

平成 28 年 6 月 4 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460303

研究課題名(和文)一酸化窒素によるカルシウム放出機構の骨格筋における機能的意義

研究課題名(英文)Functional role of NO-induced Ca<sup>2+</sup> release in skeletal muscle

研究代表者

山澤 徳志子 (Yamazawa, Toshiko)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：00282616

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：一酸化窒素による細胞内カルシウム放出機構(NICR)を中枢神経系で発見し、これが神経細胞死に関与していることを明らかにした。本研究では、骨格筋において、NICRの生理的および病態生理的意義を解明することを目的とした。悪性高熱症等で報告されているリアノジン受容体変異遺伝子を培養細胞に安定発現させ、Ca<sup>2+</sup>濃度測定、分子動力学計算法によるシミュレーションを行い、機能的変異を多角的、定量的に解析する方法を開発した。また、NICRを阻害した小動物の骨格筋初代培養細胞を用いて、骨格筋幹細胞の増殖速度及び、多核骨格筋細胞への分化過程について差異が認められない事を示した。

研究成果の概要(英文)：We found that nitric oxide (NO) -induced Ca<sup>2+</sup> release (NICR), and that NICR is involved in NO-induced neuronal cell death. We investigated properties of the RyR1 channels carrying disease-associated mutations at the N-terminal region. HEK293 cells expressing the mutant RyR1 channels exhibited alterations in Ca<sup>2+</sup> homeostasis, i.e., enhanced CICR and NICR sensitivity, decrease of ER Ca<sup>2+</sup> contents, increases in resting cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> concentration, changes in pattern of electrostatic interaction. We investigated characterization of RyR1C3636A channels in skeletal muscle.

研究分野：医歯薬学

キーワード：一酸化窒素 カルシウム リアノジン受容体

## 1. 研究開始当初の背景

一酸化窒素 (NO) が細胞内カルシウム ( $\text{Ca}^{2+}$ ) 上昇を引き起こすことを発見し、そのメカニズムを解明してきた。NO による  $\text{Ca}^{2+}$  上昇は、細胞内小胞体膜にあるリアノジン受容体を介する  $\text{Ca}^{2+}$  放出機構 (NO-induced  $\text{Ca}^{2+}$  release; NICR) であることを明らかにした。さらに、NO の下流におけるシグナル伝達がサイクリック GMP を介するのではなく NO によるリアノジン受容体の S-ニトロシル化を介することを突き止めた。神経型 NO 合成酵素 (nNOS) と 1 型リアノジン受容体 (RyR1) が共発現する脳組織においては、脳虚血などの病態に伴い、グルタミン酸放出 →  $\text{Ca}^{2+}$  流入 → nNOS の活性化により NO が産生され、神経細胞死を誘発することが知られている。そこでこの過程に NICR が寄与しているかを調べたところ、NO による神経細胞死と NICR の関連を示す結果を得た。この結果は NICR に対する変調を加えることが、脳虚血などの病態を改善する有用な手段になる可能性を示唆した。これらの研究により、NO が  $\text{Ca}^{2+}$  を動員させる (NO が  $\text{Ca}^{2+}$  の上流に位置する) という新しい概念 (NICR) を提唱した。また NO による蛋白分子の S-ニトロシル化は近年注目され始めている分野で、S-ニトロシル化酵素とニトロシル化を解除する脱ニトロシル化酵素が見つかって以来、1,000 件あまりの研究論文が発表されている。NO の S-ニトロシル化を受ける分子のうち  $\text{Ca}^{2+}$  上昇を引き起こす分子は我々が見つけた RyR1 と容量依存性  $\text{Ca}^{2+}$  流入チャネルの 2 つだけである。また、RyR1 を活性化するものとしてカフェインと  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{Ca}^{2+}$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$  release; CICR) が知られているが、申請者らは NO が RyR1 の内因性アゴニストになることを突き止めたことになる。

Kakizawa, Yamazawa *et al*, *EMBO J*, 2012.

