

リアノジン受容体に対するカルモジュリンの結合性増強は  
カテコラミン誘発性多形性心室頻拍関連心筋細胞の  
不整脈誘発要因となるチャンネル不全を改善する

氏名 福田 昌和

所属 山口大学大学院医学系研究科

応用医工学系専攻 器官病態内科学分野

平成26年4月

## 目 次

第1章 要旨	2
第2章 緒言	3
第2章 研究方法	
3.1 動物モデル	3
3.2 カルモジュリン (CaM) と Gly-Ser-His-CaM の発現と精製	3
3.3 心筋細胞の単離	4
3.4 $\text{Ca}^{2+}$ spark と $\text{Ca}^{2+}$ content の測定	4
3.5 サポニン処理細胞における外因性 CaM の リアノジン受容体に対する結合性定量	5
3.6 心筋細胞の一過性 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度変化 ( $\text{Ca}^{2+}$ transient) モニタリング	5
3.7 単離心室心筋細胞での電気生理学的記録	5
3.8 統計処理	5
第4章 研究結果	
4.1 CPVT 型 RyR2 に対する CaM 結合性は 野生型 RyR2 と異なり cAMP の刺激で低下する	6
4.2 ノックイン細胞において CaM-GSH は $\text{Ca}^{2+}$ spark を抑制し $\text{Ca}^{2+}$ content を増加させる	7
4.3 ノックイン細胞において CaM 結合性の増強は 非透過処理細胞において抗不整脈効果を持つ	8
4.4 野生型細胞およびノックイン細胞それぞれで遅延後脱分極 (DAD) と激発電位 (TA) での WT-CaM と GSH-CaM の明確な効果の違い	9
第5章 考察および結論	10
Supplementary data	11
謝辞	12
参考文献	13

## 第1章 要旨

### 目的：

カルモジュリン (CaM) はリアノジン受容体 (RyR2) におけるチャンネルの開閉制御に重要な役割を果たしている。我々はカテコラミン誘発性多形性心室頻拍 (CPVT) 関連の遺伝子変異を持つノックイン (KI) マウスを用いて、CPVT でのチャンネル不全における CaM の関与について、また、CaM を用いてチャンネル不全を改善させる可能性について検討した。

### 方法と結果：

CaM 結合性は蛍光標識した外因性 CaM を細胞内に導入することにより評価した。CaM 結合性は cAMP 存在下の野生型 (WT) 細胞では変化しないが、KI 細胞では低下した。3 アミノ酸を付加し RyR に対する結合性を高めた CaM (GSH-CaM) を用いると、cAMP 存在下の KI 細胞で CaM 結合性は改善された。パッチクランプ法を用い単離心筋細胞においてペーシング前後で膜電位を測定し、ペーシング後の遅延後脱分極 (DAD) および激発電位 (TA) について評価した。イソプロテレノール (ISO) 投与下では WT 細胞において DAD を 11% に認め、TA は認めなかった。KI 細胞ではそれぞれ 60%、38% で認めたが、GSH-CaM 存在下では、38%、10% に減少した。KI 細胞で Ca スパーク頻度は WT 細胞よりも多い (100% 増加) が、GSH-CaM を加えると 33% 増加に抑えた。これは CaM を加えた場合 (76% 増加) よりも抑制した。タンパク導入キットにより CaM、GSH-CaM を導入し、ペーシング後の自発性 Ca 放出 (sCaT) を評価した。ISO 存在下の KI 細胞では 37% に sCaT を認めたが、CaM 存在下では 26%、GSH-CaM 存在下では 9% に減少した。

### 結語：

CPVT 型変異をもつ RyR の  $\beta$  刺激時のチャンネル機能異常 (Ca リーク増加、DAD、TA、Ca スパーク頻度、sCaT) は、RyR に対する CaM 結合性を増加させることにより正常な機能に改善させることができる。

