培地上に移し培地上での運動性について、這行跡を比べる実験を行った。

2.2.3.1. 材料および方法

6cmのシャーレに大腸菌 OP-50 を塗布した NGM 寒天培地上に、1.5 ml の M9 緩衝液で薄く覆った培地と、緩衝液を加えない NGM 寒天培地のそれぞれに、野生型 N2 線虫の成虫を 3 匹ずつのせ、2 時間培養することで

Gene Name	Flight	Clino	HyperG	Hyper Flag
<i>adr-1</i>	0	-0.2	0.1	NC
<i>adr-2</i>	0.1	-0.2	0.2	NC
<i>alg-1</i>	-0.2	-0.1	0	NC
<i>alg-2</i>	0	0.3	0.4	MI
<i>dcr-1</i>	0.2	0	0	NC
<i>drr-1</i>	-0.1	-0.2	-0.1	NC
<i>ego-1</i>	0	0	0.1	NC
<i>egl-13</i>	0.6	-0.1	0.2	NC
	0.3	0.1	0.2	NC
<i>eri-1</i>	0.3	0	0.1	NC
	0.3	0	0.1	NC
<i>hpt-2</i>	-0.1	-0.2	0	NC
	0.1	0.1	0.2	NC
	0.3	0.2	0.1	NC
	0.1	0	0.1	NC
<i>mes-2</i>	0.3	-0.2	0.1	NC
<i>mes-3</i>	0.1	0.1	0	NC
<i>mes-4</i>	0.2	-0.3	0.1	NC
<i>mes-6</i>	0	-0.2	0.1	NC
<i>mut-7</i>	0.1	-0.2	0.3	NC
	0.2	0	0.3	NC
<i>mut-8/rde-2</i>	0.3	-0.1	0	NC
	0.2	0.1	0	NC
<i>mut-14</i>	0.1	-0.2	0.2	NC
<i>mut-16/rde-6</i>	0	-0.1	0.3	NC
<i>pgt-1</i>	0.1	-0.3	0.1	NC
<i>ppw-2</i>	0.1	-0.3	0.2	NC
<i>rde-1</i>	0.2	0.1	-0.2	NC
	0.1	0.1	-0.1	NC
<i>rde-3</i>	0.3	-0.1	0	NC
<i>rde-4</i>	0.1	-0.2	-0.2	NC
<i>rha-1</i>	0	0.1	-0.2	NC
	-0.1	0.1	0.2	NC
<i>rsd-2</i>	0.1	-0.2	-0.1	NC
	-0.2	-0.1	-0.1	NC
<i>rsd-3</i>	0	-0.1	-0.2	NC
<i>rsd-6</i>	0.2	0	0.1	NC
<i>rrf-1</i>	0.4	0.2	0.4	MI
	0	0	0.1	NC
<i>rrf-3</i>	0	-0.1	0	NC
<i>sid-1/rsd-8</i>	0.4	-0.3	0.2	NC
<i>tsn-1</i>	0.1	-0.1	0.3	NC
<i>vig-1</i>	0.2	0	0	NC
	-0.1	0	-0.1	NC

表2 過重力下における RNAi マシナリー関連遺伝子の発現変化
RNAi 関連遺伝子群の転写量は、これまでの ICE-First 宇宙実験、過重力、クリノスタットなどの条件下でも、ほとんど変動しない。

数十個の卵を産卵させた。その後、親虫を除去し、20℃で4日間、成虫になるまで成育を続けた。これら成虫を再び、OP-50 を塗布した新しい NGM 寒天培地上に移し、線虫の波形の這行パターンを観察した。

2.2.3.2. 結果

その結果、緩衝液で薄く覆った培地上で成育成長させた成虫は、NGM 寒天培地に移した場合、寒天培地上における表面張力の影響を受け、線虫の S 字型体形が対照区に比べてより強く曲がること、さらに、這行した跡の波形の振幅も顕著に増加することを確認した (図1)。すなわち、浮力により線虫にかかる重力ならびに表面張力を低減させた状況で成育成長させた場合、筋肉量が低下し、再び表面張力の強い寒天培地上に移した際、体形ならびに運動を維持するために、より強い振幅の S 字波形をとらざるを得ないことが示唆された。この結果

