

博士論文（要約）

熱による筋融解のモデル生物学的研究

平成29年度

東北大学大学院生命科学研究科
生態システム生命科学専攻

門間 健太

熱中症は、近年の地球規模での温暖化など気候変動に伴い死亡率の急激な増加が概算される深刻な疾患である (Patz *et al.*, 2005; Rowlands *et al.*, 2012). 高温や多湿な環境下で長時間活動することで、深部体温が 40°C 以上に上昇した際に生じる急性の組織傷害や多臓器不全を伴う疾患をさす。疫学は、高齢者の男女ともに日常生活で起こる非労作性熱中症が多く、重症例も多い。初期にはめまい、倦怠感や筋攣縮などの症状がみられ、休養や治療などの適切な対応を取ることで快方に向かう。しかし、ある一定の閾値を超え症状が進行すると、筋原線維の崩壊に伴う横紋筋融解症が生じ、その結果、腎不全を来し、最後には死に至る (Abderrezak *et al.*, 2002).

ヒトをはじめとする後生生物での高温ストレスにより生体内反応として、小胞体(ER)に異常なタンパク質が蓄積することで ER ストレスおよび代償性機構である小胞体ストレス応答 (Unfolding Protein Response: UPR) が起こる (Walter and Ron, 2011). 加えて、小胞体から細胞質への Ca^{2+} 過剰漏出が引き起こされ、ミトコンドリアから ROS が発生し、酸化ストレスが生じることも知られている (Hall *et al.*, 2001; Michelucci *et al.*, 2015). ER は細胞内における Ca^{2+} の貯蔵器官であり内部の Ca^{2+} 濃度は 0.1 から 1mM 程度に、一方、細胞質やミトコンドリア内では 0.01mM 程度に維持されている (Hajnocy *et al.*, 2003; Fig. 1). ミトコンドリアは、酸素呼吸により細胞内のエネルギーを生産することが主な役割だが、ER 膜上の Inositol triphosphate (IP3)/Ryanodine receptor から放出された Ca^{2+} を一過的に取り込み細胞の恒常性維持にも関わるが、過剰な Ca^{2+} の蓄積はミトコンドリア膜の透過性を亢進させて、Cytochrome c に代表される各種アポトーシス誘導因子の放出につながる (Chandel *et al.*, 1998; Fleury *et al.*, 2002, Orrenius *et al.*, 2003; Graier *et al.*, 2008). これらの多くの知見は、培養細胞を用いた研究を中心に明らかにされてきた。

骨格筋細胞では、筋原線維の収縮に Ca^{2+} を利用し、これらは筋小胞体 (Sarcoplasmic reticulum: SR) から Ryanodine receptor (RYR) を介して放出される。悪性高熱症患者 (揮発性吸入麻酔薬などにより骨格筋細胞内の Ca^{2+} 貯蔵庫である筋小胞体から細胞質内への Ca^{2+} 放出機構が異常に亢進する疾患、10 万人に 1 人の頻度で発症) および熱中症患者に共通の素因があることが示唆され、RYR の変異が同定されている (MacLennan and Phillips, 1992; Rosero *et al.*, 2009; Tobin *et al.*, 2001; Thomas and Crowhurst, 2013; Nishio *et al.*, 2009). RYR 変異を導入したモデルマウスを用いた研究では、高温環境で体温が著しく上昇すること、骨格筋において細胞質へ過剰な Ca^{2+} が

漏出し突然死を誘発することが報告されている (Yang *et al.*, 2006; Durham *et al.*, 2008). しかしながら, 高温によって誘発される Ca^{2+} 漏出から筋融解への詳細な分子メカニズムは明らかになっていない. 骨格筋を構成する筋細胞は筋線維とも呼ばれ, 幅 0.1mm, 長さ数 cm の細長く, これらが束のように集まって筋肉を構成している. 筋細胞は多核細胞で, 細胞質には筋に特異的な細胞小器官として筋原線維が縦方向に充満し, 核ならびにミトコンドリア, SR が外側に押しつけられ, 筋鞘と呼ばれる細胞膜で覆われている (Fig. 2). さらに筋原線維には, アクチンとミオシンが交互に重なりスライドすることで収縮を可能とするサルコメアと呼ばれる特殊な構造を形成している. サルコメアから, 筋原線維, さらに筋線維が多数集まって筋肉が構成されていることから, 分子レベルでの解析の困難さの要因につながっている.

