骨格筋の重力応答と廃用性萎縮：細胞外基質・コラーゲンと分子シャペロンから探る

小黒 - 安藤麻美 (University of California, Los Angeles)

要旨 寝たきりの生活や宇宙での生活など運動量が極端に少ない環境において、骨格筋はアクティブに収縮しなくなるだけでなく環境からの伸張刺激も少なくなる。そのような状況下での筋萎縮が健康の維持において問題となっている。本研究では、微小重力および過重力による筋線維の構造や機能の変化ではなく、筋線維を結束した筋の発揮する力を骨格に伝達する細胞外基質の変化に着目し、その構成タンパク質であるコラーゲンの合成量の変化を、コラーゲンの分子シャペロンである HSP47 をマーカーとして測定した。その結果、重力の変化に対し 30 分という短時間で、HSP47 及びコラーゲン合成量の変化が現れることが確認された。HSP47 の上流には重力応答に関与する新しい制御機構がありそうだ。

はじめに

宇宙生活や病床での寝たきり生活においては、低重力もしくは類似の環境の下で骨格筋萎縮が起こることが知られている。微小重力環境によって引き起こされる骨格筋への負荷減少は、これら細胞の力学的支持を担っている基底膜や結合組織に直接もしくは間接的に影響を及ぼすと考えられる。筋組織は、細胞外の力学的支持体として細胞外マトリックス (ECM) の一種である基底膜 (basal lamina) を持っており、ECM は重力を含む機械的刺激に対して、骨格筋収縮の張力を発揮して、腱組織へ伝達する役割も果たしている。多くの細胞は ECM との接着を必要とし、ECM への接着の解離によりアポトーシスが誘導される。これらにより骨格筋は、細胞内の細胞骨格と細胞外の ECM で細胞内外の機械的刺激に応答することができる。

これまでに微小重力下の研究では、筋線維の構造と機能の変化、骨カルシウム代謝の変化などについては多くの研究がなされてきたが、筋内の結合組織や基底膜などの変化についてはほとんど調べられてこなかった。その原因の一つには、これらの組織における力学的支持構造の主体となっているコラーゲンが、酸や酵素処理によっても部分的にしか可溶化されないため、その定量化が困難なことがある。コラーゲンを直接定量するのは困難だが、コラーゲンのシャペロンであり、発現量に相同性のある HSP47 は定量することが可能である。この HSP47 は小胞体内に局在するコラーゲンに特異的に結合するストレスタンパク質であり、プロモーター領域には熱ショックエレメントのコンセンサス配列をもち、コラーゲンの成熟を助ける働きがあることが分かっている (Nagata and Yamada, 1986)。そこで本研究では、コラーゲン合成量のマーカーとしてこのコラーゲン特異的シャペロンである HSP47 に着目した。

本研究は、微小重力下での筋萎縮のメカニズムと、この現象を誘導する引き金となる重力感知機構の解明を目指すものである。主に、外的なストレスに生体はどのような応答をしているのか、筋萎縮についてこれまでどのような研究がなされてきたか、そして、この適応機構を解明するため、細胞外マトリックス関連分子に焦点を当てて検討を行った。

ラットヒラメ筋における HSP47 とコラーゲンの重力変化に対する応答

宇宙滞在による無重量環境曝露は、骨格筋の萎縮を招く。この骨格筋の萎縮は、単に形態的な萎縮にとどまらず、筋力低下をはじめさまざまな収縮機能の退行性変化を伴うことが明らかになっている。無重量環境曝露による骨格筋の萎縮は、主に骨格筋に対する荷重が除去されることが原因であると考えられ、比較的短期間で顕著な筋萎縮が認められる。本章でのラットの後肢懸垂モデルは無重量環境曝露状態に近い筋萎縮のモデルと考えられる。ラットの後肢懸垂による体重、ヒラメ筋組織重量の変化は先行研究 (Atomi *et al.*, 1991; Sakurai *et al.*, 2005) と同等である。遠心による後肢への過重力負荷は、体重変化からも分かるように後肢懸垂と同様にストレスと成っていることが分かるが、体重あたりのヒラメ筋組織重量は重力負荷群では対照に比べて有意に増加した (Oguro *et al.*, 2006)。過重力時ではラットヒラメ筋組織の肥大が肉眼でも観察され、ラットは腹部などの脂肪がつく部分が痩せ細り、抗重力筋だけが肥大していた。これより、遠心モデルが負荷モデルとして用いることができると考えられた。

