

親が遺伝的に微小重力で回転するかしないかに関わらず、宇宙で孵化した稚魚はどちらの系統も微小重力で回転せず、ふつうに泳ぐということである。⁵⁾つまり、微小重力での姿勢制御に関する感覚混乱つまり宇宙酔いは、宇宙で孵化した稚魚では生じないと結論された。地球上(重力のある場所)で長く育ったものが経験により身につけた感覚が存在してこそ、微小重力での宇宙酔いが起こるのであろう。したがって宇宙ステーションで育ったメダカの泳ぎには(宇宙に居る限り)、何の問題もないことが推測される。

系統による胚発生能の比較も行ってみた。地上で受精させ、発生が開始していることを確認したccT系統と他の系統の胚を、1個から数個ごとに金網容器の小さな区画に入れ、シャトルに搭載した(金網容器内は細かく区画分けされている)。できるだけ発生段階が初期の胚、つまり0日胚(stage11)および1日胚(stage17)を搭載した。と言っても、シャトル打ち上げはその30時間後であるから、打ち上げ時にはかなり発生段階の進んだ胚(stage19およびstage24)になっていたはずである。よって、それ以降の胚発生が微小重力で順調に進むかどうかをチェックする実験であり、目的はccT系統と他の系統との胚発生の能力の比較にあった。

結果はccT系統の孵化率の方が他の系統の胚よりも成績が良かった。たとえばccT系統は搭載した175個の胚のうち130個が孵化した(孵化率74%)が、他の系統は(他の3つの系統の胚の合計として)98個を搭載し、54個が孵化した(孵化率55%)。地上の実験でも、一般にccT系統の胚は薬剤や放射線といったストレスに比較的強いことが知られている。微小重力というストレスに対してもこの傾向が認められたことになる。⁵⁾ccT系統は成魚でも胚でも、宇宙ステーションでの実験に適したメダカの系統と言える。

宇宙ステーション用の水棲生物飼育装置の開発

宇宙実験は装置の良し悪しがすべてと言っても過言ではない。この点、日本は宇宙用の水棲生物飼育装置の開発では常に世界を一步リードしてきた。日本の装置自体も、この10年余りで大きな進化を遂げてきた。たとえば水質の維持には、魚の排泄するアンモニアをどう処理するかが重要である。1992年には鯉を1週間生存させるために、アンモニアを化学的に吸着する方法が採られた。1994年の我々の実験では飛行期間が2週間であったため、バクテリア(硝化菌)を用いたバイオフィルターが採用された。これは亜硝酸菌でアンモニアを亜硝酸に変え、さらに硝酸菌で亜硝酸を魚には比較的毒性の低い硝酸に変換する系である。やがて海水でも使用できる装置となり、ガマアンコウなる魚の宇宙での電気生理学実験に用いられた(1998年)。^{6,7)}このような輝かしい歴史のもと、宇宙ステーション用の水棲生物飼育装置の開発が宇宙開発事業団で進んでいる。⁸⁾小型魚(メダカやゼブラフィッシュ)の継代飼育、およびツメガエルの産卵からオタマジャクシの変態完了までの宇宙での実現を目指した設計となっている。これら3種の生物については、装置の性能はすでに国内外の多くの研究者のニーズに十分に答えられるレベルに達している。

文 献

- 1) Ijiri, K.: *Biol. Sci. Space*, **8**, 231 (1994).
- 2) Ijiri, K.: *Fish Biol. J. Medaka*, **7**, 1 (1995).
- 3) Ijiri, K.: *Adv. Space Res.*, **21**, 1155 (1998).
- 4) Ijiri, K.: *Adv. Space Res.*, **25**, 1997 (2000).
- 5) Ijiri, K.: *Biol. Sci. Space*, **9**, 3 (1995).
- 6) Sakimura, T. *et al.*: *Biol. Sci. Space*, **13**, 314 (1999).
- 7) Nagaoka, S. *et al.*: *Biol. Sci. Space*, **13**, 327 (1999).
- 8) Uchida, S. *et al.*: *Adv. Space Res.*, **30**, 797 (2002).

