

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590330

研究課題名(和文)人工アミノ酸導入による2型リアノジン受容体チャネル活性制御とその破綻機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of regulatory mechanisms of type 2 ryanodine receptors by introducing artificial amino acids

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：2型リアノジン受容体(RyR2)は筋小胞体のカルシウム遊離チャネルで心筋の興奮収縮連関に重要な役割を果たしている。RyR2の突然変異はチャネル活性の亢進を引き起こして不整脈性疾患の原因となる。本研究では、疾患変異を有するRyR2の性質を詳細に検討してチャネル活性に対する疾患変異の効果を調べた。さらにRyR2の特定の部位に光架橋可能な人工アミノ酸を導入することにより、チャネル活性化メカニズムと関連するサブドメイン間相互作用についての解析を試みた。疾患変異はチャネルの複数のパラメータに影響を与えることがわかった。また、各ドメイン内の相互作用に影響を与えることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Type 2 ryanodine receptor is a Ca<sup>2+</sup> release channel in the sarcoplasmic reticulum and plays an important role in excitation-contraction coupling in heart. Mutations in RyR2 cause hyperactivate the channel, leading to arrhythmogenic diseases. Here, we examined molecular mechanism of disease-causing mutations on the channel activity by determining the properties of the mutant channels. Furthermore, we tried to detect possible interactions within or between subdomains by introducing photo-crosslinkable artificial amino acids. We found that disease-causing mutations affect various parameters of the channel activity. Possible alterations of interactions within the domains are also suggested.

研究分野：薬理学

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 人工アミノ酸

## 1. 研究開始当初の背景

2型リアノジン受容体 (RyR2) は筋小胞体の細胞内  $Ca^{2+}$  遊離チャンネルで、心筋の興奮収縮連関に重要な役割を果たしている。RyR2 遺伝子の突然変異はチャンネル活性の異常亢進を引き起こし、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) などの重篤な不整脈性疾患の原因となる。RyR2 は N 末が細胞質で foot 構造を形成し、C 末が6本の膜貫通セグメントでチャンネルを形成している。疾患変異は細胞質ドメインの2カ所 (サブドメイン1および2) と膜貫通セグメントを含むサブドメイン3の3カ所に集中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、骨格筋に存在する RyR サブタイプの RyR1 においてサブドメイン1およびサブドメイン2の相互作用が RyR のチャンネル活性を亢進させること、サブドメイン3の変異はチャンネルゲーティングに直接影響を与えることを明らかにしてきた。しかし、RyR2 で同様な制御機構が存在するかどうかは明らかになっていなかった。

近年の遺伝子工学技術の進歩により、哺乳類細胞において人工アミノ酸 (非天然アミノ酸) を標的タンパク質の特定の部位に導入することが可能となった。この技術を用いれば光架橋可能な人工アミノ酸を導入することにより、サブドメイン内およびサブドメイン間の相互作用を検出することが出来ると期待される。

## 2. 研究の目的

本申請研究では、RyR2 における疾患変異のチャンネルに対する制御機構を明らかにするため、疾患変異を導入した RyR2 の性質を検討した。加えて、疾患変異部位に光架橋可能な人工アミノ酸を導入することにより各サブドメイン内、およびサブドメイン間の相互作用を検出することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) RyR2 安定発現細胞の作製と疾患変異の導入

RyR2 遺伝子はマウス心筋からクローニングして pcDNA5/FRT/TO ベクターに挿入した。このベクターを Flp-In T-REx HEK293 細胞に導入することでテトラサイクリン誘導性の RyR2 安定発現細胞を作製した。疾患変異はヒトの CPVT 変異と相同の変異 (R2473S、H4761P) を導入した。

### (2) RyR2 活性測定

RyR2 活性測定は細胞内  $Ca^{2+}$  イメージングおよび $^3H$ リアノジン結合で行った。細胞内

$Ca^{2+}$  イメージングは HEK 細胞に蛍光  $Ca^{2+}$  指示薬 (細胞質: fluo-4、小胞体: R-CEPPIA1er) を導入して測定した。 $^3H$ リアノジン結合は細胞質  $Ca^{2+}$  を変化させて  $Ca^{2+}$  依存性の活性を測定した。

