

令和 4 年 5 月 22 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03198

研究課題名(和文) 悪性高熱症の原因となる1型リアノジン受容体変異の熱暴走マッピング

研究課題名(英文) Heat-sensitivity map of RyR1 mutants causing malignant hyperthermia

研究代表者

鈴木 団 (Suzuki, Madoka)

大阪大学・蛋白質研究所・講師

研究者番号：40350475

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：骨格筋で熱産生が制御不能となる悪性高熱症(MH)は、その原因の一つに、カルシウム放出チャネルである1型リアノジン受容体(RyR1)の変異が知られる。しかしたった一つの変異がこの巨大なタンパク質からのカルシウム放出を変調し、熱産生が暴走する仕組みは不明である。そこで本研究では、RyR1変異体における熱応答を解析し、変異部位と熱応答性との相関を得て、重篤な変異の集中する箇所を探る(「熱暴走マッピング」)ことを目的とした。N末領域についての理解が進捗し、新たなMHモデルマウスの構築が進むなど、当初の計画を上回る進捗を得た。本報告時点の成果は、原著論文4報と総説2報、オンラインアーカイブ1報。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究を通して得られた熱感受性と変異部位の相関に関する知見は、一般にカルシウム放出チャネルに関する学術研究にとって大きく貢献する以外に、臨床的に有効なデータ群へとつながることも期待される。本研究では、悪性高熱症においては、変異箇所に応じてRyR1の熱応答性が変わること示した。迅速な対処が求められる臨床においては、事前にRyR1変異箇所を得ることで、熱応答性の強弱についての特徴を予め調べて対応を予想しておく、といったことが可能になるかもしれない。

研究成果の概要(英文)：Malignant hyperthermia (MH) is a life threatening disorder, where the thermogenesis in skeletal muscle cells becomes unstoppable. Mutations in the calcium release channel of skeletal muscles, RyR1, have been known to cause MH. However, the mechanism that single mutations disrupt the function of this large channel (RyR1 is a tetramer of about 550 kDa-monomers) is yet to be clarified. In this project, we analyzed thermal response of cells expressing RyR1 mutants to draw the "heat-sensitivity map" of RyR1. We found a variety of heat sensitivity in mutants at the N-terminal regions, and a disease model mouse was successfully developed. In overall, the achievements were more fruitful than what we have planned initially. At the time of this final report, we have published four original research articles, two review papers, and one manuscript uploaded to the online archives.

研究分野：生物物理学

キーワード：カルシウム 光学顕微鏡 蛍光イメージング 熱パルス

### 1. 研究開始当初の背景

悪性高熱症 (*malignant hyperthermia*, MH) は吸入麻酔薬を用いた場合などに引き起こされ、39°C 以上に至る異常な体温上昇や筋肉の硬直を示し、即座に適切な処置のなされない場合には死に至る重篤な疾患である。MH は、骨格筋細胞の筋小胞体膜上に存在する  $Ca^{2+}$  放出チャネルである、骨格筋型(1型)リアノジン受容体 (RyR1) に変異が入ることによって引き起こされることが明らかとなっている。MH に関連した RyR1 変異体を発現する骨格筋では、筋小胞体内腔から細胞質側への  $Ca^{2+}$  漏れが増大し、最終的に筋肉の温度が上昇することで制御不能の超高代謝活動と高体温を引き起こすと考えられている。MH を生じる RyR1 変異体は 300 種類以上が同定されている。

RyR1 は、約 5,000 のアミノ酸残基からなる分子量約 550kDa のモノマーが 4 量体として機能する。たった一つの変異が、この巨大なタンパク質の働きを変調して MH という重篤な疾患が生じる。しかしタンパク質構造が十分に解かれておらず、コンフォメーション変化も明らかになっていないため、どの変異がどのような機能異常を生じるのか不明であり、予想も難しい。RyR1 変異体から  $Ca^{2+}$  の漏れ出すメカニズムは、どのようなものだろうか？この答えが明らかとなれば、症状を抑制、または予測する方法も得られると期待できる。

### 2. 研究の目的

本研究では、多種類の RyR1 変異体における熱応答を解析し、変異部位と熱応答性との相関を得て、重篤な変異の集中する箇所を探る(「熱暴走マッピング」)。この解析結果から、MH に関連した RyR1 変異体から  $Ca^{2+}$  の漏れ出す分子メカニズムの解明を目指す。具体的な実験項目は、手法の点から次の 2 つに分けられる。