宇宙と細胞

桑井 康宏

人類が初めて宇宙に飛び出してから、およそ半世紀が経過した。この間、宇宙飛行によって、身体の中で神経系、循環系、筋・骨格系、造血・免疫系などにさまざまな変化が起きることがわかってきた。¹⁾骨からのミネラル分の流出や骨量の減少はよく知られており、²⁾同じような症状は宇宙飛行ラットでも観察されている。³⁾原因として、無重力(正確には微小重力)によって骨代謝に

異常をきたした結果、骨の形成と吸収のバランスが崩れたと考えられている。では一体なぜ、宇宙飛行によって骨にそのような異変がおきるのだろうか。もちろん極限環境から生ずるストレスやホルモン分泌変化による全身性の因子による影響も無視できないが、むしろ多くは、微小重力によって骨に直接的に引き起こされた問題としてとらえられている。そこで骨の形成に中心的な役割を

演ずる骨芽細胞に注目し、正常な骨芽細胞が微小重力による影響を受け、その機能に異変が起きると考え、正常なラット大腿骨の骨芽細胞を用いて宇宙実験を行った。

骨芽細胞培養の宇宙実験

ラット骨芽細胞を特殊な培養容器に入れ、スペースシャトルに搭載し、地球から約 300 km 離れた軌道上で 4～5 日間培養した。軌道上で宇宙飛行士たちは、位相差顕微鏡を用いて細胞の形態や生育状態を観察し、写真撮影を行うとともに、軌道上 3 日目に活性型ビタミン D₃ 添加培地への交換を行い、20 時間インキュベートしたのちグアニジンを注入し細胞を可溶化した。これと同じプロトコルで翌 4 日目から 5 日目にかけて、再度繰り返し実験を行った。可溶化した細胞や回収した培地は、シャトル内に冷凍状態で保存し、地上帰還後、定量的 RT-PCR 法により遺伝子 mRNA レベルの解析を行い、また酵素免疫法により、培地中の PGE₂ (prostaglandin E₂) などを定量した。以下、骨の増殖因子あるいはそのレセプター、さらにレセプター以降のシグナル伝達分子などいくつかを紹介する。

今回の宇宙実験のプロトコルでは、細胞数を直接計測することはできなかったが、その代わりに、細胞数の目安として、培養容器の中に含まれる細胞 DNA 総量を求めた。その結果、軌道上 4 日目では、培養容器あたり DNA 総量は、地上対照群に比べて、およそ半減していたが、軌道上 4 日目から 5 日目にかけての細胞 DNA 総量の増加率は、地上対照群と同じく、約 2 倍であった。⁴⁾ つまり宇宙飛行の比較的早い時期に、骨芽細胞に変化が生じ、細胞増殖のスピードが一時的にダウンしたのであるのか、あるいは、一時的に細胞死が誘導され、細胞数が半減したのであるのか。しかしその後は次第に回復し、宇宙飛行中においてもほぼ順調に細胞増殖することができるまでになったことを示唆している。

骨芽細胞によって産生され、骨に多量に存在する骨増殖因子として TGF- β (transforming growth factor- β) や IGF-I (insulin-like growth factor-I) などが知られている。これらは、骨芽細胞の増殖・分化、さらにはアポトーシスなど多岐にわたって重要な役割を演ずる。骨芽細胞において TGF- β スーパーファミリーに属する代表的な TGF- β 1 の産生が、宇宙では地上の半分以下に低下した。⁵⁾ IGF-I は成長ホルモンの作用と骨成長との間を橋渡しする重要な増殖因子であり、オートクライン/パラクライン的な作用によって、骨芽細胞による I 型コラーゲンの合成や骨基質の形成を促進する。宇宙では、骨芽細胞

での IGF-I の発現 (mRNA レベル) が、極端に低下することがわかった (図 1)。⁶⁾

実はこのとき、宇宙飛行中の骨芽細胞ではグルココルチコイドレセプターの発現が、地上の 5～10 倍も上昇していたのである。⁷⁾ IGF-I 遺伝子の転写は、グルココルチコイドによって抑制されることから、⁸⁾ 宇宙では、グルココルチコイド/グルココルチコイドレセプターを介して、IGF-I 遺伝子の転写が抑制されたのであろうか。

先天性の IGF-I 欠乏症では、骨量は著しく減少し、⁹⁾ 反対に骨芽細胞で IGF-I が過剰発現するトランスジェニックマウスでは、骨量が増加する。¹⁰⁾ このように内因性の IGF-I は骨の成長・形成を大きく左右するため、宇宙での骨芽細胞の IGF-I 発現の大幅低下は、骨量減少の誘因となる可能性が高い。さらに骨の中で IGF-I は、特殊な結合タンパク (IGFBP-5) などによって捕捉・保存されているが、宇宙では、この IGFBP-5 の発現も低下していた。⁷⁾

