

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591082

研究課題名(和文)リアノジン受容体分子内のK201結合コアをターゲットとした不整脈治療の実用化

研究課題名(英文)Development of novel arrhythmia therapy using K201 binding core in RyR2 molecule

研究代表者

山本 健(YAMAMOTO, Takeshi)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：50363122

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：K201 binding coreの構造について、S2246Lのmutation部位とK201 binding siteがloop状になっている構造についての解析ができた。さらにK201 binding coreの下流にあるcalmodulinの結合解離という新たなシグナルを解析し、K201 binding coreのシグナルがcalmodulinの解離を経てチャンネル孔へ伝えられることがわかった。これによって治療ターゲット分子としてのリアノジン受容体のなかで治療ターゲットドメインを2つ同定できた。

研究成果の概要(英文)：We revealed that S2246L mutation site and K201 binding site are making loop and interacting each other. We further analyze the calmodulin binding to RyR2 and find that K201 binding core signal transmitted to calmodulin binding site, and then transmitted to the channel pore. From these data, we find two new target domains for the arrhythmia treatment.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：リアノジン受容体 K201 E-C coupling 致死的不整脈

1. 研究開始当初の背景

申請者らはリアノジン受容体を安定化させ Ca リークを抑制する K201(JTV519)の作用部位を同定する研究から K201 は RyR2 の 2114-2149 に結合することにより、N 末端と central ドメイン間の unzipping を抑制し RyR を安定化することを明らかにした (Circulation 2008)。興味深いことに、JTV519 結合部位のドメインペプチド (DP:2114-2149) は JTV519 と同様に RyR 安定化作用がある。このチャンネル安定化メカニズムをさらに詳細に検討したところ、このペプチド (DP2114-2149) の結合する部分は 2234-2270 近傍であることを同定した。2234-2270 内には 2246 番に S2246L という CPVT 型の点突然変異があるため、この 2246 近傍のペプチドを合成した。すると興味深いことに、この 2246 近傍のペプチドは DP2114-2149 近傍に結合することが判明した。ここで我々は新しいモデルを提唱したい。すなわち 2114-2149 ドメインと 2246 近傍ドメインというきわめて近接する 2 つのドメインがいわば K201 binding core とでも表現すべき core を形成し、この core 内の新たなドメイン-ドメイン連関が N-terminal domain と central domain の連関ひいてはチャンネルの安定化と密接な関連を持っていると考えられる。

2. 研究の目的

CPVT 型 knock-in mouse を用いてリアノジン受容体内の K201 binding core とチャンネル制御ドメインの構造連関を解明し、リアノジン受容体内の K201 binding core をターゲットとした心不全および致死的不整脈の新しい治療法を開発することである。

3. 研究の方法

(1) SAED という蛍光を内在するクロスリンカーを用いた標的部位特異的な蛍光ラベルテクニックを用い K201 binding domain 近傍の domain-domain 連関を解明する。すなわち DP2246 というペプチドに SAED をクロスリンクさせ、この DP2246-SAED conjugate を SR と反応させ、UV を当てることで SAED を K201 binding domain にラベルする。

(2) CPVT 型 mutation (R2474S) の不整脈発生メカニズムを patch clamp を用いて検討する。すなわち R2474S-KI マウスの心筋細胞を単離し、whole cell patch clamp 法を用いて心筋細胞の膜電位を計測し、頻回刺激時に起こる DAD, triggered activity(TA)の頻度を測定する。

(3) CPVT 型 mutation (S2246L) を内在する S2246L/+KI マウスを作成する。WT および KI マウスヘテロメトリー (Data Science International) 植え込み後、心電図監視下に腹腔内に epinephrine (2mg/KgBW)を投与、

またはトレッドミルにて運動負荷を行う。

(4) K201 binding core 長鎖ペプチドに結合する化合物を QCM 法によってスクリーニングする。

4. 研究成果

(1) S2246L においては RyR に対する DP2246 よりも DP2246mut の方が結合親和性が高く S2246L の mutation が domain-domain interaction を強めていることが示唆された (図 1)。