## 第2章 緒言

カルモジュリン (CaM) はリアノジン受容体 (RyR2) の修飾タンパクの一つであり、チャンネルの内因性調節機構として知られている<sup>1)2)</sup>。実際に細胞質内  $\text{Ca}^{2+}$  が生理的濃度の場合 CaM は RyR2 に対して抑制的に作用する<sup>2)</sup>。RyR2 内での CaM の結合部位は、いわゆる”clamp region”と膜貫通部位であるチャンネル部位との中央に存在しており<sup>3-5)</sup>、我々はこれまでに以下の仮説を提唱している<sup>6-8)</sup>。それは”clamp region”に存在する N-terminal domain と central domain が相互に関連し(すなわち”ドメインスイッチ”)、CaM に依存して on/off の活動がチャンネルに伝達されているというものである。この仮説を支持するために我々は最近、点突然変異 (R2474S) により生じた N-terminal domain と central domain のドメイン関連障害が CaM 結合性を低下させ、結果として拡張期  $\text{Ca}^{2+}$  スパークを生じ致命的不整脈につながることを示した<sup>9)</sup>。さらに、イヌでのペーシング誘発性心不全モデルを用いて、不全心筋ではドメインスイッチの関連障害が RyR2 に対する CaM 親和性を低下させ、その結果  $\text{Ca}^{2+}$  の自発的な放出が生じること、および、外因性 CaM により低下した CaM 親和性を改善させることにより異常な  $\text{Ca}^{2+}$  放出を抑制し、 $\text{Ca}^{2+}$  濃度変化 ( $\text{Ca}^{2+}$  transient) と細胞収縮性を正常化することを示した<sup>10)</sup>。正常な心筋機能における RyR2 に結合した CaM の決定的な役割や、心機能障害の進行における CaM の解離の病的役割については Meissner らの先行研究で示されている<sup>11)</sup>。彼らは、CaM 結合部位 (3583-3603) の 3 アミノ酸を置換することによって RyR2 と CaM の結合ができないようにした遺伝子改変マウスを作製し、そのマウスは重度の収縮不全を伴う肥大型心筋症を呈し、若年死を生じることを示した<sup>11)</sup>。この発見は、CaM と RyR2 の関連性が正常なチャンネル機能を維持するため重要な役割を果たしていること、そして、心肥大のような心臓障害から保護するために重要であることを示している。

本研究で我々は、RyR2 に対する選択的な CaM 親和性の増加によって、CPVT における異常な  $\text{Ca}^{2+}$  放出を改善できるという仮説を検証した。以前の報告で RyR1 に対して CaM よりもより高い親和性を持つとされている CaM-(Gly-Ser-His)を用いて、CPVT 型の RyR2 において高親和性 CaM がチャンネルを正常化することを示す。

## 第3章 研究方法

### 3.1 動物モデル

本研究は NIH による実験動物の保護と使用のガイドライン(NIH Publication No. 85-23, revised 1996)を順守して実施した。動物の飼育と実験計画は山口大学医学部動物倫理委員会の策定したガイドラインに沿って行った。

RyR2 R2474S ノックインマウスは以前に記載されたとおりに作成した<sup>9,13)</sup>。

### 3.2 カルモジュリン (CaM) と Gly-Ser-His-CaM の発現と精製

哺乳類 CaM (mCaM) の cDNA は Dr. Zenon Grabarek (Boston Biomedical Institute, Boston, MA) より提供された。ヒト CaM の cDNA は 2 つの制限酵素部位 (the forward primer 50-ACACAGGGGATCCCATATGGCTGAC-30, reverse primer 50-CAAGCTTGGCTCGAGTCACTTTGC-30) を含むオリゴヌクレオチドプライマーによって PCR 増幅した。cDNA は pGEX4T-1 ベクターに導入され、発現ベクターとして DH5a *Escherichia coli* (Nippongene) へ導入した。菌株は 30°C 6 時間 Lysogeny Broth (LB) ampicillin で前培養され、次いで 10 倍量の Lysogeny Broth (LB) ampicillin とともに 2 時間培養した。

### 3.3 心筋細胞の単離

心筋細胞はマウス心臓から以前記載されているように単離した<sup>13,14</sup>。簡単に述べると以下のとおりである。安楽死後に心臓を速やかに摘出し、混合ガス (95%O<sub>2</sub> と 5%CO<sub>2</sub>) によりバブリングされたコラゲナーゼを含む MEM による逆行性還流を行った。左室心筋は新鮮なコラゲナーゼ含有溶液内ではさみにより分割し、桿状の成熟したマウス心筋細胞を単離した。単離されたマウス心筋細胞はラミニンコーティングされた培養容器へ移し、95%O<sub>2</sub> 5%CO<sub>2</sub> 大気圧で 37°C 12 時間培養した。