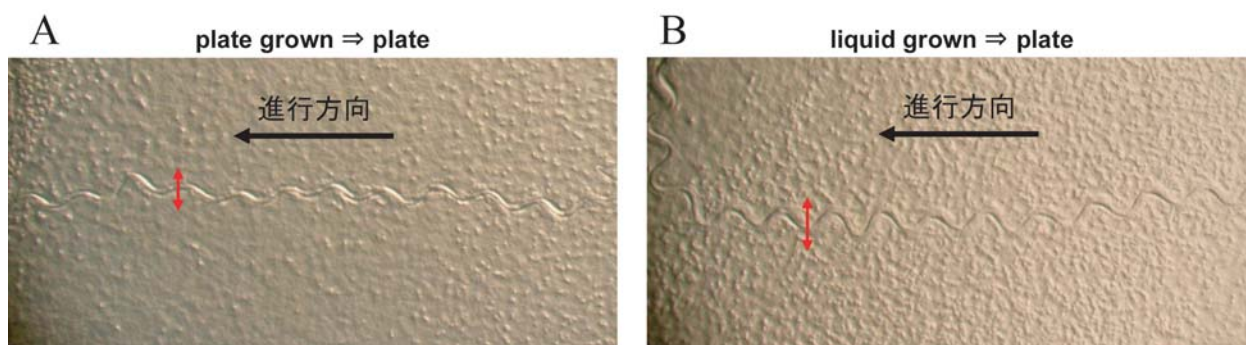


図1 液体培地で成育させた線虫を寒天培地上に移した際、前進するための振幅行動が大きくなる。液体培地で成育させた線虫は、より低い重力下で適応しており、寒天培地上での過重力 (表面張力) 下での行動が変化する。

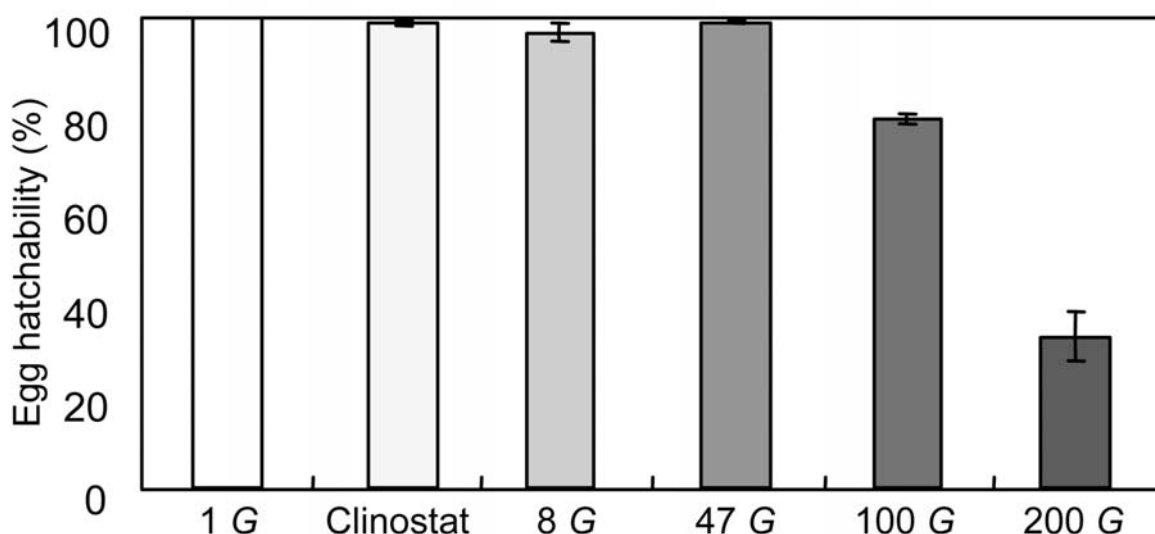


図2 野生型線虫を過重力下で育成、産卵させ、その卵の孵化率を示した。

は、ICE-First 実験ではじめて確認された線虫の筋が微小重力下で遺伝子発現のレベルで抑制を受けることを、強く裏付ける結果であり、また、今回計画の宇宙実験が真に意義深いことにつながることを予感させるものといえる。

2.2.4. 線虫において過重力の影響を最も受けやすい時期の特定

2.2.4.1. 材料および方法

宇宙への打ち上げ等においては、過重力負荷が生じることが知られている。そこで、線虫の過重力に対する影響を調べる目的で、遠心機（バックマン Allegra 25R TJ25 スイングロータ）を用いて、8 G、47G、100G、200G の各過重力での発生ならびに成長についての解析を行った。

2.2.4.2. 結果

雌雄同体野生型を47G 以下の過重力下で育成させた場合、育成・発生、次世代への影響も見られず、宇宙実験で想定される過重力の範囲内では、全く影響がないことが確認された。また、100G 以上の過重力下で成虫にまで育成させた場合、その卵の孵化率が顕著に低下することが確認された（図2）。一方で、1 G 下で受精し数細胞期にまで発生した初期胚に対して、その後、200G の過重力を加えても正常に胚発生が完了し全てが孵化することが示された。以上の結果から、成虫における次世代の生殖細胞形成から受精までの時期が過重力により感受性であることが示唆された。

