

## 「きぼう」実験が引き出す重力健康科学：機械刺激適応分子シャペロン $\alpha$ B-クリスタリンが重力適応を実現させた？！

(東大RIC) 跡見順子<sup>1</sup>, 藤田恵理<sup>1</sup>, 清水美穂<sup>1</sup>, 井尻憲一<sup>1</sup>, 秋光信佳<sup>1</sup>, (帝京科学大) 跡見友章<sup>2</sup>, 廣瀬昇<sup>2</sup>, (農工大) 渡辺敏行<sup>3</sup>, 桂田悠基<sup>3</sup>, (京大・院・理) 吉川研一<sup>4</sup>, (近畿大・生物理工) 赤坂一之<sup>5</sup>

Gravity health science from the future Kibo space study outcomes: Is gravity adaptation acquired by a mechanical stress-responding molecular chaperone  $\alpha$ B-crystallin ?!

*Yoriko Atomi<sup>1</sup>, Eri Fujita<sup>1</sup>, Miho Shimizu<sup>1</sup>, Ken-ichi Ijiri<sup>1</sup>, Nobuyoshi Akimitsu, Tomoaki Atomi<sup>2</sup>, Noboru Hirose<sup>2</sup>, Toshiyuki Watanabe<sup>3</sup>, Yuuki Katsurada<sup>3</sup>, Kenichi Yoshikawa<sup>4</sup>, Kazuyuki Akasaka<sup>5</sup>*

<sup>1</sup>The University of Tokyo, Radioisotope Center, Yayoi Bunkyo-ku, Tokyo, Japan 113-0332; <sup>2</sup>Teikyo University of Science, Department of Physical Therapy ; <sup>3</sup>Tokyo University of Agriculture and Technology, <sup>4</sup>Kyoto University, Department. of Physics, Grad. School of Sciences.; <sup>5</sup>Kinki University, High Pressure Protein Research Center, Institute of Advanced Technology. Corresponding to Yoriko Atomi (E-mail: [atomi@bio.c.u-tokyo.ac.jp](mailto:atomi@bio.c.u-tokyo.ac.jp))

**Abstract:** Space biology may contribute to health science especially in aging peoples, described as “The G-Connection” showing disuse atrophy phenomena written by astronaut Joan Vernikos. In space we cannot utilize well own life system evolved under the gravity, which is induced in the way of activity-dependent. The human being is a vertebrate and mammalian, evolved based on a principle to move, and in addition multicellular organism, having soft/elastic/flexible cells, differing from plant cells and microorganism with the hard cell wall. Therefore, it is valuable to compare responses to mechanical stimuli among various species. Recent studies show that aerobic exercise, which is mainly produced by slow antigravitational muscle, to induce coactivation of mitochondrial and cytosol myofibrillar protein like myosin by PGC-1 $\alpha$  is beneficial for protection of life-related diseases. Cells’ activities during the exercise contribute to our health. Maintenance of homeostasis for proteins with fibrous structure like cytoskeleton associating with the motor protein and extracellular matrix (ECM), which produces force, transfers it and convert it into motion like walking and running, is deeply related to health of our body, which consists of sixty millions of cells to live autonomically interacting together. Our body temperature is about 37°C. Since it is very difficult to keep right protein structure under such higher temperature, all biological system has developed molecular chaperone/stress protein system, which helps keeping protein structure naturally, refolding denatured form or breaking down it using special gavage system like proteasome and/or autophagy. Most of cellular organelle like mitochondria producing ATP, endoplasmic reticulum storing and releasing calcium as a mechanical signal, lysosome digesting unfolded protein or damaged organelles associates with cytoskeletal network, composed of microtubule, actin and intermediate filament, which organizes spatially the cell. As a result, cells respond to mechanical stimuli dynamically regulated at dual levels of molecular turnover and chemical equilibrium of assembly/disassembly between free monomer/dimer and protein higher structure like filaments. Microtubule develops more abundantly in slow/gravitational muscle cells corresponding to more mitochondria to endure/support tonic contraction. This study is designed to elucidate cellular adaptation mechanism of slow muscles, which highly develops in the human being normally to be active standing position with two legs, compared with four-leg animals. In soleus a molecular chaperone  $\alpha$ B-crystallin expresses and supports endurance of tonic contraction. We focus to elucidate the mechanism of sustainable dynamics maintained by  $\alpha$ B-crystallin and tubulin/microtubule. Recent studies show many roles of  $\alpha$ B-crystallin probably as molecular chaperone for proteins of focal adhesion like integrin, free forms of three cytoskeletons, caspase 3, of which cleavage results in mitochondrial apoptosis, unfolded proteins to proteasome with FBX4. In this study, we try to visualize a principle of cell responses cooperating for force development, mitochondrial activation, cytoskeletal dynamics observed in tonic contraction, using GFP-fusion proteins and fluorescent dye to measure various functions and elastic profiles, both analyzing system workable on the earth and in Kibou. Some applied methods have been developed to induce  $\alpha$ B-crystallin and/or factors consisting of slow muscle like mechanical stretch, mild heat stress, and the use of eggshell membrane. From these basic biological adaptive mechanism evolved on the earth, we propose strategy of gravity health science to protect against anti-gravitational muscle atrophy induced long journey to Mars by the human being, and aged people.

