

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：82645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26506029

研究課題名(和文) 線虫の宇宙環境応答分子群の同定と発生過程におけるクリティカルポイントの探究

研究課題名(英文) Exploration of the molecules responding to space environment and the critical points in development of nematodes

研究代表者

東端 晃 (Higashibata, Akira)

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・主任研究開発員

研究者番号：30360720

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：過去の宇宙実験から、重力変化により筋肉やエネルギー代謝をはじめとする生体内の重要な分子群は、遺伝子発現に変化をもたらすことが見出されている。本研究は、線虫を材料とし、クリノスタットを用いた重力変化により影響を受ける分子群の同定と、重力変動が発生過程に与えるクリティカルポイントを探ることを目的とした。遺伝子発現解析の結果、発生の初期段階から体の形成に関連する分子が変化を示し、重力を感知する機構が体形成の過程に存在することが示唆された。発生の後半では、タンパク質のリン酸化に関連する分子群は模擬微小重力環境で発現が増大するなど、宇宙でも見られる重力変化の代謝機構への影響が考えられた。

研究成果の概要(英文)：In the past space flight experiments, we observed the effects of microgravity on the genes expression related with muscles and energy metabolisms. The purpose of this study is to know the molecules that were influenced by gravity changes, and to investigate the critical points on the developmental process of *Caenorhabditis elegans* known as a model organism. The worms were grown under artificial microgravity condition on a clinostat that was an apparatus widely used for experiments for gravity effects on the ground. The expression level of body morphogenesis related genes showed the changes in the early developmental phase by clinorotation. The result suggested that the body morphogenetic process was sensitive against the gravity changes. During the latter half of the developmental phase of the worms, the artificial microgravity effects were observed on the molecules related with protein phosphorylation that had been also observed in the space experiments.

研究分野：分子生物学

キーワード：微小重力 線虫 トランスクリプトーム クリティカルポイント

1. 研究開始当初の背景

生物が宇宙環境に滞在した際、微小重力によって生体に様々な影響が見られ、特に筋肉や骨については、地上に比べて構造的にも機能的にも低下することがよく知られている。提案者はこれまでモデル生物の線虫 (*Caenorhabditis elegans*) を用いた宇宙実験を数回実施し、宇宙飛行士でも見られるような筋肉の萎縮が線虫においても見られることを確認している。特にミオシン重鎖とトロポニンに関連する分子の遺伝子およびタンパク質発現は顕著に減少することが明らかとなっている。また、微小重力環境では線虫の運動能力が低下していること、また、エネルギー代謝に関する分子群の発現低下が見られることも示されている。

2. 研究の目的

胚発生直後の *C. elegans* は 556 個の体細胞をもち、その後成虫に至るまでに 959 個の細胞へと分裂する (Sulston J.E. *et al.*, *Dev. Biol.*, 56, 110-156, 1977)。したがって各環境によって発動する遺伝子発現変化についても生育段階によって特異的なものが見出される可能性がある。上記に挙げた宇宙実験の結果は、すべて成虫の段階における結果であったため、発生過程において微小重力の影響がどのポイントでどのように効果を示すのか、そのクリティカルポイントを明らかにすることが重要であると考えられた。そこで本研究では、微小重力環境を模擬するために広く使われるクリノスタットを用いて、線虫の成長過程における遺伝子の発現変化を把握する実験系を組み立てた。線虫は孵化直後の L1 幼虫から 3.5 日ほどで成虫にまで成長するため、孵化後 1 日から 3 日目まで日毎にサンプリングし、クリノスタットによる遺伝子の発現への経時的な影響を網羅的に解析することを目的とした。

3. 研究の方法

実験に供する線虫は成虫からアルカリブリーチ法により卵を取り出し、成長を同期させた。採卵翌日の孵化した L1 幼虫を餌となる大腸菌 OP-50 と共にプラスチック容器に封入した。培養の容器は宇宙実験で用いられる密閉型プラスチック容器を用いた。L1 幼虫をクリノスタット (図 1) に設置して、3 日間、20 で培養した。封入から 1 日ごとに成虫になるまでの 3 日間 1 日毎に線虫をサンプリングした。得られた各生育段階の線虫から RNA