本研究では、ラットの後肢懸垂モデルと過重力負荷モデルを用いて筋萎縮時の ECM の変化を観察するため、コラーゲンとそのシャペロンである HSP47 を生化学、分子生物学及び細胞生物学の手

法を用いて解析した。骨格筋内の結合組織や細胞外マトリックスの主成分であるI型、IV型コラーゲン、およびコラーゲンの分子シャペロンであるHSP47の発現量に対し、重力変化がどのように影響するのかについて検討するため、ラットヒラメ筋にかかる重力変化させ、HSP47及び、コラーゲンの発現量変化を検討した。ラット微小重力モデル（後肢懸垂モデル）では、タンパクレベルでHSP47の顕著な減少が、また過重力モデル（遠心負荷3G）で顕著な増加が認められた。遺伝子レベルでは、HSP47 mRNAが、I型、IV型コラーゲン mRNA に比べて、微小重力刺激1日目の早い段階で重力に応答した（Oguro *et al.*, 2006）。これまでの研究から、運動による筋線維の肥大に比例して、コラーゲン量は増加することが分かっている。過重力刺激の結果は、このことに準ずると考えられる。つまり骨格筋組織では、負荷減少に対し、はじめにコラーゲン合成の増加が起こるが、その後に分解が亢進されて、タンパク量としては徐々に減少していくことが考えられる。このコラーゲンタンパク量の減少は、HSP47の急激かつ有意な減少に引き続いて起こっていることから、やはりHSP47遺伝子が重力刺激を先に感知してコラーゲン量を調節している可能性が高いと考えられる。

ラット筋芽細胞におけるHSP47とコラーゲンの重力変化に対する応答

ラット筋芽細胞株L6E9を用いて微小重力刺激（クリノスタット）、過重力刺激（遠心負荷20G～80G）を与え、コラーゲンとHSP47の培養筋芽細胞について検討を行った。まず、重力変化時の細胞の形態変化を観察したところ、過重力刺激40G 2時間で葉状仮足が発達し、接着面の拡大が観察された。この時まず、過重力刺激時のHSP47の筋芽細胞内での局在変化を確認するため、過重力刺激後（40G 2時間）の細胞を固定し、HSP47の抗体で免疫染色を行った。過重力刺激後（40G 2時間）の筋芽細胞では、HSP47のシグナルはコントロールに比べ、横に広がるような形態への変化が観察された（Fig. 1A）。そこで、この面積的な広がりには差があるのかどうかを解析するため、複数（n=25）の細胞の染色後の画像取得を行い、細胞ごとの蛍光面積を計測し、比較を行った（Fig. 1B）。結果として、過重力をかけた細胞では、コントロールに比べ蛍光面積の有意な増加が確認できた。

先行研究では、過重力刺激100G 2時間でも、細胞形態に変化がないとされていたが（Hirasaka *et*

al., 2005）、過重力刺激40G 2時間でこのような変化が見られたことから、この結果は新しい知見である。さらに過重力刺激時の細胞内タンパク質分布の変化についても、現在報告がないため、重力刺激でHSP47蛍光タンパク質の量が変化するというこの結果も、非常に新しい。

さらに、タンパク質発現量を検討するために行ったウエスタンブロッティングの結果（Fig. 2）から、微小重力刺激6時間でのHSP47発現量低下が確認された。これはタンパク質分解としては非常に早い。通常の分解ではタンパク質の半減期にもよるが、約12時間程度の時間がかかるとされる。そのため、このHSP47の重力刺激時の分解は、何か特異的経路が働いている可能性が考えられる。筋細胞