**Key words:** cytoskeleton, tubulin/microtubule, anti-gravitational muscle, mitochondria, molecular chaperone,  $\alpha$ B-crystallin, ECM,

## (1) 背景

### 1. 抗重力筋による身体運動と生活習慣病～宇宙実験から分かることへの戦略～

近年、生活習慣病などの主要な原因是、不適切な身体活動による遅筋のミトコンドリアの酸化能力の低下と運動した遅筋(赤筋)の萎縮によることが明らかになってきた<sup>1)</sup>。立位での歩行や活動を常態としたヒトでは、とくに遅筋である抗重力筋・ヒラメ筋が腓腹筋と同等に発達しており<sup>2)</sup>、腓腹筋比は、ラットの 10 倍である。遅筋は、I 型ミオシン/遅筋型ミオシンに代表される遅筋型筋原線維による持続的/緊張性の収縮とそのエネルギー供給に見合ったミトコンドリアによる ATP 産生に特徴付けられるが、両機能を担うタンパク質を同時に転写レベルで発現を高進するコアクティベータ PGC1  $\alpha$  が関わっていることを、ハーバード大学の Spiegelman 研究室では精力的にあきらかにしてきた。このコアクティベータは、遅筋だけではなく、エネルギーの供給と消費を身体内で時空間的に調節するため、肝臓や脂肪組織、そしてそれらを制御する脳においても同時に発現調節していることがあきらかにされ、動物個体(身体)全体でのシステムティックな制御系の存在が示され、重力場における健康・重力健康科学の必須性の背景が提起されている。

### 2. 宇宙生物学・宇宙実験地上モデルにより見いだされた抗重力筋の適応を担う低分子量ストレスタンパク質(sHSPs)・ $\alpha$ B-crystallin と細胞骨格・チューブリン/微小管

宇宙における骨格筋や骨の萎縮モデルであるラット後肢懸垂モデルは、実際の宇宙環境における動物や人における生体応答結果をよく反映していることが明らかになっている。我々は、約 20 年前に、このモデルを用いて、ヒラメ筋の萎縮で早期に特異的に減少するタンパク質として、 $\alpha$ B-crystallin を同定した<sup>3,4)</sup>。その後、 $\alpha$ B-crystallin は、ストレスタンパク質の仲間の sHSPs の一つであることがあきらかになり、現在ではタンパク質の変性を防ぐ(変性しかけたタンパク質のかたちを元に戻す)、あるいは変性し凝集沈殿することを防ぐために分解系に移行させることの手伝いをすることが cyclinD1 で明らかになっている<sup>5)</sup>。

C-elegance で熱ショック因子(HSF1)を過剰発現させると寿命が 1.7 倍延長する<sup>6)</sup>。その際に最も有効にタンパク質の凝集抑制に寄与したのが sHSPs であった。sHSPs は、分子量が小さいが、24~32 分子が緩く複合体・オリゴマーを形成するため<sup>7)</sup>、解析が難しく、HSP70 や HSP90 のようなストレスタンパク質よりも解析が遅れている。我々は、 $\alpha$ B-crystallin の変異タンパク質を遺伝子工学的に作成し<sup>7)</sup>、sHSPs が共通にもつ C 末に近い領域の  $\alpha$ -crystallin domain が、細胞骨格の一つであるチューブリン(微小管のフリーフォーム)の熱変性を抑制することをあきらかにしている<sup>8)</sup>。さらに疎水性アミノ酸が多い N 末側が、重合フォームである微小管結合タンパク質・MAPs と相互作用