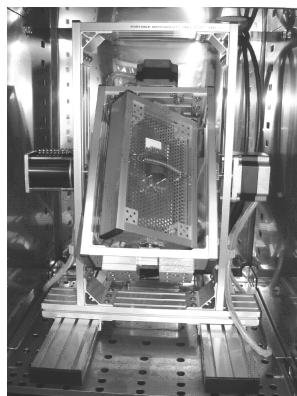


図 1 クリノスタット

を抽出処理し、DNA マイクロアレイに供した。網羅的な遺伝子発現解析は解析ソフトウェアにより処理をした。

4. 研究成果

DNA マイクロアレイ解析において各実験群の遺伝子発現量が対照群より統計学的に 2 倍以上の変化を示すもの抽出し、ジーンオントロジー (GO: Gene Ontology) 解析を行った。

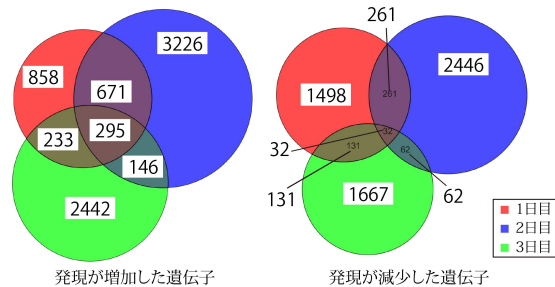


図 2 クリノスタット上で培養した線虫の経時的な遺伝子発現変化

(1) 成長過程全日にわたって共通的に発現が変動する遺伝子

遺伝子発現解析の結果、1 日目から 3 日目に採取した試料の全てにおいて共通的に発現が増加する遺伝子が 295 遺伝子抽出され (図 2) その中に小胞体アンフォールドタンパク質応答、クチクラ構成成分、ストレス応答性分子群が見出された。一方、1 日目から 3 日目全日に渡り共通的に減少する遺伝子は 32 遺伝子のみであり、GO 解析では特徴は認められなかった。

特に、クチクラ構成成分やストレス応答性分子群は、過去の宇宙実験でもその変動は捉えられており、今回のクリノスタットの結果とも一致していることから、重力変化をストレスとして感知し、特に体表成分に影響が現れ易いと考えられる。

(2) 成長過程の特定時期に発現が変動する遺伝子

成長過程の特定時期別に変動する遺伝子数を比較したところ、1 日目に変動を示す遺伝子が最も少なく、発現が増加する群は 2057 遺伝子、減少する群は 1922 遺伝子であった (図 2 の赤い円)。この群での特徴としては、フラボノイド代謝関連遺伝子群の発現の増加および体形成、脱皮、hedgehog 受容体活性に関する遺伝子群の発現の減少が認められた。定常的に発現増加が見られたクチクラ成分や 1 日目に発現減少が見られた hedgehog タンパク質など、発生の早い段階において体の形成に関与する分子群が多く変動していることは興味深い。また、孵化後 2 日目に発現の差が多く見られるものが最も多く、発現増加を示す群は 4338 遺伝子、減少する群は 2801 遺伝子であった (図 2 の青い円)。この群では、耐性幼虫の負の制御、微小管由来タンパク質の輸送、食行動の調節に関する遺伝

子群の発現が増加し、アポトーシス・細胞増殖の制御に関する遺伝子群の発現が減少した。さらに、3日目では、中間径フィラメント・細胞骨格関連遺伝子群が増加し、走化性および SCF 依存性プロテオソームユビキチンタンパク質の異化過程に関する遺伝子群が減少することが分かった。

GO 解析により変動パターンを整理してみると、時間経過とともに増加から減少、あるいはその逆のパターンを示すものも見出された。軸索やアセチルコリン等の神経伝達物質の代謝に関する遺伝子群は、2日目に発現増加し、3日目に減少することが分かった。一方で、免疫応答やタンパク質・ペプチドのリン酸化に関する遺伝子群は、2日目に発現が減少し、3日目に発現が増加した(図3)。