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

3. まとめ

本フライト実験候補テーマは、2009年初頭のフライト実験実施を目指して準備を進めており、今年度は実験計画のベースライン化が承認され、開発フェーズに移行した。また、地上実験で得られた結果も、フライト実験の価値を高めるための予備データとして蓄積されてきている。

平成19年度は、今年度制作した実験供試体の検証モデルを用いて各種適合性試験（試料の凍結および融解、機能性の確認）や実験手順の詳細化作業を行う予定である。また、地上予備実験として、(1) 重力の変化による運動性の変化を確認するための航空機を用いた運動観察、(2) 軌道上での実験アクティベーションの詳細化、(3) 軌道上での観察系に関する技術検討を行う予定である。

4. 成果発表

- [1] Higashibata A., Szewczyk N. J., Conley C. A., Imamizo-Sato M., Higashitani A., Ishioka N., “Decreased expression of myogenic transcription factors and myosin heavy chains in *Caenorhabditis elegans* muscles developed during spaceflight”, *J. Exp. Biol.*, **209**, 3209–3218, 2006.
- [2] Selch F., Higashibata A., Imamizo-Sato M., Higashitani A., Ishioka N., Szewczyk N. J., Conley C. A., “Genomic response of the nematode *Caenorhabditis elegans* to spaceflight”, *Adv. Space Res.*, in press.
- [3] Higashibata A., Higashitani A., Adachi R., Kagawa H., Honda S., Honda Y., Higashitani N., Sasagawa Y., Miyazawa Y., Szewczyk N. J., Connley C. A., Fujimoto N., Fukui K., Shimazu T., Kuriyama K., Ishioka N., “Biochemical and Molecular Biological Analyses of space-flown nematodes in Japan, the First International *Caenorhabditis elegans* Experiment (ICE-First)”, *Microgravity Sci. Technol.*, in press.
- [4] Higashitani A., Higashibata, A., Sasagawa, Y., Sugimoto, T., Miyazawa, Y., Szewczyk, N. J., Viso, M., Gasset, G., Eche, B., Fukui, K., Shimazu, T., Fujimoto, N., Kuriyama, K., Ishioka, N. “Checkpoint and Physiological Apoptosis in Space-flown *C. elegans*”, *Science on European Soyuz Missions to the International Space Station (2001–2005)*, June 2006, Toledo, Spain
- [5] 東谷篤志、東端晃、森ちひろ、鈴木蓉子、東谷なほ子、山崎丘、福井啓二、石岡憲昭、“モデル生物 *C. elegans* を用いた宇宙実験”、第23回宇宙利用シンポジウム、1月2007、東京

5. 参考文献

- [1] Grishok A., “RNAi mechanisms in *Caenorhabditis elegans*”, *FEBS Lett.*, **579**, 5932–5939, 2005.

第2章

細胞生物研究プロジェクト「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」平成18年度活動報告

二川 健*、東端 晃**、石岡 憲昭**

Annual Report of “Cbl-mediated ubiquitination downregulates the responsiveness of skeletal muscle cells to growth factors in space” in FY18

By

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

Abstract: This study is designed to elucidate molecular mechanism of microgravity-induced muscle atrophy and develop the countermeasures. In 2006, we had examination to evaluate whether our plan was suitable for space experiment in the International Space Station (ISS) and passed it. Then, we made mockup of equipments, such as sample holders and reagent suppliers, which will be used in ISS. In ground-based experiments, we examined mechanism of microgravity-induced expression of an ubiquitin ligase Cbl-b, a main regulator of muscle atrophy.

Key words: ubiquitin ligase, 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、微小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。今年度は、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審査会を開催し、実験供試体の開発フェーズへの移行が承認された。これを踏まえ、サンプルホルダーや固定前処理器具の検証モデルを製作した。また、地上予備実験として、フライト実験でターゲットとしているCbl-bに関連したユビキチン-プロテアソーム系の上流部分の探索や過重力に対する影響について検討を行った。

1. はじめに

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タンパク質分解経路 (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見出した。このタ

* Department of Nutrition Institute of Health Biosciences, University of Tokushima Graduate School

** JAXA

ンパク質分解経路は分解しようとするタンパク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多くのタンパク質がユビキチン化され分解されていることがわかった。この現象は、骨格筋において増殖因子、中でも IGF-1 に抵抗性を示し、その結果筋萎縮関連遺伝子（Atrogin-1 や Atrogenes）の発現が増大し、筋萎縮が誘導されると考えられてきた。しかしながら、どのような因子が IGF-1 の抵抗性を誘導するかは不明であった。地上予備実験により、Cbl-b というユビキチンリガーゼが IRS-1 をユビキチン化し分解を亢進することがその抵抗性の原因であることを明らかにした。平成18年度は Cbl-b の発現調節機構を解析し、Cbl-b は無重力のストレスを感知し、酸化ストレス（ROS）、Erk1/2Egr を介して発現が調節されていることを明らかにした。この上流には、Unloading Stress の感知に重要な分子が存在する可能性が大きい。フライト実験を通じて、微小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についても検討し、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。

