

総 説

無重力による筋萎縮とその食事による予防

二 川 健, 平 坂 勝 也, 池 本 円, 加 納 美保子, 浅野間 友 紀,
岸 恭 一

徳島大学医学部栄養生理学講座

(平成14年9月13日受付)

(平成14年9月20日受理)

はじめに

2006年の本格運用を目指し、国際宇宙ステーションの建設が急ピッチで進んでいる。しかしながら、長期間の宇宙滞在はヒトの生理機能に様々な影響を与える。特に、無重力状態により誘導される筋萎縮は、かなりハードな運動以外に予防法はなく、必ず解決しなければならない重大な問題の一つであると考えられている。我々は、そのメカニズムを分子レベルで解明するとともにその栄養学的予防の開発を行ってきた。今回は、我々が行ってきた無重力による筋萎縮のメカニズムに関する研究とそれを予防しうる新しい宇宙食の開発について総説したい。

(1) 微小重力下の筋タンパク質分解

微小重力環境で生体が長期間暴露されると骨格筋では萎縮がおこる。この萎縮は速筋、遅筋の両者に見られるが、抗重力筋である遅筋に著しく見られる^{1,2)}。この筋萎縮は長期的には筋タンパク質分解の亢進によると考えられている³⁾。骨格筋には、3つの主要な分解系(ユビ

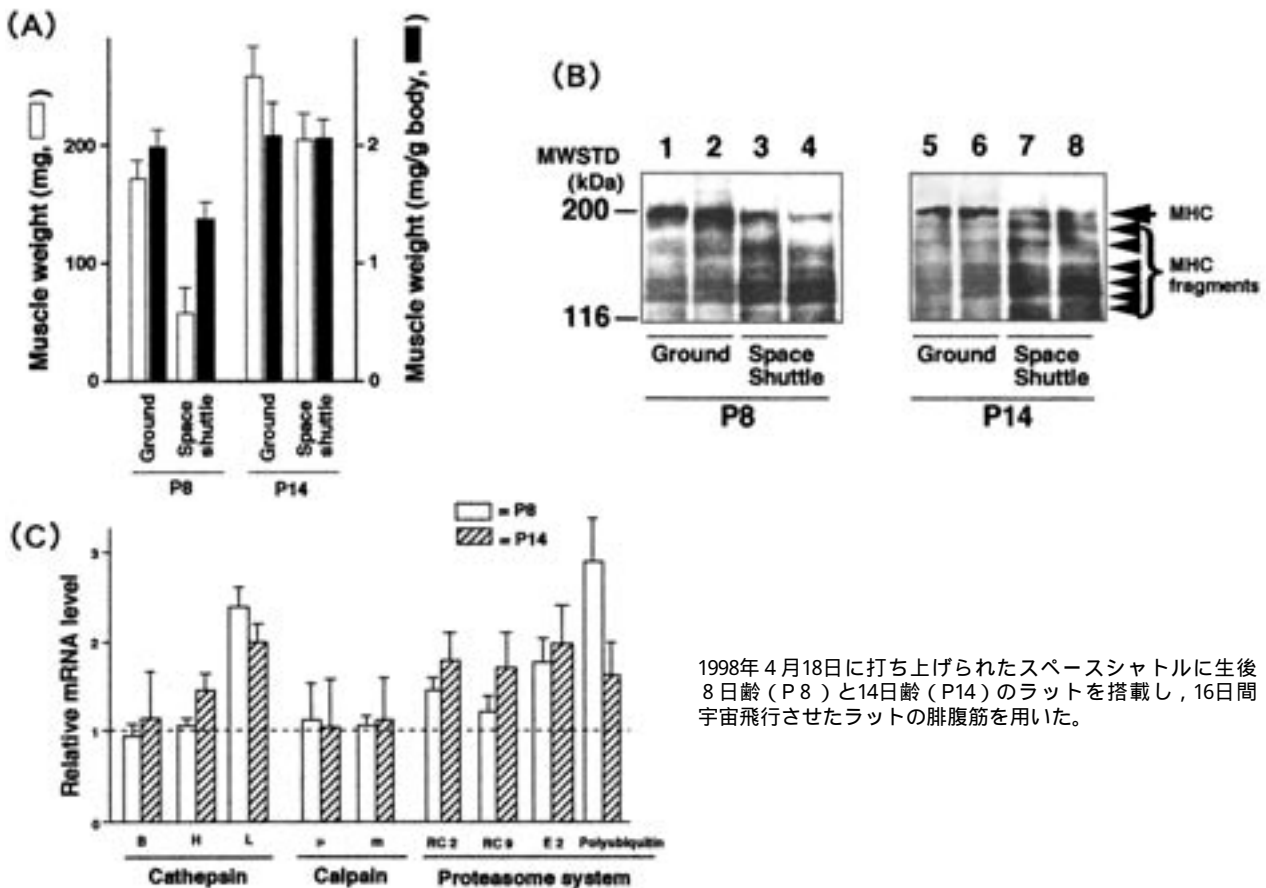
キチン・プロテアソーム系, カルシウム・カルパイン系, リソソーム系)が存在する(表1)。我々は、どの分解系が微小重力により亢進した筋タンパク質の分解を担っているのかを同定するため、スペースシャトルに搭載したラット(宇宙フライトラット)や尾部懸垂ラットでの筋プロテアーゼの発現プロファイルを解析した⁴⁾。

