

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：82645

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23700856

研究課題名(和文) 骨格筋萎縮メカニズム；ラット・マウス・メダカ骨格筋を比較して

研究課題名(英文) The mechanism of the skeletal muscle atrophy; comparing rats and mice, medaka.

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・宇宙科学研究所・研究員

研究者番号：10553422

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：後肢懸垂は長期間後肢を床から浮かせて飼育するため、後肢への機械的負荷を減少させることができる。一方、宇宙滞在マウスでは宇宙環境での微小重力によって、体全体の自重がかからない。特にマウスの後肢においては筋萎縮が宇宙環境では顕著に生じることが知られている。そのため、2つのモデルを比較することによって、後肢の筋萎縮メカニズムに関する重要な知見を得ることが期待できる。本実験では、マウス骨格筋からRNAを抽出して、DNAマイクロアレイ解析を行った。解析で得られたデータはGene Spring 11.1によって情報学的な解析を実施した。

研究成果の概要(英文)：We can simulate the skeletal muscle atrophy by using hindlimb suspension model. It was known that the skeletal muscle was atrophy during space staying. In this experiment, we compare these two models, hindlimb suspension and space flown mice, to investigate the mechanism of the skeletal muscle atrophy. We extracted RNA from these samples. RNA was hybridized to the Whole Mice Genome (4 X 44K) Oligo Microarray (Agilent Technologies) according to the manufacturer's protocol. Slide scanning was performed using the Agilent DNA Microarray Scanner.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学、応用健康科学

キーワード：筋萎縮

1. 研究開始当初の背景

宇宙環境と骨格筋：

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。しかし、2003年のスペースシャトルコロンビア号の事故以来、軌道上実験においてヒト以外の哺乳類を用いる *in vivo* 骨格筋研究が十分にできない状態である。現在、国際宇宙ステーション「きぼう」日本実験棟における第1期利用テーマとして培養細胞を用いた二川らの *in vitro* 実験が終了している。

宇宙におけるメダカ研究：

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、過Gを負荷したり、高齢になるとメダカに身体的変化が生じ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。メダカのゲノムはヒトのものと同様性が高く、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 (Figure 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

宇宙飛行士の軌道上滞在中の筋萎縮は、高齢者や長期臥床患者の廃用性筋萎縮と極めて似ている。宇宙飛行士と筋萎縮のメカニズムを解明することは、宇宙飛行士のみならず高齢者や長期臥床患者の健康管理のために極めて重要な課題である。この課題を解決するために、ヒトの筋モデルとしてラット・マウス・メダカ骨格筋を用いる。メダカは今後宇宙実験で用いられる予定であり遺伝子は非常にヒトとよく似ている。しかし、メダカ骨格筋研究はほとんど行われておらず、ヒト骨格筋とどの程度共通しているかは不明で

ある。そこで本研究は、メダカをすでに多くの骨格筋研究が行われているラット・マウスと比較することによって、骨格筋に關与する遺伝子・タンパク質発現の変化がどの程度哺乳類とメダカで共通であるかどうかを明らかにし、宇宙飛行士の筋萎縮予防や高齢者や長期臥床患者の効果的なトレーニング方法の開発に向けたメダカ骨格筋研究の可能性を見出す。また、宇宙飛行したマウスの骨格筋を解析することによって、筋萎縮メカニズムを解明する。

3. 研究の方法

メダカ実験では、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。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。

マウス実験においては、皮膚遺伝子変化と骨格筋遺伝子変化の共通点を探った。骨格筋においては、後肢懸垂モデルと宇宙滞在モデルを比較した。後肢懸垂は長期間後肢を床から浮かせて飼育するため、後肢への機械的負荷を減少させることができる。一方、宇宙滞在マウスでは宇宙環境での微小重力によって、体全体の自重がかからない。特にマウスの後肢においては筋萎縮が宇宙環境では顕著に生じることが知られている。そのため、2つのモデルを比較することによって、後肢の筋萎縮メカニズムに関する重要な知見を得ることが期待できる。これらマウス骨格筋から RNA を抽出して、DNA マイクロアレイ解析を行った。また、遺伝子発現の定量を行うためにリアルタイム PCR 解析も実施した。解析で得られたデータは Gene Spring 11.1 によって情報学的な解析を実施した。