モデル生物の一つである *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) は, 非寄生性であり土壌中の細菌などを捕食する線虫の一種で, 分子生物学的解析や生理学的解析を行う上で様々な利点を持つ生物である. まず, 分子生物学的解析における利点として 1998 年に全ゲノム配列が解読されていること, 遺伝子, 多型, 遺伝マーカー, 変異株等の情報は統合データベースである WormBase から容易に得ることができることが挙げられる (Sequencing Consortium, 1998; WormBase <http://www.wormbase.org/>). 特に, ゲノム上にある約 2 万遺伝子の約 4 割は, ヒトゲノムとの相同性が確認され基本的な生命現象は相似している. このことから *C. elegans* は, ヒトのモデル生物として有用と考えられている. 次に, 生理学的解析における利点として受精から成虫に至るまでの細胞系譜と, 発生過程での細胞の位置が完全に明らかにされていることが挙げられる. 約 1 mm の成虫では 956 個の体細胞からなり, 生物としての必要最低限の体制 (表皮, 筋肉, 神経, 消化器官, および生殖器官) をもつ. 95 個からなる体壁筋は, 脊椎動物の骨格筋と構造的にも機能的にも類似している (Moerman and Fire, 1997; Lecroisey *et al.*, 2007). その他に, ライフサイクルが約 3 日と比較的短いこと, 成虫では生殖細胞以外の細胞分裂は停止するため細胞に蓄積された損傷の変化を観察しやすいことから老化やストレス感受性の評価に用いられることが多く, その耐性機構の知見も豊富である (Sulston and Horvitz, 1997; Kenyon, 1985).

これまで *C. elegans* において, 体壁筋の収縮・弛緩機構に関する研究が報告されてきた. *C. elegans* の運動機能をつかさどる体壁筋は, 一つの細胞に一つの核を持つという脊椎動物における平滑筋としての特徴と, 骨格筋としての特徴であるサルコメア構

造を併せ持つ。興味深いことに、体壁筋を骨格筋として考えた場合、ミトコンドリアが豊富に存在する遅筋および速筋としての両方の特徴を持つ。一般的に、筋線維型はトロポミオシン (TPM) アイソフォームの存在割合で決定される (Oe *et al.*, 2011)。この分類法でも *C. elegans* の体壁筋は遅筋および速筋としての特徴を持つことが示唆されている。興奮収縮連関は他の後生生物と同様で体壁筋は全か無かの法則に従い、閾値を超えた場合には RYR/UNC-68 から Ca^{2+} が放出され筋収縮機構が活性化される (Liu *et al.*, 2011)。

リアノジンは、中南米産のヤナギ科の樹木から得られる有毒アルカロイドで、RYR に結合すると SR から Ca^{2+} が放出され、持続的な筋収縮を引き起こす。線虫においてもリアノジン処理により持続的な筋収縮が生じるが、その耐性変異として RYR のホモログである *unc-68* 遺伝子の欠損変異体を得られた (Maryon *et al.*, 1996)。*unc-68* 欠損変異体においては、運動機能の著しい低下が認められるが、サルコメア構造を含めた筋細胞の構造的欠陥はなく、成虫までの発生ならびに世代交代も可能で、筋細胞における Ca^{2+} の役割を研究する上では、この線虫の欠損変異体を用いた実験系が大変有用である。また、個々の筋細胞内では筋原線維が一層に配列し、内側に一つの核ならびにミトコンドリアが筋原線維を裏打ちするようにフィラメント状に配置し、それぞれが一層であることから、顕微鏡によるライブ観察も比較的容易に行うことができる (Fig. 3)。加齢に伴い、筋細胞のミトコンドリアの断片化が促進されることも観察されてきた (Regmi *et al.*, 2014)。さらに、線虫では高温ストレスによる運動性麻痺が報告されている (Furuhashi and Sakamoto, 2014; Furuhashi and Sakamoto, 2015)。また、高温ストレス耐性には、寿命延伸や酸化ストレス耐性機構を制御する Forkhead box O (FoxO) /DAF-16 転写因子が関わっていることが示唆されている。DAF-16 活性化個体である Insulin/IGF receptor をコードする遺伝子 *daf-2* の機能欠損変異体は、35°C の高温ストレス下で DAF-16 依存的な高温耐性を示した (McColl *et al.*, 1995)。短時間の高温ストレスが DAF-16 依存性の寿命延伸と高温耐性へ関与することが示され、DAF-16 は高温ストレス障害からの回復にも関与することが遺伝生理学的な研究により示唆されている (McColl *et al.*, 1995; Lithgow *et al.*, 1995)。

