

機関番号	82645
研究種目	研究活動スタート支援
研究期間	2009～2010
課題番号	21800096
研究課題名(和文)	「筋活動変化に対するメダカ骨格筋の影響；メダカはヒトのモデルになり得るのか？」
研究課題名(英文)	The effects on skeletal muscles in medaka of the various muscle activities; Can medaka be a model organism for human skeletal muscle researches?
研究代表者	寺田 昌弘 (MASAHIRO TERADA)
	独立行政法人宇宙航空研究開発機構 有人宇宙環境利用ミッション本部 宇宙航空プロジェクト研究員
	研究者番号：10553422

研究成果の概要(和文)：宇宙飛行士に生じる筋萎縮のメカニズム解明にメダカをモデル生物として用いられるかを検討するため、本研究では筋活動変化によってメダカ骨格筋がどのように変化するかを調べた。メダカ骨格筋凍結切片を作製し、免疫組織化学的染色によって遅筋・速筋を検出した。また、レーザーマイクロダイセクションによって遅筋・速筋を分離して回収し、筋萎縮時に高発現することが知られているユビキチンリガーゼ発現をリアルタイム RT-PCR によって検出した。

研究成果の概要(英文)：In this study, it is aimed to examine whether medaka can be studied as a model organism for skeletal muscle fiber atrophy in astronauts who stayed in space for long time. Therefore, we observed how the skeletal muscle of medaka was effected by the change of the muscle activity. The frozen cross-section of medaka was cut. Then, we detected the slow and/or fast skeletal muscle by the immunohistochemical staining. Moreover, by Laser Micro-Dissection (LMD) method, the slow and fast skeletal muscle fibers were dissected from the frozen cross-sections. And we analyzed the expression of the ubiquitin ligase by real-time RT-PCR.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,070,000	321,000	1,391,000
2010年度	960,000	288,000	1,248,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,030,000	609,000	2,639,000

研究分野：筋生理学、宇宙医学

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学、スポーツ科学

キーワード：メダカ、骨格筋、宇宙、レーザーマイクロダイセクション

1. 研究開始当初の背景

宇宙飛行士は、微小重力環境下に長期間さらされると筋活動の低下により骨格筋が萎縮することが知られている。この筋萎縮は特に抗重力筋であるヒラメ筋に著しく、速筋化

も生じる。宇宙滞在による骨格筋の機能低下は、長期滞在をする宇宙飛行士にとっては大きな問題となる。軌道上実験においては、宇宙飛行後、ラット骨格筋において2つのユビキチンリガーゼ、Cbl-b と Siah-1A の発現が

増加することが報告されている。また、宇宙空間滞在中の下肢への負荷除去を擬似したヒト対象ベッドレスト実験においても Cbl-b と atrogen-1 といった2つのユビキチンリガーゼが上昇するという報告もある。

15 日間のスペースシャトルによる宇宙飛行中に、メダカは産卵行動を行い、正常に発生・孵化すること、尾びれではなく主に胸びれを用いて泳ぎ、地上への帰還後は正常な浮き袋の使用ができず沈むという現象が観察された。また、遠心機により 5G を負荷するとメダカの背骨が湾曲するという観察がある。これらのことから、微小重力がメダカへ何らかの影響を及ぼしていることは行動観察から推測される。メダカはヒトと遺伝的に相同しており、軌道上での筋萎縮の原因のひとつと考えられるユビキチン系タンパク分解経路も存在している。また、ユビキチンリガーゼの atrogen アミノ酸配列がヒト・マウス・メダカで多くの部分が共通している (図-1)。したがって重力影響によって、メダカ骨格筋がヒトやラットと同様にユビキチンリガーゼを介して変化する可能性がある。しかし、現在メダカは軌道上で用いることのできるヒト以外の唯一の脊椎動物であるにもかかわらず、メダカの筋肉に着目した研究は国内外でもほとんど行われていない。

2. 研究の目的

そこで本研究では、宇宙飛行士に生じる筋萎縮のメカニズム解明にメダカをモデル生物として用いられるかを検討することを目的に、筋活動変化によってメダカ骨格筋がどのように変化するかを調べた。

3. 研究の方法

本実験では、メダカが軌道上滞在時に主に利用すると考えられる胸ヒレ付近の骨格筋に着目した。筋不活動モデルとして宇宙メダカを低温飼育した群、ならびに胸ヒレの活動抑制モデルとして胸ヒレを切除した群、胸ヒレのない変異体である PL 系統の 3 群間で比較を行った。

