

機関番号：15401

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20591832

研究課題名 (和文) 新規に発見されたリアノジン受容体遺伝子変異の機能解析

研究課題名 (英文) Functional analysis of mutated ryanodine receptors found newly in Japanese patients of malignant hyperthermia.

研究代表者

安田 季道 (Yasuda Toshimichi)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：20432718

研究成果の概要 (和文)：

今回の研究では、日本人の悪性高熱症患者で新規に発見された1型リアノジン受容体の遺伝子変異のうち、2508番目のアミノ酸であるアルギニンからシステインおよびヒスチジンへの変異に加えて、4894番目のアミノ酸であるアラニンからスレオニンへの変異が悪性高熱症を惹起することが示唆された。一方、先天性筋疾患の患者で見られる4894番目のアラニンからプロリンへの変異では、リアノジン受容体のアゴニストに対する反応が減弱した。

研究成果の概要 (英文)：

This research suggested that mutations of Arg2508Cys and Arg2508His in ryanodine receptor (RYR1) caused malignant hyperthermia (MH). The mutation of Ala4894Thr was also suggested to cause MH, while the mutation of Ala4894Pro which was found in the patients of congenital neuromuscular disease with uniform type 1 fiber was less sensitive to RYR1 agonist than wild type.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：麻酔・蘇生学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・麻酔・蘇生学

キーワード：悪性高熱症・リアノジン受容体・遺伝子変異

1. 研究開始当初の背景

悪性高熱症素因者のRyanodine receptor1 (RYR1)には、多くの場合、遺伝子変異がみられることが知られている。

この遺伝子変異は、特に、3箇所の領域に集中して存在することから、この領域の遺伝子配列を検索することで、スクリーニングが可能になるのではないかと考え

られるようになってきている。実際、ヨーロッパおよび北米においては、それぞれのガイドラインを設けて、スクリーニングを施行している。

本邦においても、悪性高熱症素因者に対してRYR1の全遺伝子配列の検索がなされた。その結果、多くの遺伝子変異が3箇所領域以外に存在することが確認された。また、多くの遺伝子変異が今までに報告されていない領域に存在するものであった。これらの新たに発見された遺伝子変異に関しては、この遺伝子変異が原因で細胞のカルシウム動態に異常が生じているという確証はない。このことを確認するためには、RYR1が発現していない細胞に遺伝子変異がないRYR1と遺伝子変異があるRYR1をそれぞれ遺伝子導入し、この2つの細胞でカルシウム動態に変化がみられるか否かを調べるが行われている。ヨーロッパおよび北米のガイドラインで使用されている遺伝子変異もすべてこのような機能的変化を起こしうることを確認した遺伝子変異をスクリーニングに用いている。

2. 研究の目的

本研究では、本邦の悪性高熱症素因者から新規に発見されたRYR1遺伝子変異が、細胞に機能的な影響を及ぼしているかを確認していき、これらのデータを蓄積することで、日本人悪性高熱症素因者の遺伝子診断の精度向上に寄与したいと考えている。日本人悪性高熱症素因者のRYR1全遺伝子解析において、もっとも遺伝子変異の頻度が高かったエクソン47に存在する遺伝子変異の機能的解析から開始し、それが終了した時点で、他の遺伝子変異に関しても行っていく。

3. 研究の方法

遺伝子変異のあるRYR1 発現ベクターの作成

野生型のRYR1 発現ベクターはトロント大学のMacIennan先生から提供していただいた。この野生型のRYR1 発現ベクターから遺伝子変異を導入したい部位を前後1000bpの長さで切り出し、pBluescript II にライゲーションし、このベクターに対して、遺伝子変異を導入する。遺伝子変異の導入は、QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) を使用しておこなう。遺伝子変異が導入されたpBluescript II から遺伝子変異を導入した部位を前後1000bpの長さで切り出し、再度発現ベクターにライゲーションする。遺伝子変異の確認のため、遺伝子変異を導入した近辺のシーケンスを行う。

RYR1 発現ベクターの Human Embryonic Kidney (HEK) 293 細胞への遺伝子導入

HEK293はDMEMに10%FCSおよび抗生物質を添加した培養液を使用し、37度、5%CO₂下で培養をおこなう。80%コンフルエントのHEK293細胞を回収し、35mm ガラスボトムディッシュで継代、培養する。遺伝子導入にはFugene HDを使用する。Fugene HD、発現ベクターおよび培養液を混合し、さらに24時間培養する。

細胞内カルシウム放出の測定

HEK293細胞をhepes-buffered salt solution (HBSS)で洗浄し、5μMのFura-2を導入する。1時間静置した後、測定を開始する。測定は340nmと380nmの光で励起させて、510nmの蛍光を蛍光顕微鏡で測定する。カフェインはHBSSで様々な濃度に希釈し、サンプルディッシュに一定の速度で灌流させる。340/380nm比はカルシウムイメージングシステムで計算する。

データの分析

カフェインの用量反応曲線を得るために、 $10\ \mu\text{M}$ のカフェインで刺激したときのカルシウム反応を最大反応としてのそれに対する比率をそれぞれの濃度に求める。GraphPad Prism (Ver. 4) を用いて、用量反応曲線および EC50 を計算する。