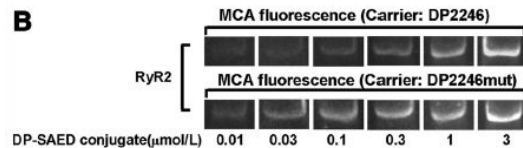


図 1 . DP2246, DP2246mut 結合

(2) CPVT 型 mutation (R2474S) の不整脈発生メカニズムを patch clamp を用いて検討した。1Hz から 5Hz までの連続した刺激において、WT マウスにおいては DAD も TA もほとんど生じていないのに比較し、KI マウスでは多数の DAD や DAD から生じる TA を確認した (図 2)。

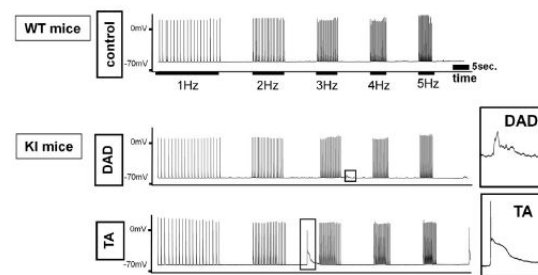


図 2 . R2474S で認められた DAD, TA

(3) S2246L+KI マウスにおいてヒトと同様の bidirectional VT が運動負荷にて誘発されることを確認した (図 3)。

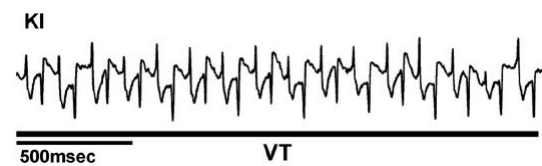


図 3 . DP2246 で誘発された VT

(4) R2474S+KI マウスでは、CaM の RyR2 に対する結合親和性を著しく高めた GSH-CaM は iso で誘発した Ca spark 頻度を著明に抑制した。

(5) R2474S+KI マウスの心筋細胞では蛋白導入キット (BioPorter) を用いて GSH-CaM の導入することで after transient や DAD の出現を押さえることができた。

(6) Tac モデルマウスにおいても CaM の親和性の低下が示唆された。

以上、CPVTのCaハンドリング異常のメカニズムとして、RyR2内ドメイン連関障害CaM解離Ca²⁺漏出が示唆され、さらに心不全においても同様のメカニズムで不整脈を生じることが強く示唆された。高親和性のGSH-CaMでCa²⁺漏出を防ぐことにより新たな心不全・不整脈治療が可能となることが示唆された。

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3件)

(1) Fukuda M, Yamamoto T, Nishimura S, Kato T, Murakami W, Hino A, Ono M, Tateishi H, Oda T, Okuda S, Kobayashi S, Koseki N, Kyushiki H, Yano M.

Enhanced binding of calmodulin to RyR2 corrects arrhythmogenic channel disorder in CPVT-associated myocytes.

Biochem Biophys Res Commun. 2014 May 23;448(1):1-7. 査読有

doi: 10.1016/j.bbrc.2014.03.152

(2) Hino A, Yano M, Kato T, Fukuda M, Suetomi T, Ono M, Murakami W, Susa T, Okuda S, Doi M, Kobayashi S, Yamamoto T, Koseki N, Kyushiki H, Ikemoto N, Matsuzaki M.

Enhanced binding of calmodulin to the ryanodine receptor corrects contractile dysfunction in failing hearts.

Cardiovasc Res. 2012 Dec 1;96(3):433-43.

査読有

doi: 10.1093/cvr/cvs271

(3) Suetomi T, Yano M, Uchinoumi H, Fukuda M, Hino A, Ono M, Xu X, Tateishi H, Okuda S, Doi M, Kobayashi S, Ikeda Y, Yamamoto T, Ikemoto N, Matsuzaki M.

Mutation-linked defective interdomain interactions within ryanodine receptor cause aberrant Ca²⁺ release leading to catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia.

Circulation. 2011 Aug 9;124(6):682-94. 査読有

doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.

