

第7章 モデル生物線虫*C.エレガンス*を用いた宇宙環境利用実験 -CERISEの報告-

東北大学 大学院生命科学研究科
東谷篤志、根本華奈子、森ちひろ、東谷なほ子
JAXA 東端晃、杉本朋子、山崎丘
AES 橋爪藤子
JSF 福井啓二、鈴木ひろみ
英国ノッティンガム大学 Nathaniel J. Szewczyk、Timothy Etheridge

A Space Utilization Experiment Using an Experimental Model Organism the Nematode *Caenorhabditis elegans* – A Report of CERISE experiment –

Graduate School of Life Sciences, Tohoku University
Atsushi Higashitani, Kanako Nemoto, Chihiro Mori, Nahoko Higashitani
JAXA Akira Higashibata, Tomoko Sugimoto, Takashi Yamazaki
AES Toko Hashizume
JSF Keiji Fukui, Hiromi Suzuki
University of Nottingham Nathaniel J. Szewczyk、Timothy Etheridge

ABSTRACT Overcoming spaceflight-induced (patho)physiologic adaptations is a major challenge preventing long-term deep space exploration. RNA interference (RNAi) has emerged as a promising therapeutic for combating diseases on Earth; however the efficacy of RNAi in space is currently unknown. In this study, we performed a space utilization experiment using a model organism *Caenorhabditis elegans* to evaluate the RNAi activity and the effect of microgravity. In spaceflight, RNAi against green fluorescent protein (GFP) reduced chromosomal GFP expression in gonad tissue, which was not different from GC. RNAi against *rbx-1* also induced abnormal chromosome segregation in the gonad during spaceflight as on Earth. Finally, culture in RNAi against lysosomal cathepsins prevented degradation of the muscle-specific α -actin protein in both spaceflight and GC conditions. In addition, we also found that (1) reducing muscle protein contents and cytoskeleton components and (2) alterations to saving energy mode and calories restriction response without food starvation during spaceflight. These results suggest that RNAi may provide an effective tool for combating spaceflight-induced pathologies and muscle protein degradation. Furthermore, OMICS analyses indicate that global transcriptional alterations occur in space and it may be difficult to maintain the skeletal muscle mass by countermeasures employed with simple exercise.

1. はじめに

今回の宇宙実験 CERISE (*C. elegans* RNAi Space Experiment) においては、モデル生物の1つである線虫 *C. elegans* を用いて、(1) 宇宙環境下における RNA 干渉機構 (RNAi) の効果を世界に先駆けて検証するとともに、(2) ヒトが長期宇宙に滞在することにおいて大きな問題となる微小重力による筋萎縮のメカニズムの分子理解、(3) 宇宙環境ストレスにおける転写、翻訳、翻訳後修飾のタンパク質リン酸化などを通じたシグナル伝達応答に関する解明、これらを通して、宇宙の微小重力による個体・細胞・分子レベルでの影響について、proteome ならびに transcriptome 解析を中心に明らかにする。これらを通して、ヒトが宇宙において長期滞在する際の筋萎縮など負の影響を緩和・抑圧することにつなげることを究極の研究目的とする。

また、RNAi は、*C. elegans* において最初に発見され (Fire et al. 1998)、その後、植物からヒトに至る多くの生物においても有効な方法であり、ヒトの新たな遺伝子治療のひとつとして実用化が目指されている。従って、RNAi 法は、今後、実施される様々な生物の宇宙実験における逆遺伝学的な解析や、将来、人類が宇宙に長期滞在する際、骨粗鬆症や筋萎縮をはじめとする諸問題や各種病気を発病した際の遺伝子治療のひとつとしての利用も想定され、本実験における効果の検証は、基礎から応用に至り幅広く意義深いものになると考えている。

2. 宇宙実験の実施概要

CERISE 実験は 2005 年に募集された、第 5 回 International Space Life Science Working Group テーマ募集 (第 5 回 ライフサイエンス国際公募) において採択され、宇宙実験準備を開始した。2006 年に CERISE に関する実験計画についてベースライン化され、供試体・容器等の器具類開発が具体化した。供試体開発と軌道上手順が詳細化され、2008 年の秋に Increment 21/22 でのフライト実験を目指して実験計画が具体化した。CERISE では、線虫 (*C. elegans*) を培養バッグに封入して打ち上げるため、米国 NASA のケネディー宇宙センター (KSC) の実験室で線虫の各種変異株を準備する必要がある。この作業を確実に実施できるように、実際のフライト実験の約 1 年前の 2008 年 12 月に KSC で線虫の培養および実験部供試体の組み立てに関する現地リハーサルを実施した。