- (1) 野生型 (WT) および変異体について、熱応答性および平安静時細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の計測
- (2) 分子動力学計算 (MD) による、変異箇所とチャネル動態との相関の仕組みの解釈

### 3. 研究の方法

RyR1 変異体の熱応答を解析して、RyR1 変異体から  $Ca^{2+}$  が流出する分子メカニズムの理解を目指して研究を進めた。(1)計測と(2)MD が本研究の主要な要素であり、うち(1)計測については、熱応答の計測と平安静時  $Ca^{2+}$  濃度の計測の二つを実施した。熱応答は、光学顕微鏡下で任意の場所に微小な熱源を生成して 1 細胞ごとに熱刺激する技術(熱パルス法)を用いて行った。熱パルス法を、RyR1 変異体を小胞体 (ER) 膜に発現する HEK 細胞へ応用し、蛍光  $Ca^{2+}$  指示薬 fluo-4 の蛍光観察を組み合わせた光学顕微鏡系を利用して、細胞の熱パルス応答を詳細に検討した(図 1)。平安静時細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の計測は、研究分担者らのこれまでの方法を利用し、カフェイン刺激により RyR1 を活性化して  $Ca^{2+}$  を放出させることで行った。増加する細胞内  $Ca^{2+}$  濃度を、レシオ型  $Ca^{2+}$  蛍光指示薬の fura-2 で測ることで定量的に比較した。特に、実験を進める中で、ER 内腔  $Ca^{2+}$  濃度のより詳細な解析が必要となったことから、さらに蛍光タンパク質由来の ER 内  $Ca^{2+}$  プロブ GCEPIAer もあわせて利用した。また(2)においては、変位箇所とチャネル動態との相関の仕組みの解釈を目的に、分子動力学計算 (MD) による解析を行った。

### 4. 研究成果

多くの成果がまとまり、いずれも論文として発表できた。

蛍光  $Ca^{2+}$  イメージングと MD とを組み合わせた解析を、N 末領域変異体(図 2)について行った。N 末領域に生じた点突然変異が与える RyR1 チャネル機能についての理解が進み、論文として報告した [Yamazawa T. (2020) *J Gen Physiol*]

熱パルス法を用いたより詳細な解析は、4 種類の N 末領域変異体について行った。まず WT の

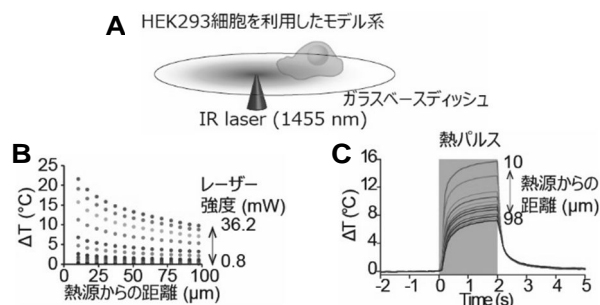


図1. 本研究の概要。(A-C)顕微鏡系の模式図。MHを引き起こすRyR1変異体の熱パルス応答を、HEK293モデル細胞系により計測する。顕微鏡下で細胞の近傍に、水に吸収される波長1455nmのレーザーを集光して(A)、同心円状の局所的な温度勾配を作る(B)。熱源が小さいため、数10-100ms程度の速さで温度勾配を生成、消滅できる(C)。

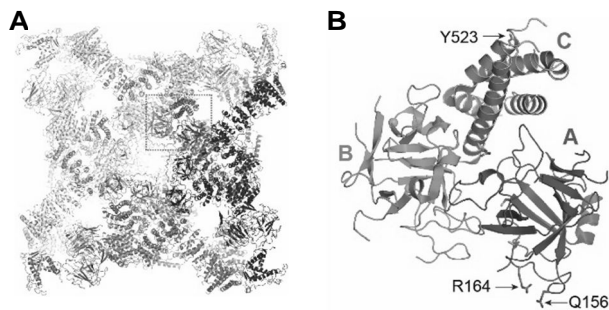


図2. MHを生じる、RyR1のN末領域変異体。(A)RyR1の細胞質側のクライオEM像 (PDB 5TB0)。(B)N末領域の結晶構造 (2XOA)。本研究で解析したN末領域変異、およびサブドメインA-Cを示す。X線結晶構造解析により得られたサブユニットの構造から4量体を *in silico* で再構成し、変異がチャネル動態に与える影響を解析した。変異体の番号はウサギ RyR1。[Yamazawa T. (2020) *J Gen Physiol*; Oyama K. (2020) *bioRxiv*]