宇宙フライトラットの腓腹筋湿重量は地上コントロールラットのそれに比べ著明に減少した(図1A)。骨格筋中筋原線維の全タンパク質の約45%を占めるミオシンの重鎖(MHC)が、宇宙フライトによってユビキチン化され、分解が亢進していることを確認した(図1Bとデータ示さず)。宇宙フライトラットの筋肉内プロテアーゼ mRNA 量は、プロテアソームのサブユニットである RC2 と RC9, ポリユビキチンとその結合酵素である E_{14k}, カテプシン L が増加し、 μ カルパイン, m カルパイン, カテプシン B, カテプシン H は地上コントロールとほとんど差がなかった(図1C)。

一方、模擬微小重力モデルである尾部懸垂ラットにおいても、懸垂の日数とともにヒラメ筋、腓腹筋の筋湿重量が有意に減少した(図2A)。さらに、尾部懸垂ラッ

表1 骨格筋中の主な分解系

分 解 系	特 徴
ユビキチン プロテアソーム系	ユビキチンは76個のアミノ酸からなる分子量8600のタンパク質である。このユビキチンがユビキチン活性化酵素(E1), ユビキチン結合酵素(E2), ユビキチンリガーゼ(E3)を介して基質と結合すると、その基質は、26S プロテアソームにより分解されやすくなる。
カルパイン系	細胞内に存在するカルシウム依存性の中性プロテアーゼによって分解される系である。活性化にそれぞれ μ M, mM 程度の Ca^{2+} 濃度を必要とする μ カルパイン, m カルパインの2種類のアイソザイムがある。活性化したカルパインは、細胞骨格筋関連タンパク質を限定分解する。内在性阻害タンパク質としてカルパスタチンがある。
リソソーム系	リソソームに存在する酸性プロテアーゼ(カテプシン群)によって分解される系である。主なものとしてカテプシン B, H, L がよく知られている。