4. 研究成果

悪性高熱症素因者リアノジン受容体 (RYR1) に存在する遺伝子変異の中で、日本人には C7522T の遺伝子変異 (アミノ酸ではアルギニンからシステインへ変異) が最も頻度が高いので、まず、この遺伝子変異をもつプラスミドを以下のように作成した。野生型 RYR1 がインサートされたプラスミドから制限酵素 (ESiWI, SpeI) で約 1600bp を切り出し、pBluescript I I にインサートした。このプラスミドを用いて、遺伝子変異を作成した。遺伝子変異の作成には、QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit を使用した。その後、C7522T 変異の導入された断片を制限酵素 (ESiWI, SpeI) で切り出し、RYR1 にインサートすることで、変異型 RYR1 がインサートされたプラスミドを作成した。当初、MacLennan 先生 (トロント大学) から提供された野生型 RYR1 は pCDNA にインサートされたものであったが、RYR1 は約 15kb と非常に大きいため細胞への導入効率が悪かった。そこで、より簡便に RYR1 の導入された細胞を確認するために、pTRE-Tggt-pBI-AcGFP ベクターを使用して GFP と RYR1 を同時発現するプラスミドを作成した。結果は、C7508T 変異 RYR1 および野生型の RYR1 のカフェインに対する EC50 はそれぞれ 2.62 ± 0.23 , $1.86 \pm 0.23\ \text{mM}$ であった。また、4-クロロ-M-クレゾールに対する EC50 はそれぞれ 179.3 ± 35.2 , $73.1 \pm 19.4\ \mu\text{M}$ であった。これらの結果から C7522T の遺伝子変異は悪性高熱症を

起こしうる変異のひとつであることが確認された。この結果は European malignant hyperthermia group (EMHG) にも報告した。その後承認され、EMHG のホームページ上で公開されている <http://www.emhg.org/nc/genetics/mutations-in-ryr1/>。2508 番目のアミノ酸に関しては 3 つの変異が報告されている。残り 2 つのアミノ変異であるアルギニンからグリシン (R2508G) およびヒスチジン (R2508H) への変異に関しても、プラスミドを作成し実験を行なおうとしたが、R2508G の変異は作成できなかったため R2508H のみの実験を行なった。RYR1 (R2508H) のカフェインに対する 50% 効果濃度 (EC50) は正常: 2.72 ± 0.28 , R2508H: $1.39 \pm 0.17\ \text{mM}$ で、正常 RYR1 と比較してアルギニンからヒスチジンへのアミノ酸変異でも反応性が亢進していた。これにより 2508 番目のアルギニンからヒスチジンへのアミノ酸変異も、悪性高熱症の原因となりうるということが証明された。

その後、C 末端側である 4894 番目のアミノ酸変異に着目し実験を行った。アラニンからスレオニンの変異は、2508 番目の変異と同様にカフェイン及び 4chloro-m-cresol (4CmC) への反応が亢進しており、悪性高熱症の原因となることが証明された。一方、この部位のプロリンへの変異が先天性筋疾患の一つである congenital neuromuscular disease with uniform type 1 fiber (CNMDU1) の患者から発見されている。この変異を我々の実験系で再現したところカフェイン及び 4CmC に濃度を上げても細胞内カルシウム濃度の上昇が認められなかった。このような反応はセントラルコア病など他の先天性筋疾患で報告されているアミノ酸変異でも報告されており、CNMDU1 が生じる原因がセントラルコア病の発症原因と類似している可能性が示唆され

た。加えて、この部位において今まで報告されていないアミノ酸変異を作成し実験したところ、セリンへの変異では悪性高熱症の患者から発見されたスレオニンへの変異と同様の反応亢進が確認されたが、グリシンへの変異では逆に反応が減弱した。セリンおよびスレオニンはともにヒドロキシル基をもったアミノ酸である。C 末端側のアミノ酸変異は先天性筋疾患の患者で報告されることが多いが、4894 番目のアミノ酸変異の場合、ヒドロキシル基を持ったアミノ酸への変異に伴うリアノジン受容体の構造変化が悪性高熱症を引き起こすことが示唆された。当初予定していたアミノ酸変異のすべてについて悪性高熱症を起こしうるか否かについて確認することができなかった。リアノジン受容体が巨大であるためにその発現ベクターを作成するのに非常に多くの時間を費やさなければならなかったのが一番の原因であった。

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 1 件)

1. Takako Migita, Functional analysis of ryanodine receptor 1 p.R2508C mutation in exon47, Journal of anesthesia, 23 巻, 査読有, 2009, p.341-346

[学会発表] (計 2 件)

1. 原木 俊明, 同一部位で異なるアミノ酸変異が報告された 1 型リアノジン受容体機能の検討, 第 28 回悪性高熱研究会, 2009 年 11 月 29 日, 東京.

2. 右田 貴子, Effect of propofol on calcium homeostasis of HEK cell transfected RYR1 mutations, 第 3 回 Asian Anaesthesia innovators(AAI) Meeting, 2008 年 11 月 8 日, ホーチミン (ベトナム)

[その他]

ホームページ等

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/anesth/MH/MHmenu.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安田 季道 (Yasuda Toshimichi)

広島大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：20432718

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：