RyR1 では応答があまり見られないいっぽう、変異体では細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  の大きな上昇が引き起こされた。また  $\text{Ca}^{2+}$  は RyR1 を通して ER 内腔から細胞質へと流出していることも確認できた。そして、全ての変異体において熱パルスに反応する確率は WT よりも高く、かつ同じ MH の原因となる変異であるにもかかわらず、熱感受性は変異体ごとに異なることが明らかになった。ここまでの成果をまとめ、オンラインアーカイブ上で公開した [Oyama K. (2020) *bioRxiv*]

その後、並行して進めていた新たな MH モデルマウスの構築が進み、RyR1 の新規阻害薬の開発に成功し、MH を抑制できることを見出した [Yamazawa T. (2021) *Nat Commun*]。そこで本モデルマウスより調製した骨格筋細胞の熱パルス応答についての結果を、HEK 細胞系での結果をまとめた内容 [Oyama K. (2020) *bioRxiv*] へ加え、査読誌へ投稿した (審査中)。また RyR1 の構造解析に関する総説を発表した [Ogawa H. (2021) *J Muscle Res Cell Motil*]

RyR1 の立体構造は、クライオ電子顕微鏡の進歩により、2015 年には 3 つのグループから近原子レベルの分解能で報告された。さらにその翌年、チャネル開口状態のクライオ電顕構造も報告されるなど、立体構造の理解は近年大きく進んでいる。しかしその一方で、RyR1 疾患関連変異の構造-機能相関の解析はほとんど進んでいない。特に MH においては、なぜ WT に比べて変異体からは  $\text{Ca}^{2+}$  が漏れやすいのか、といった基本的な分子メカニズムは未解明である。RyR1 の MD 計算解析については、それほど高分解能でないクライオ電顕を用いた MD 計算の報告があるが、本グループのように生理実験と動的構造を組み合わせた研究はなされていない。MH の研究において、熱パルスの利用は、我々の知る限り、本グループを除いてこれまでに実施された例は無い。このような国内外の状況において、本研究より得られた成果は、その学術的な独自性・独創性の点において、国際的にも極めて高いと考える。

MH に関する研究を進める中で、当初は予期していなかった関連する研究成果も並行して得られた。第一に、本研究で利用する熱パルス法を、動物発生時における神経の発達において重要なアクチンフィラメント結合タンパク質ドレブリンによるアクチン活性阻害機構の解析に応用することで、体温が  $37^{\circ}\text{C}$  であることの重要性を示唆する結果を得ることができた。本成果は論文発表し、プレスリリースも行った [Kubota H. (2021) *Nano Lett*]。第二に、代謝で生じうる細胞内の局所的な温度上昇についての理論的考察を行い、論文として報告した [Suzuki M. & Plakhotnik T. (2021) *Appl Phys Lett*]。さらに、熱パルス法の細胞応用について最新の動向をまとめ、これを総説として発表した [Oyama K. (2022) *Biophys Rev*]

### <引用文献>

- Kubota H, Ogawa H, Ishii S, Oyama K, Miyazaki M, Kawamura Y, Ishiwata S and Suzuki M. Microscopic temperature control reveals cooperative regulation of actin–myosin interaction by drebrin E. *Nano Lett*, 21: 9526-9533 (2021)
- Ogawa H, Kurebayashi N, Yamazawa T, Murayama T. Regulatory mechanisms of ryanodine receptor/ $\text{Ca}^{2+}$  release channel revealed by recent advancements in structural studies. *J Muscle Res Cell Motil*, 42:291-304 (2021)
- Oyama K, Ishii S, Suzuki M. Opto-thermal technologies for microscopic analysis of cellular temperature-sensing systems. *Biophys Rev*, 14: 41-54 (2022)
- Oyama K, Zeeb V, Yamazawa T, Murayama T, Oyamada H, Harada Y, Fukuda N, Ishiwata S, and Suzuki M. Heat hypersensitivity of ryanodine receptor type 1 mutants implicated in malignant hyperthermia. *bioRxiv* (2020) doi: <https://doi.org/10.1101/2020.10.29.351452>
- Suzuki M, and Plakhotnik T. Opportunities for hybrid diamond nanosensors in biological applications. *Appl Phys Lett*, 119: 190502 (2021)
- Yamazawa T, Kobayashi T, Kurebayashi N, Konishi M, Noguchi S, Inoue T, Inoue YU, Nishino I, Mori S, Inuma H, Manaka N, Kagechika H, Uryash A, Adams J, Lopez JR, Liu X, Diggle C, Allen PD, Kakizawa S, Ikeda K, Lin B, Ikemi Y, Nunomura K, Nakagawa S, Sakurai T, and Murayama T. A novel RyR1-selective inhibitor prevents and rescues sudden death in mouse models of malignant