1998年4月18日に打ち上げられたスペースシャトルに生後8日齢(P8)と14日齢(P14)のラットを搭載し、16日間宇宙飛行させたラットの腓腹筋を用いた。

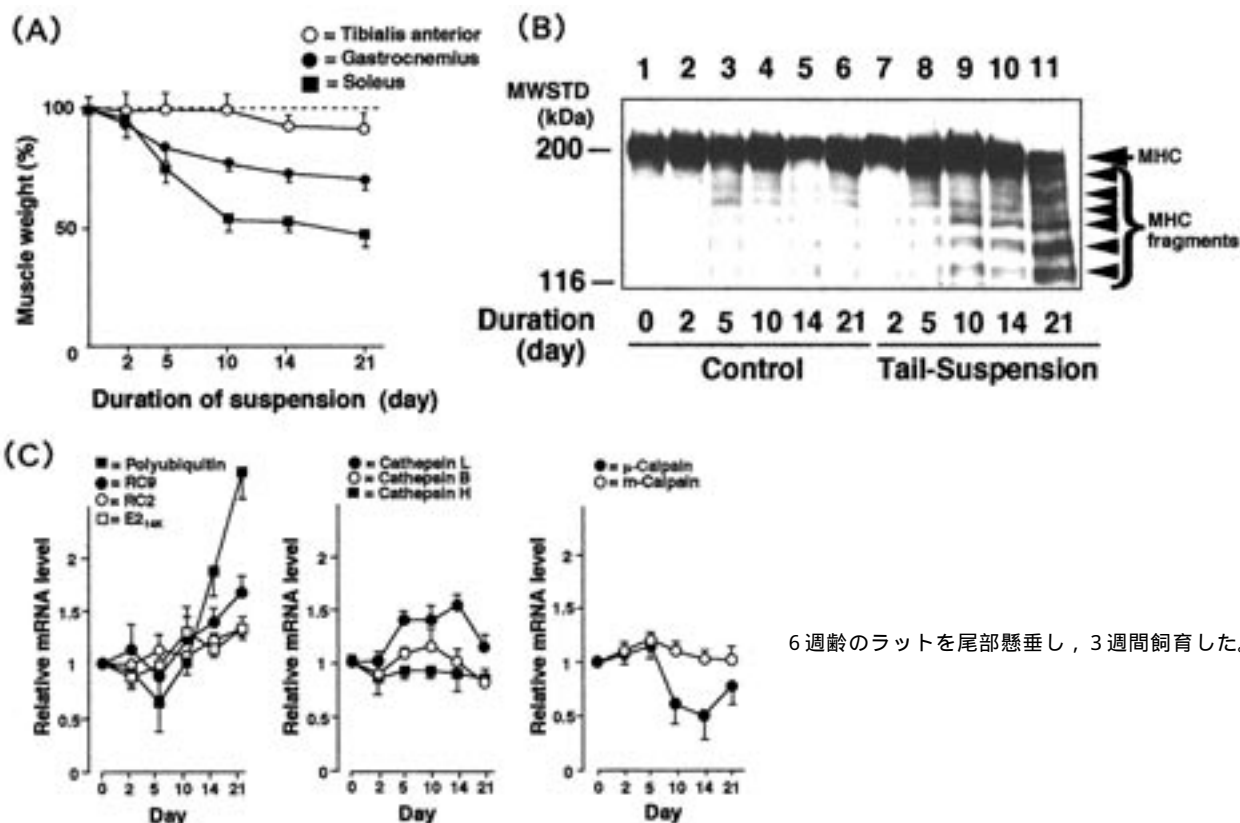
図1 スペースフライトによる変動

トのミオシン重鎖も経時的にユビキチン化され、その分解産物が集積した(図2B)。プロテアーゼの発現パターンも、宇宙フライトの場合と似て、カテプシンLの発現増加に続き、プロテアソーム(RC2, RC9)、ポリユビキチンそしてE_{14k}の発現が上昇した(図2C)。以上の結果から、宇宙フライトラットや尾部懸垂ラットの骨格筋では、ユビキチンプロテアソームタンパク質分解系が亢進していることが示唆された。

(2) 微小重力下で誘導される酸化ストレスと抗酸化栄養素(システイン)の筋萎縮に対する予防効果

筋タンパク質のユビキチン化は、酸化ストレス、プロテアーゼやカルシウム依存性のリン酸化などによるタンパク質の立体構造の変化が引きがねになると考えられている。近藤らは、ラットのギブス固定で萎縮した骨格筋で過酸化脂質の分解産物であるTBARS(thiobarbituric

acid-reactive substance)や酸化型グルタチオン(GSSG)の増加と還元型グルタチオン(GSH)の減少を報告している⁵⁾。我々も、尾部懸垂ラットの腓腹筋中のTBARS, GSSGとGSH量を測定し、骨格筋内で酸化ストレスが生じていることを確認した(図3A)。激しい運動による筋肉内の酸化ストレスは理解しやすいが、尾部懸垂や固定による廃用性筋萎縮になぜ酸化ストレスが生じるのだろうか?まだ、仮説の段階であるが、我々は無重力のミトコンドリアへの作用に着目している(図4)。比較的大きなオルガネラであるミトコンドリアは無重力環境下では形態がより丸みをおびたものになるらしい。実際、宇宙フライトラットの腓腹筋をDNA microarray解析を行ったところ、ミトコンドリア遺伝子だけでなくミトコンドリアに局在する蛋白質をコードした遺伝子の発現異常が観察された(データ示さず)。寝たきりなどの筋萎縮でも、ミトコンドリアの機能異常が生じることが知られているので、我々はミトコンドリアからもれ出した活性酸素が筋タンパク質のユビキチン化を誘導してい