[学会発表](計8件)

(1) Takeshi Yamamoto

Symposium Dissociation of Calmodulin from RyR2 Plays a Key Role in Diastolic Ca²⁺ Leak from Sarcoplasmic Reticulum in Pressure-overload Heart Failure

The 78th Annual scientific Meeting of the Japanese Circulation Society

2014.3.21 (東京国際フォーラム, 東京)

(2) Tetsuro Oda, Takeshi Yamamoto,

Shigehiko Nishimura, Takayoshi Katoh, Masakazu Fukuda, Shinichi Okuda, Shigeki Kobayashi, Masafumi Yano

Cardiomyocyte Ryanodine Receptor (RyR2) Oxidation in situ Causes Defective Interdomain Interaction and Reduces Calmodulin (CaM) Binding

The 78th Annual scientific Meeting of the Japanese Circulation Society

2014.3.21 (東京国際フォーラム, 東京)

(3) Tetsuro Oda, Takeshi Yamamoto, Shigehiko Nishimura, Takayoshi Katoh, Masakazu Fukuda, Shinichi Okuda, Shigeki Kobayashi, Masafumi Yano

Mapping the Binding Site of RyR2 "Unzipping" Peptide (DPc10) by Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) in Permeabilized Cardiomyocytes

The 78th Annual scientific Meeting of the Japanese Circulation Society

2014.3.21 (東京国際フォーラム, 東京)

(4) Masakazu Fukuda, Takeshi Yamamoto, Shigehiko Nishimura, Takayoshi Katoh, Shinichi Okuda, Tetsuro Oda, Shigeki Kobayashi, Masafumi Yano

Dantrolene Corrects Aberrant Ca²⁺ Release and Improves Calmodulin Binding to RyR2 in CPVT-associated Mutation

The 78th Annual scientific Meeting of the Japanese Circulation Society

2014.3.21 (東京国際フォーラム, 東京)

(5) Takayoshi Katoh, Takeshi Yamamoto, Shigehiko Nishimura, Takeki Myoren, Wakako Murakami, Masakazu Fukuda, Makoto Ohno, Hiroki Tateishi, Mamoru Mochizuki, Tetsuro Oda, Shinichi Okuda, Shigeki Kobayashi, Masafumi Yano

Enhanced Binding of Calmodulin to the Ryanodine Receptor Corrects Abnormal Calcium Handling in Pressure Over Loaded Heart Failure

The 78th Annual scientific Meeting of the Japanese Circulation Society

2014.3.21 (東京国際フォーラム, 東京)

(6) Shigeki Kobayashi, Wakako Murakami, Takayoshi Kato, Masakazu Fukuda, Akihiro Hino, Hiroki Tateishi, Takeshi Yamamoto, Masafumi Yano, Masunori Matsuzaki

Oral 「Fixing Ca²⁺ Leakage From Cardiac Ryanodine Receptor by Low-dose of Blocker Safely Enhances Inotropic Response to Milrinone in Acute Heart Failure」

85th Scientific Session of American Heart Association

Los Angeles USA 2012.11.3

(7) Shinichi Okuda, Masakazu Fukuda, Takayoshi Katoh, Shigehiko Nishimura, Shigeki Kobayashi, Takeshi Yamamoto, Masafumi Yano Poster 「Dantrolene May Suppress Arrhythmogenesis by Inhibition of CaMKII-mediated Aberrant Ca²⁺ Release Within the Ryanodine Receptor in Cardiac Troponin T-related Familial Hypertrophic Cardiomyopathy」
86th Scientific Session of American Heart Association
Dallas USA 2013.11.16

(8) Masakazu Fukuda, Takeshi Yamamoto, Shigehiko Nishimura, Takeki Myouren, Takayoshi Katoh, Wakako Murakami, Makoto Ono, Tetsuro Oda, Shinichi Okuda, Shigeki Kobayashi, Masafumi Yano
Oral 「Dantrolene Inhibits Aberrant Ca²⁺ Release and Arrhythmogenesis via Enhancing Binding of Calmodulin to RyR2 in CPVT-Associated Mutation」
86th Scientific Session of American Heart Association
Dallas USA 2013.11.16

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 健 (YAMAMOTO, Takeshi)
山口大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：50363122

(2) 研究分担者

小林 茂樹 (KOBAYASHI, Shigeki)
山口大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：90397993