

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 10 月 18 日現在

機関番号：32653

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2019

課題番号：16K15195

研究課題名(和文)微小重力ストレスにおけるオルガネラ機能障害の時空間的解析と宇宙環境利用への提言

研究課題名(英文)Organelle homeostasis in microgravity environment

研究代表者

榊 建二郎 (Kenjiro, Sakaki)

東京女子医科大学・看護学部・准教授

研究者番号：70509968

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：近年、人類は宇宙へと進出して長期宇宙滞在を実現し、宇宙空間を活用した様々な研究開発を通して科学技術の更なる発展を進めている。また同時に、前提となってきた地上重力を失った状況で健康的に生活するためのリスク評価の必要性に迫られている。本研究は、種々の疾患や生理機能障害と深く関連する細胞内小器官の恒常性維持(オルガネラ品質管理)に焦点を当て、この問題に取り組んだ。オルガネラ品質管理について確立されている小胞体に関して微小重力が及ぼす影響を解析したが、これまでに明確な変化は観察されていない。現在、他の細胞内品質管理機構との連携が小胞体での変化を代償している可能性を考慮し、解析を継続している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では当初予想された微小重力による小胞体恒常性維持への影響が、明確には観察されないことを示した。更なる解析を要するが、小胞体とミトコンドリアの連携が微小重力で活発化することが近年報告されつつあることを考えると、ミトコンドリア品質管理機構などの他の細胞内品質管理機構との連携によって代償されている可能性も考えられる。今後はそのようなオルガネラ間でのダイナミックな連携に注目して研究を進展させることが重要と考えられる。

研究成果の概要(英文)：Recently, human beings have succeeded long-term staying in space. This big advance gives us the new question "How we adapt to this environmental change in space" that should be critical for healthcare of astronauts at space colonies. To assess this question, we analyze the effect of microgravity on homeostasis in eukaryotic cells. In this research, we focused on homeostasis in the endoplasmic reticulum (ER) of which protein quality control system (ERQC) and stress response against ER dysfunction (UPR[ER]) have been well-cleared in comparison with the other organelle. As the results of gene analysis by using the nematode *C.elegans*, which is the most simple and established genetic model organ, we cannot find a critical effect on the expression of UPR genes in microgravity. Furthermore, microscopic analysis also revealed that ER morphology was not changed in microgravity.

研究分野：生化学 細胞生理学

キーワード：オルガネラ品質管理 微小重力 小胞体

1. 研究開始当初の背景

地球上に存在するあらゆる生命体にとって、セントラルドグマに沿った遺伝子発現は生命活動の基盤として不可欠なものである。その過程では、産生される RNA やタンパク質を監視して異常産物を分解・除去する「細胞内品質管理」と呼ばれる防御システムが働くことで、より精度の高い遺伝子発現を実現し、多彩な生理機能を根底から支えている。

特にタンパク質品質管理は、それぞれの細胞内小器官(オルガネラ)においてシャペロン蛋白質の介助により折り畳まれた新生タンパク質のフォールディング状態を監査し、構造異常タンパク質を「オルガネラタンパク質分解」によって分解する。また遺伝的・環境的要因による異常タンパク質の蓄積(オルガネラストレス)を感知し、「オルガネラストレス応答」を介して遺伝子発現を調節し、タンパク質フォールディングやタンパク質分解を強化することで恒常性を維持する。このようなタンパク質品質管理を介したオルガネラ機能の恒常性維持は「オルガネラ品質管理」と総称され、その破綻が糖尿病や神経変性疾患、がんなど多岐に渡る疾病と深く関連することが近年明らかとなり、その分子機構を解明すべく世界中で精力的な研究が進められている。

近年、国際宇宙ステーション(ISS)での継続的な宇宙滞在が実施され、宇宙空間を活用した様々な実験を通して科学技術の発展に大きく貢献している。また長期滞在が可能になったことで、宇宙飛行士の健康管理が重要な課題となり、細胞・個体レベルでの研究が進められている。そのような中で近年、微小重力によって細胞骨格の形状が大きく変化し、細胞の機能や形態に影響を及ぼすことが報告された。これは細胞骨格を基盤に細胞全体に張り巡らされた構造を持つ小胞体やミトコンドリアには多大なる影響を与えるものであり、同じく細胞骨格に支えられている核との通信を含めて、オルガネラ品質管理にただならぬ影響があると考えざるを得ない。また、これらの事象は長期宇宙滞在における健康管理や疾患の発症リスクを考慮する上で無視できないものであるにも関わらず、これに関する研究は過去に行われていない。

2. 研究の目的

代表者はこの研究分野において、分泌タンパク質生合成の中心である小胞体でのタンパク質品質管理(小胞体品質管理)を軸に研究を展開し、分子機構や生理的役割の解明に迫る数々の発見を行ってきた。特に重要な点として、「RNA 品質管理と小胞体品質管理のクロストークの発見(PNAS 2012)」や「小胞体ストレスによるオートファジー誘導(JBC 2008)」など、様々な細胞内品質管理とのダイナミックな相互作用が小胞体の恒常性維持において基盤的役割を果たすことを明かした。

本研究ではオルガネラスタシス研究における代表者の経験を活かし、また日本航空宇宙機構(JAXA)による協力の下で、世界で初めてこの問題に取り組む。重要なポイントとして、微小重力がオルガネラ膜動態(オルガネラダイナミクス)とオルガネラ品質管理に及ぼす影響を明らかにする。モデル生物・線虫 *C. elegans* を用いた組織別オルガネラストレス発生モニター系を構築し、より迅速で簡便に微小重力によるオルガネラストレスの影響を時空間的に解析する。疾患モデル(変異体)を含めて生理的な影響について評価を行い、世代内・世代間での疾患発症のリスク評価データの集積を行う。