する<sup>9)</sup>。 $\alpha$ B-crystallin の発現が高い通常の筋芽細胞やグリオーマ細胞では、微小管脱重合薬のノコダゾールに対する抵抗性が高い<sup>10)</sup>。中間径フィラメントも同様にフリーフォームを可溶化する<sup>11)</sup>、アクチンとの相互作用についても仮説が発表されている<sup>12)</sup>。人でも座業的な生活をしている高齢者ほど筋(外側広筋)の HSP27 と  $\alpha$ B-crystallin の発現が増え、さらにそのリン酸化フォームが増加している。これは変性したタンパク質の凝集沈殿から保護するためであると考えられる<sup>13)</sup>。

分子シャペロンが世話をするタンパク質基質は一つではないが、sHSPs が細胞骨格のフリーフォームと相互作用することから、そのフリーフォームの濃度により動的平衡を維持するこれらの細胞骨格の基本的システム制御系が、 $\alpha$ B-crystallin の発現の多い細胞では分化後においても維持されているという仮説が提起される。先に述べた PGC1  $\alpha$  が遅筋のタンパク質及びミトコンドリアタンパク質を転写レベルで制御しているが、この PGC1  $\alpha$  自体を制御する因子が、実は微小管の重合に影響する微小管重合制御薬であるタキソールやノコダゾールであることが上記 Spiegelman の研究室から報告されており<sup>14)</sup>、この仮説ほぼ正しいと思われる。精製したチューブリンの重水中の微小管重合(通常の条件よりも安定化)が無重力の影響を受けることは、Tabony のグループが航空機実験で再現した<sup>15)</sup>。

### 3. 骨格筋における力学的強度への対応とダイナミクスの維持: 3つの細胞骨格を束ねるプレクチン、細胞内膜系のダイナミクス

骨格筋における細胞骨格の研究はきわめて遅れていたが、最近、神経筋結合部位に発現している膜タンパク質であるアンキリン B が、一方で微小管と結合し、もう一方でダイナクチン 4 を介してジストロフィンと結合していることが報告された<sup>16)</sup>。ジストロフィンはすでに細胞膜裏打ち構造のアクチンフィラメントネットワークとも結合していることがあきらかにされている。さらに骨格筋では、3つの細胞骨格を連結するタンパク質・プレクチン(プラキンファミリー)が発現しており、細胞の接着班・力発揮-伝播の基点でしかもチャネルタンパク質や各種受容体も集まっている横紋筋のコスタメア構造では細胞の接着班とも連携し<sup>17)</sup>、常時機械的刺激に対応する強度維持を担っている。常時伸縮し続ける抗重力筋では、強度に耐えることと平行してカルシウムやエネルギー供給、膜タンパク質や分泌タンパク質の合成・分解を持続する必要があり、小胞体やゴルジ、ミトコンドリアやリソーム、等の内膜系細胞内小器官をも動的に構造維持する必要がある。微小管とゴルジの関係と役割を研究し続けてきた NIH の Ralston のグループ<sup>18)</sup>は、昨年の ASCB でマウスの足裏の小さな筋を培養系に移行し、顕微鏡下で微小管のプラス端に結合するタンパク質 EB1 の GFP 融合タンパク質のダイナミクスが通常の増殖期の細胞と同様に観察されることを紹介した。同グループは、微小管は遅筋線維で良く発達していることも報告している<sup>19)</sup>。この微小管は、

ゴルジ体のダイナミクスをも維持しており、細胞骨格と細胞内膜系が連動するよう組織化されている横紋筋ではダイナミクスを観察できる方法でこそ、その本態をあきらかにすることが示されつつある。

#### 4. 緊張性収縮を支える機械的応答と運動したタンパク質のホメオスタシス維持: $\alpha$ -B-crystallinノックアウトマウスは、ストレスへの抵抗性が減退する

宇宙における骨格筋の萎縮と細胞骨格の関係をみた報告は少ないが、宇宙環境への長期滞在では遅筋(線維)の萎縮が特異的であり、遅筋線維のアクチンフィラメントの長さの不揃いが報告されている<sup>20)</sup>。 $\alpha$ -B-crystallinも含めて分子シャペロン機能をもつストレスタンパク質を種々の神経筋骨格系の病態マウスに発現させ、変性タンパク質の凝集を低減させる効果が報告されている<sup>21)</sup>。