Fig. 1. (A) 過重力時の筋芽細胞（L6E9）におけるHSP47の免疫染色像の変化
a. コントロール b. 過重力40Gを2時間かけたもの c. コントロール（高倍率） d. 過重力40Gを2時間かけたもの（高倍率） Bar=20 μ m
(B) 過重力刺激（40G 2時間）時の筋芽細胞内におけるHSP47の蛍光部位の面積

Fig. 2. 微小重力 (MG), 過重力 (HG) 時の筋芽細胞 (L6E9) における形態変化とタンパク質 (HSP47、HSC70、I 型・IV 型コラーゲン、HSF1) の発現量変化

内ではオートファジーリソソーム分解経路が非常に早い段階で働く。つまり重力負荷減少は、刺激初期にオートファジーリソソーム分解経路を活性化させる可能性が考えられる。また、重力刺激時に HSF1 の活性型が確認できなかったことも非常に興味深い。このことは熱ショックストレスで誘導される経路が、重力変化には応答していない可能性を示している。つまり重力変化に対し、骨格筋は何か特異的な経路で適応変化を起こしている可能性がある。このことを議論するためには、まずは筋細胞においてどの程度の重力強度と時間で細胞内の遺伝子が増加するかを検討する必要がある。

では、形態変化を起こす重力強度と時間では、HSP47 遺伝子またはタンパク質発現量に変化があるのだろうか？そこで、次に筋芽細胞に先ほど形態変化が見られた過重力刺激 40G 2 時間をベースに、重力強度と時間を変化させた刺激を与え、実験を行った。この結果から、L6 細胞では HSP47 mRNA が 1 ～ 2 時間という短い時間の間に重力刺激に応答して発現変化することが分かった (Oguro *et al.*, 2006)。これらの結果から、骨格筋は細胞レベルで重力変化に応答していることが分かった。そこでさらに、重力変化に応じて HSP47 の発現量が増加する際の重力感知機構を解析するため、筋芽細胞を用いて、HSP47 のサイトカインや他のシャペロンとの発現量変化の比較を行った。ラット筋芽細胞 L6 における、HSP70、 α B-crystallin、Grp78、TGF β 1 mRNA レベルはいずれも、過重力 40G 2 時間でコントロールに比べて有意な変化は見られなかった。これらの結果から、重力に応答した HSP47 mRNA の発現量変化は、熱ショック、TGF β による誘導、小胞体ストレス応答のいずれにも誘導されない、独自の経路の可能性が考えられる。以下にその理由を論じていく。

先行研究では、4、5 日間のスペースフライトで、ラットの骨芽細胞において TGF β の減少に伴い、HSP70 と HSP47 遺伝子は有意に減少することが報告されている (Kumei *et al.*, 2003)。これは本実験で行った、筋芽細胞に微小重力刺激を加えた実験よりも長い時間で検討しているため、本研究の 1 ～ 2 時間の早い反応とは異なる可能性が高い。

その他の先行研究では、ラットの後肢懸垂モデルでラットヒラメ筋における HSP70、HSP90、HSP27、 α B-crystallin の発現量が減少することが報告されている (Sakurai *et al.*, 2005)。この場合 HSP を制御する一般的な転写因子である HSF1 が重力負荷減少に応答して、多種の HSP の減少が見られた可能性が高い。この考え方に一致して、HSF1 の発現を阻害する TNF α の上昇が、筋芽細胞で微小重力刺激 0.5 時間から 2 時間の間で確認された (Oguro *et al.*, 2006)。 α B-crystallin と HSP70 遺伝子は、プロモーター配列内に HSF1 に依存したエレメントを持っているが、HSP47 mRNA の発現上昇が見られた過重力刺激 40G、2 時間では、それら遺伝子の mRNA 発現量変化で有意な変化は特に見られなかった。このことから、HSF1 依存的な発現誘導は HSP47 の素早い過重力応答反応には関係がない可能性が高い。この結果に加えて、微小重力刺激 0.5 時間から 2 時間において HSP70 に有意な変化が見られなかったことも、HSF1 依存的な経路とは関係ないという考え方を支持している。TGF β 経路は、過重力刺激下で HSP47 mRNA の発現を誘導する可能性が示唆されるが、過重力刺激 40G 時に変化が見られなかったことから、現状では関連性がみられないが、微小重力刺激 1 時間で発現に減少が見られるため、時間に依存して発現調節されているのかもしれない。TNF α mRNA は、HSP47 mRNA が応答する微小重力刺激 0.5 時間、1 時間、2 時間でコントロールに比べて有意な増加が認められていることから、これも重力応答に関与する経路である可能性がある。また、HSP47 には、HSF1 依存的な TNF α に関係するエレメントと、HSF1 と独立した TGF β に敏感に反応するエレメントとがあるので (Sasaki *et al.*, 2002)、これら両方が重力変化の素早い応答に必要なのかもしれない。