6週齢のラットを尾部懸垂し、3週間飼育した。

図2 尾部懸垂による変動

るのではないかと考えている(図4)。

筋萎縮による酸化ストレスを抑制することが筋萎縮の予防に通じるかを確認するため、抗酸化作用を有し、HIV感染者や担癌患者の筋萎縮に有効であることが報告されているシステインを尾部懸垂ラットに胃内投与した⁶⁾。140mgのシステイン投与によりTBARSとGSSGは減少し、GSH増加した(図3A)。さらに、システイン投与により懸垂ラットの筋タンパク質のユビキチン化とミオシン重鎖の断片化を有意に抑えた(図3B,C)。同様に、もう一つの抗酸化栄養素であるビタミンE(αトコフェロール)の効果も調べたが、システインと異なり尾部懸垂によるユビキチン化の阻害効果はほとんど見られなかった(データは示さず)⁷⁾。

(3) 日本の宇宙食の変遷

戦後の日本の宇宙開発は、糸川博士のペンシル型ロケットに始まるが、限られた予算と乏しい技術のため、もっぱらアメリカの技術に頼った開発が行なわれてきた。しかし、ミューロケット、N型ロケットと進むにつれ、

国産率は高まり、平成7年のH IIロケットにより純国産ロケットの開発に成功した。一方、「人が生活することができる宇宙基地を、10年以内に建設する」という、1984年レーガン大統領(当時)の提唱した国際宇宙ステーション計画に日本も参加することとなった。1998年より建設が始まり、2000年11月からは数名の宇宙飛行士が滞在している。現在のところ、2006年にすべての施設が完成する予定である。日本が独自に開発した初の軌道上実験モジュール(Japanese Experimental Module: JEM「きぼう」)も2004年頃に運用開始となり、日本も長期に宇宙に滞在するための環境整備が必要となってきた。このように、日本人の宇宙開発はもっぱら人工衛星の打ち上げが主目的であったことと、日本人の宇宙飛行はアメリカのスペースシャトルにより行なっているために、宇宙食の開発はほとんどアメリカの知識に頼ったものである。それらを簡単に表2にまとめた。宇宙滞在期間が短かったマーキュリーやジェミニ時代の宇宙食はロケットの重量制限などにより、味やその成分などの重要性はあまり考慮されず、排泄物をできるだけ少なくするという点のみに力点を置いた非常に味気のないもので