$\alpha$ -B-crystallin ノックアウトマウスでは、大きな機能障害は観られなかつた<sup>22)</sup>。しかし、 $\alpha$ -B-crystallin ノックアウトマウスのレンズから調整した細胞では異常増殖が観察され、ガン抑制遺伝子であるp53の機能の低下が観られた<sup>23)</sup>。さらにこの細胞モデルを用いて Bai et al., (2003)は、細胞増殖の異常を報告、次いで Lin et al., (2006)はこの $\alpha$ -B-crystallin(-/-)細胞を用いて、細胞周期のG1期からS期への制御因子であるD1サイクリンがユビキチンプロテアソーム系で分解されることが障害されたことから、ユビキチン化の鍵となるユビキチナリガーゼE3(転移酵素)は、FBX4と $\alpha$ -B-crystallinの複合体であることを発見した<sup>24)</sup>。この $\alpha$ -B-crystallin はリン酸化フォームである。P38 MAPキナーゼによる57番目のセリンのリン酸化は、キャスパー<sup>3</sup>の活性化(切断)を抑制し、アポトーシスへの移行を阻止する<sup>21,25,26)</sup>。このリン酸化の役割は自己免疫疾患や、神経変性病及び加齢<sup>13)</sup>によっても変性タンパク質の凝集を抑制するのに寄与している。

遅筋は速筋に比べて、ストレスタンパク質が多く発現している。有酸素運動では、タンパク質の合成と分解の両方が上がる<sup>27)</sup>。つまり両歯車が回転していればタンパク質のホメオスタシスが維持されやすい。血管も発達し、ミトコンドリアが多く、ミトコンドリア内でのATP産生と共に電子伝達系の酵素複合体Iによる補酵素ニコチンアミドヌクレオチドNADHの代謝と運動した脱アセチル化酵素であるサーチュインファミリーが、きわめて微妙なバランスで長寿や神経疾患に効果を示すことが明らかになってきた<sup>28)</sup>。ストレスタンパク質一群の発現調節を担う熱ショック因子もまたサーチュインにより脱アセチル化されることで活性化する<sup>29)</sup>。サーチュインは、ミトコンドリア、核、細胞質のいずれでも機能している。健康とは、従来考えられていた糖や脂質の代謝の増減だけの問題ではなく、代謝を活性化(あるいは抑制)するのに必要な各種酵素タンパク質やさらにそれらの代謝系全体の活性化を調節する転写因子の修飾、さらにはそれらの代謝の切り替えに関与する鍵を握る酵素タンパク質の不安定性などが相互に関係していると考えられるようになってきた。鍵酵素や転写因子として機能するタンパク質ほど不安定である可能性が大きく、タンパク質のターンオーバー、つまり合成と分解がともに回転する常態の維持が鍵となる。細

胞骨格自体の維持(つまりフィラメントの伸長・短縮の平衡状態の維持)にもATPやGTPのエネルギーが必須である。遅筋の持続的な収縮とは、きわめて微妙なNAD代謝、酸化的リン酸化によるエネルギー产生とタンパク質のホメオスタシスの両輪を回すことでもある。またエネルギー产生だけではなく、その代謝を維持するためのUCPの活性化による熱产生も同時に稼動させることで温度を維持することも同時に行っている。すなわち緊張性収縮は、タンパク質の合成も分解もともに高くすることで、細胞の修復系を稼動させ続けているともいえる。培養細胞では通常の状態でも30%という高い間違いを犯していることが報告されている<sup>30)</sup>。

宇宙の微小重力環境で萎縮するのは遅筋であり、生活習慣病においても不活性化するのは遅筋である。構成的に活動していることそのことが、維持に必要なので、筋量の増加をねらう筋力トレーニングよりも、遅筋の維持や細胞内外の環境を維持する刺激を効果的に与えるほうが遅筋の変性への対応策となる可能性がある。我々は、ストレッチ<sup>31)</sup>やマイルドな温度の上昇(2°Cの上昇でPGC1 $\alpha$ が活性化<sup>31)</sup>、卵殻膜摂取などにより、これらの代謝を活性化することが可能かどうかを研究している。またサーチュイン群を活性化するというポリフェノール類等の抗酸化剤<sup>32)</sup>や類似の効用をもつ合成分子などの利用も考えられるかもしれない<sup>33)</sup>。しかし、いずれにせよ筋の活動は必須である。緊張性収縮を担う構造特性と適応構造をあきらかにすることが重力に適応した抗重力筋の萎縮防止メカニズムの解明には必要で、本研究では、上記 $\alpha$ -B-crystallinを軸として緊張性収縮を可能にする細胞の構造-機能連関特性を可視化する実験系を、主に細胞培養系で構築する。

