

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 27 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21500383

研究課題名（和文） 分子内サブドメイン相互作用によるリアノジン受容体チャネル制御機構の解明

研究課題名（英文） Regulation of ryanodine receptor channel by interdomain interaction

研究代表者

村山 尚 (MURAYAMA TAKASHI)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：10230012

研究成果の概要(和文):リアノジン受容体の突然変異はチャネル活性の亢進を引き起こし、種々の筋疾患の原因となる。本研究では、チャネル活性化のメカニズムと考えられているサブドメイン間相互作用について金粒子ラベルおよび FRET によって解析した。サブドメイン 1 と 2 は極めて近接して相互作用していることがわかった。一方、チャネル領域のサブドメイン 3 の変異は S4-S5 リンカーを介するチャネルゲーティングに影響を与えることが示唆された。

研究成果の概要(英文): Disease-associated mutations in ryanodine receptor/Ca²⁺ release channel hyperactivate the channel. Interdomain interaction is proposed to be involved in the mechanism of hyperactivation. Here, we examined interaction between subdomains 1 and 2 by nanogold labeling and FRET. We found that subdomains 1 and 2 are closely located and interact to each other. In addition, mutations in subdomain 3 may affect the channel gating by altering the interaction via the S4-S5 linker.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010 年度	500,000	150,000	650,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：神経・筋肉生理学

科研費の分科・細目：神経科学、神経・筋肉生理学

キーワード：リアノジン受容体、筋小胞体、カルシウムチャネル、相互作用

1. 研究開始当初の背景

リアノジン受容体 (RyR) は骨格筋および心筋の細胞内 Ca 遊離チャネルで、興奮収縮連関に重要な役割を果たしている。RyR 遺伝子の突然変異は骨格筋では悪性高熱症 (MH) やセントラルコア病 (CCD)、心筋ではカテコラミン誘発性心室性頻拍 (CPVT) や不整脈源性右室心筋症 (ARVC) などの筋疾患を引き起こす。RyR は N 末が細胞質で foot 構

造を形成し、C 末がチャネルを形成する膜貫通セグメントである。疾患関連変異は細胞質の 2 カ所 (サブドメイン 1 および 2、SD1、SD2) と膜貫通セグメント (SD3) の 3 カ所に集中しており、疾患変異を有する RyR はチャネル活性が異常亢進していることが知られていた。

研究代表者はこれまでの一連の研究により、SD1 と SD2 の相互作用に競合的に作用すると考えられるドメインペプチドが RyR

のチャネル活性を亢進させること、およびチャネル活性が亢進している MH 変異ではドメインペプチドの効果が減弱していることを見出した。これらの結果は、RyR のチャネル活性は二つのサブドメイン (SD1 と SD2) 間の相互作用により制御されていて、疾患変異はこの相互作用を破綻させチャネル活性を亢進させるという仮説に一致していた。しかし、RyR は分子量が 200 万を超える巨大な膜タンパク質であり、アミノ酸残基レベルでの構造情報が得られていなかった。また、SD3 の変異がどのように疾患を引き起こすのかは明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

本申請研究では、相互作用すると考えられる二つのサブドメイン (SD1 および SD2) をナノゴールドおよび FRET プローブで標識して解析をおこない、SD1 と SD2 が実際に相互作用しているかどうかをアミノ酸残基レベルで調べることを目的とした。また、SD3 の疾患変異によるチャネル活性亢進の分子メカニズムについても検討を行った。

3. 研究の方法

(1)プローブ導入用変異 RyR の作製

SD1 および SD2 への相互作用検出用プローブの導入は His-tag を介して行った。RyR1 遺伝子に His-tag (10×His) を挿入後、HEK 細胞に安定発現した。発現タンパク質は分子内に導入した Streptavidin binding peptide (SBP)-tag により精製した。His-tag リガンドは C2-NTA を 5 nm 金粒子または Cy3-maleimide と反応させて作製した。

SD3 の疾患変異については、S4-S5 リンカー中に存在する変異 (T4825I) を作製した。また、S4-S5 リンカーのアミノ酸をそれぞれアラニン置換した変異体も作製した。

(2)サブドメインマッピング

精製した His-tag 挿入 RyR1 に Ni-NTA 修飾金粒子を結合させ、ネガティブ染色法により電子顕微鏡観察した。金粒子の位置を RyR 立体構造上にマッピングした。

(3)FRET イメージング

RyR1 の二つのサブドメイン (SD1、SD2) の一方に GFP を他方に His-tag を導入して Cy3-NTA を結合させた。サブドメイン間の FRET を観察した。