ラット筋芽細胞における HSP47 重力応答特異的配列の検討

HSP47 独自の重力応答経路について検討するため、HSP47 遺伝子のプロモーター解析を行った。HSP47 のプロモーター領域には、HSE があり、こ

HSP47の転写調節領域と各エレメント

Fig. 3. 重力刺激時における HSP47 のプロモーター配列と転写因子の模式図 (Nagata et al., 2003 より引用)

ここに HSF が結合することによって、熱ショックなどのストレスに際して、HSP47 が発現誘導される (Nagata, 2003)。永田らの作製した HSP47 プロモーターベクターを用いて、ルシフェラーゼレポーター遺伝子による発現解析を行った。マウス HSP47 の 5.5kb のプロモーター領域を持ったコンストラクトにおいては転写開始点上流 - 280bp に存在する SP1 binding site (GC box と BS5-B) に Sp2 あるいは Sp3 が結合すること (Fig. 3) が、basal な転写活性に重要である (Hirata et al., 1999; Yasuda et al., 2002)。そこで - 280bp までの配列中に重力応答配列があるか、または - 5.5kb から - 280bp の間に重力応答配列があるのかを検討するため、その間のいくつかのコンストラクトを用いて、プロモーター解析を行ったところ、HSP47 の第 2 イントロン内に重力を感知する配列があると考えられる結果が得られた (小黒 - 安藤、未発表)。つまり、HSP47 に特異的な早期の重力応答は、HSP47 独自の重力感知機構を介して誘導される可能性が示唆された。特に HSP47 の第 2 イントロン中には、未知の転写因子が結合する可能性がある (Fig. 3)。この部位には HSP47 の発現を抑制するサイレンサーのような因子が結合する可能性もあるのではないかと推察された。

まとめ

本研究では、これまであまり解析されてこなかった筋組織の細胞外マトリックスとその分子シャペロンに着目し、その重力応答を解析することで、細胞レベルでの重力応答の一端を解明したものである。特に HSP47 が 1 ～ 2 時間という短い時間で重力に反応すること、それが転写制御によることは、本研究によって初めて明らかになった新しい知見

である。さらに本研究において、また、HSP47 遺伝子の重力応答配列の同定を行い、重力転写因子を探索することは、微小重力から起こる筋萎縮機構の解明につながり、この重力転写因子を薬理学的に応用すれば、筋萎縮阻害薬の開発が可能となる。さらに、リハビリテーション的に応用することで、転写因子発現量をマーカーとした運動方法の開発につながると考えられる。この重力感知機構を明らかにすることは、近い将来に宇宙空間により進出していく人類にとって、非常に有用性が高いこととなることが予想される。