スペースシャトル・アトランティス号の打ち上げが 2009 年 11 月 16 日に決まり、約 1 か月前の 2009 年の 10 月から KSC においてフライト試料の準備を開始した。CERISE のサンプルを搭載したアトランティス号は予定どおり、2009 年 11 月 16 日に ULF3 (STS-129 ミッション) として打ち上げられた。アトランティス号が ISS にドッキング後、JEM にサンプルが輸送され、打ち上げから 2 日間室温で保管した後、打ち上げから 3 日目の 11 月 18 日から 25 日まで、JEM 内部の実験装置を用いた軌道上実験が実施された。先述のとおり、実験は 4 日目培養群と 8 日目培養群に分かれており、それぞれの群に対して μ G および 1G 群を設定した。培養は CBEF 内部の 20°C で行われ、予定の日数培養した後、CB 内部に設置された顕微鏡で生育状況および行動の様子について観察を行った。実験を終了したサンプルは、軌道上で冷凍保存した後、次フライトの STS-130 にて冷凍回収した。実験スケジュールを下に示す。

- ・試料・試薬準備(射場作業) :2009年10月23日～11月16日
- ・打上(スペースシャトル(STS-129)) :2009年11月16日
- ・培養 (4日培養群) :2009年11月18日～2009年11月22日(*1)
- (8日培養群) :2009年11月18日～2009年11月25日
- ・冷凍 :上記培養終了から2010年2月17日
- ・回収(スペースシャトル(STS-132)) :2010年2月21日

*1: 観察を行ったN2野生株 μ Gおよび1G群の2バックのみ通常の4日培養で冷凍されたが、その他、残りの計28バックは、4日培養群については、クルーのオペレーションミスによりサンプルが実験終了後33時間、キャビンに放置されていたため、実際の冷凍は23日に実施された。

今回、用いた実験供試体は、線虫を培養する培養バッグ(図1)と、先行のRad GeneおよびLOHで使用実績を持つサンプルホルダー(Type A)(図2)から構成される。

培養バッグは中央でピンにより2室に仕切られており、小スペースには線虫の第一幼虫(L1)、大スペースには餌となる大腸菌を封入した。軌道上でのクルー操作でピンを取り除き、線虫に大腸菌が給仕されることにより実験が開始された。



図.1 培養バッグ:左に大腸菌液、右に線虫



図.2 サンプルホルダー

3. 宇宙実験の結果

(1) 宇宙環境におけるRNAi効果の検証結果

はじめに、RNAiに関わるmachineryの遺伝子発現レベルについて、 μ Gおよび1G群、地上対照群のそれぞれで4日間育成させた成虫の個体、ならびに8日間育成させた第2世代の成虫個体から全RNAを抽出精製しプローブを作成して、DNAマイクロアレイによる発現解析を行った。その結果、RNase IIIのDicer、PIWIタンパク質、Argonaute、RIDE-4などのRNAi machineryのmRNA発現量は、いずれの育成条件においても有意な差は認められず、これらの遺伝子発現は重力の影響を受けないことが明らかになった。

次に、遺伝子組換えにより発現させた外来性緑色蛍光タンパク質(GFP)融合遺伝子の発現を

feeding RNAi法による発現抑制の活性評価に用いた。AZ212株 (*pie-1::GFP::histone H2B* 融合体)では、生殖腺内の卵母細胞の核内ならびに次世代の卵(初期胚)の核内においてGFPの強い蛍光が観察される。このL1幼虫に対して、GFP dsRNAを発現する大腸菌を餌として、4日間(実際には5.5日間)または8日間与えた第1、第2世代の成虫個体について、 μ Gおよび地上対照群で、同一の落射蛍光強度と露光時間での蛍光顕微鏡によるGFP強度の観察を行った。その結果、微小重力下においても地上対照区と同様にGFP dsRNAのfeeding RNAiにより、GFP発現シグナルが完全に消失することが確認された。それら頻度は、ほぼ80%強の個体で完全にシグナルが消失していた。