## 2. 研究の目的

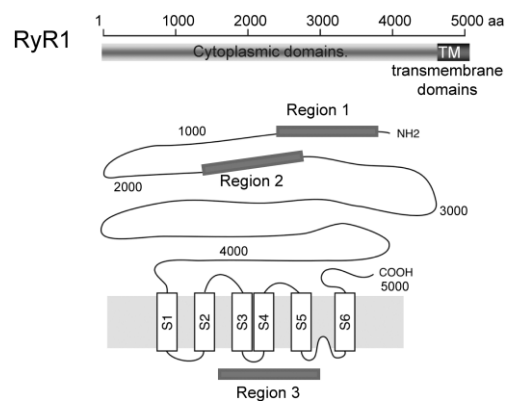
骨格筋の  $\text{Ca}^{2+}$  遊離チャネルも RyR1 であり、nNOS を共発現している点では脳組織と共通した特徴を持つ。本研究では、骨格筋において、NO による  $\text{Ca}^{2+}$  放出機構の生理的および

病態生理的意義を明らかにする。

## 3. 研究の方法

悪性高熱発症に寄与する機能的リアノジン受容体変異を解析するために、X 線結晶構造が解かれている N 末領域 (領域 1) から着手した。領域 1 から変異アノジン受容体遺伝子をカセット化法により 10 種類作製し、HEK 細胞にトランスフェクションして安定発現細胞を作製した。リアノジン受容体の野生型 (WT) と N 末側の変異体を発現した HEK 細胞に蛍光  $\text{Ca}^{2+}$  指示薬である fura-2 を負荷して室温で 30 分インキュベーション・洗浄後、倒立顕微鏡のステージに設置した。CICR 活性・NICR 活性を評価するため、 $\text{Ca}^{2+}$  イメージングは、モノクロメータを用いて 345 nm と 380nm で励起し 420 nm 以上の蛍光を CCD カメラで取得し画像解析した。細胞周囲だけを瞬時 (500 ミリ秒以内) に溶液交換できるように電磁弁をコンピューターで制御した。

## 4. 研究成果



Schematic diagram of RyR protein showing the predicted transmembrane domains (S1-S6) and the large N-terminal domains. The three hotspot regions are indicated.

Region 1; MH/CCD hotspot region 35~614

Region 2; MH/CCD hotspot region 2163~2458

Region 3; MH/CCD hotspot region 3916~4943

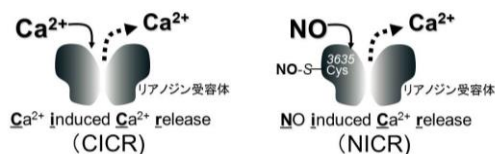
### (1) 悪性高熱症発症患者の RyR1 遺伝子変異における CICR-NICR 機能の解析

① リアノジン受容体の活性薬であるカフェインを投与すると、小胞体から細胞質側に  $\text{Ca}^{2+}$  放出されることにより細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が上昇する。そこで、まず、野生型でカフェインの  $\text{Ca}^{2+}$  応答を調べると 1 mM カフェインか

ら一過性の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度上昇が観察され 10 mM カフェインで最大反応を示した。同様に今回作製した変異リアノジン受容体とで比較した。R533H 以外の変異体 (L13R、Q155K、R163C、R163L、R401C、R401H、Y522C、Y522S) は野生型に比べて低濃度のカフェインで  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度上昇を引き起こしたが、10 mM カフェイン (最大反応) のピークサイズは減少した。中でも Y522C と Y522S のカフェインによる  $\text{Ca}^{2+}$ 放出のピークサイズは野生型に比べて約 2 割以下まで減少することを示した。