### (3) 人工アミノ酸の導入

光架橋可能な人工アミノ酸として p-benzoyl-phenylalanine (pBpa) を用い、アンバーコドン (TAG) を介して導入した (Hino et al., 2012)。RyR2 は人工アミノ酸導入部位を TAG コドンに置換した。全長の発現を確認するため C 末端に HA タグ (YPYDVPDYA) を挿入して、HEK 細胞の安定発現株を作製した。pBpa を tRNA に結合させるため、改変したアミノアシル tRNA 合成酵素 (aaRS) と tRNA を RyR2 安定発現細胞に一過性に発現した。aaRS と tRNA を高発現するために、組換えパキウイルスを用いた。ウイルスベクターは pFastBac1 を改変して作製した。このベクターは Vesicular stomatitis virus G-protein (VSV-G) を発現するようにデザインされており、哺乳類細胞へ感染を可能にしている。目的タンパク質は CMV プロモータにより哺乳類細胞中で発現する (図1)。

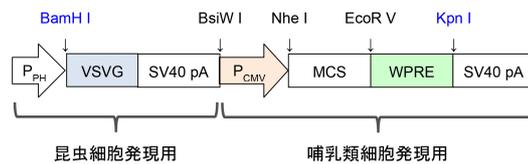


図1. 改変 pFastBac1 ベクターの模式図。

## 4. 研究成果

### (1) RyR2 発現細胞の細胞内 $Ca^{2+}$ 測定と疾患変異の効果

RyR2 を発現させた HEK 細胞の  $Ca^{2+}$  イメージングを fluo-4 AM により共焦点レーザー顕微鏡を用いて行った。その結果、野生型 (WT) では細胞質  $Ca^{2+}$  の自発的な振動 (オシレーション) が観察された (図2)。CPVT 変異である R2473S、H4761P を導入すると  $Ca^{2+}$  振動の頻度の増加とピーク  $Ca^{2+}$  の低下が見られた。ピーク  $Ca^{2+}$  の低下は小胞体内腔の貯蔵  $Ca^{2+}$  量の低下による可能性があるため、次に小胞体内腔の  $Ca^{2+}$  を R-CEPPIA1er で直接測定した (図3)。小胞体  $Ca^{2+}$  濃度は細胞質  $Ca^{2+}$  同様にオシレーションを示したが、CPVT 変異では小胞体内腔  $Ca^{2+}$  レベルの低下が見られ、これらの効果の強さは変異体の種類によって異なっていた。小胞体内腔  $Ca^{2+}$  濃度は細胞質  $Ca^{2+}$  ピークと強く関連していたことから小胞体貯蔵  $Ca^{2+}$  低下により細胞質  $Ca^{2+}$  ピークが低下したことが明らかとなった。

## (2) 疾患変異 RyR2 のチャネル活性測定

小胞体内腔貯蔵  $\text{Ca}^{2+}$  の低下は RyR2 チャネルからのリークによる可能性が考えられた。そこで、RyR2 のチャネル活性を  $\text{Ca}^{2+}$  依存性  $[\text{RyR2}]$  リアノジン結合法で評価した。リアノジンは開状態のチャネルに特異的に結合するため、チャネル活性の良い指標となる (Murayama & Kurebayashi, 2011)。野生型は二相性の  $\text{Ca}^{2+}$  依存性を示した (図 4)。この活性は 活性化  $\text{Ca}^{2+}$  感受性、不活性化  $\text{Ca}^{2+}$  感受性、および 最大値 (=ゲイン) という 3 つのパラメータによって決定される。

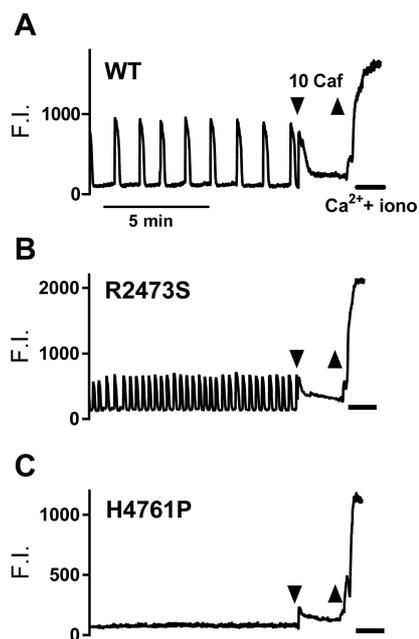


図 2 . RyR2 発現 HEK 細胞の細胞質  $\text{Ca}^{2+}$  オシレーション . Fluo-4 AM による測定。

CPVT 変異体は活性化  $\text{Ca}^{2+}$  感受性の増大、不活性化  $\text{Ca}^{2+}$  感受性の低下、ゲインの増大を引き起こした。これらの作用は変異体特異的であり、その程度は小胞体内腔  $\text{Ca}^{2+}$  レベルの低下と逆相関していた。したがって、CPVT 変異では RyR2 を介した  $\text{Ca}^{2+}$  リークが起こり、小胞体内腔  $\text{Ca}^{2+}$  レベルが低下したと考えられる。