(4)チャネル活性解析

RyR チャネルの活性は、HEK 細胞のカフェイン誘発性 Ca^{2+} 遊離および精製 RyR を用いた [3H]リアノジン結合により評価した。

4. 研究成果

(1)SD1 と SD2 の相互作用解析

SD1 または SD2 に His-tag を導入した RyR1 に Ni-NTA 金粒子を結合してネガティブ染色法により電子顕微鏡観察を行った。その結果、SD1 と SD2 はいずれも RyR1 立体構造上の domain 5 および 9 の近傍に局在することが明らかとなった。この結果は、SD1 および SD2 に GFP をラベルして得られた結果 (Wang et al. JBC, 2007) と一致していた。したがって、SD1 と SD2 は立体構造上で近接していることが示唆された。

SD1 に GFP および SD2 に His-tag を介して Cy3 を導入した RyR1 で FRET を測定したところ、両者の間で有意な FRET が検出された。GFP と Cy3 を交換した場合でも同様な結果が得られた。したがって、SD1 と SD2 は極めて近接していると考えられる。MH 変異を導入した変異体で同様な実験を行ったところ、FRET 効率については野生型と有意な差が得られなかった。このことは、MH 変異は局所での相互作用を変化させるが、ドメイン全体に及ぶグローバルな変化ではないことを示唆している。

以上の結果は、SD1 と SD2 が極めて近接した部位に位置して相互作用していることを強く示唆している。疾患変異は局所における相互作用を変化させることで活性に影響を与えることが考えられる。相互作用のより詳細な理解のためには、結晶構造解析などの原子レベルでの構造情報が必要となる。

(2)SD3 における疾患変異と活性の関連

SD3 に存在する疾患変異は膜貫通セグメント内およびセグメントを繋ぐリンカーに存在している。最近の電位依存性カリウムチャネルの結晶構造解析から、S4-S5 リンカーがチャネルゲーティングに重要な役割を果たしていることが明らかとなった。RyR1 の予想される S4-S5 リンカー中には MH 変異 (T4825I) が存在するので、この変異体の性質および S4-S5 リンカーの役割を調べた。

T4825I は野生型に比べてチャネル活性が亢進していた (図 1)。興味深いことに、スレオニン残基をアラニンに置換した T4825A は逆に活性が低下した (図 1)。これは、当該アミノ酸残基の種類により活性が調節されているという興味深い結果である。

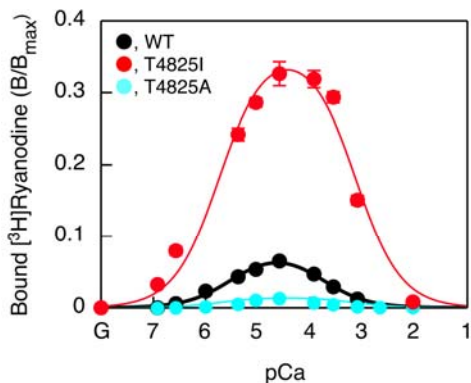


図1. MH変異体(T4825I)とアラニン置換変異体(T4825A)の³Hリアノジン結合.

次に、S4-S5 リンカーの 5 アミノ酸 (T4825-S4829) についてアラニン置換体を作製して、その活性を調べた。その結果、活性が大きく低下するもの (T4825A, S4829A)、中等度に低下するもの (I4826A, S4828A)、逆に活性が著明に上昇するもの (L4827A) とさまざまな変化を示した (図 2)。

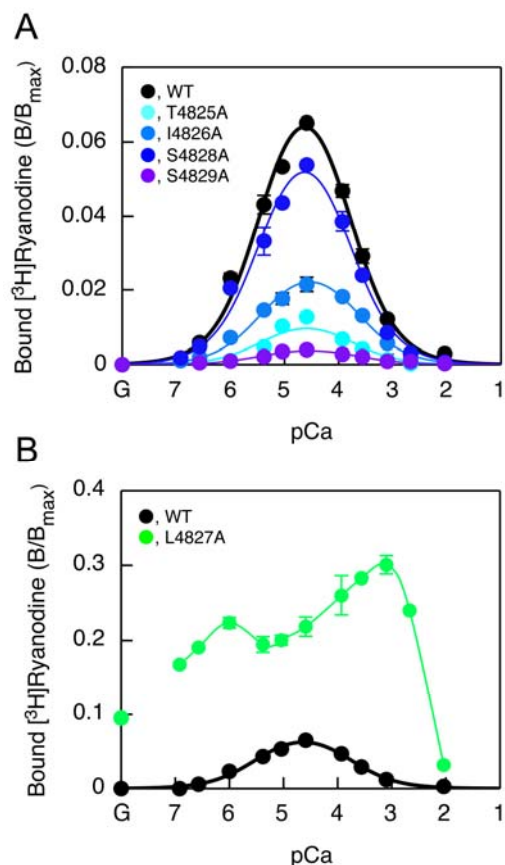


図2. S4-S5リンカーアラニン置換変異体の³Hリアノジン結合

S4-S5 リンカーの当該部位は高い helix probability が予想されている。そこで、 α -helical representation を描画したところ、著明な低下を示すもの (T4825、S4829) がクラスターを形成し、活性上昇を示す L4827 はちょうど反対に位置することがわかった