## (2) 研究構想

### 1. 細胞実験

#### 1)これまでの研究と今回の提案の意義

図1に2000年に報告した両生類腎臓A6細胞と哺乳類(ラット)の株細胞の重力応答を示す。生涯を水中で生活する両生類ゼノパスのA6細胞の細胞増殖は、6Gで最大になる<sup>34)</sup>が、哺乳類細胞では40Gと高い。ラット筋芽細胞L6と $\alpha$ -B-crystallinの発現を増やしたL6SE細胞及びA6細胞の培養皿上での移動速度をタイムラプス撮影で観察したところ、図1Bに示すように低かった(ほとんど移動しない)が、A6細胞及び $\alpha$ -B-crystallinの発現を抑制したL6AS細胞では移動速度が約4倍に上がった。水棲動物であるゼノパスのA6細胞と $\alpha$ -B-crystallinの発現を抑えたL6AS細胞の移動度が類似していることは興味深い。 $\alpha$ -B-crystallinは、緊張性収縮に必要な細胞接着部位を恒常に補強し続け、細胞が移動せず持続的に収縮できるような構造を支えていると考えられる。遅筋ではZ帯の幅が広いことに対応するのかかもしれない。遺伝病を含め多くの筋の病態では、接着班に対応するZ帯が破壊される<sup>35)</sup>。

図2に、動物細胞の重力応答に関して考案すべき綱目についてまとめた。

## 2) 細胞の張力発揮とダイナミクスの可視化及び $\alpha$ -B-crystallin の時空間的影響

数多くの地上実験が必要だが、最終的には「きぼう」上で $\alpha$ -B-crystallin の発現を制御することで、張力発揮特性をも含めて接着の力を測定できる細胞基盤(二光子励起共焦点レーザー顕微鏡で作成したアクリルアミド製のマイクロ剣山;図3)上に筋芽細胞/筋管細胞/心筋細胞等を接着させ、その動態を、次ぎの3段階で測定する。

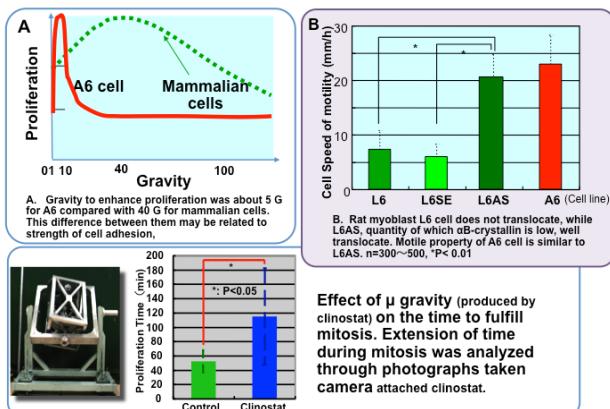


Fig. 1 Specificity in proliferation, responses and speed of cell motility of amphibian Xenopus A6 cell & mammalian rat  $\alpha$ B-crystallin-antisense cell

■How to study "An animal cell responses to gravity" from a standpoint "Gravity Health Science"? →Examine "sustainable responses of animal cell", related to adhesion, tonic contraction/sustainable tension development →Verify an idea and a method to analyze of motile and adhesive properties of animal cells

### "Animal cells are very dynamic!"

- These properties may be dependent on dual turn over of molecules and formation of protein complex like polymerization/depolymerization (depending on energy usage)?
- Visualization of energy production & utilization at tonic contraction (mitochondrial electrical potential/heat production)
- Visualization of cell shape, motility, dynamics, force, mitochondrial activity.