②静止時の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度を詳細に解析すると、R533H 除く全ての変異体では、野生型よりも静止時の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の有意な上昇を示した。カフェインによる  $\text{Ca}^{2+}$ 放出のピークサイズと静止時細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度との関係を調べると、カフェインの最大反応と静止時細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の間には負の相関が認められた。つまり、静止時の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度が上昇すると、カフェインのピークサイズが減少したことより、変異リアノジン受容体の CICR 活性の亢進はチャネルの構造に影響を与え小胞体から  $\text{Ca}^{2+}$ が漏れやすくし、その結果小胞体内腔の  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度が減少している可能性が示唆された。そこで、リアノジン受容体と同様に小胞体膜にある  $\text{IP}_3$  (イノシトール三リン酸) 受容体を介した  $\text{Ca}^{2+}$ 放出活性を調べた。 $\text{IP}_3$  受容体のアゴニストである ATP (アデノシン三リン酸) による  $\text{Ca}^{2+}$ 放出活性はカフェインによる  $\text{Ca}^{2+}$ 放出活性とは正の相関を示した。これらのことより、小胞体内腔の  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の減少が強く示唆された。

③CICR 活性に対する NICR の関与を調べると、CICR 活性が高い程、NICR 活性が高い傾向が認められ、CICR 活性と、NICR 活性は相関する結果が得られた。



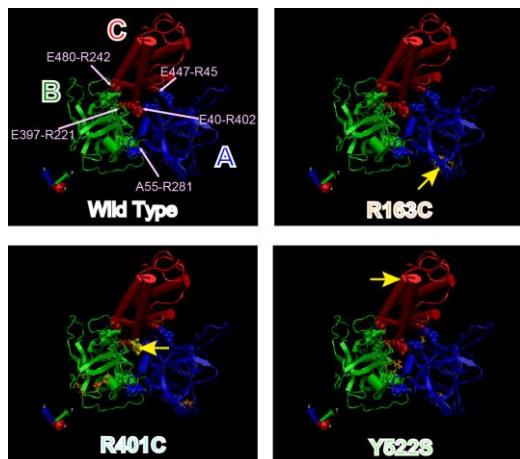
④クラゲ由来の蛍光蛋白質(GFP)との融合蛋白質を用いた  $\text{Ca}^{2+}$ プローブ (カメレオン)は宮脇らによって報告された。これ

は異なった波長スペクトルを有する GFP を 2 種類用い、シグナル分子である  $\text{Ca}^{2+}$ 認識蛋白質との融合蛋白質を作り蛍光共鳴エネルギー転移 (FRET) の程度によって  $\text{Ca}^{2+}$ 結合をモニターする方法である。このカメレオンは細胞質のように  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の低いところは測定可能であるが、 $\sim$ mM もあるような小胞体内腔の  $\text{Ca}^{2+}$ 動態はモニターできなかった。近年、 $\text{Ca}^{2+}$ 認識蛋白質に変異を入れて  $\text{Ca}^{2+}$ との結合の親和性を下げた改変カメレオンに小胞体移行シグナルをつけて小胞体内腔の  $\text{Ca}^{2+}$ 動態だけを選択的にモニターできるように設計したプローブ鈴木らによって報告された。この小胞体内腔の  $\text{Ca}^{2+}$ プローブを HEK 細胞に遺伝子導入することにより、小胞体内腔  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度を測定した。予測どおり、小胞体内腔の  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度は、野生型 (WT) に比べて変異体 (Q155K、R163C、Y522S) では減少していることが観測できた。この結果は、静止時の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の高い変異体はチャネル構造に関わる変調により  $\text{Ca}^{2+}$ が小胞体から漏れやすくなっている可能性を支持するものである。また同一細胞において、細胞質  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度と小胞体内腔の  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度変化の同時測定を試み、細胞質の  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度が上昇した時には小胞体内腔では  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度が減少することを示せた。

## (2) 分子動力学計算法によるシミュレーションと $\text{Ca}^{2+}$ 放出活性

悪性高熱症による変異によるリアノジン受容体チャネル構造に与える影響を検証するため、蛋白質のダイナミックな構造変化を予測できる分子動力学計算法によるシミュレーションを行った。 $\text{Ca}^{2+}$ シグナルの解析から得られた機能変化が、計算による静電結合パターンに相関があるかを検証するためである。これより、A—Cドメイン間 (E447-R45 残基) とB—Cドメイン間 (E397-R221残基) の結合確率が、カフェインによる  $\text{Ca}^{2+}$ 放出のピークサイズと弱いながら正に相関することが認められた。静電結合の結合確率が高い程、カフェイン誘発性  $\text{Ca}^{2+}$ の放出が大きくなるということは、変異によってこれらの結合が弱くなることで小胞体からの  $\text{Ca}^{2+}$ リークを起こす原因にある可能性が示唆

