

平成 30 年 6 月 27 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26460305

研究課題名(和文) 変異リアノジン受容体のカルシウム漏れによる心室頻拍：催不整脈性のインビトロ再構成

研究課題名(英文) Ventricular tachycardia triggered by augmented Ca leak through ryanodine receptor carrying point mutation: In vitro reconstruction of arrhythmogenicity

研究代表者

上原 明 (Uehara, Akira)

福岡大学・医学部・准教授

研究者番号：60140745

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)：我々は、ヒト心室頻拍患者の心筋リアノジン受容体の点変異体K4750QをIn vitro再構成し、変異体の単一チャネル電流特性とCa<sup>2+</sup>動態を検討した。その結果、細胞質側Ca<sup>2+</sup>による活性化、細胞質側Ca<sup>2+</sup>による不活性化、小胞体内腔側Ca<sup>2+</sup>による活性化の3つから成るRyR2のCa<sup>2+</sup>感受性機構群は、全てCa<sup>2+</sup>リーク能が劇的に高まる方向に変化していた。これは、3つのCa<sup>2+</sup>リガンド結合部位群からのCa<sup>2+</sup>結合に伴う構造変化の情報がK4750を含む箇所では収斂される部位に変異が入っていることで説明される。変異RyR2発現細胞では、Ca<sup>2+</sup>リーク亢進による小胞体内腔のCa<sup>2+</sup>枯渇も確認された。

研究成果の概要(英文)：Mechanisms of Ca release from SR/ER through the cardiac RyR2 w a point mutation K4750Q linked to ventricular tachycardia VT were functionally examined by measuring Ca signals and single RyR2 channel currents. The Ca signals were obtained from HEK293 and cardiac HL-1 cells expressing RyR channels. The single-channel currents were from RyR2 purified proteins. The mutation caused simultaneous functional defects in RyR2 function that include cytosolic Ca hyper-activation/sensitization, loss of cytosolic Ca/Mg-mediated inactivation, and luminal Ca hyper-activation/sensitization. The excessive SR Ca leak in K4750Q-expressing cells reduced [Ca]<sub>lum</sub> significantly lowering CPVT risk at rest. We thus show that the mutation markedly enhanced multiple RyR2 Ca regulatory mechanisms, which indicates that the K4750 residue resides at a pivotal structural point that synergizes cytosolic and luminal RyR2 control inputs.

研究分野：心臓生理

キーワード：心筋 リアノジン受容体 不整脈 Ca

1. 研究開始当初の背景

心筋リアノジン受容体 RyR チャンネルは心筋の興奮収縮連関の要をなす細胞内 Ca 動員蛋白質である。RyR は約 5000 個ものアミノ酸から構成されるが、遺伝子変異により機能的に重要なアミノ酸が1個でも置換されると Ca リーク能が異常に増大し、ヒトでは致死性の Ca 依存性不整脈を起こす。然しながら、その RyR 変異の催不整脈性機構は、まだ良く判ってはいない。我々は、同 Ca 依存性不整脈を代表する良い実験モデルとして、RyR の点変異によるカテコラミン誘発性多形性心室頻拍 CPVT 疾患を選んだ。この不整脈疾患の心臓発作は、患者の身体運動時にのみ起こるという特徴を有する。

2. 研究の目的

Ca 依存性不整脈を発生させるヒト RyR 変異を HEK293 細胞や心筋細胞由来の HL-1 細胞に再構成し、その催不整脈性機構を RyR 分子機能に着目しながら検討した。

3. 研究の方法

ヒト心室頻拍患者 RyR の点変異体 K4750Q を中心に *In vitro* 再構成し、RyR 蛋白質の単一チャンネル電流特性と Ca 動態を調べる機能解析を行った。Ca 動態解析では、細胞質を標的とする GECO と小胞体 ER 内腔を標的とする CEPIA などの Ca センサーを用いて、それぞれの Ca 濃度を同時測定した。

4. 研究成果

第一に、RyR の野性型および変異体 (K4750Q と R2473S) を培養細胞 HEK293 に異所性に発現させ、Fluo-4 による細胞質 Ca のイメージング実験を行った(図 1)。その結果、RyR 変異により、より高頻度に発生する催不整脈性の Ca 波が再現された。