骨芽細胞で IGF-I が IGF-I レセプターに結合した後のシグナルは、レセプターチロシンキナーゼの基質である IRS-1 (insulin receptor substrate-1) や Shc (src homology and collagen) 複合体を介して伝えられ、Ras/MAP キナーゼ系などを活性化する。IRS-1 ノックアウトマウスでは骨量が減少するなど、骨芽細胞にとって IRS-1 は IGF-I シグナルに不可欠であり、もちろん骨代謝にとっても重要な役割を演じている。¹¹⁾ 筆者らが行った宇宙実験で、この IRS-1 の発現が、微小重力によってほぼ完全に抑制されることがわかった (図 2)。⁶⁾

このように、骨に対してアナボリックに作用する IGF-I の産生、骨の中で IGF-I を捕捉する結合タンパク、さらには IGF-I レセプター下流のシグナル伝達など、骨芽細胞における IGF-I をめぐる一連の反応が、微小重力に

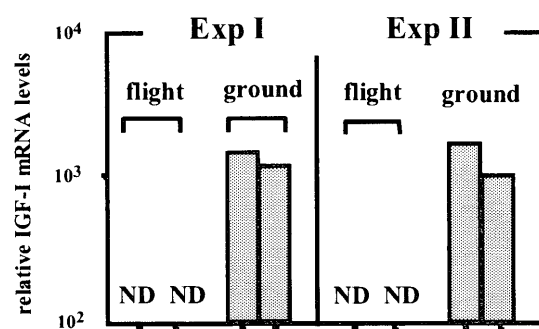


図 1. 宇宙飛行中の骨芽細胞の IGF-I 遺伝子発現。実験は飛行中 2 回繰り返し実施された。house-keeping 遺伝子 (GAPDH) に対して基準化した後の IGF-I mRNA レベルを細胞培養容器 (横軸) ごとに示す。ND, 検出されず。(文献 6 より改変)

よって大きく損なわれることが強く示唆されたのである。興味あることに、骨芽細胞の IGF-I レセプター自身の発現は、宇宙では地上に比べて約 2 倍上昇していた。⁶⁾ これと同じ現象は、他の研究グループからも報告されており、¹²⁾ 宇宙での骨量減少あるいは IGF-I 応答性の低下に対して、骨芽細胞内で誘導される一種の補償的な反応とも考えられている。

さらに Shc の発現も、宇宙飛行群では地上対照群の半分に低下していた (図 3)。¹³⁾ Shc は、リン酸化したレセプターへ結合すると、チロシンキナーゼの基質としてリン酸化され、それに続く Grb2 (growth factor receptor bound protein 2) や Sos (son of sevenless, Ras の GDP/GTP 交換因子) とともに Shc-Grb2-Sos 複合体を形成し、EGF レセプターや IGF-I レセプターなどのリガンド刺激を、下流の Ras/MAP キナーゼなどへ伝達する際の重要な

分子である。

すなわち、骨芽細胞での EGF レセプター自身の発現は、宇宙と地上とで差はなかったが、¹³⁾ EGF レセプター直下の重要なアダプタータンパクの発現が抑制されたのである。微小重力では、ラット骨芽細胞の一部の増殖因子レセプターあるいはレセプター下流のシグナル伝達が抑制され、このため骨の形成に必要な増殖因子の作用が十分に発揮されなくなるのかもしれない。

最近、骨芽細胞が持つ別の機能について、骨髓中の血液幹細胞から成熟した破骨細胞が形成されるには、骨芽細胞 (間質細胞) との間で、特定の分子を介して直接接触することが必要であることがわかってきた。そして骨芽細胞から産生・放出された PGE_2 が近傍の破骨細胞の前駆体などにパラクライン的に作用して、破骨細胞の成熟・活性化を促進することも確認されている。宇宙では、この PGE_2 の産生が、律速酵素 COX-2 (cyclooxygenase-2) の発現とともに、地上の 10 倍以上にも増加したのである (図 4)。⁴⁾ 同様に骨芽細胞によって産生され、近傍の破骨細胞を分化誘導することで知られている IL-6 (interleukin 6) の発現も、宇宙では地上の 5 倍以上に増加していた。⁴⁾