### ■What experimental model is good?

1) Amphibian Xenopus kidney cell (Atomi group 2000/Asashima group, 2010)

2) Mammalian rat/mouse myoblast/myotube

- Differentiation to slow muscle and maintenance it

### ■Development of method

- Labeling of molecules/cells using GFP or radioisotope
- Dynamic analysis of cells/molecules (time-lapse - FRAP - FRET - turnover rate using radioisotope)
- Property of force development of cells (the use of 3D- $\mu$  columns produced by laser etching named by "Kenzan")
- Use of centrifuge/clinostat to add gravity/ $\mu$  gravity, and experiment in space "Kibou".

■Survival state and responsiveness to gravity

- development, differentiation (diff), sustainability after diff.
- proliferation/adhesion/cell-cell contact/differentiation
- living environment (water, land, space)

### ■Key to analyze on the earth

- Responses to centrifuge/clinostat
  - proliferation/differentiation
  - adhesion/dynamics/interaction among three cytoskeletons/cytoskeleton dynamics/Ca<sup>2+</sup> dynamics/mitochondrial activity
- Stress protein to respond gravity
  - Function of  $\alpha$ B-crystallin
  - Function to stabilize cytoskeleton
  - Decreased stability, changed shape, decreased mitochondrial activity, increased apoptosis, abnormal proliferation due to decreased expression of  $\alpha$ B-Crystallin
  - Function of  $\alpha$ B-crystallin in vitro, in vivo

Fig. 2 Experimental conditions to consider and various problems to visualize intrinsic property of mammalian cells and response to gravity, and effects of molecular chaperone (stress proteins) to give adaptability on the earth and possibility in space.

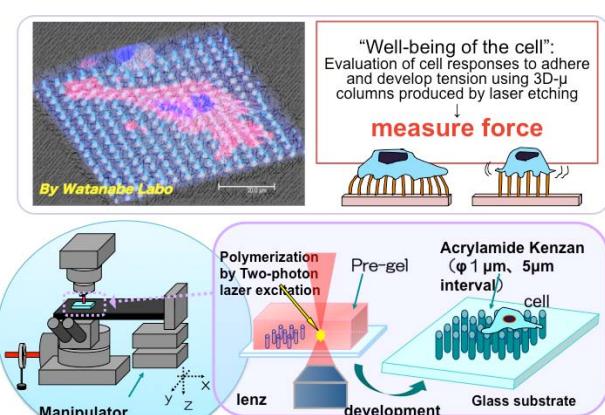


Fig. 3 Visualizing and measurement of cellular responses including developing force

a)放射性同位元素を加え、タンパク質のターンオーバーを生化学的に解析する。b)細胞の形態及び動態の観察、c)細胞内力学応答構造関連分子のダイナミクス:細胞骨格、 $\alpha$ -B-crystallin 及び関連分子の GFP 融合タンパク質を発現させ、タイムラプス撮影すると同時に、FRAP などで、タンパク質構造体の重合・脱重合などの動態を解析する。d)細胞分裂などのダイナミクス(基礎条件として、増殖・分化の特性を解析する)。基盤の柔らかさを変えることで、たわみ具合から細胞の力や方向性を測定することができる。質量はあるが重さが消失する宇宙において接着性の細胞の張力や細胞骨格のダイナミクス及びミトコンドリアのエネルギー準位、カルシウム動態などを蛍光タンパク質や色素を用いた可視化によりあきらかにする。

## 2. まとめと今後の展望

$\alpha$ -B-crystallin は、MAP キナーゼなどによりリン酸化されると FBX4 と複合体を形成することでユビキチン E3 としてタンパク質の分解に関わることが報告されている<sup>36,37</sup>。また、 $\alpha$ -B-crystallin は、最近脂肪細胞<sup>38</sup>やレチナ色素上皮細胞<sup>39</sup>から分泌されること、脊椎硬化症(MS)などの免疫疾患には、ヒトリコンビナント  $\alpha$ -B-crystallin タンパク質の静注により、病状が軽減すること<sup>40</sup>などが報告されて