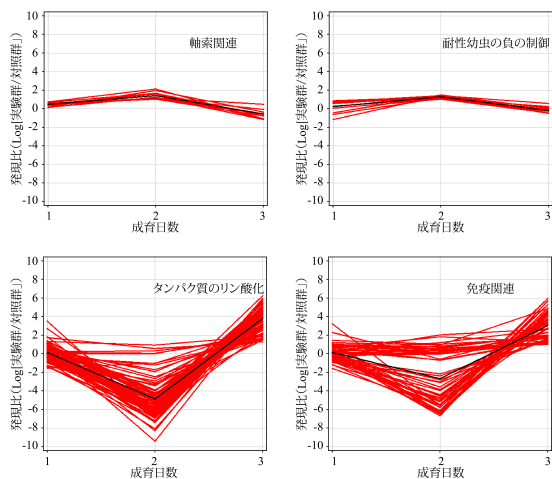


図3 時間経過とともに発現が増加から減少、減少から増加へと変動する遺伝子群

(3) クリノスタット上で培養した線虫の体長について

過去に行った宇宙実験では、微小重力環境下で成育した線虫は、1G環境で成育した線虫に比べて5%程度体長が短くなること分かっている(Higashibata A. et al., npj Microgravity, 2, 115022, 2016)。本研究でのクリノスタット

上で成育した線虫についても、孵化後からの各成育日数において有意に体長が小さくなることを見出された(図4, 表1)。

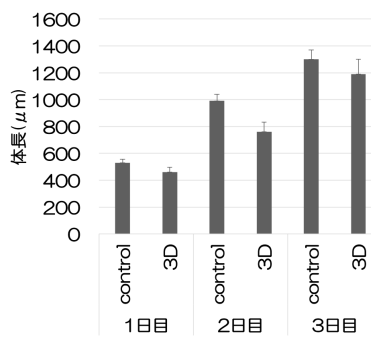


図4 クリノスタットによる体長変化

表1. クリノスタット上で培養した線虫の体長

	1日目	2日目	3日目
体長比*	0.87	0.77	0.92

*体長比(クリノスタット培養群/対照群)(n=150)

(4) 本研究から得られた結果からの考察

クリノスタットによる重力変化が生じると、線虫の発生初期段階から体形成・成長に関連する分子の遺伝子群に発現変動が起こり体形成において負の方向に影響を受けていることが示唆された。過去の宇宙実験の結果においても同様な傾向が見られていることから、重力を敏感に感受する機構が体形成の過程に存在すると考えられる。また、体形成の関連遺伝子群の低下の後に、神経系の遺伝子発現が増加することにより神経伝達物質を産生し、その後、タンパク質・ペプチドのリン酸化および脱リン酸化活性を高めることで、体内の代謝調節を行っている可能性が考えられる。さらに、時間軸に関係なく応答することが明らかになった小胞体アンフォールドタンパク質応答遺伝子は、重力応答性遺伝子として重要な意味を持つ可能性があり、微小重力下ではタンパク質の折りたたみ構造の正確性に影響が出る可能性も示唆された。

引用文献

Sulston J.E., Horvits H.R., Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*, *Dev. Biol.*, **56**, 110-156, 1977.

Higashibata A., Hashizume T., Nemoto K., Higashitani N., Etheridge T., Mori C., Harada S., Sugimoto T., Szewczyk N.J., Baba S.A., Mogami Y., Fukui K., Higashitani A., Microgravity elicits reproducible alterations on cytoskeletal and metabolic gene and protein expression in space-flown *Caenorhabditis elegans*, *npj Microgravity*, **2**, 2016, 15022, doi: 10.1038/npmgrav.2015.22

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計2件)

Higashibata A., Hashizume T., Nemoto K., Higashitani N., Etheridge T., Mori C., Harada S., Sugimoto T., Szewczyk N.J., Baba S.A., Mogami Y., Fukui K., Higashitani A., Microgravity elicits reproducible alterations on cytoskeletal and metabolic gene and protein expression in space-flown *Caenorhabditis elegans*, *npj Microgravity*, **2**, 2016, 15022, doi: 10.1038/npmgrav.2015.22