これらの変化が、実際に *in vivo* で、破骨細胞の成熟・活性化へ直結するかどうか確認する必要があるが、宇宙飛行で発症する骨ミネラル流出や骨量減少には、少なくとも、骨芽細胞の機能の変調が深く関わっていることが強く示唆された。骨芽細胞での PGE_2 は NO (nitric oxide) とともに、力学的刺激を骨形成に導く重要なメディエーターとしてもよく知られている。最近筆者らは、骨芽細胞において NO を合成する誘導型 NO 合成酵素 (iNOS) の発現が、宇宙では地上の 100 倍以上も上昇することを報告している。⁵⁾ 微小重力も一種の力学的刺激 (負荷の除去) として認知され、力学的負荷時と同様に PGE_2 や NO/

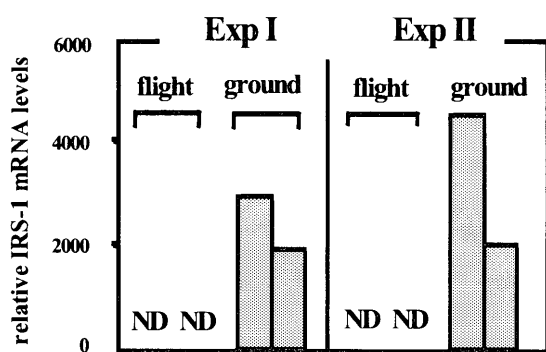


図 2. 宇宙飛行中の骨芽細胞の IRS-1 遺伝子発現. 実験は飛行中 2 回繰り返し実施された. house-keeping 遺伝子である GAPDH に対して基準化した後の IRS-1 mRNA レベルを細胞培養容器 (横軸) ごとに示す. ND, 検出されず. (文献 6 より改変)

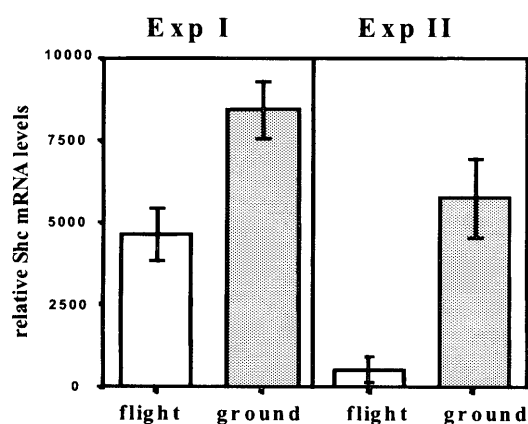


図 3. 宇宙飛行中の骨芽細胞の Shc 遺伝子発現. 実験は飛行中 2 回繰り返し行った. (Exp I & II) house-keeping 遺伝子である GAPDH に対して基準化した後の Shc mRNA レベルを表す. 各群 4 例の平均値と標準偏差 $P < 0.01$. (文献 13 より改変)

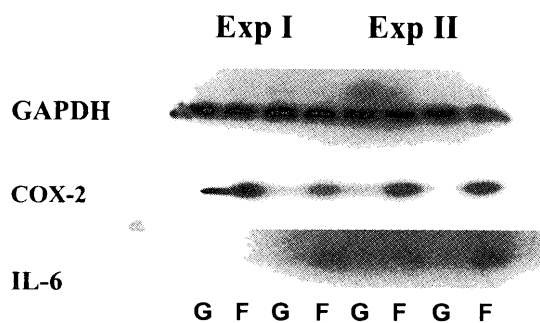


図 4. 宇宙飛行中の骨芽細胞の COX-2 および IL-6 遺伝子発現. 実験は飛行中 2 回繰り返し実施され、最上段は house-keeping 遺伝子である GAPDH の mRNA レベル. 細胞培養容器 (横軸) 毎に示す. F, 宇宙飛行容器; G, 地上対照容器. (文献 4 より改変)

iNOSが動員される。PGE₂やNO/iNOSという同じ物質が細胞内で総員されながら、まったく反対の結果（骨形成と骨萎縮）が引き起こされる。非常に興味深い現象であり、骨芽細胞でPGE₂やNO/iNOSが動員される真の意義は何なのか、今後、詳細に調べる予定である。