### 3.4 Ca<sup>2+</sup> spark と Ca<sup>2+</sup> content の測定

カルシウムスパーク (Ca<sup>2+</sup> spark) はサポニンによる透過処理をした心筋細胞を用いて、以前に述べられたようなレーザー共焦点顕微鏡 (LSM-510, Carl Zeiss)<sup>13,15,16</sup> を用いて測定した。簡単に述べると、心筋細胞は 23°C で relaxing solution (EGTA 0.1 mmol/L, ATP 5 mmol/L, HEPES 10 mmol/L, K-aspartate 150 mmol/L, MgCl<sub>2</sub> 0.25 mmol/L, reduced glutathione 10 mmol/L) により還流した。心筋細胞膜は 30 秒間サポニン (50 μg/ml) に浸すことにより透過処理を行った。透過処理後、心筋細胞は MaxChelator により計算した遊離 Ca<sup>2+</sup> 濃度となるような細胞内溶液 internal solution (EGTA 0.5 mmol/L, HEPES 10 mmol/L, K-aspartate 120 mmol/L, ATP, 5 mmol/L, free [Mg<sup>2+</sup>] 1 mmol/L, reduced glutathione 10 mmol/L, free [Ca<sup>2+</sup>] 30 nmol/L, creatine phosphokinase 5 U/ml, phosphocreatine 10 mmol/L, dextran (Mr: 40,000) 4%, Rhod-2 0.02 mmol/L, pH 7.2) に移した。

Rhod-2 は 543nm レーザー光で励起され、560nm 以上の蛍光波長を示す。Ca<sup>2+</sup> spark 画像は透過処理をした心室心筋細胞で収集し、CaMKII (Ca<sup>2+</sup>/CaM 依存性タンパクリン酸化酵素 II) 抑制薬である KN-93 (1 μmol/L) とオカダ酸 (1 μmol/L) を添加した。KN-93 および/またはオカダ酸を加えない実験は行っていない。そのため、KN-93 による、もしくは、オカダ酸によるセリン/スレオニンリン酸化酵素の抑制による CaMKII 抑制は直接的には測定していない。

データは高速で信頼できる自動スパーク解析ソフトである SparkMaster により解析した<sup>17</sup>。解析は一般的なパラメータ (スパーク数、スパーク頻度) とともに個別のスパークパラメータ (振幅、FWHM: 50% 幅、FWHM: 50% 持続時間) についても含まれる。筋小胞体内のカルシウム含量 (Ca<sup>2+</sup> content) は筋小胞体内に蓄積された Ca<sup>2+</sup> の放出のためカフェイン (10mmol/L) の急速還流を行うことにより測定した。

### 3.5 サポニン処理細胞における外因性 CaM のリアノジン受容体に対する結合性定量

HiLyte Fluor 647 (AnaSpec Inc., CA)により蛍光標識された CaM (F-CaM) は、上記 Ca<sup>2+</sup> spark 測定と同一の条件でサポニンによる細胞膜透過処理をした WT および KI 心筋細胞に導入した。局在化した CaM は F-CaM の蛍光強度による濃度測定により分布を評価した。蛍光標識された細胞を共焦点レーザー顕微鏡により走査した(LSM-510, Carl Zeiss) (絞り 1.3、励起 633nm、蛍光 640nm)。サルコメアに沿った HiLyte Fluor 647 の蛍光強度の周期的な変化は長軸に沿った関心領域 (~25 μm) で加算し、その距離で除して評価した。

### 3.6 心筋細胞の一過性 Ca<sup>2+</sup>濃度変化モニタリング

単離心筋細胞は 20 μM Fluo4-AM (アセトキシメチルエステル) に 30 分室温で培養し、2 回 Tyrode 溶液で洗浄した。すべての実験は 35℃で実施した。電気刺激(IonOptix, MA, USA)での細胞刺激により共焦点顕微鏡(LSM-510, Carl Zeiss)のレーザー走査および蛍光デジタル顕微鏡(BZ9000, Keyence, Japan)により細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度測定を行った。WT 細胞および KI 細胞において 1,2,3,4,5Hz 刺激後の自発的 Ca<sup>2+</sup>放出を測定した。

