

論文の内容の要旨

論文題目 重力に早期応答するコラーゲン特異的分子シャペロン HSP47 の解析
Physiological analysis of the molecular chaperone HSP47 rapidly senses
gravitational changes

氏名 小黑 麻美

第1章 序論

スペースフライトや寝たきりなどによる重力負荷減少は、骨格筋萎縮を引き起こす。これによる筋力低下は、病態回復時の地上での活動的な生活へ復帰する際に非常に大きな障害となる。しかしながら、骨格筋がどのように微小重力に反応して、萎縮を引き起こすかについては未解明なままである。中でも、筋組織の力学的支持体であり、かつ細胞の生存に重要な役割を果たすコラーゲンの重力反応についての報告はほとんどない。そこで本研究では、特に結合組織の主成分である I 型コラーゲン、基底膜の主成分である IV 型コラーゲン、そしてこれらコラーゲンの分子成熟に必須の分子シャペロンである HSP47 に着目し、研究を行った。

本研究の目的

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、ラットヒラメ筋や培養筋芽細胞にかかる重力変化させ、HSP47 及び、コラーゲンの発現量変化の解析を

した。これら解析の結果から、筋肉の重力応答における HSP47 及びコラーゲンの役割について考察した。

第2章 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

まずはじめに、微小重力環境モデル・過重力モデルを用いてラット骨格筋にかかる重力を変化させ、コラーゲンとその分子シャペロン HSP47 の骨格筋における発現量変化を解析した。ラット微小重力モデルでは、タンパクレベルで Hsp47 の顕著な減少が、また過重力モデルで顕著な増加が認められた。遺伝子レベルでは、HSP47mRNA が、I 型、IV型コラーゲン mRNA に比べて、早い段階で重力に応答した。

第3章 ラット筋芽細胞での HSP47 とコラーゲンの重力変化に対する応答

次に、ラット筋芽細胞株 L6E9 に微小重力環境モデル・過重力モデルを用いて重力変化を与え、コラーゲンと HSP47 の培養筋芽細胞における発現量変化を解析した。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、横に広がる形態が観察された。そこで HSP47 とコラーゲンの発現について検討したところ、微小重力モデルではタンパクレベルで HSP47 の顕著な減少が、また過重力モデルでは顕著な増加が認められた。遺伝子レベルでは、Hsp47mRNA が、I 型、IV型コラーゲン mRNA に比べて、早い段階での重力に反応した。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。

第4章 ラット筋芽細胞での HSP47 関連遺伝子の重力変化に対する応答

第3章までの研究で、HSP47 が細胞レベルで重力を感知し、発現量を調節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 の発現量に変化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 1mRNA 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HSP47mRNA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よらない、新しい経路によって誘導される可能性があることが明らかになった。

第5章 ラット筋芽細胞での 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 プロモーターにルシフェラーゼをつないで、LUC 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。

第6章 総合討論

以上の結果から、HSP47 の新たな重力反応メカニズムの可能性について考察する。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。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。