2. 成果の概要

2.1. 実験計画のベースライン化作業

本フライト実験候補テーマは、2000年にフライト候補テーマと選定されて以来、フライト実験に向けた実験計画の詳細化作業を行ってきた。第1章で述べたとおり、さまざまな確認事項や検討事項についての対処法を示し、実験計画書（ベースライン版）の案を作成した。本フライト候補テーマについても実験供試体への開発フェーズへの移行に関して平成18年7月28日に審査会を開催した。審査の結果、科学的・技術的実現性について十分検討されていると評価でき、問題なく開発フェーズに移行できることが確認された。

2.2. 地上予備実験の実施

フライトに向けた地上予備実験として、以下の項目について実施した。

2.2.1. 骨格筋における Unloading ストレス感知の分子機構

寝たきり患者や宇宙飛行士にとって、Unloading による骨格筋の萎縮は深刻な問題であり、そのメカニズムの解明と治療法の開発が急務である。一般的に筋萎縮はタンパク質合成と分解のインバランスにより起こると考えられている。私達は、骨格筋における3つの主要な分解系（ユビキチン-プロテアソーム系、カルシウム-カルパイン系、リソソーム系）の中でも、ユビキチン-プロテアソーム依存性筋タンパク質分解経路が、Unloading による筋萎縮で重要な働きをしているということを示してきた。

ユビキチン-プロテアソーム依存性タンパク質分解経路は、分子量8,600のペプチドであるユビキチンがユビキチン活性化酵素（E1）、ユビキチン結合酵素（E2）、ユビキチンリガーゼ（E3）を介し、基質分子に結合すること（ポリユビキチン化）から開始される。このシステムの律速酵素であるユビキチンリガーゼ群の中で、私達の研究グループは Cbl-b が廃用性筋萎縮の原因因子の1つであることを明らかにした（論文投稿中）。Cbl-b は、中央にユビキチンリガーゼとしての機能の特徴づける RING フィンガードメインを、N 末端にリン酸化したチロシンとの結合ドメインを有し、受容体型チロシンキナーゼシグナル伝達を負に調節する働きを持つことが知られている。Unloading 環境に曝露した骨格筋では、この Cbl-b の発現が上昇し、骨格筋の増殖分化を司る IGF-1 のシグナル分子 IRS-1 の分解を亢進した。その結果、骨格筋細胞は IGF-1 に抵抗性を示し、Unloading による筋萎縮が誘導された。

以上のように、Cbl-b の筋萎縮原因遺伝子としての機能が解明される一方、その発現調節機構については未だ不明のままである。どのように Unloading ストレスが Cbl-b 遺伝子の発現を上昇させるのかを解明することは、骨格筋がどのように機械的ストレスを感知しているかの解明につながるはずである。本研究では、骨格筋固有の機械的ストレス感知の分子機構の解明を目的とし、Cbl-b の Unloading ストレスによる発現調節機構について検討した。

2.2.2. 試料および方法

2.2.2.1. 活性酸素種の検出

ラット横紋筋芽細胞 L6 細胞を37°C、5 %CO₂の条件下で、増殖培地（10%牛胎児血清を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)）を用いて24時間培養した。培地を Hanks' Balanced Salt Solution（4 mM NaHCO₃, 137 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.8 mM MgSO₄, 0.3 mM Na₂HPO₄, 5.5 mM glucose, 0.4 mM KH₂PO₄, 1.26 mM CaCl₂; HBSS）に換え、10 μM の酸化ストレス検出薬 5-(and-6)-carboxy-2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (carboxy-H₂ DCFDA) mixed isomers (Molecular Probes) と等量の DCFDA 排出阻害剤 Pluronic®F-127 (Invitrogen) を添加し、37°C、20分間反応した。培地を HBSS に換え 3D-clinorotation（後述）刺激後、蛍光顕微鏡で観察した。5mM *N*-Acetyl-L-cysteine (NAC) は carboxy-H₂ DCFDA と同時期に添加し HBSS 交換時に新たなものに交換した。