4. 研究成果

メダカ実験では、これまで取り組んできた実験の継続として、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。これまで、低温飼育群の速筋線維では atrogen-1 の発現が上昇していた結果を得ている (Figure 2、研究活動スタート支援・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? 課題番号 21800096 より)。

マウス実験においては、サンプルシエにより 2 種類の宇宙滞在マウスサンプルを得た。1 つ目は、マウス飼育装置(MDS)を用いた 13 週間の長期宇宙滞在マウス、2 つ目は、小動物飼育装置(AEM)を用いた 2 週間の短期宇宙滞在マウスである。これらのサンプルシエ研究により、マウスの体毛付き皮膚のストレス応答関連タンパク質やタンパク質合成、さらに細胞老化に關与する遺伝子群の発現変動を DNA マイクロアレイおよびリアルタイム PCR によって解析した。

リアルタイム PCR の結果、宇宙長期滞在マウスの皮膚では、抗酸化酵素であるカタラーゼや SOD3 の遺伝子発現が上昇していることが確認された(Figure 3)。また、ストレス応答遺伝子である *Gadd45g* が長期フライトで明らかに上昇していることが確認出来た(Figure 4)。

これらのことから、長期宇宙滞在による様々なストレスの影響で、体内の活性酸素が上昇し、それに伴い抗酸化酵素の発現量が上昇したことが考察出来た。宇宙実験で線虫は寿命が延びるという報告があるが、マウスでは宇宙滞在の影響で細胞老化が促進する方向に遺伝子の発現が変動していることが示唆された。

また、後肢懸垂マウスの骨格筋と 1 か月軌道上に滞在したマウスの骨格筋の DNA マイクロアレイ解析も実施した。これらのデータを皮膚の遺伝子解析結果と比較して、共通した変化が見られるかを検討した。その結果、いくつかの遺伝子では同じような発現変化をしていたものもあったが、まったく逆の変化をした遺伝子もあった。

ユビキチンリガーゼ atrogin アミノ酸配列

ヒト	MPFLGQDWRSFGQNVVKTADGWKRFLDEKSGSFVS-DLSSYCN--KEVYNKENLFNLSLN
マウス	MPFLGQDWRSFGQNVVKTADGWKRFLDEKSGSFVS-DLSSYCN--KEVYSKENLFFSLN
メダカ	MPFLGQDWRSFGQNVVKTEDGWKKTITLLENKVSME-SFKVKKEEFCFNKENLLISLG
ヒト	YDVAAKKRKDKMLNSKTKTQYFHQEKWIYVHKGSTKERHGYCTLGEAFNRLDFSTAILDS
マウス	YDVAAKKRKDKIQNSKTKTQYFHQEKWIYVHKGSTKERHGYCTLGEAFNRLDFSTAILDS
メダカ	YEMSAKKRRKDLMNNTKAPYFHKREKWIYVHKGSTKERHGYCTLGEAFNRLDFCSAIAKDT
ヒト	RRFNYYVRLLELIAKSQLTSLSGIAQKNFMNILEKVVLLKVLQEDQNNRILRELLQTLTYTS
マウス	RRFNYYVRLLELIAKSQLTSLSGIAQKNFMNILEKVVLLKVLQEDQNNRILRELLQTLTYTS
メダカ	RRFNYYVRLLELIAKSQLPSSLGVAQKNYMNILERVVQKVLDDQNNRIPKELLQTLTYVS
ヒト	LCTLVQRVQKSVLVGNINMWWYRMEITLHWQQQLNNTIQRPAFKGLITFDLPLCLQLNI
マウス	LCTLVQRVQKSVLVGNINMWWYRMEITLHWQQQLNNTIQRPAFKGLITFDLPLCLQLNI
メダカ	LCGLVQDMGKSVLVGNINMWWYRMEITLHWQQQLNNTIQRPAFKGLITFDLPLCLQLSI
ヒト	MQRISDGRDLVSLGQAAFDLHVLEDRLLWKLQYHFSEQRIRKRLISDKGQLDWKMKM
マウス	MQRISDGRDLVSLGQAAFDLHVLEDRLLWKLQYHFSEQRIRKRLISDKGQLDWKMKM
メダカ	MDRLSDGRDLVSLGQVCFELGVLTEDRLLWKLCHYHFTDRQIRRLMVSDEKGLHLEWKKM
ヒト	YFKLVRCYPRKEQYGDITLQCKKHCHILSWKGTDPHPTANNPESCSVSLSPQDFINLKF
マウス	YFKLVRCYPRKEQYGVITLQCKKHCHILSWKGTDPHPTANNPESCSVSLSPQDFINLKF
メダカ	YFKLVRCYPRKEQYSDTLHFCVTHCHILFWK----DHPCTANNPENC TMSLSPQDFINLNF