(図 3)。この結果は、S4-S5 リンカーは α ヘルックスを形成して、チャンネルゲーティングに重要な役割を果たしていることを示唆している。

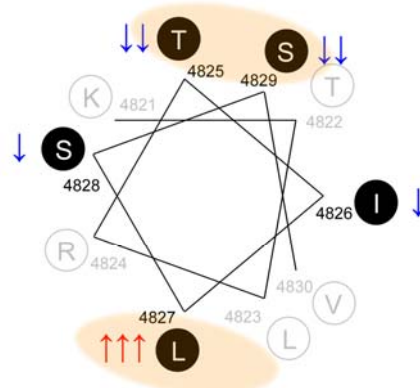


図3. S4-S5リンカーの α -helical representation. 青矢印は活性低下、赤矢印は活性亢進を示す。

以上の結果から、SD3 領域の疾患変異のいくつかは S4-S5 リンカーの機能に影響を与えて活性化を起こしている可能性が示唆された。S4-S5 リンカーが他のドメインとどのように相互作用しているかは未だ不明であり、今後はこの点を明らかにする必要がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

① Murayama T, Kurebayashi N, Oba T, Oyamada H, Oguchi K, Sakurai T, Ogawa Y: Role of amino-terminal half of the S4-S5 linker in type 1 ryanodine receptor (RyR1) channel gating. *J Biol Chem*, 286: 35571-35577, 2011 (査読有り)

② Murayama T, Kurebayashi N: Two ryanodine receptor isoforms in nonmammalian vertebrate skeletal muscle: Possible roles in excitation-contraction coupling and other processes. *Prog Biophys Mol Biol*, 105: 134-144, 2011 (査読有り)

③ Kitai T, Watanabe Y, Toyoshima YY, Kobayashi T, Murayama T, Sakaue H, Suzuki H, Takahagi T: Simple method of synthesizing nickel-nitritotriacetic acid gold nanoparticles with a narrow size distribution for protein labeling. *Jpn J Appl Phys*, 50: 095002, 2011 (査読有り)

④ Kashiyama T, Murayama T, Suzuki E, Allen PD, Ogawa Y: Frog α - and

β -ryanodine receptors provide distinct intracellular Ca^{2+} signals in a myogenic cell line. PLoS ONE 5: e11526, 2010 (査読有り)

⑤ 呉林なごみ, 村山 尚. リアノジン受容体. 生体の科学, 61: 444-445, 2010 (査読有り)

[学会発表] (計 4 件)

① 村山 尚, 呉林なごみ, 大羽利治, 小山田英人, 小口勝司, 小川靖男, 櫻井 隆; 1 型リアノジン受容体S4-S5 リンカーはチャンネルゲーティングを調節する. 第 85 回日本薬理学会年会, 京都, 2012 年 3 月 16 日 (口頭)

② Murayama T, Kurebayashi N, Oba T, Oyamada H, Oguchi K, Sakurai T, Ogawa Y: Role of amino-terminal half of the S4-S5 linker in the RyR1 channel gating. Biophysical Society 56th Annual Meeting, San Diego, 27 Feb, 2012. (ポスター)

③ 村山 尚, 小林琢也, 檜山 拓, 呉林なごみ, 木森義隆, 諸根信弘, 北井敏幸, 高萩隆行, 櫻井 隆; 新規多機能GFPを用いたリアノジン受容体の構造機能解析. 第 82 回日本薬理学会年会 横浜 2009 年 3 月 17 日 (口頭)

④ Murayama T; Ryanodine receptor isoforms in excitation-contraction coupling in skeletal muscle. 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences. Kyoto, 29 Jul, 2009. (口頭)

[その他]

ホームページ等

<http://pharmacology.sakura.ne.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

村山 尚 (MURAYAMA TAKASHI)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：10230012

(2)連携研究者

呉林 なごみ (KUREBAYASHI NAGOMI)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：50133335

(3)連携研究者

諸根 信弘 (MORONE NOBUHIRO)

京都大学・物質-細胞システム拠点・講師

研究者番号：50399680

(4)連携研究者

高萩 隆行 (TAKAHAGI TAKAYUKI)

広島大学・工学研究科・教授

研究者番号：40271069

(5)連携研究者

上原 明 (UEHARA AKIRA)

福岡大学・医学部・准教授

研究者番号：60140745