重力環境が変わると、培養した哺乳動物細胞の中で、イノシトールリン脂質代謝の変化やMAPのリン酸化が引き起こされ、¹⁴⁾そして遺伝子が動員される¹⁵⁾ことを、筆者らが発表してから10年少々しか経ていない。この間に、培養細胞を用いた宇宙実験は実に数多く行われるようになり、微小重力が細胞に及ぼす影響も次第に明らかにされるようになった。しかし、まったく同じ培養細胞を用いても、実験毎に相反する結果が生ずる場合もある。たとえば、マウス頭蓋冠由来MC3T3-E1細胞をスペースシャトル飛行中培養し、微小重力下でのオステオカルシン（骨に特異的に発現する代表的な基質タンパクのひとつ）の産生や遺伝子発現を調べた実験がいくつかのグループによって行われているが、宇宙飛行中に増加するという報告と、逆に低下するという報告がみられる。こ

の実験ごとに相反する結果については、培養システムや実験プロトコールの違いによる影響など、十分に検証し、宇宙実験に対する信頼性を高めなければならない。

文 献

- 1) Nicogossian, A. E. *et al.* (ed.): *Space Physiology and Medicine*, 3rd ed, Lea & Febiger, Baltimore (1994).
- 2) Vogel, J. M. and Whittle, M. W.: *Aviat. Space Environ. Med.*, **47**, 396 (1976).
- 3) Morey, E. R. and Baylink, D. J.: *Science*, **201**, 1138 (1978).
- 4) Kumei, Y. *et al.*: *J. Biotechnol.*, **47**, 313 (1996).
- 5) Kumei, Y. *et al.*: *Ann. NY Acad. Sci.* (投稿中)
- 6) Kumei, Y. *et al.*: *Ann. NY Acad. Sci.*, **973**, 75 (2002).
- 7) Kumei, Y. *et al.*: *J. Appl. Physiol.*, **85**, 139 (1998).
- 8) Delany, A. M. and Canalis, E.: *Endocrinol.*, **136**, 4776 (1995).
- 9) Zhao, G. *et al.*: *Endocrinol.*, **141**, 2674 (2000).
- 10) Laron, Z. *et al.*: *J. Bone Miner. Res.*, **14**, 156 (1999).
- 11) Ogata, N. *et al.*: *J. Clin. Invest.*, **105**, 935 (2000).
- 12) Bikle, D. D. *et al.*: *Am. J. Physiol.*, **267**, E822 (1994).
- 13) Akiyama, H. *et al.*: *Mol. Cell. Biochem.*, **202**, 63 (1999).
- 14) Kumei, Y. *et al.*: *Exp. Cell Res.*, **192**, 492 (1991).
- 15) Kumei, Y. *et al.*: *J. Cell Sci.*, **93**, 221 (1989).

カエルのカエルによるカエルのための宇宙

(Space of the frog, by the frog, for the frog shall not perish.)

山下 雅道

カエルの宇宙・重力生物学

生命が始まり、地球の歴史とともに進化してきたすがたを明らかにするのが、生物学にあたえられている使命である。¹⁾重力生物学は、地球が生命現象に与える環境要素のうち、重力に注目している。生物の形態や機能が重力によりどう決められており、重力へどのように適応しているのかを解明する。このような研究をすすめるのに、どのような現象、生物種を対象として選ぶのがよいかは、繰り返し検討されてきた。

両生類は、およそ4億年前のデボン紀に陸上に進出した初めての脊椎動物（四足類）である。陸上では、生命現象に関係する物理・化学的な環境や、熱や物質を輸送する過程が水中とは大きく異なる。高効率な生命活動を可能にする酸素は、空気中から豊富に得ることができる。空気は、その密度をはじめとするいろいろな物性が水とは大きく異なる。酸素・二酸化炭素やその他の物質の生

物体周囲での輸送は、生物体の大きさや形、生物の代謝や活動を支配している。したがって、水から空気への媒質の変化は、さまざまな現象に影響をおよぼし、生物の活動の様相をかえる。

陸棲化は、重力に抗して体やその各部を支えながら運動することを要求する。それまで生物体の密度とおおよそ等しい密度の水のなかで浮力によって体を支えられていたものが、空気中では浮力は1/1000と小さくなり、体重を自ら支持しなくてはならない。流体力学的な抵抗をきめる粘性は空気において低い。慣性力の支配する条件では動きの抵抗になる動圧は空気の密度の小ささに比例して小さい。²⁾このようなことから、陸上やさらに空中では、高効率な移動運動が可能になる。

陸上への進出には、耐乾燥、空気による呼吸のしくみを作らないといけないといったのりこえるべき高い障害もいくつかあった。熱・物質輸送過程は生物体の形やしくみをさまざまに制約し規定しており、水中から陸上へ