参考文献

- Atomi, Y., Yamada, S., and Nishida, T. (1991). Early changes of alpha B-crystallin mRNA in rat skeletal muscle to mechanical tension and denervation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **181**, 1323-1330.
- Hirasaka, K., Nikawa, T., Yuge, L., Ishihara, I., Higashibata, A., Ishioka, N., Okubo, A., Miyashita, T., Suzue, N., Ogawa, T., et al. (2005). Clinorotation prevents differentiation of rat myoblastic L6 cells in association with reduced NF-kappa B signaling, *Biochim. Biophys. Acta*, **1743**, 130-140.
- Hirata, H., Yamamura, I., Yasuda, K., Kobayashi, A., Tada, N., Suzuki, M., Hirayoshi, K., Hosokawa, N., and Nagata, K. (1999). Separate cis-acting DNA elements control cell type- and tissue-specific expression of collagen binding molecular chaperone HSP47, *J. Biol. Chem.*, **274**, 35703-35710.
- Kumei, Y., Morita, S., Shimokawa, H., Ohya, K., Akiyama, H., Hirano, M., Sams, C. F., and Whitson, P. A. (2003). Inhibition of HSP70 and a collagen-specific molecular chaperone (HSP47) expression in rat osteoblasts by microgravity, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1010**, 476-480.
- Nagata, K. (1996). Hsp47: a collagen-specific molecular chaperone, *Trends Biochem. Sci.*, **21**, 22-26.
- Nagata, K. (2003). HSP47 as a collagen-specific molecular chaperone: function and expression in normal mouse development, *Semin. Cell Dev. Biol.*, **14**, 275-282.

- Nagata, K., Saga, S., and Yamada, K. M. (1986). A major collagen-binding protein of chick embryo fibroblasts is a novel heat shock protein, *J. Cell Biol.*, **103**, 223-229.
- Nagata, K., and Yamada, K. M. (1986). Phosphorylation and transformation sensitivity of a major collagen-binding protein of fibroblasts, *J. Biol. Chem.*, **261**, 7531-7536.
- Oguro, A., Sakurai, T., Fujita, Y., Lee, S., Kubota, H., Nagata, K., and Atomi, Y. (2006). The molecular chaperone HSP47 rapidly senses gravitational changes in myoblasts, *Genes Cells*, **11**, 1253-1265.
- Sakurai, T., Fujita, Y., Ohto, E., Oguro, A., and Atomi, Y. (2005). The decrease of the cytoskeleton tubulin follows the decrease of the associating molecular chaperone alphaB-crystallin in unloaded soleus muscle atrophy without stretch, *FASEB J.*, **19**(9), 1199-1201.
- Sasaki, H., Sato, T., Yamauchi, N., Okamoto, T., Kobayashi, D., Iyama, S., Kato, J., Matsunaga, T., Takimoto, R., Takayama, T., et al. (2002). Induction of heat shock protein 47 synthesis by TGF-beta and IL-1 beta via enhancement of the heat shock element binding activity of heat shock transcription factor 1, *J. Immunol.*, **168**, 5178-5183.
- Yasuda, K., Hirayoshi, K., Hirata, H., Kubota, H., Hosokawa, N., and Nagata, K. (2002). The Kruppel-like factor Zf9 and proteins in the Sp1 family regulate the expression of HSP47, a collagen-specific molecular chaperone, *J. Biol. Chem.*, **277**, 44613-44622.

おぐろ - あんどう あさみ

カリフォルニア大学ロサンゼルス校神経学科

Department of Neurology, University of California, Los Angeles

710 Westwood Plaza, Los Angeles, CA 90095-1769, USA

Gravity Response and Disuse Atrophy in Skeletal Muscle: Understanding from Extracellular Matrix-Collagen and Its Molecular Chaperon HSP47

Asami Oguro-Ando

University of California, Los Angeles

Abstract

Prolonged immobilization, as in the cases of bed rest or astronauts flying in space, is known to result in less activity and keeping skeletal muscle under unstretched condition. This inactivity will seriously threaten the quality of life not only of the Aged also every persons in modern society. There were a lot of researches on dynamicity of structure and function of muscle fiber under micro-gravity and hyper-gravity, while less about ECM. We have examined changes of the amount of molecular chaperone HSP47 as well as collagens. We have found rapid changes of HSP47 associating with collagens at 30 min after transition of gravity. New corresponding regulation of gravity-relating gene expression will be uncovered soon.