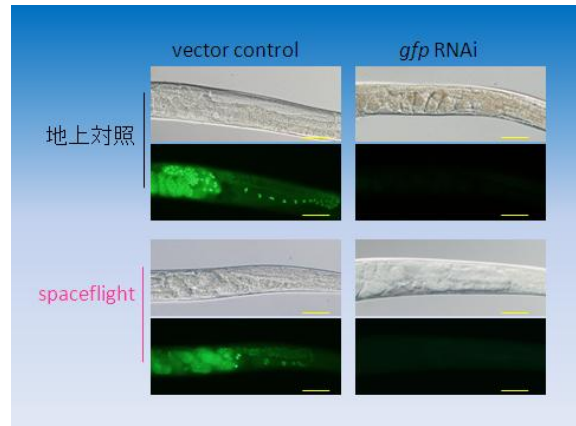


図.3 フライトサンプル第1世代における*gfp* RNAi効果

また、線虫ゲノム上にコードされている必須遺伝子ユビキチンリガーゼE3複合体の*rbx-1*遺伝子をターゲットとしたRNAiについての検証も行った。*rbx-1*遺伝子は、染色体の正常な分離分配過程や細胞周期の制御に必須であり、その欠損では核の不等分裂が高頻度に生じる(Sasagawa et al. 2003)。その結果、 μ G群と地上対照群のいずれにおいても、卵(初期胚)において、様々な核分裂の異常が確認された(図4)。一方で、GFPの蛍光強度には変化はみられず、ターゲット遺伝子に特異的なRNAi効果が確認された。

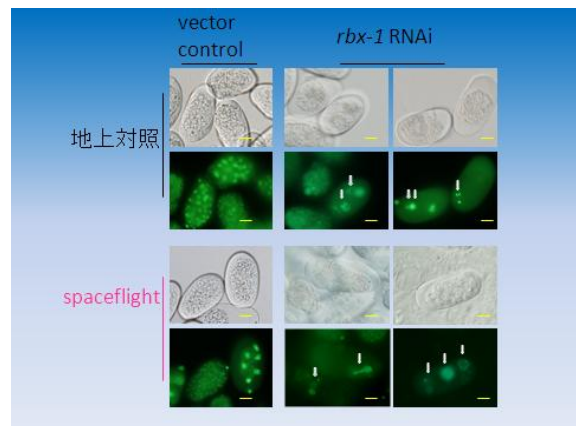


図.4 *rbx-1* RNAiにより生じる初期胚での核の分裂異常

最後に、lysosomeにおけるアスパルチルプロテアーゼ遺伝子*asp-4/asp-6* 両遺伝子のRNAiを同時に行った。ASP-4ならびにASP-6遺伝子産物は、lysosomeにおける様々なタンパク質の分解系に関与し、ネクロシス様の細胞死にも関わることを報告されている(Syntichaki et al. 2002)。同RNAiを行った結果、筋肉タンパク質の α -アクチンの分解は、 μ G群と地上対照群ともに顕著に抑えられること、一方、細胞骨格などに関わる β -アクチンの安定化は生じないことが明らかになった(図5)。