### 3.7 単離心室心筋細胞での電気生理学的記録

膜電位は MultiClamp 700B (Axon Instruments)を使用しホールセルモードで測定した。静止状態、Ca<sup>2+</sup>に正常に反応する桿状の細胞で明瞭な横紋の見える細胞を電気生理学的記録に用いた。活動電位の記録の際には、3ms で 1.5~2.5nA の脱分極パルスを用いてパッチ電極から細胞内への電流刺激を行った。すべての実験は 5kHz で記録(Digidata 1322A, Axon Instruments)し、解析ソフト pCLAMP version 9.2 (Axon Instruments)を用いた。振幅は最大の変化とペーシング直前・直後の平均の差として判断した。CaMKII 抑制薬である KN-93 は Tyrode 溶液内から心筋内へ導入した。

### 3.8 統計処理

2 群間の差の検定には、対応のある/対応のない t 検定を用い、濃度依存性データの群間比較は、post hoc Scheffe 検定を併用した ANOVA で行った。イベント発生率では  $\chi^2$  自乗検定によるクロス集計を用いた。

## 第4章 研究結果

我々は以前の研究で、RyR2 に対する CaM 親和性が低下すると Ca<sup>2+</sup>リークが生じ、そのことによって収縮不全や不整脈が生じることを明らかにした<sup>9,10,20</sup>。さらに、不全心筋では CaM よりも RyR1 に対してより高い親和性を持つ CaM-(Gly-Ser-His)は RyR2 を安定化させ、Ca<sup>2+</sup>リークを抑制し心筋機能を改善させることを示した。ここではさらに、CaM-GSH が R2474S KI モデルにおいてチャンネルを正常化させるかどうかについて検討を行った。

### 4.1 CPVT 型 RyR2 に対する CaM 結合性は野生型 RyR2 と異なり cAMP の刺激で低下する

CPVT 型の RyR2 に対する CaM 結合性により生理学的状態が変化するかを評価するために、サポニンによる細胞膜透過処理を行った WT および KI 細胞に対して、HiLyte Fluor 647 により蛍光標識した外因性 CaM (F-CaM) を導入し、細胞内で結合した CaM を評価した (Fig. 1A)。外因性に導入した F-CaM の蛍光と RyR2 を免疫染色した蛍光は、サルコメアに沿った周期的なパターンを取っており、重要なことは CaM と RyR2 の蛍光パターンが非常に一致していることである。サルコメアに沿って観察される蛍光強度を、導入した F-CaM もしくは F-GSH-CaM の濃度としてプロットしたとき、WT 細胞では CaM と GSH-CaM の結合性は cAMP のあるなしに関わらず変化なかった。KI 細胞の場合、cAMP 投与により CaM の濃度依存性は右方変異したにもかかわらず、GSH-CaM では cAMP の存在下でも濃度依存性は変わらなかった (Fig. 1)。