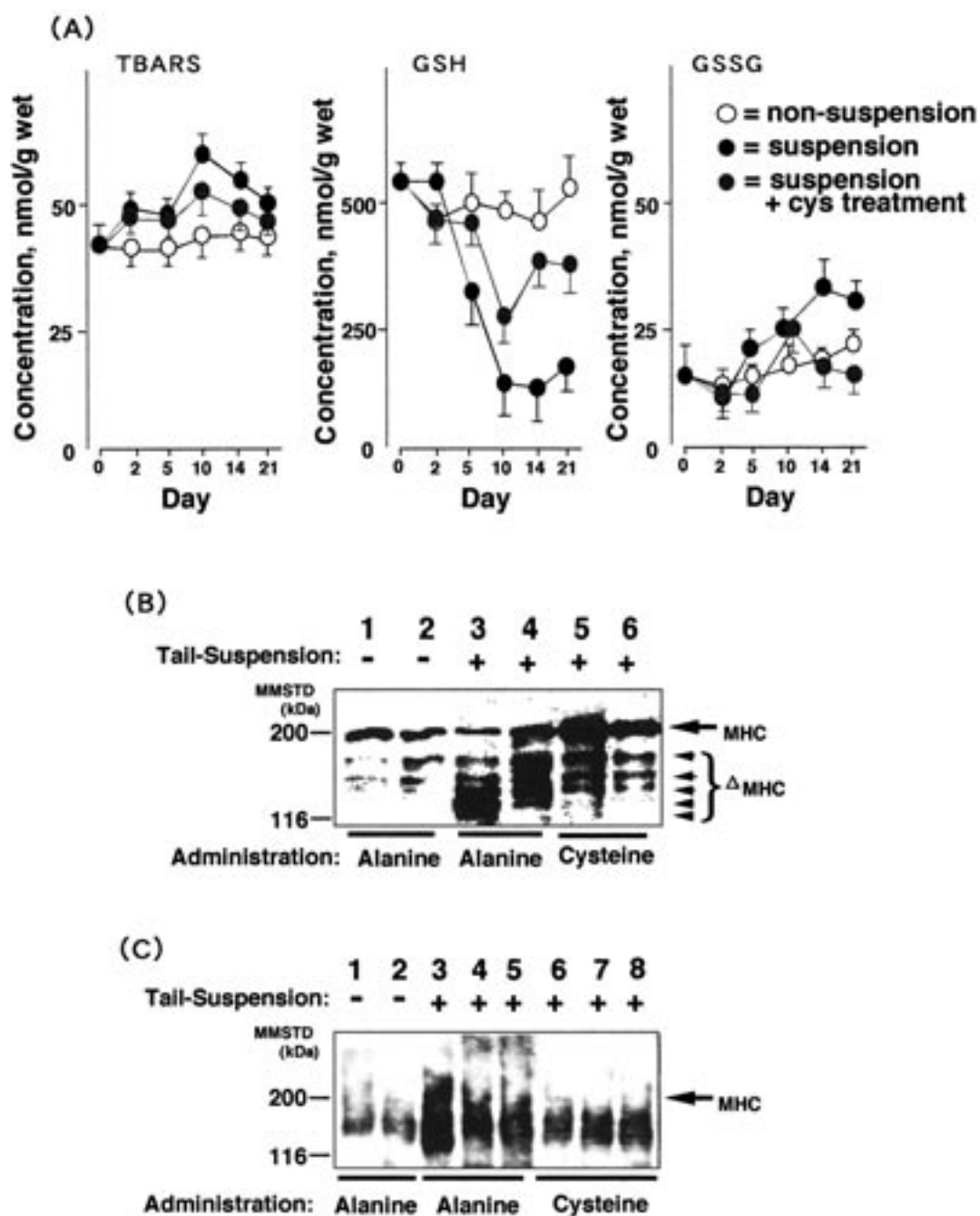


図3 尾部懸垂における酸化ストレスの変動と Cys 添加時の変化

あった。アポロ時代からスカイラブ時代には、味や形状は徐々に改善されていき、現在のスペースシャトル時代では、たこ焼きなどほとんど日常の食品と同じものを食することが可能になってきた。しかしながら、これらは単に宇宙飛行士の空腹を満たすための食事であり、無重力や宇宙放射線による障害などに対処したものではない。それゆえ、無重力による筋萎縮に有効な食事などの

開発はほとんど進歩していないのが現状である。実際、宇宙環境下で失われたタンパク質を単純に食物で補おうとする高タンパク質食品の摂取は、筋萎縮を抑制することができなただけでなく、尿中のカルシウム、シュウ酸塩、尿酸塩などの排泄物を増加させ、尿路結石形成などをもたらすことでその有効性は疑問視されている⁸⁾。