hyperthermia and heat stroke. *Nat Commun*, 12:4293 (2021)

Yamazawa T, Ogawa H, Murayama T, Yamaguchi M, Oyamada H, Suzuki J, Kurebayashi N, Kanemaru K, Oguchi K, Sakurai T, Iino M. Insights into channel modulation mechanism of RYR1 mutants using  $\text{Ca}^{2+}$  imaging and molecular dynamics. *J Gen Physiol*, 152 (1), e201812235 (2020)

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Ogawa Haruo, Kurebayashi Nagomi, Yamazawa Toshiko, Murayama Takashi	4. 巻 42
2. 論文標題 Regulatory mechanisms of ryanodine receptor/Ca <sup>2+</sup> release channel revealed by recent advancements in structural studies	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Muscle Research and Cell Motility	6. 最初と最後の頁 291 ~ 304
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10974-020-09575-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kotaro Oyama, Shuya Ishii, Madoka Suzuki	4. 巻 14
2. 論文標題 Opto-thermal technologies for microscopic analysis of cellular temperature-sensing systems	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biophysical Reviews	6. 最初と最後の頁 41-54
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12551-021-00854-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Madoka Suzuki, Taras Plakhotnik	4. 巻 119
2. 論文標題 Opportunities for hybrid diamond nanosensors targeting photothermal applications in biological systems	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Applied Physics Letters	6. 最初と最後の頁 190502
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1063/5.0063089	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Hiroaki Kubota, Hiroyuki Ogawa, Makito Miyazaki, Shuya Ishii, Kotaro Oyama, Yuki Kawamura, Shin'ichi Ishiwata, Madoka Suzuki	4. 巻 21
2. 論文標題 Microscopic Temperature Control Reveals Cooperative Regulation of Actin-Myosin Interaction by Drebrin E	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nano Letters	6. 最初と最後の頁 9526-9533
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.nanolett.1c02955	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yamazawa, T., T. Kobayashi, N. Kurebayashi, M. Konishi, S. Noguchi, T. Inoue, Y.U. Inoue, I. Nishino, S. Mori, H. Iinuma, N. Manaka, H. Kagechika, A. Uryash, J. Adams, J.R. Lopez, X. Liu, C. Diggle, P.D. Allen, S. Kakizawa, K. Ikeda, B. Lin, Y. Ikemi, K. Nunomura, S. Nakagawa, T. Sakurai, and T. Murayama	4. 巻 12
2. 論文標題 A novel RyR1-selective inhibitor prevents and rescues sudden death in mouse models of malignant hyperthermia and heat stroke	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 4293
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-24644-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Oyama Kotaro, Zeeb Vadim, Yamazawa Toshiko, Murayama Takashi, Oyamada Hideto, Harada Yoshie, Fukuda Norio, Ishiwata Shin'ichi, Suzuki Madoka	4. 巻 -
2. 論文標題 Heat hypersensitivity of ryanodine receptor type 1 mutants implicated in malignant hyperthermia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2020.10.29.351452	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Yamazawa Toshiko, Ogawa Haruo, Murayama Takashi, Yamaguchi Maki, Oyamada Hideto, Suzuki Junji, Kurebayashi Nagomi, Kanemaru Kazunori, Oguchi Katsuji, Sakurai Takashi, Iino Masamitsu	4. 巻 152
2. 論文標題 Insights into channel modulation mechanism of RYR1 mutants using Ca <sup>2+</sup> imaging and molecular dynamics	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of General Physiology	6. 最初と最後の頁 e201812235
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1085/jgp.201812235	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計17件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 10件)