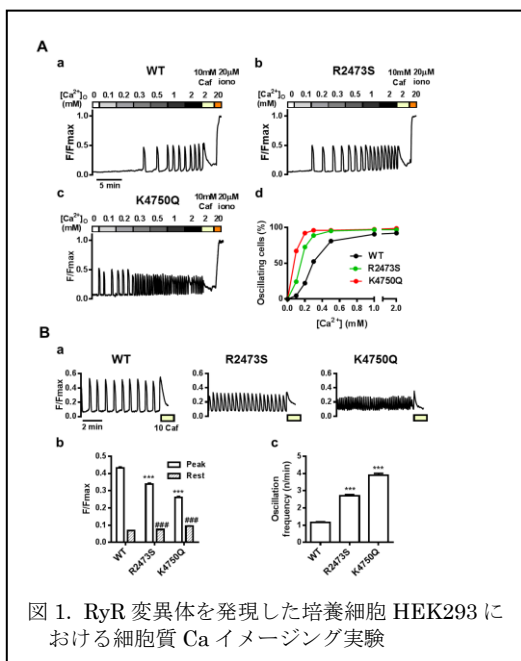


図 1. RyR 変異体を発現した培養細胞 HEK293 における細胞質 Ca イメージング実験

第二に、RyR の野性型および変異体 (K4750Q) を HL-1 心筋細胞に発現させ、細胞質 Ca イメージングを行った(図 2)。心筋細胞でも、催不整脈性の Ca 波が確認された。

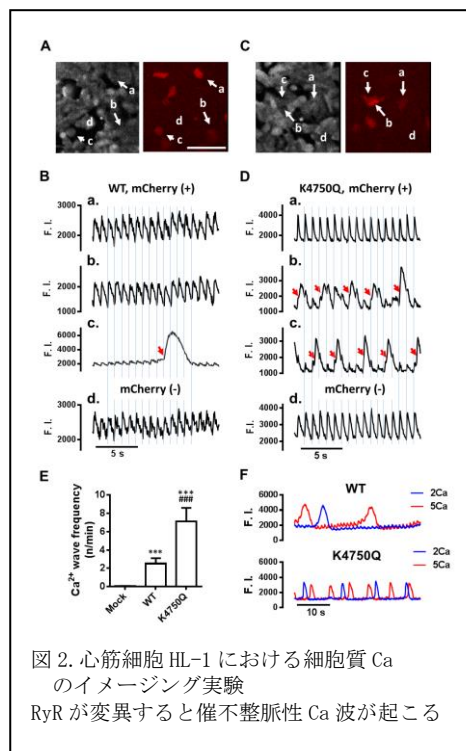


図 2. 心筋細胞 HL-1 における細胞質 Ca のイメージング実験  
RyR が変異すると催不整脈性 Ca 波が起こる

第三に、CEPIA を用いて RyR 発現細胞の小胞体 ER 内腔 Ca 濃度と細胞質 Ca 濃度を同時測定した(図 3)。RyR 変異体 (K4750Q と R2473S) の Ca リーク亢進による小胞体の Ca 枯渇を捉えた。

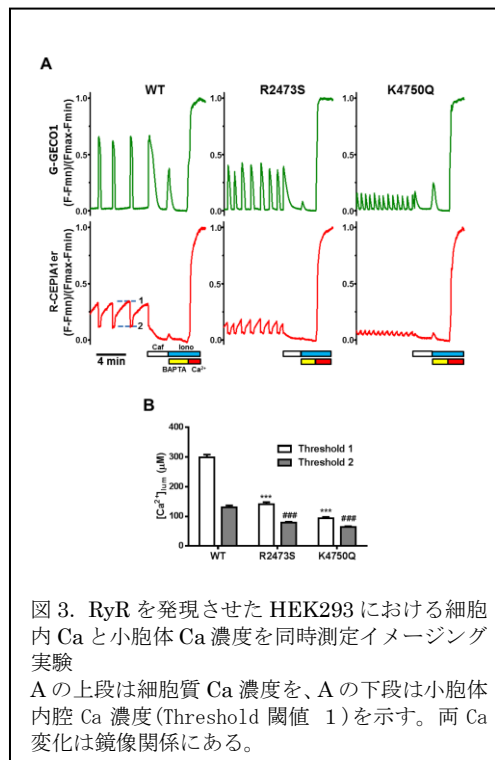
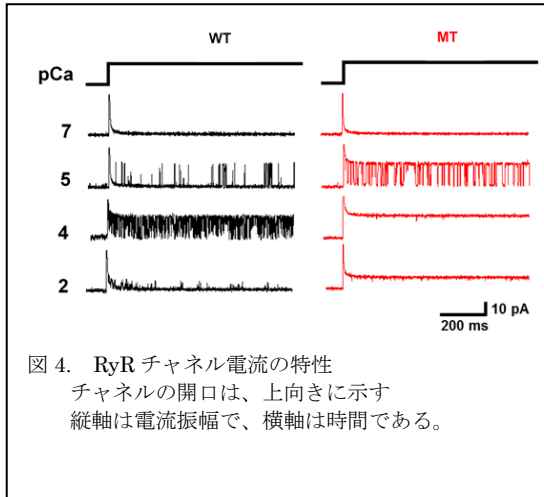
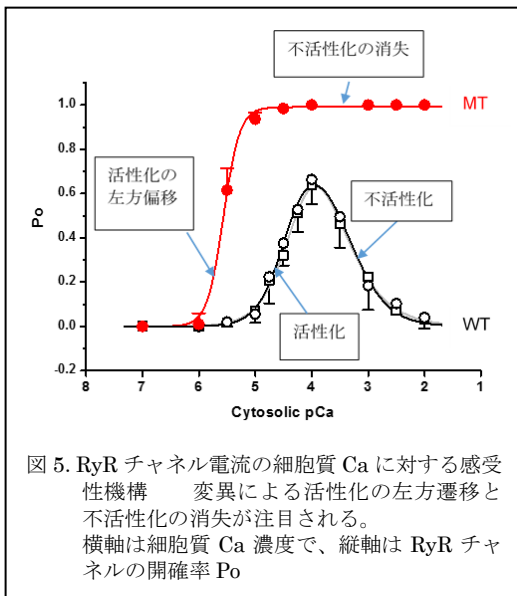