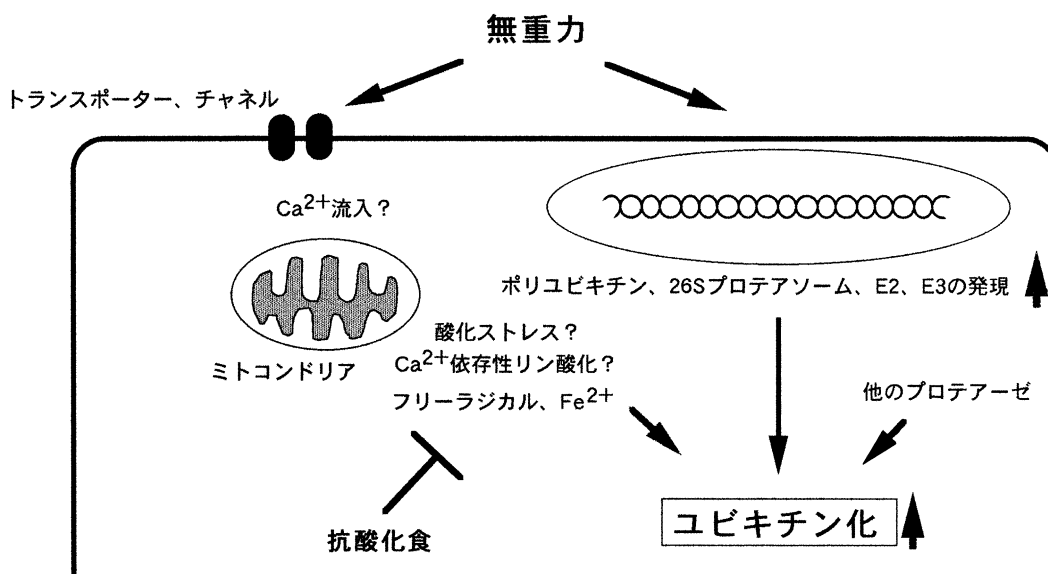


図4 微少重力下の筋肉内の変動

表2 宇宙食の変遷

時代(年代)	特徴
マーキュリー時代 (1962~63)	食物が宙に浮かないようにするため、チューブ状の容器の先に、ストロー状のものをさし、クリーム及びゼリー状の宇宙食を摂取。
ジェミニ時代 (1963~68)	宇宙滞在が長期化したことにより、宇宙食の重要性が見直される。包装を開くためと食物に水を加えるためのハサミやウォーターガンなどの器具が登場。
アポロ時代 (1969~72)	お湯が食品を液化するのに使われはじめ、通常のスプーンでの食事へ。一日一人当りの宇宙食は2800kcalでタンパク質28%、炭水化物62%、脂質18%である。
スカイラブ時代 (1973~74)	食物は上へ持ち上げながら開ける、ふた付きアルミニウム缶に詰められたものを利用、飲み物容器は折たたみ式。
スペースシャトル時代 (1981~)	食品は四角いコンテナに入れられるようになり、乾燥物を中心に生鮮食品も搭載。日常の食品と同じものを食することが可能に。

9) 宇宙開発事業団(NASDA)水野 康氏の記述より抜粋

(4) 今後の展望

我々の新しい宇宙食の開発は、まだスタートしたばかりである。今回示した様に、システインの効果もまだ完全でなく、今後、さらなる研究が必要である。しかしながら、抗酸化栄養素により筋萎縮の予防ができれば、薬剤とは異なり、副作用がなく、長期の使用が可能である。この利点をいかし、近い将来、必ずより有効な食事法を開発したい。最近、ユビキチンプロテアソーム蛋白質分解経路では、基質であるタンパク質にユビキチンを結合させるユビキチン連結酵素が律速酵素であることがわかってきた。現在我々はユビキチン連結酵素をターゲッ

トとしたより効果的なユビキチン化抑制栄養素(剤)を開発中である。さらに、今年度中にラットを5年後に筋細胞をそれぞれスペースシャトルで打ち上げる予定である。これらの研究を通して、無重力による筋萎縮のメカニズムの解明とその予防法の開発を目指したい。

謝辞

本総説の機会を与您いただきました徳島大学医学部の武田憲昭教授に深謝致します。本総説において紹介した研究成果は、次の方々との共同研究により遂行されました。諸先生方に深く感謝の意を表します。武田伸一先

生, 埜中征哉先生(国立精神・神経センター), 泉龍太郎先生(日本宇宙開発事業団), KM Baldwin 博士, GR Adams 博士(カリフォルニア大学・アーバイン校), 唐渡孝枝先生(徳島大学酵素科学研究センター)。本研究の一部は, 日本宇宙開発事業団と日本宇宙フォーラムが提供する地上公募研究と文部科学省の基盤研究(C)によりサポートされた。