2.2.2.2. プラスミド作成とルシフェラーゼアッセイ

ヒトゲノムライブラリよりプライマー 5'-CACCACCCTGGTTGTCCACAGG-3' と 5'-CTTTCGGCGCCGTAGCTGTCCA-3' を用いて Cbl-b 遺伝子の 上流-2072 bp から +249 bp を pGL3-Basic Vector (Promega) に組み込みプラスミドを作成した。同様に 5'-CACCGAGCTCGGCATTGGCTCA -3' と 5'-CTTTCGGCGCCGTAGCTGTCCA -3' を用いて 上流-111 bp から +249 bp までの cDNA を、5'-CACCGGTACCCTGGGTCCTGT -3' と 5'-CTTTCGGCGCCGTAGCTGTCCA -3' を用いて 上流-59 bp から +249bp までの cDNA を合成し、プラスミドに subclone 化した。制限酵素 Sma I / Xho I フラグメント（-292 bp から +249 bp までの cDNA）と、Mlu I / Xho I フラグメント（+217 bp から +249 bp までの cDNA）をそれぞれ pGL3-Basic Vector に組み込んだ。

赤毛ザル腎細胞 COS 7 細胞を37°C、5 %CO₂の条件下で、100 μg/ml ストレプトマイシン、100 IU/ml ペニシリン G を含む増殖培地を用いて24時間培養した。無血清の増殖培地に替え、FuGENE6 (Roche) を用いて上述のベクターをトランスフェクションした。4時間後、10 μM 過酸化水素下で24時間培養し、lysis buffer (Promega) 200 μl で細胞を回収した。細胞破碎後、4°C、12,000g、2分間の条件で遠心した上清10 μl と Luciferase Assay Reagent (Promega) 20 μl を混合し、ルミノメーターで測定した。

2.2.2.3. ゲルシフトアッセイ

COS7 細胞を10 μM H₂O₂ または PBS で3時間処理し、130 mM NaCl, 5 mM KCl, 8 mM MgCl₂, 0.5 mM DTT を含む 10 mM Tris-HCl washing buffer) で細胞を回収した。遠心後、5 mM KCl, 0.5 mM MgCl₂, 0.5 mM DTT を含む 20 mM HEPES-KOH (hypotonic buffer) で細胞を破碎した。さらに、遠心後の沈殿物を 500 mM NaOH, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA-NaOH, 25% Glycerol, 0.5 mM DTT を含む 20 mM HEPES-KOH (extraction buffer) で4°C、1時間攪拌した。遠心後、上清を 0.5 mM EDTA-NaOH, 50 mM KCl, 10% Glycerol, 0.5 mM DTT を含む 20 mM HEPES-KOH (binding buffer) で透析し、核蛋白抽出液とした。75 pmol の合成 oligo nucleotide を T4 kinase (Nippon Gene) を用いて γ-[³²P]ATP (Amersham biosciences) で標識し、プローブを作成した。核タンパク抽出液とそれぞれの Probe を binding solution (5mM MgCl₂, 2.5% Glycerol, 1mg BSA, 1 % NP-40, 50mM KCl) 中で30分混和し、6 % アクリルアミドゲルで140V、1.5時間泳動した。ゲルを乾燥後、オートラジオグラフィで解析を行った。

2.2.2.4. 3D-clinorotation（三次元培養法）

L6 細胞を37°C、5 %CO₂の条件下で、100 μg/ml ストレプトマイシン、100 IU/ml ペニシリン G を含む増殖培地を用いて、ほぼ100%コンフルエントまで静地培養した。ウェル内を培地で満たし密閉後、小型クリノスタット PMS-VI の試料台に固定した。X 軸11.0 rpm、Y 軸13.0 rpm の条件で回転培養した。コントロールとして、他の条件はそのまま静地培養したものを用いた。一部の実験では10 μM の mitogen-activated protein kinase (MAPK) 経路阻害剤 (Calbiochem) を1時間前処理した。

2.2.2.5. Real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法

総 RNA に終濃度 $1\mu\text{M}$ oligo-dT primer、 $10\mu\text{M}$ random primer、 0.5mM dNTPs (Promega)、 100U MLV reverse transcriptase (Promega) を加え 42°C 、60分間、 95°C 、5分間逆転写反応を行い、cDNA を合成した。合成した cDNA に Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) とプライマーを加え、PCR 反応を行った。内部標準として glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を用いた。PCR 反応は、まず 50°C 、2分間プレヒートし、 95°C 、10分間でタックポリメラーゼを活性化させた。その後、 95°C 、15秒間の熱変性、 60°C 、1分間のプライマーとの結合、cDNA 伸長反応を40サイクル繰り返した。