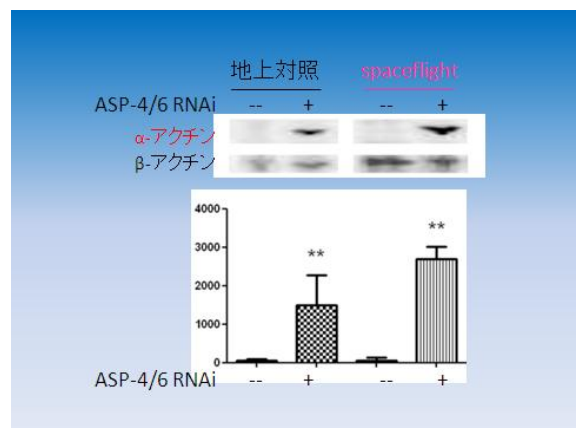


図.5 *asp-4/asp-6*RNAiによる α -アクチン安定化

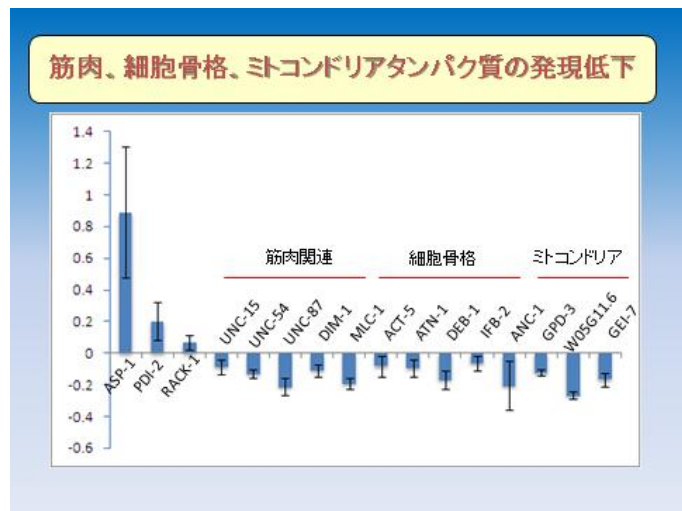
(2) μ Gによる筋関連遺伝子とそのタンパク質の発現抑制と分解系の活性化による筋萎縮機構

4日間ならびに8日間培養された野生型N2の μ G群、軌道上1G群と地上対照群の各バックから凍結サンプルの一部を融解し、成熟した成虫300匹を実体顕微鏡下(氷上)でピックして、5M Urea 2M Thiourea 0.5% CHAPSを含む溶液中で超音波破碎し、全タンパク質の抽出精製を行った。これら各200匹からのproteome解析は、全ての実験群でそれぞれ3反復、MALDI-TOF/TOF装置とiTRAQ標識による定量的なproteome解析を行った。その結果、578種のタンパク質を特定し、そのなかで μ G群において、1G群と地上対照群と比較して、43種が有意に発現量を低下し($p < 0.05$)、16種が増加する($p < 0.05$)ことを確認した。

特に、低下したものには筋肉に関連するタンパク質群ならびに細胞骨格タンパク質、そしてミトコンドリアのエネルギー生産や代謝に関わるタンパク質群が主なものであった。逆に、相対的に発現量が増加したものは、アスパルチルプロテアーゼASP-1タンパク質と翻訳伸長因子やリボソームタンパク質などであった(図6)。

図.6 宇宙微小重力

の影響により発現が変動したタンパク質



全ゲノム2万遺伝子に対するDNAマイクロアレイによる発現解析では、タンパク質の発現量の低下がみられた主要筋タンパク質の遺伝子群ならびに代謝関連遺伝子群、ミトコンドリアのエネルギー生産に関わる遺伝子群の多くが、mRNAの発現レベルでも低下し、一方、F-boxタンパク質をはじめとするユビキチンプロテアソーム系のタンパク質分解に関わる遺伝子群の多くの上昇が確認された。また、カロリー制限により発現誘導されるサーチェイン遺伝子 *sir-2.1* (Bamps et al. 2009) の発現量が増加し、その結果、SIR-2.1により抑制される遺伝子群の発現の低下が確認された。

さらに、軌道上の顕微鏡を用いて、 μ G群と1G群の野生型N2株の4日目のサンプルについて、ISSクルーによる顕微鏡観察を行い、その映像は、つくばのJAXA本部の管制室において配信を受けた(図7)。それら映像から、線虫の運動パターンの解析を行った。その結果、 μ Gで成育した個体では、S字型の運動の波長には変化がみられないが、振幅が少し低下するとともに、周波数ならびに波の速度、減衰率のいずれもが、1G群と比較して、



図.7 つくば管制室でのISS顕微鏡画像の配信

約6割にまで有意に低下することが確認された。これらの運動能力の低下は、微小重力下での成育により、筋肉タンパク質の低下やエネルギー生産の低下など起因する可能性が強く示唆された。

4. 結論

以上、前半の解析結果から、生殖細胞ならびに次世代の初期胚、lysosomeのいずれの組織におけるRNAiも、地上対照区と同様に微小重力区でも有効に作用することが検証できた。さらに、lysosomeのアスパルチルプロテアーゼ遺伝子の活性を調節することで、筋肉構成タンパク質のひとつ α -アクチンの分解を抑えることができることも今回、新たに証明できた。今後、様々な生物種のRNAi法を用いた宇宙環境下での逆遺伝学的ノックダウン実験や、将来、宇宙飛行士の長期宇宙滞在にとまらぬ骨粗鬆症や筋萎縮をはじめとする諸問題に対する遺伝子治療として、RNAi法が十分に活用できることを世界に先駆けて示せたといえる。この成果はPLoS One誌に発表するとともに、関連する総説の執筆依頼などを受け、国内外で高い評価を得た(Etheridge et al. 2011 a, b)。