文 献

- 1) Ilyina-Kakueva, E.I., Portugalov, V.V. and Krivenkova, N.P. : Space flight effects on the skeletal muscles of rats. *Aviat. Space Environ. Med.*, 47 : 700 703 ,1976
- 2) Musacchia, X.J., Steffen, J.M., Fell, R.D., Dombrowski, M.J., *et al.* : Skeletal muscle atrophy in response to 14 days of weightlessness : vastus medialis. *J. Appl. Physiol.*, 73 : 44S 50S ,1992
- 3) Thomason, D.B., Biggs, R.B. and Booth, F.W. : Protein metabolism and β -myosin heavy-chain mRNA in unweighted soleus muscle. *Am. J. Physiol.*, 257 : R300 R305 ,1989
- 4) Ikemoto, M., Nikawa, T., Takeda, S., Watanabe, C., *et al.* : Space shuttle flight (STS 90) enhance degradation of rat myosin heavy chain in association with activation of ubiquitin-proteasome pathway. *FASEB J.*, 15 : 1279 1281 ,2001
- 5) Kondou, H., Miura, M., Nakagaaki, I., Sasaki, S., *et al.* : Trace element movement and oxidative stress in skeletal muscle atrophied by immobilization. *Am. J. Physiol.*, 262 (*Endocrinol.Metab.*, 25): E583 E590 , 1992
- 6) Droge, W. and Holm, E. : Role of cysteine and glutathione in HIV infection and other diseases associated with muscle wasting and immunological dysfunction. *FASEB J.*, 11 : 1077 1089 ,1997
- 7) Kano, M., Kitano, T., Ikemoto, M., Hirasaka, K., *et al.* : Isolation and characterization of a novel gene Sfig in rat skeletal muscle up-regulated by spaceflight (STS 90) *J Med. Invest.*, (in press)
- 8) Kim, Y., and Linkswiler, H. : Effect of level of protein intake on calcium metabolism and on parathyroid and renal function in the adult human male. *J. Nutr.*, 109 : 1399 1404 ,1979
- 9) インターネット(<http://www.tec-tsuji.com/nttgourmet/tec-tsuji/hotnews/spacefood/index-j.html>)

Mechanism of microgravity-induced muscle atrophy and development of effective space food against the atrophy

Takeshi Nikawa, Katsuya Hirasaka, Madoka Ikemoto, Mihoko Kano, Yuki Asanoma and Kyoichi Kishi

Department of Nutrition, The University of Tokushima School of Medicine, Tokushima, Japan

SUMMARY

To elucidate the mechanisms of microgravity-induced muscle atrophy, we focused on fast-type myosin heavy chain (MHC) degradation and expression of proteases in atrophied gastrocnemius muscles of neonatal rats exposed to 16-d spaceflight (STS-90). The spaceflight stimulated ubiquitination of proteins, including a MHC molecule, and accumulation of MHC degradation fragments in the muscles. Semi-quantitative RT-PCR revealed that the spaceflight significantly increased mRNA levels of cathepsin L, proteasome components, polyubiquitin, and ubiquitin-conjugating enzyme in the muscles, compared with those of ground control rats. The levels of μ -calpain, m-calpain, cathepsin B, and cathepsin H mRNAs were not changed by the spaceflight. We also found that tail-suspension of rats for 10 d or longer caused the ubiquitination and degradation of MHC in gastrocnemius muscle, as was observed in the spaceflight rats. In the muscle of suspended rats, these changes were closely associated with activation of proteasome and up-regulation of expression of mRNA for the proteasome components and polyubiquitin. Administration of a cysteine protease inhibitor, E-64, to the suspended rats did not prevent the MHC degradation. Our results suggest that spaceflight induces the degradation of muscle contractile proteins, including MHC, possibly through a ubiquitin-dependent proteolytic pathway.

To elucidate whether the ubiquitination was accompanied with oxidative stress, we measured markers for oxidative stress, such as thiobarbituric acid-reactive substance (TBARS) and glutathione disulfide (GSSG), in gastrocnemius muscle of tail-suspended rats. Glutathione (GSH) concentration in the muscle significantly decreased from Day 5 and reached a minimum value on Day 10. Tail-suspension reciprocally increased concentrations of TBARS and GSSG in parallel with enhancement of protein ubiquitination, suggesting that oxidative stress may play an important role in protein ubiquitination caused by tail-suspension. To prevent ubiquitination associated with oxidative stress, we also administered an antioxidative nutrient, cysteine, to tail-suspended rats. Intra-gastric supplementation of 140 mg/rat of cysteine for 2 wks or longer normalized the ratio of GSH to GSSG in the muscle and suppressed protein ubiquitination and MHC fragmentation, compared with supplementation of the equimolar amount of alanine. The cysteine supplementation significantly suppressed the loss of hindlimb muscle weight. Our results also suggest that supplementation of antioxidative nutrients, such as cysteine, may be beneficial to prevent ubiquitination of muscle protein caused by unweighting.

Key words : spaceflight, MHC degradation, ubiquitination, cysteine, tail-suspended rats