された。今回の研究により、E397とR221残基の間の結合が機能的に重要である示唆された。これより、分子動力学計算法の用いたシミュレーションの結果とカルシウムシグナルによる機能解析に相関が認められた。



### (3) NICR を阻害した小動物 (RyR1-C3636A ノックインマウス) の骨格筋機能解析

NICR に必須な S-ニトロシル化部位に変異を入れて NICR を阻害した小動物 (リアノジン受容体が S-ニトロシル化を受ける 3636 番目のシステイン残基をアラニン残基に置換した RyR1-C3636A ノックインマウス) の骨格筋初代培養細胞を用いて、骨格筋幹細胞の増殖速度及び、多核の骨格筋細胞への分化過程について差異があるか検証したところ、野生型と RyR1-C3636A ノックインマウスには有意な差が認められなかった。これより、これらの過程には NICR の寄与が少ないことが明らかになった (論文投稿中)。筋損傷における、NICR の寄与については解析中である。

#### 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 6 件)

1. Yamazawa, T., and Kakizawa, S. (2016). Nitric oxide-induced calcium release: neuronal cell death. 日薬理誌 147, 200-205. DOI:10.1254/fpj.147.200 査読有

2. Kakizawa, S., and Yamazawa, T. (2016). Nitric-oxide induced calcium release: regulatory mechanism and physiological function. 日薬理誌 147, 194-199. DOI: 10.1254/fpj.147.194 査読有
3. Yamaguchi, M., Yamazawa, T. (9 名中 6 番目), et al. (2016). Approaches to physical fitness and sports medicine through X-ray diffraction analysis of striated muscle. J Phys Fitness Sports Med 5, 47-55. DOI: 10.7600/jpfsm.5.47 査読有
4. Mikami, Y., and Yamazawa, T.\*. (2015). Chlorogenic acid, a polyphenol in coffee, protects neurons against glutamate neurotoxicity. Life Sci 139, 69-74. DOI: 10.1016/j.lfs.2015.08.005 査読有
5. Murayama, T., Kurebayashi, N., Yamazawa, T. (9 名中 3 番目), et al. (2015). Divergent Activity Profiles of Type 1 Ryanodine Receptor Channels Carrying Malignant Hyperthermia and Central Core Disease Mutations in the Amino-Terminal Region. PLoS One 10, e0130606. DOI: 10.1371/journal.pone.0130606 査読有
6. Nakano, M., Oyamada, H., Yamazawa, T. (7 名中 3 番目), et al. (2014). Construction and Expression of Ryanodine Receptor Mutants Relevant to Malignant Hyperthermia Patients in Japan. Showa Univ J Med Sci. 26, 27-38. DOI: 10.15369/sujms.26.27 査読有

[学会発表] (計 18 件)

1. 山澤徳志子、中村直俊、佐藤真理、佐藤主税 大気圧電子顕微鏡による分泌腺組織の水中観察 第 93 回日本生理学会大会 2016 年 3 月 22-24 日、札幌コンベンションセンター (北海道)
2. 山澤徳志子、中村直俊、佐藤真理、佐藤主税 大気圧電子顕微鏡による唾液腺組織の水中観察 第 89 回日本薬理学会年会 2016 年 3 月 9-11 日、パシフィコ横浜 (神奈川県)