1. 発表者名 Madoka Suzuki, Vadim Zeeb
2. 発表標題 Precise temperature manipulation reveals heat hypersensitivity of ryanodine receptor type 1
3. 学会等名 The 20th HFSP Awardees Meeting (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Suzuki, M.
2. 発表標題 Measuring ultralocal thermal conductivity using hybrid diamond nanosensors
3. 学会等名 Bio-Nano Cross-Over International Workshop (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Plakhotnik T., Suzuki, M.
2. 発表標題 The mystery of intracellular heat
3. 学会等名 The 20th HFSP Awardees Meeting (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Suzuki, M.
2. 発表標題 Heat diffusion in animal cells.
3. 学会等名 International Cooperation Meeting for Biology (ICMB) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Liu Chujie, Yoshie Harada, Madoka Suzuki
2. 発表標題 Heat sensitive mutations in the middle region of the RyR1 channel implicated in malignant hyperthermia studied by optically controlled local heat pulse method
3. 学会等名 International Cooperation Meeting for Biology (ICMB) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Madoka Suzuki and Yoshie Harada
2. 発表標題 Intracellular heat diffusion acting behind thermogenesis
3. 学会等名 The 16th International Symposium of the Institute Network for Biomedical Sciences / KEY FORUM 2021 International Symposium (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Suzuki, M.
2. 発表標題 Heat diffusion from a nanoparticle in a cell
3. 学会等名 The 14th International Symposium on Nanomedicine (ISNM2021) joint with 11th Taiwan-Japan-Korea Nanomedicine Meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Chujie Liu, Toshiko Yamazawa, Kotaro Oyama, Yoshie Harada, Madoka Suzuki
2. 発表標題 Cellular heat hypersensitivities caused by mutation in the C terminus region of the RyR1 channel implicated in malignant hyperthermia
3. 学会等名 第59回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Akito Matsui, Hayato Yamashita, Akihiro Tsuji, Asuka Yamaguchi, Madoka Suzuki, Masayuki Abe
2. 発表標題 The cellular uptake observation of nanoparticles by high speed AFM combined with fluorescent microscopy
3. 学会等名 第59回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2021年



1. 発表者名 Suzuki, M.
2. 発表標題 Intracellular thermal conductivity determined by dual-functionalized diamond nanosensor
3. 学会等名 The 4th International Forum on Quantum Metrology and Sensing (IFQMS) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 久保田寛顕, 宮崎牧人, 石渡信一, 鈴木団
2. 発表標題 ミクロスコピックな温度の精密操作で見いだされたドレブリンEによるアクチン・ミオシン相互作用の協同的制御
3. 学会等名 生体運動研究合同班会議2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山澤徳志子
2. 発表標題 分子動力学計算と生理実験によるリアノジン受容体のカルシウム放出機構の解析
3. 学会等名 第64回日本神経化学学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Toshiko Yamazawa
2. 発表標題 Therapeutic effects of novel type1 ryanodine receptor inhibitor on malignant hyperthermia
3. 学会等名 Calcium signaling and excitation-contraction coupling in cardiac, skeletal and smooth muscle; Journal of General Physiology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山澤徳志子
2. 発表標題 リアノジン受容体によるカルシウム恒常性異常に関連した筋疾患
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Toshiko Yamazawa, Haruo Ogawa, Takashi Murayama, Maki Yamaguchi, Hideto Oyamada, Junji Suzuki, Nagomi Kurebayashi, Kazunori Kanemaru, Katsuji Oguchi, Sakurai Takashi, Masamitsu Iino
2. 発表標題 Molecular dynamics and Ca <sup>2+</sup> imaging of mutant type 1 ryanodine receptor
3. 学会等名 Biophysical Society 64rd Annual Meeting（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山澤徳志子
2. 発表標題 新規1型リアノジン受容体阻害薬の筋疾患に対する治療効果
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山澤徳志子
2. 発表標題 骨格筋におけるポリアミンの役割
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会 第98回 日本生理学会 合同大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	山澤 徳志子  (Yamazawa Toshiko)  (00282616)	東京慈恵会医科大学・医学部・准教授   (32651)	
研究 分担者	大山 廣太郎  (Oyama Kotaro)  (70632131)	国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・高崎量子応用 研究所 先端機能材料研究部・主任研究員(定常)   (82502)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
ロシア連邦	Russian Academy of Sciences			
英国	St James' s University Hospital			
米国	Mount Sinai Medical Center			