図 3. RyR を発現させた HEK293 における細胞内 Ca と小胞体 Ca 濃度を同時測定イメージング実験  
A の上段は細胞質 Ca 濃度を、A の下段は小胞体内腔 Ca 濃度(Threshold 閾値 1)を示す。両 Ca 変化は鏡像関係にある。

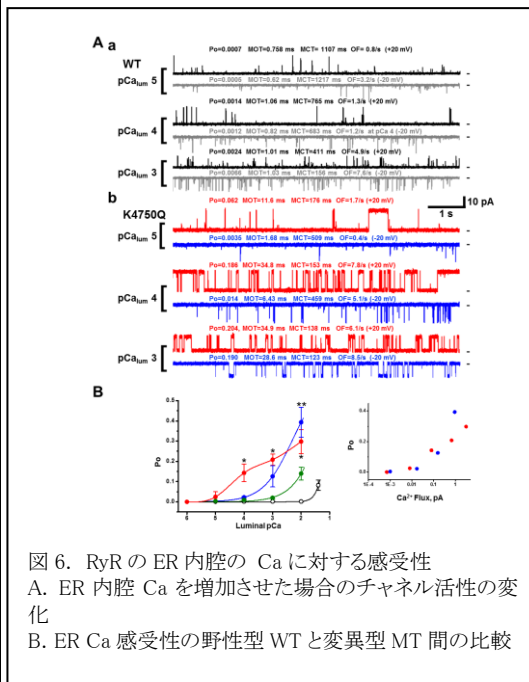
第四に、RyR 蛋白分子から単一チャネル電流を測定し、野生型 RyR と変異型 MT 間の電流特性を比較した(図 4)。細胞質 Ca 濃度を高めると、RyR チャネル活性は野性型 WT と変異型 MT では異なる様式で変化する。変異型 RyR のチャネル活性すなわち開確率はどの Ca の濃度においても一貫して上昇していた。



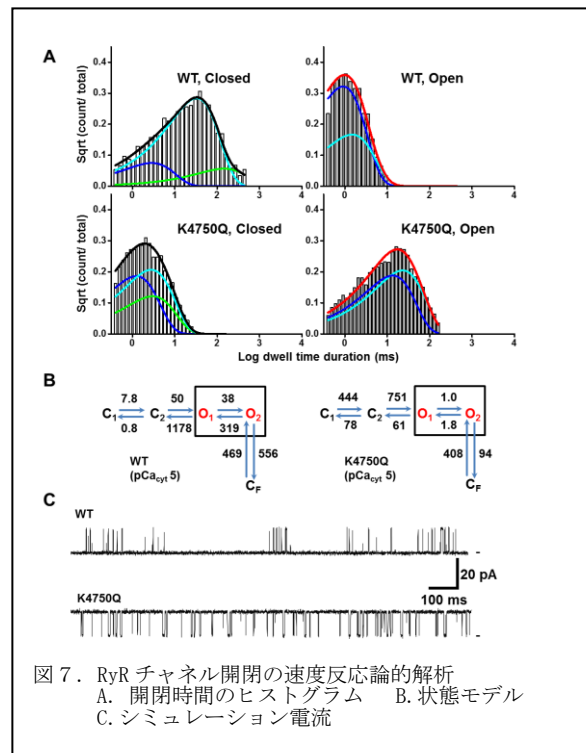
第五に、細胞質側 Ca に対する RyR 感受性を詳細に検討した。その Ca 感受性は、細胞質側 Ca による RyR チャネル電流の活性化、同 Ca による不活性化、小胞体内腔側 Ca による活性化の 3 つから成ることが判った(図 5)。これらの感受性は全て、変異により劇的に変化しており、何れも変異 RyR 分子の Ca リーク能の劇的上昇に寄与していた。