メダカ個体を MS-222 を用いて麻酔し、液体窒素で冷却したイソペンタン中で瞬間凍結し、メダカ体躯をコルク片に OCT コンパウンドを用いて固定し、クリオスタット (Leica CM1850) を用いて凍結横断切片を作成した。連続凍結切片を用いて、メダカの速筋・遅筋をそれぞれ F59 抗体と S58 抗体 (Sant Cruz) ならびに Laminin 抗体 (abcam)、DAPI の 3 重染色を行った。染色した切片は蛍光顕微鏡で観察し、胸ヒレ付近の骨格筋における速筋・遅筋の分布を調べた。また、Laminin 染色画

像では ScionImage ソフトを用いて、骨格筋線維の横断面積を測定し筋萎縮度合いを比較した。

また、レーザーマイクロダイセクション装置 (Leica LMD6000) を用いて、凍結切片よりメダカの速筋・遅筋部分を別々に採取し ISOGEN を用いて mRNA を抽出し、リアルタイム RT-PCR によりユビキチンリガーゼである atrogen-1 の遺伝子発現を定量した。

さらに、メダカ Hd-rR 系統を用いて、5 日間飢餓状態においた個体と通常給餌した個体の速筋と遅筋を比較した。飢餓個体 2 匹、通常給餌個体 2 匹について、速筋部分と遅筋部分を含む部分をそれぞれメスで切り取り、Total Protein Extraction Kit (BioChain) を用いてタンパクを抽出した。SDS-PAGE を行ったサンプルを LC-MS/MS (ZAPLOUS, AMR) を用いて解析し、Mascot により、発現しているタンパク質を同定した。

4. 研究成果

免疫組織化学的染色において、F59 抗体によって速筋が S58 抗体によって遅筋がそれぞれ鮮明に染色された。速筋はメダカ横断切片全体に分布していたが、遅筋は胸ヒレ付近にはほとんど分布していなかった。遅筋の分布はメダカ背筋付近に見られたが、その割合は非常に少なかった。また、S58 抗体で染色された筋線維は F59 抗体でも染色された (図-2)。このことによって、メダカの遅筋線維は遅筋特有のミオシン重鎖タンパクのみでなく速筋特有のミオシン重鎖タンパクも発現しておりハイブリット筋線維だと考えられる。同一個体内での遅筋線維 (ハイブリット線維) と速筋線維の横断面積を比較すると遅筋線維 (ハイブリット線維) が著しく小さいことが判明した (図-3)。

レーザーマイクロダイセクション装置 (Leica LMD6000) を用いて、低温飼育群と対照群の凍結切片よりメダカ速筋・遅筋 (ハイブリット筋) 部分を別々に採取し atrogen-1 の遺伝子発現を定量した。その結果、低温飼育群の速筋線維では atrogen-1 の発現が上昇していた (図-4)。遅筋線維での動向は現在検討中である。

以上の結果より、メダカでは遅筋特有のタンパク質のみを発現している筋線維は胸ヒレ付近ならびに背筋付近には分布しておらず、ハイブリット筋線維が背筋付近にわずかに分布している。また、ハイブリット筋は速筋線維に比較して著しく細い線維であることが判明した。低温飼育により速筋においてはユビキチンリガーゼである atrogen-1 の発

現が上昇しており、より筋萎縮が生じやすい状態であることが考えられる。

LC-MS/MS 分析からは、飢餓状態の遅筋において 1 度目の分析では、753 個のタンパク質の発現が見られ、2 度目では、432 個の発現が示唆された。このうち、飢餓状態の遅筋と通常状態の遅筋に共通に発現していて、飢餓状態の速筋にも、通常状態の速筋にも発現していない遅筋特異的と思われるタンパク質が 6 個同定された。また、飢餓個体の速筋、遅筋とともに発現しているが、通常状態の速筋、遅筋には発現していない、飢餓状態で特異的に発現していると思われるタンパク質が 2 個同定された。

ユビキチンリガーゼ atrogen1 アミノ酸配列

ヒト MPFLGQDWRSPGQNWVKTADGWKRFLDEKSGSFVS-DLSSYCN--KEVYNKENLFSNLSN
 マウス MPFLGQDWRSPGQSWVYKTADGWKRFLDEKSGSFVS-DLSSYCN--KEVYSKENLFSNLSN
 メダカ MPFLGQDWRSPGQNWVKTEDGWKKTITLE-ENNKVSMESFCKVKEEFCFNKELLISLIG

ヒト YDVAAKKRKKDMLNSKTKTYFHQEKWIYVHKGSTKERHGYCTLGEAFNRLDFSTAILDS
 マウス YDVAAKKRKKDIQNSKTKTYFHQEKWIYVHKGSTKERHGYCTLGEAFNRLDFSTAILDS
 メダカ YEMSAKKRRKDLNANNTRKAPYFHREKWIYVHKGSTKERHGYCTLGEAFNRLDFCSAIKIDT