2.2.2.6. ウェスタンブロット法

タンパク質 ($30\mu\text{g}$) を SDS 化後、ポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行った。ゲル中のタンパク質をセミドライプロット装置 (ATTO) を用いて Polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜 (Bio-Rad) に転写した。転写後、PVDF 膜を 4% 精製ミルクカゼインで 1時間ブロッキングし、0.05% Tween-20 を含む PBS (PBS-T) で洗浄した。次に、膜を一次抗体 (抗 Egr 抗体 (Santa Cruz Biotechnology)、抗 Cbl-b 抗体 (Santa Cruz Biotechnology)、抗 MAPK 抗体 (Cell Signaling)) と 37°C で 1時間反応させた。洗浄後、さらに二次抗体 [抗ウサギ IgG 抗体 (Amersham)、または抗マウス IgG 抗体 (Amersham)] と 37°C で 1時間反応させた。洗浄後、Enhanced Chemiluminescence 検出システム (Amersham) を用いて抗体と反応したタンパク質を検出した。

7) RNA 干渉法による遺伝子のノックダウン

L6 細胞を 37°C 、5% CO_2 の条件下で、増殖培地を用いて 24時間培養した。培地を Opti-MEM (GIBCO) に替え、Lipofectamine2000 (Invitrogen) を用いて 100nM の合成 Egr-1、Egr-2、Egr-3 siRNA (B-Bridge International, Inc.) をトランスフェクションした。72時間後、示した時間 3D-clinorotation 培養した。その後グアニジンイソチアシン酸-フェノール-クロロホルム混合溶液 (Nippon Gene) により総 mRNA を抽出した。

2.2.3. 結果

2.2.3.1. 酸化ストレスによる Cbl-b 発現の誘導

酸化ストレスによる Cbl-b mRNA の発現量を検討した。L6 筋芽細胞において、 $100\mu\text{M}$ と $250\mu\text{M}$ の H_2O_2 処理をしたところ、それぞれ 6時間と 12時間をピークとする Cbl-b mRNA の増大を確認した。

2.2.3.2. 模擬微小重力 (3D-clinorotation) による酸化ストレスの誘導

酸化ストレス感知試薬 (carboxy- H_2 DCFDA) を前処理した L6 筋芽細胞を 3D-clinorotation に曝露させ、細胞内の蛍光強度を観察した。コントロール (Vehicle 処理) では蛍光を発する細胞は見られなかった。一方、3D-clinorotation に供した L6 細胞は、 H_2O_2 処理した細胞と同程度の酸化ストレスの蓄積が観察された。N-Acetyl-L-cysteine の前処理によりこの蛍光は消失した。

2.2.3.3. ヒト Cbl-b プロモーター解析

ヒト Cbl-b 遺伝子の酸化ストレス応答領域をルシフェラーゼアッセイにより解析した。Cbl-b 遺伝子の上流 -2072 bp を含むルシフェラーゼベクターは、 H_2O_2 処理に反応してルシフェラーゼ活性を増加させた。上流 -292 bp および -111 bp を含むルシフェラーゼベクターも同様に H_2O_2 に反応したが、上流 -59 bp および +217 bp を含むルシフェラーゼベクターは、 H_2O_2 に反応しなかった。この知見により、Cbl-b 上流遺伝子の酸化ストレス応答領域は上流 -111 bp から -60 bp に存在することがわかった。

そこでこの領域を 3つのプローブに分け、ゲルシフトアッセイを行った。 H_2O_2 処理後の L6 細胞の核抽出タンパク質に、Probe 1 および Probe 2 に結合するものはなかった。ところが、Probe 3 は H_2O_2 に反応する核タンパク質の結合をとらえることができた。さらに、Probe 3 の変異体 Mt 1 および Mt 2 のうち Mt 2 のみこの核タンパク質と結合しなかった。この結果より、未同定の転写調節因子は、Egr-1 や Sp1 のコンセンサス配列に結合することが示唆された。

最後に、これらの転写調節因子に対する抗体を用いてスーパーシフトアッセイを行った結果、Egr-1、Egr-2、Egr-3 の抗体は、Probe 3 と結合する核タンパク質の量を有意に減少させた。一方、Sp1 の抗体は Probe 3 と核タ

ンパク質との結合に影響を与えなかった。以上の所見より、Cbl-b 遺伝子の主要な転写調節因子は Egr であることがわかった。

2.2.3.4. Unloading ストレスによる Egr および Cbl-b の発現

L6 筋芽細胞の 3D-clinorotation による Egr および Cbl-b mRNA の発現パターンを検討した。興味深いことに、3D-clinorotation 後1.5時間で Egr の発現量がピークに達し、そのさらに1.5時間後に Cbl-b mRNA の発現量が増大した。これらの 3D-clinorotation による誘導はタンパク質レベルでも確認できた。さらに、L6 筋管細胞を 3D-clinorotation に曝露した場合でも、L6 筋芽細胞を H₂O₂処理した場合でも、Egr と Cbl-b mRNA の反応は同じであったことから、筋芽細胞も筋管細胞も Unloading ストレスに対する応答機構はほぼ同じであると考えられた。