いること等も、 $\alpha$ -B-crystallin が、細胞骨格と細胞膜とをつなぐような親水性と疎水性の両方の性質を持つ分子シャペロンとして機能していることと関係があると考えられる。細胞の接着のサポートやミトコンドリアのアポトーシスの最終段階に働くカスパーゼの切断を  $\alpha$ -B-crystallin が阻止することが関わっている<sup>26</sup>。その結果、免疫応答を補助するなど、細胞の内外でダイナミックな細胞膜と細胞骨格を連携させて機能維持を担うため力学的ストレスを受容・伝達に関わるタンパク質達を変性凝集から護っていると考えられる。今後、 $\alpha$ -B-crystallin ノックアウトマウス<sup>22,40,41</sup>の利用や、人の病態時の  $\alpha$ -B-crystallin の動態も含めて研究を進めることで、身体内、細胞内外のタンパク質のホメオスタシス維持に機能している  $\alpha$ -B-crystallin の研究成果をフォローしながら、細胞のみならず、動物実験や人の宇宙の長期滞在への有効な方法論を提起してゆくことができると考えている。

## 参考文献

- Handschin, C. & Spiegelman, B.M., The role of exercise and PGC1alpha in inflammation and chronic disease. *Nature* 454, 463-469 (2008).
- 佐竹隆、跡見順子、& 岡島佳樹、常生活における運動の下腿三頭筋重量と相対重量への影響について. *体力科学* 36, 25-30 (1987).
- Atomi, Y., Yamada, S., & Nishida, T., Early changes of alpha B-crystallin mRNA in rat skeletal muscle to mechanical tension and denervation. *Biochem Biophys Res Commun* 181, 1323-1330. (1991).