また、後半のOMICSの解析結果から、約1,000個の体細胞からなる線虫 *C. elegans* は、成虫においても0.01mg程度であるが、微小重力の影響により筋萎縮が生じること、さらに、今回、新たに、細胞骨格タンパク質の発現量も有意に低下して、特に核やミトコンドリアをアンカーするタンパク質ANC-1が低下したことから、これらオルガネラの細胞内におけるポジショニングに重力が大きく関与している可能性が強く示唆された。耳石などを持たない線虫において、個々の細胞が微小重力を感受し、適応応答を行っていることが示唆された点は大きな発見といえる。

また、筋の萎縮には、新規合成の阻害と分解系の促進の大きく2つのプロセスが想定されるが、今回、宇宙フライトの線虫において、筋タンパク質の遺伝子発現が低下するとともに、多くのタンパク質分解系の活性化がみられたことから、新規合成の不活化ならびに分解系の活性化の両方が微小重力により促進している可能性が強く示唆された。

さらに、新規合成とも密接にかかわるミトコンドリアのエネルギー生産を含めた代謝活性の低下が生じること、ミトコンドリアDNAのコピー数も低下すること、そしてカロリー制限が生じることなどは、個々の細胞がそれぞれ微小重力に応答して「省エネモード」に入ったという新たな仮説につながるものといえる。

5. あとがき

これまでに、宇宙飛行士における骨や筋の萎縮を防ぐ目的で、バネなどの張力を利用したトレーニング方法ならびに食事メニューなどが考案され実際の軌道上でも実施されている。しかしながら、計算上の期待される効果は必ずしも得られず、その原因の特定にも至っていない。一方、今回の研究成果は、個々の細胞レベルで重力を感受し、個々の細胞が省エネルギーとカロリー制限の状況に至っている可能性を強く示唆するものであり、これらが、宇宙飛行士のトレーニング等の効果が期待を下回る原因につながるのかもしれない。宇宙飛行士などの個々の細胞においてもこのような

状況が発生しているかどうか、また、その対応に関して、ヒト培養細胞も含めた今後の宇宙利用研究の成果が期待される。

また、今回の宇宙実験において、筋タンパク質の減少、細胞骨格タンパク質の低下、ミトコンドリアエネルギー生産に関わるタンパク質の低下、サーチュイン遺伝子の活性によるカロリー制限の発動など、複数の応答が確認されたが、これらの応答の時系列ならびにそれぞれの因果関係を解明する研究が次なる大きな課題と考察される。これら課題を解くためには、それぞれのステップの突然変異系統やRNAiによるノックダウンを用いた宇宙実験を実施することで、時系列ならびに因果関係が明確にできるものと想像している。

参考文献

- Bamps S, Wirtz J, Savory FR, Lake D, Hope IA. The *Caenorhabditis elegans* sirtuin gene, *sir-2.1*, is widely expressed and induced upon caloric restriction. *Mechanisms of Ageing and Development* 2009; 130(11-12): 762-70.
- Etheridge T, Nemoto K, Hashizume T, Mori C, Sugimoto T, Suzuki H, Fukui K, Yamazaki T, Higashibata A, Szewczyk NJ, Higashitani A. The effectiveness of RNAi in *Caenorhabditis elegans* is maintained during spaceflight. *PLoS One* 2011(a); 6(6): e20459.
- Etheridge T, Nemoto K, Hashizume T, Mori C, Sugimoto T, Suzuki H, Fukui K, Yamazaki T, Higashibata A, Szewczyk NJ, Higashitani A. The next phase of life-sciences spaceflight research: harnessing the power of functional genomics. *Communicative & Integrative Biology* 2011(b); 4:6, 1-2.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998; 391(6669): 806-11.
- Sasagawa Y, Urano T, Kohara Y, Takahashi H, Higashitani A. *Caenorhabditis elegans* RBX1 is essential for meiosis, mitotic chromosomal condensation and segregation, and cytokinesis. *Genes to Cells* 2003; 8(11): 857-72.
- Syntichaki P, Xu K, Driscoll M, Tavernarakis N. Specific aspartyl and calpain proteases are required for neurodegeneration in *C. elegans*. *Nature* 2002; 419: 939-44.