Harada S., Hashizume T., Nemoto K., Shao Z., Higashitani N., Etheridge T., Szewczyk N.J., Fukui K., Higashibata A., Higashitani A., Fluid dynamics alter *Caenorhabditis elegans* body length via TGF- β /DBL-1 neuromuscular signaling, *npj Microgravity*, **2**, 2016, 16006, doi: 10.1038/npmgrav.2016.6

〔学会発表〕(計 10 件)

Higashibata A., Hashizume T., Nemoto K., Higashitani N., Etheridge T., Mori C., Harada S., Sugimoto T., Szewczyk NJ., Baba SA., Mogami Y., Fukui K., Higashitani A., Alteration of muscle, cytoskeleton, and mitochondria evokes caloric restriction in spaceflown nematodes, 11th Asian Microgravity Symposium, 2016, Hokkaido University, Sapporo.

Harada S., Hashizume T., Nemoto K., Shao Z., Higashitani N., Etheridge T., Szewczyk NJ., Fukui K., Higashibata A., Higashitani A., Neuromuscular signaling via TGF- β /DBL-1 acts to alter body physique in response to environmental conditions, 11th Asian Microgravity Symposium, 2016, Hokkaido University, Sapporo.

橋爪 藤子、梅原 真澄、東谷 篤志、東端 晃、クリノスタートで培養した線虫の体長と遺伝子発現の経時的解析、第 62 回日本宇宙航空環境医学会大会日本宇宙生物科学会第 30 回大会合同大会、2016 年 10 月 13-15 日、愛知医科大学(愛知県長久手市)

梅原 真澄、橋爪 藤子、東谷 篤志、東端 晃、線虫の重力変化応答を探るための至適成育環境の検討、第 62 回日本宇宙航空環境医学会大会日本宇宙生物科学会第 30 回大会合同大会、2016 年 10 月 13-15 日、愛知医科大学(愛知県長久手市)

梅原 真澄、橋爪 藤子、門間 健太、東谷 篤志、矢野 幸子、東端 晃、線虫 *C. elegans* の輸送条件の最適化 -Nematode Muscles 地上予備試験を通じて-、日本宇宙生物科学会第 29 回大会、2015 年 9 月 26-27 日、帝京大学(東京都板橋区)

橋爪 藤子、栗山 可奈、長田 郁子、大島 里佳、滝浦 舞、東端 晃、東谷 篤志、矢野 幸子、Epigenetics 宇宙実験で用いた線虫 *C. elegans* の継世代培養方、日本宇宙生物科学会第 29 回大会、2015 年 9 月 26-27 日、帝京大学(東京都板橋区)

東端 晃、橋爪 藤子、東谷 なほ子、馬場 昭次、東谷 篤志、微小重力環境における線虫の筋肉およびエネルギー代謝に関する遺伝子変化、日本宇宙生物科学会第 29 回大会、2015 年 9 月 26-27 日、帝京大学(東京都板橋区)

内田 貴之、安倍 知紀、近藤 茂忠、真板(大野)綾子、中尾 玲子、平坂 勝也、小林 剛、曾我部 正博、東端 晃、石岡 憲昭、武田 伸一、二川 健、無重力によ

る筋細胞内シグナル・トランスダクション、日本宇宙生物科学会第 29 回大会、2015 年 9 月 26-27 日、帝京大学(東京都板橋区)

東谷 篤志、東端 晃、橋爪 藤子、微小重力と宇宙放射線との複合効果；線虫の宇宙と地上実験からの再考、日本宇宙生物科学会第 29 回大会、2015 年 9 月 26-27 日、帝京大学(東京都板橋区)

Higashitani A., Takiura M., Monma K., Higashitani N., Hashizume T., Ooshima R., Kuriyama K., Osada I., Sano H., Higashibata A., “Epigenetics” and “Nematode Muscles” in the next *C. elegans* space experiments, 日本宇宙生物科学会第 28 回大会、2014 年 9 月 22-23 日、大阪府立大学(大阪府堺市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)
取得状況(計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

東端 晃(HIGASHIBATA, Akira)
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・主任研究開発員
研究者番号：30360720

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

東谷 篤志(HIGASHITANI, Atsushi)
橋爪 藤子(HASHIZUME, Toko)
梅原 真澄(UMEHARA, Masumi)