- 4) Atomi, Y., Yamada, S., Strohman, R., & Nonomura, Y., Alpha B-crystallin in skeletal muscle: purification and localization. *J Biochem (Tokyo)* 110, 812-822. (1991).
- 5) Barbash, O. & Diehl, J.A., SCF (Fbx4 / alphaB - crystallin) E3 ligase: when one is not enough. *Cell Cycle* 7, 2983-2986 (2008).
- 6) Hsu, A.L., Murphy, C.T., & Kenyon, C., Regulation of aging and age-related disease by DAF-16 and heat-shock factor. *Science* 300, 1142-1145 (2003).
- 7) 藤田恵理, タンパク質のホメオスタシス-低分子量ストレスタンパク質と細胞骨格. *Biol. Sci. Space.* 22, 148-157 (2008).
- 8) Ohto-Fujita, E., Fujita, Y., & Atomi, Y., Analysis of the alphaB-crystallin domain responsible for inhibiting tubulin aggregation. *Cell Stress Chaperones* 12, 163-171 (2007).
- 9) 藤田義信, 低分子量ストレスタンパク質 αB-クリスタリンと微小管の相互作用 (博士論文). (2006).
- 10) Fujita, Y., Ohto, E., Katayama, E., & Atomi, Y., alphaB-Crystallin-coated MAP microtubule resists nocodazole and calcium-induced disassembly. *J Cell Sci* 117 (Pt 9), 1719-1726 (2004).
- 11) Nicholl, I.D. & Quinlan, R.A., Chaperone activity of alpha-crystallins modulates intermediate filament assembly. *Embo J* 13, 945-953 (1994).
- 12) Mounier, N. & Arrigo, A.P., Actin cytoskeleton and small heat shock proteins: how do they interact? *Cell Stress Chaperones* 7, 167-176 (2002).
- 13) Yamaguchi, T. et al., Age-related increase of insoluble, phosphorylated small heat shock proteins in human skeletal muscle. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 62, 481-489 (2007).
- 14) Arany, Z. et al., Gene expression-based screening identifies microtubule inhibitors as inducers of PGC-1alpha and oxidative phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 4721-4726 (2008).
- 15) Papaseit, C., Pochon, N., & Tabony, J., Microtubule self-organization is gravity-dependent. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 8364-8368 (2000).
- 16) Ayalon, G., Davis, J.Q., Scotland, P.B., & Bennett, V., An ankyrin-based mechanism for functional organization of dystrophin and dystroglycan. *Cell* 135, 1189-1200 (2008).
- 17) Boyer, J.G., Bernstein, M.A., & Boudreau-Lariviere, C., Plakins in striated muscle. *Muscle Nerve* 41, 299-308 (2010).
- 18) Zaal, K.J. et al., Who needs microtubules? Myogenic reorganization of MTOC, Golgi complex and ER exit sites persists despite lack of normal microtubule tracks. *PLoS One* 6, e29057 (2010).
- 19) Ralston, E., Lu, Z., & Ploug, T., The organization of the Golgi complex and microtubules in skeletal muscle is fiber type-dependent. *J Neurosci* 19, 10694-10705 (1999).
- 20) Fitts, R.H., Riley, D.R., & Widrick, J.J., Physiology of a microgravity environment invited review: microgravity and skeletal muscle. *J Appl Physiol* 89, 823-839 (2000).
- 21) Hishiya, A. & Takayama, S., Molecular chaperones as regulators of cell death. *Oncogene* 27, 6489-6506 (2008).
- 22) Brady, J.P. et al., AlphaB-crystallin in lens development and muscle integrity: a gene knockout approach. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42, 2924-2934 (2001).
- 23) Bai, F., Xi, J.H., Wawrousek, E.F., Fleming, T.P., & Andley, U.P., Hyperproliferation and p53 status of lens epithelial cells derived from alphaB-crystallin knockout mice. *J Biol Chem* 278, 36876-36886 (2003).
- 24) Lin, D.I. et al., Phosphorylation-dependent ubiquitination of cyclin D1 by the SCF(FBX4-alphaB crystallin) complex. *Mol Cell* 24, 355-366 (2006).
- 25) Webster, K.A., Serine phosphorylation and suppression of apoptosis by the small heat shock protein alphaB-crystallin. *Circ Res* 92, 130-132 (2003).
- 26) Steinman, L., A molecular trio in relapse and remission in multiple sclerosis. *Nat Rev Immunol* 9, 440-447 (2009).
- 27) Goldspink, D.F., Exercise-related changes in protein turnover in mammalian striated muscle. *J Exp Biol* 160, 127-148 (1991).
- 28) Saunders, L.R. & Verdin, E., Cell biology. Stress response and aging. *Science* 323, 1021-1022 (2009).
- 29) Westerheide, S.D., Anckar, J., Stevens, S.M., Jr., Sistonen, L., & Morimoto, R.I., Stress-inducible regulation of heat shock factor 1 by the deacetylase SIRT1. *Science* 323, 1063-1066 (2009).
- 30) Schubert, U. et al., Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature* 404, 770-774 (2000).
- 31) Yamaguchi, T., Suzuki, T., Arai, H., Tanabe, S., & Atomi, Y., Continuous mild heat stress induces differentiation of mammalian myoblasts, shifting fiber type from fast to slow. *Am J Physiol Cell Physiol* 298, C140-148 (2010).
- 32) Speciale, A., Chirafisi, J., Saija, A., & Cimino, F., Nutritional antioxidants and adaptive cell responses: an update. *Curr Mol Med* 11, 770-789.
- 33) Imai, S., SIRT1 and caloric restriction: an insight into possible trade-offs between robustness and frailty. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 12, 350-356 (2009).
- 34) Tanaka, M. & Atomi, Y., [Gravitational response of Xenopus A6 cells]. *Biol Sci Space* 14, 200-201 (2000).
- 35) Goldfarb, L.G. & Dalakas, M.C., Tragedy in a heartbeat: malfunctioning desmin causes skeletal and cardiac muscle disease. *J Clin Invest* 119, 1806-1813 (2009).
- 36) den Engelsman, J., Keijser, V., de Jong, W.W., & Boelens, W.C., The small heat-shock protein alpha B-crystallin promotes FBX4-dependent ubiquitination. *J Biol Chem* 278, 4699-4704 (2003).
- 37) Barbash, O., Egan, E., Pontano, L.L., Kosak, J., & Diehl, J.A., Lysine 269 is essential for cyclin D1 ubiquitylation by the SCF(Fbx4/alphaB-crystallin) ligase and subsequent proteasome-dependent degradation. *Oncogene* 28, 4317-4325 (2009).
- 38) Lehr, S. et al., Identification and validation of novel adipokines released from primary human adipocytes. *Mol Cell Proteomics* 11, M111 010504 (2012).
- 39) Gangalum, R.K., Atanasov, I.C., Zhou, Z.H., & Bhat, S.P., AlphaB-crystallin is found in detergent-resistant membrane microdomains and is secreted via exosomes from human retinal pigment epithelial cells. *J Biol Chem* 286, 3261-3269 (2011).
- 40) Ousman, S.S. et al., Protective and therapeutic role for alphaB-crystallin in autoimmune demyelination. *Nature* 448, 474-479 (2007).
- 41) Kase, S. et al., alphaB-crystallin regulation of angiogenesis by modulation of VEGF. *Blood* 115, 3398-3406 (2010).