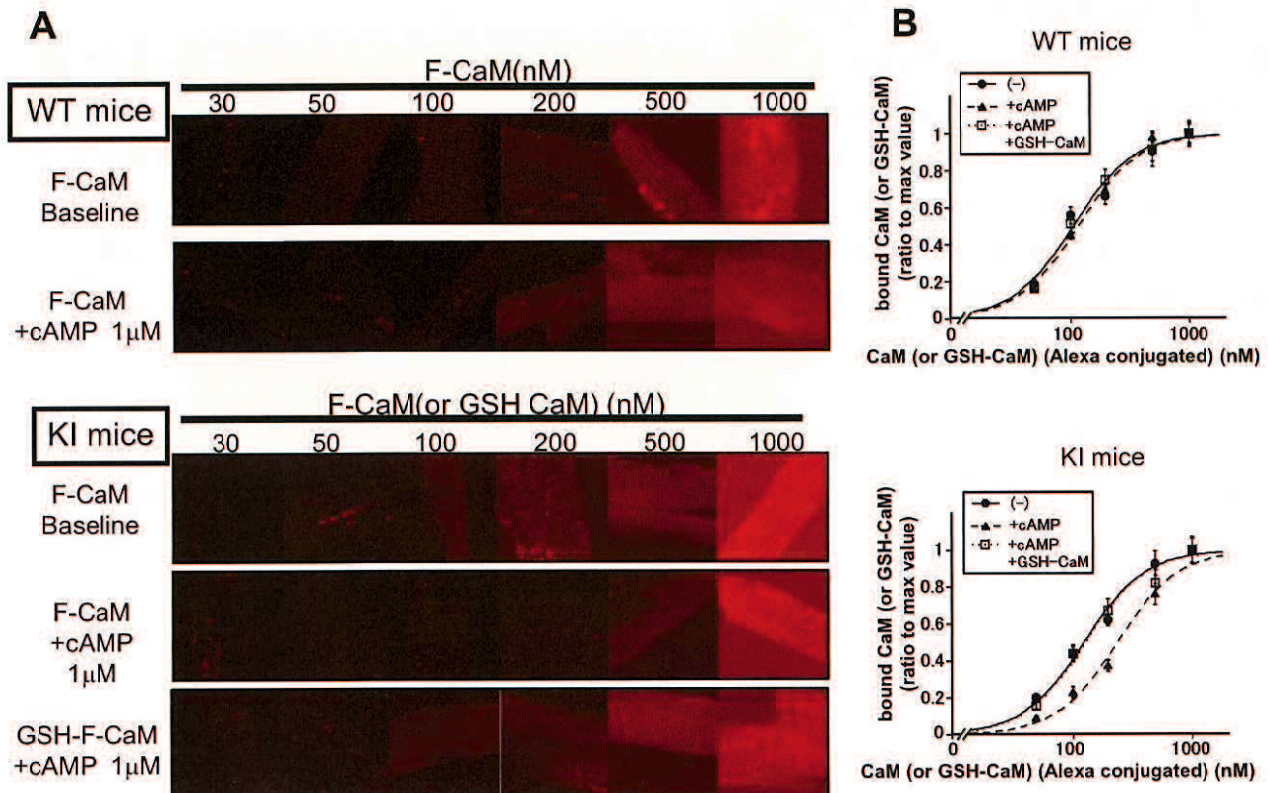


Fig. 1 外因性 CaM の結合特性。(A)特徴的な F-CaM もしくは F-GSH-CaM の画像。(B) 最大値に対する結合率としての評価。±SE として表示。3~4 心臓から 8~13 細胞。

#### 4.2 ノックイン細胞において CaM-GSH は Ca<sup>2+</sup> spark を抑制し Ca<sup>2+</sup> content を増加させる

CaM の RyR2 に対する結合によりドメイン連関障害が改善されることにより Ca<sup>2+</sup> 放出イベントが抑制されるかどうかを評価するために、我々はサポニンによる細胞膜透過処理を行った心筋細胞で Ca<sup>2+</sup> spark を測定した。KI 細胞では Ca<sup>2+</sup> spark 頻度は cAMP の投与により有意に増加した。しかし、増加した Ca<sup>2+</sup> spark 頻度は WT-CaM (100nM) では抑制されないが CaM-GSH では抑制された (Fig. 2A, B)。

筋小胞体内の Ca<sup>2+</sup> content に対する外因性 CaM の影響を評価するために、サポニン処理細胞にカフェイン (10mmol/L) を投与した。Fig. 2C にあるように、KI 細胞では Ca<sup>2+</sup> content は cAMP の投与により減少した。WT-CaM では改善しなかったが、CaM-GSH の投与により通常のレベルまで Ca<sup>2+</sup> content は改善した。