ヒト RRFNYVVRLEELIAKSQITSLSGIAQKNFMNLEKVVVKVLEDDQNTIRLIRELLQTLVYS
 マウス RRFNYVVRLEELIAKSQITSLSGIAQKNFMNLEKVVVKVLEDDQNTIRLIRELLQTLVYS
 メダカ RRFNYVVRLEELIAKSQITSLSGVAQKNYMNILERVVQKVLDDQNVRIKELLQTLVYS

ヒト LCTLVQVRVGSVLVGNINMWVYRMEITLHWQQQLNIIQTRPAFKGLITFDLPLCLQLNI
 マウス LCTLVQVRVGSVLVGNINMWVYRMEITLHWQQQLNIIQTRPAFKGLITFDLPLCLQLNI
 メダカ LCGLVQDMGKSVLVGNINMWVYRMEITLHWQQQLDNIQINRPTCTGMITDLPLASLQLSI

ヒト MQRISDGRDLVSLGQAAPDLHVLSEDRLLWKKLCQYHFSERQIRKRLILSDKGQLDWKKM
 マウス MQRISDGRDLVSLGQAAPDLHVLSEDRLLWKKLCQYHFSERQIRKRLILSDKGQLDWKKM
 メダカ MDRISDGRDLVSLGQVCPGLVITLSEDRLLWKKLCHYHFTDRQIRRLMVSDEKGLIEWKKM

ヒト YFKLVRCYPRREQYGVITLQCKHCHILSWKGTDPHPTANNPESCSVSLSPQDFINLKF
 マウス YFKLVRCYPRREQYGVITLQCKHCHILSWKGTDPHPTANNPESCSVSLSPQDFINLKF
 メダカ YFKLVRCYPRREQYSDTLHFCTHCHILFWK---DHPCTANNPENCMTSLSPQDFINLKF

Figure 1: The comparison of amino acid sequence of atrogen1 between human, mice, and medaka.

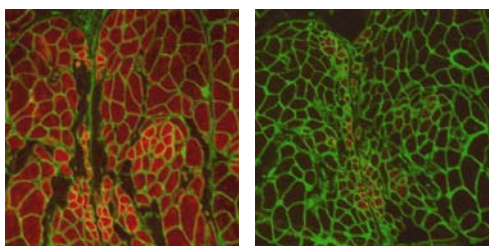


Figure 2: The image of the staining for fast (left) and slow (right) skeletal muscle fibers in the back muscle of medaka. Red: fiber type, Green: Laminin (basal membrane)

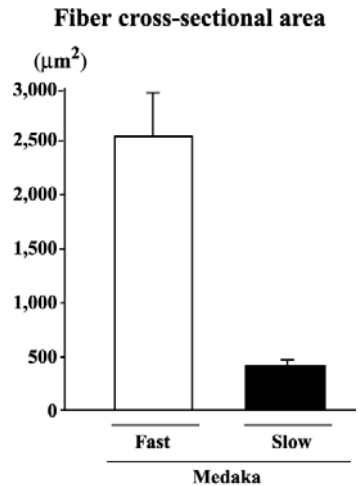


Figure 3: The comparison of the cross-sectional area between fast and slow skeletal muscle.

atrogin-1 遺伝子の発現量

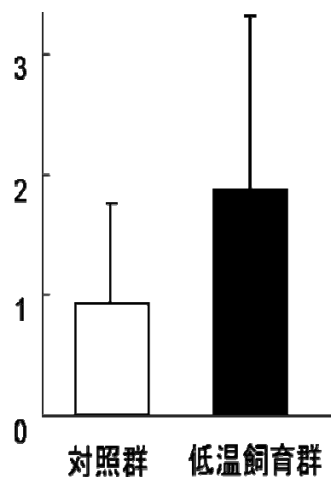


Figure 4: The comparison of the gene expression of atrogen-1 in fast skeletal muscle fibers.

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)

[学会発表] (計 3 件)

- [1] 寺田昌弘、メダカを対象とした骨格筋解析ならびに心電図解析、第 56 回日本宇宙航空環境医学会大会、2010 年 11 月 12 日、所沢市。
- [2] 寺田昌弘、メダカ骨格筋の評価法の検討；メダカ骨格筋は宇宙で萎縮するのか？、日本宇宙生物科学学会第 24 回大会、2010 年 9 月 17 日、仙台市。
- [3] 寺田昌弘、メダカ骨格筋を対象とした評

働法の検討、第 18 回日本運動生理学会大会、
2010 年 7 月 31 日、鹿児島市。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

寺田 昌弘 (TERADA MASAHIRO)
独立行政法人宇宙航空研究開発機構 有
人宇宙環境利用ミッション本部 宇宙航
空プロジェクト研究員
研究者番号：10553422

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：