3. Yamazawa T, Murayama T, et al. (10名)  
Correlation of molecular dynamics analysis and calcium signaling in mutant ryanodine receptors. 60th The Biophysical Society Annual Meeting 27Feb-02Mar, 2016 Los Angeles CA USA
4. 山澤 徳志子, 村山 尚ら(11名) 変異リアノジン受容体における分子動力学解析とカルシウムシグナル可視化解析の相関解析 第53回生物物理学学会年会 2015年9月13-15日、金沢大学(石川県)
5. 山澤 徳志子, 大野 哲生, 村山 尚, 大城戸 真喜子, 櫻井 隆, 山口 眞紀 骨格筋の増殖・分化に及ぼすポリアミンの作用第一回日本筋学会学術集会 2015年8月8日、国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター(東京都)
6. Yamazawa T, Murayama T, et al. (9名).  
Functional analysis of type 1 ryanodine receptor carrying disease associated mutations. "Muscle: Excitation-Contraction Coupling" Gordon Research Conference 31May- 5June, 2015 Sunday River, ME USA
7. 山澤徳志子, 三上義礼 ポリフェノールの神経保護作用 第92回日本生理学会大会 2015年3月21-23日神戸国際会議場(兵庫県)
8. 山澤徳志子 中枢神経における一酸化窒素によるカルシウム放出第88回日本薬理学会年会 2015年3月18-20日、名古屋国際会議場(愛知県)
9. 山澤 徳志子, 村山 尚ら(9名) 1型リアノジン受容体N末領域における悪性高熱症に関わる機能的変異 第52回生物物理学学会年会 2014年9月25-27日、札幌コンベンションセンター(北海道)
10. Yamazawa T, Murayama T, et al. (10名)  
Functional analysis of ryanodine receptor carrying malignant hyperthermia associated mutations. WCP(国際薬理学会)2014年7月13-18日Cape town, South Africa.
11. 山澤 徳志子, 村山 尚ら(10名) N末端悪性高熱症関連突然変異をもたらしている1型リアノジン受容体の機能解析 第87回日本薬理学会年会 2014年3月19-21日、東北大学(宮城県)
12. 山澤徳志子, 大野哲生, 大城戸真喜子, 山本裕大, 山口眞紀, 竹森重 骨格筋の増殖・分化に対するポリアミンの作用 第91回日本生理学会大会 2014年3月16日-18日、鹿児島大学(鹿児島県)
13. Yamazawa T, Murayama T, et al. (10名).  
Functional analysis of ryanodine receptor carrying malignant hyperthermia associated mutations. Biophysical Society 58th Annual Meeting 2014年2月15日-19日、San Francisco California USA
14. 山澤徳志子, 大野哲生, 大城戸真喜子, 山本裕大, 山口眞紀, 竹森重 骨格筋幹細胞に及ぼすポリアミンの役割 日本ポリアミン学会 第5回年会 2014年1月23-24日、千葉科学大学(千葉県)
15. 山澤徳志子, 大野哲生, 大城戸真喜子, 山本裕大, 山口眞紀, 竹森重 骨格筋幹細胞に及ぼすポリアミンの影響平成25年筋生理の集い 2013年12月21日、東京慈恵会医科大学(東京都)
16. 山澤 徳志子, 村山 尚ら(8名) 悪性高熱症関連変異をもたらしている1型リアノジン受容体の機能解析 第58回生物物理学学会年会 2013年10月28-30日、国立京都国際会館(京都府)
17. 山澤徳志子, 大野 哲生, 山本 裕大, 山口眞紀, 竹森重 骨格筋幹細胞の増殖・分化におけるポリアミンの作用 第68回日本体力医学会大会 2013年9月21-23日、日本教育会館・学術総合センター(東京都)
18. Yamazawa T, Murayama T, et al. (9名)  
Exploration of functional mutations of ryanodine receptor in malignant hyperthermia. IUPS2013(国際生理学会) 2013年7月21-26日、Birmingham, UK.

6. 研究組織

(1)研究代表者

山澤徳志子 (Yamazawa Toshiko)

東京慈恵会医科大学・分子生理学・講師

研究者番号：00282616

(2)研究分担者

なし ( )

研究者番号：

(3)連携研究者

なし ( )

研究者番号：