第六に、RyR チャネルのイオン流の ER 内腔の Ca に対する感受性を検討した(図 6)。ER 内の Ca を増加するにつれ、RyR チャネルが活性化された(図 6 A)。変異により、RyR の ER 内腔 Ca に対する感受性も増大することが判明した(図 6 B)。



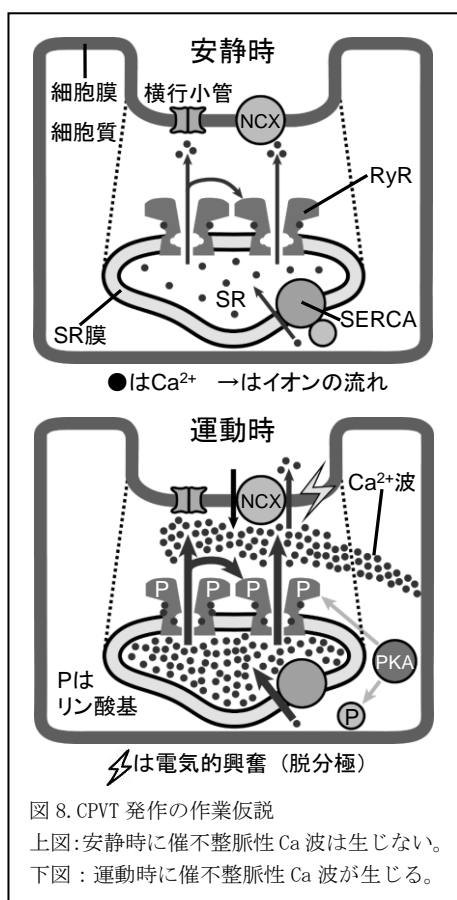
第七に、RyR チャネル開閉の数理モデルを作成した(図 7)。開閉 CO ヒストグラムとともに、2 個以上の開閉状態群から構成されていた。同ヒストグラムから作成した状態モデルを見ると、RyR は変異により全体的に開状態にシフトすることが判明した。つまり、変異により、RyR は開状態に留まる確率が高まっていた。



以上の成果を要約すると、(1) RyR チャネルは変異により Ca リーク能が異常に上昇していた。(2) その RyR Ca リーク能の変異による上

昇は、低濃度域の細胞質 Ca による RyR チャンネル活性化と高濃度域の細胞質 Ca による不活性化の喪失および ER 内 Ca による活性化からなっていた。(3) RyR 変異により、ER 内に貯蔵される Ca が枯渇していた。(4) 催不整脈性 Ca 波を捉えたことで、遺伝子変異の再現のみならず不整脈表現型も培養細胞や心筋細胞などの *In vitro* 実験系で再現されることが確認された。

更に本成果を統合し、致死性の Ca 依存性不整脈 CPVT における発症メカニズムの作業仮説を立てた(図 8)。患者の安静時に発作が起こらないのは、RyR 変異により ER 内 Ca の枯渇(図 3)されることにより説明される。また、患者の身体運動時に発作が起こるのは、RyR 変異によるチャンネルの Ca リーク能亢進(図 4, 5)に始まる心筋細胞表面膜の電氣的興奮により説明される。



### 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 2 件)

Extensive Ca<sup>2+</sup> leak through K4750Q cardiac ryanodine receptors caused by cytosolic and luminal Ca<sup>2+</sup> hypersensitivity.  
A Uehara, T Murayama, M Yasukochi, M Fill, M Horie, T Okamoto, Y Matsuura, K Uehara, T Fujimoto, T Sakurai, and N Kurebayashi J Gen Physiol. 149: 199-218 (2017)

リアノジン受容体の細胞質および小胞体 Ca<sup>2+</sup>に対する感受性機構は催不整脈性変異により障害

される 上原明 日本生理学雑誌 サイエンストピックス 79 巻 3 号 39 ページ (2017)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:  
 発明者:  
 権利者:  
 種類:  
 番号:  
 出願年月日:  
 国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:  
 発明者:  
 権利者:  
 種類:  
 番号:  
 取得年月日:  
 国内外の別:

[その他]  
 ホームページ等

### 6. 研究組織

#### (1) 研究代表者

上原 明 (Uehara Akira)  
 福岡大学・医学部・准教授  
 研究者番号: 60140745

#### (2) 研究分担者

上原 清子 (Uehara Kiyoko)  
 福岡大学・医学部・准教授  
 研究者番号: 00084244

塩谷 孝夫 (Shioya Takao)  
 佐賀大学・医学部・助教  
 研究者番号: 20253594

#### (3) 連携研究者

( )

研究者番号:

#### (4) 研究協力者

( )