本研究は、(1)簡便かつ迅速に組織別のデータを集積できる線虫の強みを活かすことで、宇宙滞在という特殊性ゆえに被験体数が限定されてしまうヒトや高等動物での疾患リスク評価に有用な情報を提供する。(2)昨今、宇宙環境を利用した再生医療技術の開発が進められる中で、時空間的に組織別でのリスク評価を行う本研究結果は、より安全な組織再生の実現に向けて極めて重要な情報となる。といった将来的な発展が見込めるものである。

3. 研究の方法

本研究では、オルガネラホメオスタシスが特に詳しく解析がなされている小胞体とミトコンドリアを対象に、それぞれの恒常性維持のために働く小胞体ストレス応答(UPR[ER])およびミトコンドリアストレス応答(UPR[mit])の遺伝子応答について検討を行った。方法としてはUPR応答遺伝子群に関する定量 RT-PCR による発現解析と、代表的な応答遺伝子 BiP および HSP60 の線虫ホモログ hsp-4 および hsp-60 の蛍光レポーター株(zcls4, zcls9)を用いた顕微鏡観察を行った。また小胞体形態観察のための蛍光レポーター株(hjls14)を用いて小胞体のオルガネラダイナミクスの観察を行った。

微小重力実験は 3D クリノスタット PMS-VII (AES 社) を用いた。培養はガス透過性密閉培養器である DCC (千代田化工建設) を用いた。培養条件は大腸菌 OP50 (OD=2.5) と 0.75% メチルセルロースを含む液体培養用培地 (S-medium) で、20 °C の温度条件下で行った。1G 対照としては、培地と線虫を封入した DCC を 20 °C で静置したものをを用いた。

4. 研究成果

野生型線虫株 (N2) について、次亜塩素酸ナトリウムと水酸化ナトリウム処理により生育を同調した上で、卵の段階から 16 時間と 24 時間、L1-L2 幼生期の段階から 16 時間と 24 時間の 4 種類の条件で微小重力実験を行った。RNA を抽出した上で、UPR[ER] および UPR[mit] の応答遺伝子群について定量 RT-PCR を行ったが、顕著な発現変化を示す遺伝子は無かった。また、zcls4 および zcls9 を用いたレポーター解析でも、大きな発現の変化は認められなかった。

UPR[ER] に関しては 3 つの伝達経路 (IRE1 経路, PERK 経路, ATF6 経路) が知られており、いずれかに障害がある際には他の経路が代償することが知られている。そのため各経路を欠損した遺伝子破壊株 *ire-1(v33)*, *pek-1(ok275)*, *atf-6(tm1153)* 株を用いて、微小重力実験を行った。定量 RT-PCR 解析の結果、一部の遺伝子群に若干の発現変化が認められたものの、1G コントロールとの間で顕著な発現変化を示す遺伝子はなかった。

小胞体のオルガネラ動態への影響を調べるために、*hjl-14* 株について L1-L2 期から 24 時間、微小重力に晒した上で蛍光顕微鏡観察を行った。その結果、核周縁に分布する小胞体が減少する傾向が観察されたが、細胞内分布に顕著な変化は観察されなかった。

これまでの実験では、UPR[ER] と UPR[mit] については微小重力空間において顕著な影響が認められなかった。しかし哺乳動物での実験では、細胞骨格系が微小重力の影響を受けることと連動して、細胞骨格に構造的基盤を持つミトコンドリアの形態変化が起きることが報告されている。また近年では小胞体とミトコンドリアの接合 (MAM) が微小重力応答に関与することも報告されつつある。そのため、それぞれのオルガネラの恒常性が影響を受けないことは、やや不可解な点もある。

1 つの可能性としては、哺乳動物と異なり、線虫ではオルガネラホメオスタシスに重力環境が重要ではないということが考えられる。もう 1 つの可能性としては、他の細胞内品質管理機構が代償的に働くことで小胞体やミトコンドリアの恒常性を維持していることが考えられる。

代表者らの研究からオートファジーやナンセンス依存 RNA 分解 (NMD) といった細胞内品質管理機構が小胞体品質管理機構と連携を取って小胞体の恒常性維持に働いていることが明らかとなっている。現在、これらの細胞内品質管理機構の相互作用が微小重力環境でどのように影響を受けるかについて、解析を行っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 末廣勇司, 榊建二郎, 吉名佐和子, 堀沙耶香, 出嶋克史, 岩田悟, 三谷昌平	4. 巻 79(3)
2. 論文標題 ラットの坐骨神経と下肢骨格筋を用いた容積導体と神経 骨格筋間の信号伝達機構を学ぶ実習	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 日本生理学会誌	6. 最初と最後の頁 44-48
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kenjiro Sakaki
2. 発表標題 C.elegans as a model system to study Unfolded Protein Response
3. 学会等名 2018 Fall International Convention of The Pharmaceutical Society of Korea (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	澤 斉 (Sawa Hitoshi)	国立遺伝学研究所・多細胞構築研究室・教授 (63801)	
研究協力者	三谷 昌平 (Mitani Shohei)	東京女子医科大学・医学部・教授 (32653)	
連携研究者	東端 晃 (Higashibata Akira) (30360720)	国立研究開発法人宇宙航空研究開発機構・有人宇宙技術部門・主任開発員 (82645)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------