## (3) RyR2 への人工アミノ酸の導入

人工アミノ酸の導入はアンバーコドン (TAG) に対する tRNA に人工アミノ酸を結合して導入する方法で行った (Hino et al., 2012)。今回は光架橋可能な人工アミノ酸として p-benzoyl-phenylalanine (pBpa) を用いた。RyR2 は CPVT 変異部位のコドンにアンバーコドンに置換し、発現確認のために C 末に HA タグ (YPYDVPDYA) を挿入して HEK 細胞に安定発現した。

Hino らのオリジナルの方法では aaRS と

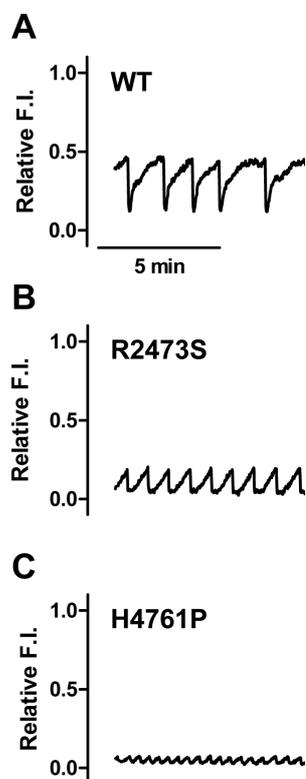


図 3 . RyR2 発現 HEK 細胞の小胞体  $\text{Ca}^{2+}$  測定 . R-CEPIAer による測定 .

tRNA を組み込んだ発現ベクターをリポフェクション法で一過性発現させ、pBpa 添加培地で培養することにより pBpa の導入を行っている。その方法を試したが発現効率が低く、RyR2 の発現を確認することが出来なかった。そこで、aaRS と tRNA をシュドタイプバキュロウイルスベクターに組み込むことにした。バキュロウイルスは昆虫細胞に感染するウイルスであるが、Vesicular stomatitis virus G-protein (VSV-G) をウイルス外被にコートしたシュドタイプウイルスは哺乳類細胞にも高効率に感染することが可能である。バキュロウイルスは長鎖 DNA (>30 kb) を挿入することが出来るため、aaRS と tRNA の組み込みが可能となった。

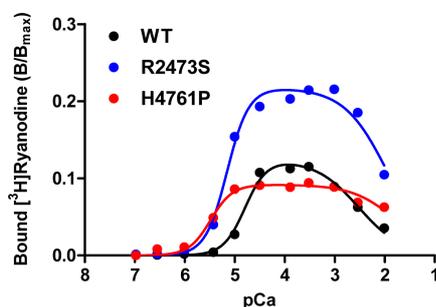


図 4 . RyR2 の  $\text{Ca}^{2+}$  依存性  $[\text{RyR2}]$  リアノジン結合活性 .

作製した組換えバキュロウイルスを人工アミノ酸変異導入 RyR2 発現 HE 細胞に感染させたところ、HA 抗体陽性の全長 RyR2 の発現を確認することができた。しかし、現在

まで発現量は依然として十分ではなく、光架橋実験および架橋産物解析を行うレベルには至っていない。この原因としては、RyR2 遺伝子が 15 kb と非常に長いため、人工アミノ酸導入の効率が低下していることが考えられる。今後、発現系のさらなる至適化、大規模化を図ることで解析可能なサンプルを得たいと考えている。

最近のクライオ電子顕微鏡法のシンポにより RyR の立体構造が原子分解能に近いレベルで明らかとなった (Yan et al., 2015)。今後は、これらの構造情報を参考にすることでドメイン内、ドメイン間の相互作用を調べていくことが可能になると思われる。人工アミノ酸導入法は発展性の高い方法であり、発現系、検出系等のさらなる至適化を行うことにより、さまざまな研究に応用可能であると考えられる。

#### 参考文献

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.

Hino N, Sakamoto K, Yokoyama S: Site-specific incorporation of unnatural amino acids into proteins in mammalian cells. *Methods Mol Biol*, 794: 215-228, 2012.

Yan Z, Bai XC, Yan C, Wu J, Li Z, Xie T, Peng W, Yin CC, Li X, Scheres SH, Shi Y, Yan N. Structure of the rabbit ryanodine receptor RyR1 at near-atomic resolution. *Nature*, 517(7532):50-55, 2015.