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

atrogin-1 遺伝子の発現量

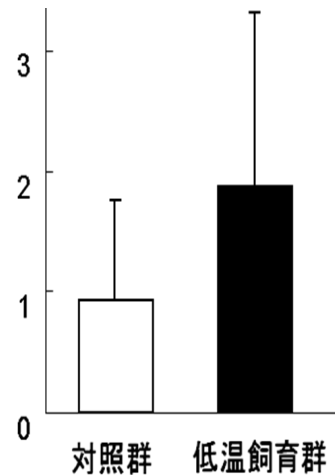


Figure 2: The comparison of the gene expression of atrogin-1 in fast skeletal muscle fibers.

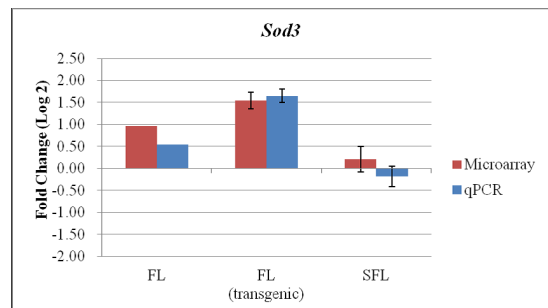


Figure 3: The SOD3 gene expression on mice skin.

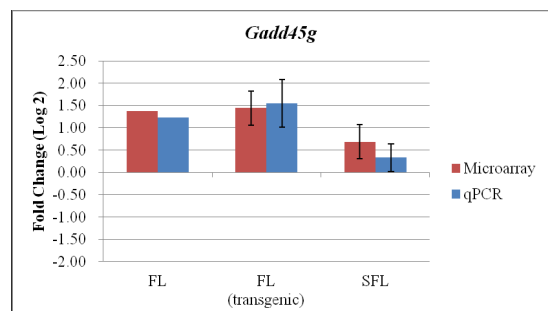


Figure 4: The Gadd4g gene expression on mice skin.

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 1 件)

1. Terada, M., Seki, M., Higashibata, A.,

Yamada, S., Takahashi, R., Majima, H., Yamazaki, T., Watanabe-Asaka, T., Niihori, M., Mukai, C., Ishioka, N. Genetic analysis of the human hair roots as a tool for spaceflight experiments. *Advances in Bioscience and Biotechnology* 4: 75-88, 2013.

〔学会発表〕(計3件)

1. Terada, M., Yamada, S., Seki, M., Takahashi, R., Higashibata, A., Majima, H., Ohshima, H., Ohira, Y., Ishioka, N., Mukai, C., The Effects on Gene Expression on Human Hair and Mice Skin by Spaceflight, American Society for Gravitational and Space Biology, 29th Annual Meeting, Orland, FL, USA, November 3-8, 2013. (poster)
2. Terada, M., Yamada, S., Seki, M., Takahashi, R., Higashibata, A., Majima, H., Ohshima, H., Ohira, Y., Ishioka, N., Mukai, C., The Genetic Analyses on Human Hair and Mice Skin, 19th IAA Humans in Space Symposium, Cologne, Germany, July 7-12, 2013. (Poster)
3. 寺田昌弘、山田深、関真也、高橋理佳、東端晃、馬嶋秀行、大島博、石岡憲昭、向井千秋、宇宙飛行による毛髪での遺伝子変化、第36回日本分子生物学会年会、神戸、2013年12月3-6日(ポスター)

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・宇宙科学研究所・研究員

研究者番号：10553422