2.2.3.5. Unloading ストレスによる Egr 発現誘導シグナル経路の特定

Unloading ストレスがどのようなシグナル経路を介して Egr 発現を誘導しているのかについて、Egr の発現に重要である MAP キナーゼ経路を中心に検討した。3D-clinorotation に曝露後、約30分で MAP キナーゼ ERK、JNK、p38のすべてがリン酸化したので、MAP キナーゼシグナルのそれぞれの経路に特異的な阻害剤を用いて、Egr 発現に参与する主要な MAP キナーゼ経路を特定した。Egr mRNA の発現は ERK 経路の阻害剤によってのみ有意に抑制された。これらの所見から、Unloading ストレスによる Egr の発現は、MAP キナーゼ ERK シグナル経路を介していることが示された。

2.2.3.6. Egr 遺伝子ノックダウンによる Cbl-b mRNA 発現への影響

Unloading ストレスにより活性化する Egr 群のうち、どの Egr が最も重要な働きをしているのかを検討するため、Egr-1、Egr-2、Egr-3 の siRNA を用いて Cbl-b mRNA 発現に対する影響を解析した。まず初めに、それぞれの siRNA の特異性を確認した。それぞれの siRNA は標的遺伝子の発現量を特異的に約30%まで抑制した。しかしながら、Egr-1、Egr-2、Egr-3 それぞれの siRNA 処理では 3D-clinorotation による Cbl-b mRNA の発現上昇を抑制できなかった。次に、すべての siRNA を同時に処理すると Cbl-b mRNA の発現上昇が著明に抑制された。以上の結果から、Egr-1、Egr-2、Egr-3 は Unloading ストレスによる Cbl-b 発現の主要な転写調節因子であり、それぞれは互いに代償できることが示唆された。

2.3. 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。以下は、地上研究で得られた結果に対する考察である。

今年度の地上研究により、微小重力モデルである 3D-clinorotation により H₂O₂処理と同程度の酸化ストレスが L6 筋芽細胞内に蓄積することを証明した。ヒト Cbl-b 遺伝子の転写開始点から上流-70 bp 付近に酸化ストレス応答領域が存在することを明らかにした。さらに、その酸化ストレス応答領域には転写調節因子 Egr-1、Egr-2、Egr-3 が結合することから、これら Egr 群が Unloading ストレスの重要な感知分子の一つであることが示唆された。

L6 筋管細胞を 3D-clinorotation に曝露した場合でも、L6 筋芽細胞を H₂O₂処理した場合でも、Egr と Cbl-b mRNA の反応は同じであった。これにより、筋芽細胞や筋管細胞の Unloading に対する感知機構はほぼ同じであり、Egr 群が重要な働きをしていることが示唆された。

本研究において、Egr-1、Egr-2、Egr-3 それぞれの siRNA 処理では 3D-clinorotation による Cbl-b mRNA の発現上昇を抑制しなかった。しかしながら、すべての siRNA を同時に処理すると Cbl-b mRNA の発現上昇が著明に抑制された。このことから、Egr-1、Egr-2、Egr-3 は Unloading ストレスによる Cbl-b 発現の主要な転写調節因子であり、それぞれは互いに代償できることが示唆された。

今回の実験結果から、3D-clinorotation 刺激が細胞内に酸化ストレスを発生させ、それに引き続いて MAPK 経路が活性化していると考えられた。さらに阻害剤の添加実験により、Unloading による Egr の発現が、ERK シグ

ナル経路を介していることを明らかにした。しかしながら、Unloading ストレスがどのように酸化ストレスを誘導するのかは不明である。近年、TGF- β 刺激が培養細胞内に H₂O₂ を発生させることが報告されており、筋膜上の受容体が酸化ストレス誘導に関与しているのかもしれない。今後、細胞内酸化ストレス発生機序についてさらなる検討が必要である。

本研究により、酸化ストレス、ERK 経路に続く転写調節因子 Egr の活性化が Unloading ストレス感知の重要な経路であることが明らかとなった。機械的刺激をシグナル伝達分子に変換し、遺伝子発現を制御するこの経路は、廃用性筋萎縮の治療法を開発するための新規の分子ターゲットとなりうると考えた。また、この経路の解明により、骨格筋における再生の活性化や障害の抑制を目的とする薬剤の開発や、効果的な運動トレーニング法の確立につながると確信している。今後は、機械的ストレス感受性を持つ受容体や、受容体直下ではたらくシグナル伝達因子の検索、細胞内酸化ストレスの発生機序の解明などを中心に検討し、Unloading ストレス感知の分子機構の全貌を明らかにしたい。

3. まとめ

本フライト実験候補テーマは、2009年初頭のフライト実験実施を目指して準備を進めており、今年度は実験計画のベースライン化が承認され、開発フェーズに移行した。また、地上実験で得られた結果も、フライト実験の価値を高めるための予備データとして蓄積されてきている。