そこで本学位論文では、モデル生物線虫の高温ストレスが引き起こす運動性の低下から、筋細胞の崩壊に至る過程を明らかにすることで、ヒト熱中症にみられる横紋筋融解症の分子基盤の理解を目指した。線虫の *unc-68*, *daf-2*, および *daf-16* などの欠損

変異体や体壁筋内の Ca^{2+} 濃度センサーとしての *GCaMP* 導入個体, 筋細胞ミトコンドリアの GFP による可視化個体などを用いて, 高温ストレスが引き起こす運動性の異常と体壁筋のミトコンドリア形態変化, RYR を介した Ca^{2+} 漏出, ER ストレスとの関連性について明らかにした. また, これまで活性化することで細胞質から核に移行する DAF-16/FoxO 転写因子が, 高温などのストレスによって, 筋細胞における Z 膜 dense body やミトコンドリアにも局在することを見出したので, これらの知見についてもまとめ.

引用文献

1. Abderrezak, B., Knochel, J. P., & James, P. (2002). Heat stroke. *N Engl J Med*, *346*(25), 1978-1988.
2. Chandel, N. S., Maltepe, E., Goldwasser, E., Mathieu, C. E., Simon, M. C., & Schumacker, P. T. (1998). Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *95*(20), 11715-11720.
3. Durham, W. J., Aracena-Parks, P., Long, C., Rossi, A. E., Goonasekera, S. A., Galvan DL, Gilman CP, Baker MR, Shirokova N, Protasi F, Dirksen R, & Hamilton SL. (2008). RyR1 S-nitrosylation underlies environmental heat stroke and sudden death in Y522S RyR1 knockin mice. *Cell*, *133*(1), 53-65.
4. Fleury, C., Mignotte, B., & Vayssière, J. L. (2002). Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling. *Biochimie*, *84*(2), 131-141.
5. Furuhashi, T., & Sakamoto, K. (2014). FoxO/Daf-16 restored thrashing movement reduced by heat stress in *Caenorhabditis elegans*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, *170*, 26-32.
6. Furuhashi, T., & Sakamoto, K. (2015). Heat shock factor 1 prevents the reduction in thrashing due to heat shock in *Caenorhabditis elegans*. *Biochemical and biophysical research communications*, *462*(3), 190-194.
7. Graier, W. F., Trenker, M., & Malli, R. (2008). Mitochondrial Ca²⁺, the secret behind the function of uncoupling proteins 2 and 3?. *Cell calcium*, *44*(1), 36-50.
8. Hajnóczky, G., Davies, E., & Madesh, M. (2003). Calcium signaling and apoptosis. *Biochemical and biophysical research communications*, *304*(3), 445-454.
9. Hall, D. M., Buettner, G. R., Oberley, L. W., Xu, L., Matthes, R. D., & Gisolfi, C. V. (2001). Mechanisms of circulatory and intestinal barrier dysfunction during whole body hyperthermia. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, *280*(2), H509-H521.
10. Kenyon, C. (1985). Cell lineage and the control of *Caenorhabditis elegans* development. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, *312*(1153), 21-38.