#### 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7件)

Murayama T, Kurebayashi N, Yamazawa T, Oyamada H, Suzuki J, Kanamaru K, et al. Divergent activity profiles of type 1 ryanodine receptor channels carrying malignant hyperthermia and central core disease mutations in the amino-terminal region. *PLoS ONE*. 2015; in press., 査読有

Nonaka M, Morimoto S, Murayama T, Kurebayashi N, Li L, Wang YY, et al. Stage-dependent benefits and risks of pimobendan in mice with genetic dilated cardiomyopathy and progressive heart

failure. *Br J Pharmacol*. 2015; 172(9): 2369-82. 査読有 doi: 10.1111/bph.13062.

Murayama T, Kobayashi T. Purification of Recombinant Proteins with a Multifunctional GFP Tag. *Methods Mol Biol*. 2014; 1177: 151-61. 査読有 doi: 10.1007/978-1-4939-1034-2\_12.

Inoue H, Murayama T, Tashiro M, Sakurai T, Konishi M. Mg<sup>2+</sup>- and ATP-dependent inhibition of transient receptor potential melastatin 7 by oxidative stress. *Free Rad Biol Med*. 2014; 72: 257-66. 査読有 doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.04.015.

Tsuzuki T, Sakaguchi N, Kudoh T, Takano S, Uehara M, Murayama T, et al. Design and synthesis of cyclic ADP-4-thioribose as a stable equivalent of cyclic ADP-ribose, a calcium ion-mobilizing second messenger. *Angew Chem*. 2013; 52(26): 6633-7. 査読有 doi: 10.1002/anie.201302098.

Shoji K, Murayama T, Mimura I, Wada T, Kume H, Goto A, et al. Sperm-associated antigen 4, a novel hypoxia-inducible factor 1 target, regulates cytokinesis, and its expression correlates with the prognosis of renal cell carcinoma. *Am J Pathol*. 2013; 182(6): 2191-203. 査読有 doi: 10.1016/j.ajpath.2013.02.024.

Kakizawa S, Yamazawa T, Chen Y, Ito A, Murayama T, Oyamada H, et al. Nitric oxide-induced calcium release via ryanodine receptors regulates neuronal function. *EMBO J*. 2012; 31(2): 417-28. 査読有 doi: 10.1038/emboj.2011.386.

[学会発表](計6件)

村山 尚、呉林なごみ、小山田英人、鈴木純二、金丸和典、小口勝司、飯野正光、櫻井隆; 1型リアノジン受容体チャネルに対する疾患変異の多様な効果。第86回日本薬理学会年会, 福岡, 2013年3月23日(口頭)

村山 尚、青木良輔、赤塚祐介、呉林なごみ、小山田英人、小口勝司、櫻井隆; C末端悪性高熱変異を有する1型リアノジン受容体チャネルの機能解析。第90回日本生理学会大会, 船堀, 2013年3月28日(ポスター)

Murayama T, Kurebayashi N, Yamazawa T, Oyamada T, Takemori T, Oguchi K, Sakurai T; Effects of amino-terminal disease-associated

mutations on the CICR activity of RyR1 channel. Biophysical Society 58th Annual Meeting, San Francisco, 15 Feb, 2014(ポスター)

村山 尚、呉林 なごみ、山澤 徳志子、小山田 英人、鈴木 純二、金丸 和典、竹森 重、小口 勝司、飯野 正光、櫻井 隆; 1型リアノジン受容体N末疾患変異はカルシウムチャンネル活性に多様な影響を及ぼす. 第87回日本薬理学会年会, 仙台, 2014年3月21日(口頭)

Murayama T, Kurebayashi N, Yamazawa T, Oyamada H, Suzuki J, Kanemaru K, Oguchi K, Iino M, Sakurai T; Effects of MH and CCD mutations in the central region on RyR1 channels. Biophysical Society 59th Annual Meeting, Baltimore, 9 Feb, 2015. (ポスター)

村山 尚、呉林 なごみ、山澤 徳志子、小山田 英人、鈴木 純二、金丸 和典、小口 勝司、飯野 正光、櫻井 隆; 1型リアノジン受容体チャンネル活性に対する中央領域疾患変異の効果. 第88回日本薬理学会年会, 名古屋, 2015年3月20日(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) 研究分担者

( )

研究者番号:

### (3) 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

坂本 健作 (SAKAMOTO, Kensaku)

理化学研究所・拡張遺伝暗号システム研究

チーム・チームリーダー

研究者番号: 50240685

大羽 利治 (OBA, Toshiharu)

中部大学・応用生物学部・教授

研究者番号: 50008330