平成19年度は、今年度制作した実験供試体の検証モデルを用いて各種適合性試験（用いる培養細胞と細胞培養容器の適合性、培地や固定液の交換効率の確認）や実験手順の詳細化作業を行う予定である。また、地上予備実験として、(1) 疑似微小重力環境を用いて、フライト実験で予定している手順をシミュレートし実験的に検証、(2) Cbl-b 調節機構のさらに上流の分子（真の Unloading Stress の受容体）の探索を行う予定である。

4. 成果発表

- [1] Suzue N., Nikawa T., Onishi Y., Yamada C., Hirasaka K., Ogawa T., Furochi H., Kosaka H., Ishidoh K., Gu H., Takeda S., Ishimaru N., Hayashi Y., Yamamoto H., Kishi K., Yasui N., "Ubiquitin ligase Cbl-b downregulates bone formation through suppression of IGF-I signaling in osteoblasts during denervation", *J. Bone Miner. Res.*, **21**, 722-734, 2006.
- [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 through a 1,25-dihydroxyvitamin D-dependent pathway" *J. Bone Miner. Metab.*, **24**, 291-299, 2006.
- [3] Ogawa T., Furochi H., Mameoka M., Hirasaka K., Onishi Y., Suzue N., Oarada M., Akamatsu M., Akima H., Fukunaga T., Kishi K., Yasui N., Ishidoh K., Fukuoka H., Nikawa T., "Ubiquitin ligase gene expression in healthy volunteers with 20-day bedrest", *Muscle Nerve*, **34**, 463-469, 2006.
- [4] Shimooka R., Yasuhiro K., Chiba N., Tanaka J., Rokutan K., Furochi H., Hirasaka K., Nikawa T., Kishi K., "Soy protein diet prevents hypermethioninemia caused by portacaval shunt in rats", *J. Med. Invest.*, **53**, 255-263, 2006.
- [5] Sato T., Yamamoto H., Sawada N., Nashiki K., Tsuji M., Muto K., Kume H., Sasaki H., Arai H., Nikawa T., Taketani Y., Takeda E., "Restraint stress alters the duodenal expression of genes important for lipid metabolism in rat", *Toxicology*, **227**, 248-261, 2006.
- [6] Nikawa T., Nakao R., Asanoma Y., Hayashi R., Furochi H., Hirasaka K., Kishi K., "A skeletal muscle-derived secretory protein, attractin, upregulates UCP-2 expression in mouse 3T3-L1 adipocytes", *Biol. Sci. Space*, **20**, 33-39,

2006.

- [7] Furochi H., Nikawa T., Hirasaka K., Suzue N., Ishidoh K., Onishi Y., Ogawa T., Yamada C., Suzuki H., Higashibata A., Oarada M., Kishi K., Yasui N., “Distinct gene expression profiles in the femora of rats exposed to spaceflight, tail-suspension and denervation”, *Biol. Sci. Space*, **20**, 80–91, 2006.
- [8] Oarada M., Gono T., Tsuzuki T., Igarashi M., Hirasaka K., Nikawa T., Onishi Y., Toyotome T., Kamei K., Miyazawa T., Nakagawa K., Kashima M., Kurita N., “Effect of dietary oils on lymphocyte immunological activity in psychologically stressed mice”, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**, 174–182, 2007.
- [9] Nakano S., Mishiro T., Takahara S., Yokoi H., Hamada D., Yukata K., Takata Y., Goto T., Egawa H., Yasuoka S., Furochi H., Hirasaka K., Nikawa T., Yasui N., “Distinct expression of mast cell tryptase and protease activated receptor-2 in synovia of rheumatoid arthritis and osteoarthritis”, *Clin. Rheumatol.*, 2007 (Epub ahead of print).
- [10] Takahashi H., Nakao R., Hirasaka K., Kishi K., Nikawa T. “Effects of Single Administration of Rokumi-gan (TJ-87) on Serum Amino Acid Concentration of 6 Healthy Japanese Male Volunteers” *J. Med. Invest.*, in press.

宇宙航空研究開発機構特別資料 JAXA-SP-06-034

発行日 平成 19 年 3 月 30 日
編集・発行 宇宙航空研究開発機構
〒182-8522 東京都調布市深大寺東町 7-44-1
URL : <http://www.jaxa.jp/>
印刷・製本 藤原印刷株式会社

本書及び内容についてのお問い合わせは、下記にお願いいたします。
宇宙航空研究開発機構 情報システム部 研究開発情報センター
〒305-8505 茨城県つくば市千現 2-1-1
TEL : 029-868-2079 FAX : 029-868-2956

©2007 宇宙航空研究開発機構

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