11. Lecroisey, C., Ségalat, L., & Gieseler, K. (2007). The *C. elegans* dense body: anchoring and signaling structure of the muscle. *Journal of muscle research and cell motility*, 28(1), 79-87.
12. Lithgow, G. J., White, T. M., Melov, S., & Johnson, T. E. (1995). Thermotolerance and extended life-span conferred by single-gene mutations and induced by thermal stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(16), 7540-7544.
13. Liu, P., Ge, Q., Chen, B., Salkoff, L., Kotlikoff, M. I., & Wang, Z. W. (2011). Genetic dissection of ion currents underlying all-or-none action potentials in *C. elegans* body-wall muscle cells. *The Journal of physiology*, 589(1), 101-117.
14. MacLennan, D. H. & Phillips, M. S. (1992). Malignant hyperthermia. *Science* 256, 789-794.
15. Maryon, E. B., Coronado, R., & Anderson, P. (1996). *unc-68* encodes a ryanodine receptor involved in regulating *C. elegans* body-wall muscle contraction. *The Journal of Cell Biology*, 134(4), 885-893.
16. McColl, G., Rogers, A. N., Alavez, S., Hubbard, A. E., Melov, S., Link, C. D., Bush AI, Kapahi P & Lithgow, G. J. (2010). Insulin-like signaling determines survival during stress via posttranscriptional mechanisms in *C. elegans*. *Cell metabolism*, 12(3), 260-272.
17. Michelucci, A., Paolini, C., Canato, M., Wei-Lapierre, L., Pietrangelo, L., De Marco, A., Reggiani C, Dirksen RT & Protasi, F. (2015). Antioxidants Protect Calsequestrin-1 Knockout Mice from Halothane-and Heat-induced Sudden Death. *The Journal of the American Society of Anesthesiologists*, 123(3), 603-617.
18. Moerman, D. G., & Fire, A. (1997). 16 Muscle: Structure, Function, and Development. *Cold Spring Harbor Monograph Archive*, 33, 417-470.
19. Nishio, H., Sato, T., Fukunishi, S., Tamura, A., Iwata, M., Tsuboi, K., & Suzuki, K. (2009). Identification of malignant hyperthermia-susceptible ryanodine receptor type 1 gene (RYR1) mutations in a child who died in a car after exposure to a high environmental temperature. *Legal Medicine*, 11(3), 142-143.
20. Oe, M., OHNISHI - KAMEYAMA, M., Nakajima, I., Muroya, S., Shibata, M., Ojima, K., Kushibiki S & Chikuni, K. (2011). Proteome analysis of whole and water-soluble

proteins in masseter and semitendinosus muscles of Holstein cows. *Animal science journal*, 82(1), 181-186.

21. Orrenius, S., Zhivotovsky, B., & Nicotera, P. (2003). Regulation of cell death: the calcium–apoptosis link. *Nature reviews Molecular cell biology*, 4(7), 552-565.
22. Patz, J. A., Campbell-Lendrum, D., Holloway, T., & Foley, J. A. (2005). Impact of regional climate change on human health. *Nature*, 438(7066), 310-317.
23. Regmi, S. G., Rolland, S. G., & Conratt, B. (2014). Age-dependent changes in mitochondrial morphology and volume are not predictors of lifespan. *Aging (Albany NY)*, 6(2), 118.
24. Rosero, E. B., Adesanya, A. O., Timaran, C. H., & Joshi, G. P. (2009). Trends and outcomes of malignant hyperthermia in the United States, 2000 to 2005. *The Journal of the American Society of Anesthesiologists*, 110(1), 89-94.
25. Rowlands, D. J., Frame, D. J., Ackerley, D., Aina, T., Booth, B. B., Christensen, C., Carl Christensen, Matthew Collins, Nicholas Faull, Chris E. Forest, Benjamin S. Grandey, Edward Gryspeerdt, Eleanor J. Highwood, William J. Ingram, Sylvia Knight, Ana Lopez, Neil Massey, Frances McNamara, Nicolai Meinshausen, Claudio Piani, Suzanne M. Rosier, Benjamin M. Sanderson, Leonard A. Smith, Dáithí A. Stone, Milo Thurston, Kuniko Yamazaki, Y. Hiro Yamazaki & Myles R. Allen. (2012). Broad range of 2050 warming from an observationally constrained large climate model ensemble. *Nature Geoscience*, 5(4), 256-260.
26. Sulston, J. E., & Horvitz, H. R. (1977). Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Developmental biology*, 56(1), 110-156.
27. Thomas, J., & Crowhurst, T. (2013). Exertional heat stroke, rhabdomyolysis and susceptibility to malignant hyperthermia. *Internal medicine journal*, 43(9), 1035-1038.
28. Tobin, J. R., Jason, D. R., Challa, V. R., Nelson, T. E., & Sambuughin, N. (2001). Malignant hyperthermia and apparent heat stroke. *Jama*, 286(2), 168-169.
29. Walter, P., & Ron, D. (2011). The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science*, 334(6059), 1081-1086.
30. Yang, T., Riehl, J., Esteve, E., Matthaiei, K. I., Goth, S., Allen, P. D., Pessah IN & Lopez, J. R. (2006). Pharmacologic and functional characterization of malignant hyperthermia in

the R163C RyR1 knock-in mouse. *The Journal of the American Society of Anesthesiologists*, 105(6), 1164-1175.