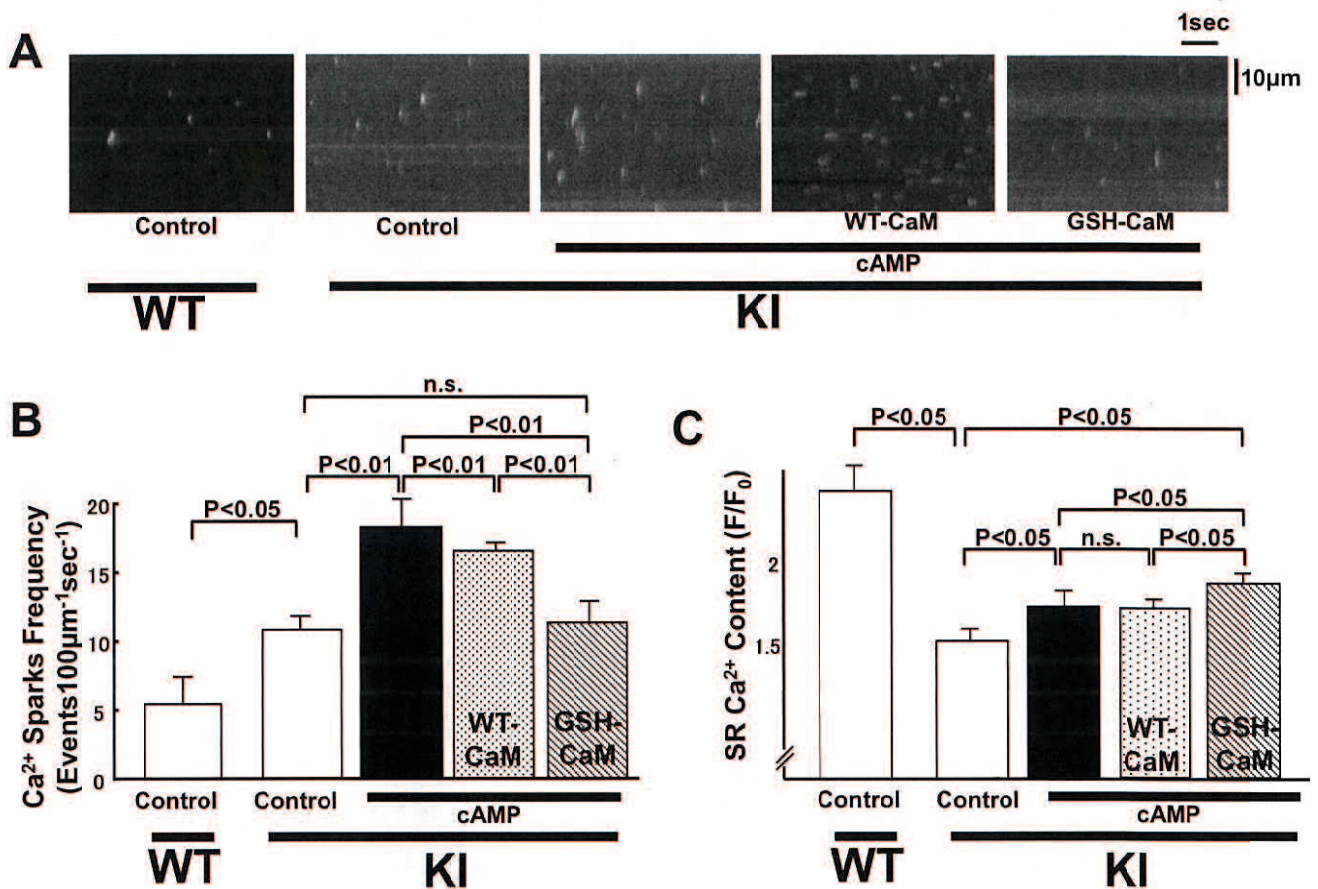


Fig.2 サポニン処理細胞における Ca<sup>2+</sup> spark および Ca<sup>2+</sup> content における WT-CaM (CaM-GSH) (200nmol/L) の効果。正常心筋細胞および KI 心筋細胞を cAMP (1 μmol/L) で処理した。Ca<sup>2+</sup> content は 10mmol/L カフェインの投与により測定、Ca<sup>2+</sup> spark は CaMKII 抑制薬である KN-93 (1 μmol/L) の存在下に観察した。(A) Ca<sup>2+</sup> spark の代表的画像 (B) Ca<sup>2+</sup> spark 頻度の要約 (C) Ca<sup>2+</sup> content の要約

データは平均±SE。8-16 細胞それぞれ 3 から 4 単離



4.3 ノックイン細胞において CaM 結合性の増強は非透過処理細胞において抗不整脈効果を持つ

WT細胞はイソプロテレノール (30nmol/L) 投与下でのペーシングにおいて異常な一過性 Ca<sup>2+</sup>濃度変化 (Ca<sup>2+</sup> transient) を認めなかった。しかしながら、KI 細胞はイソプロテレノールの投与下にペーシング頻度が1から5Hzへ増加していくときに Ca<sup>2+</sup> transientが増加した。重要なことは、WT-CaMでは十分に抑制されなかった Ca<sup>2+</sup> transientが CaM-GSH では抑制されたことである (WT-CaM/CaM-GSHはタンパク導入キットにより導入された) (Fig. 3)。

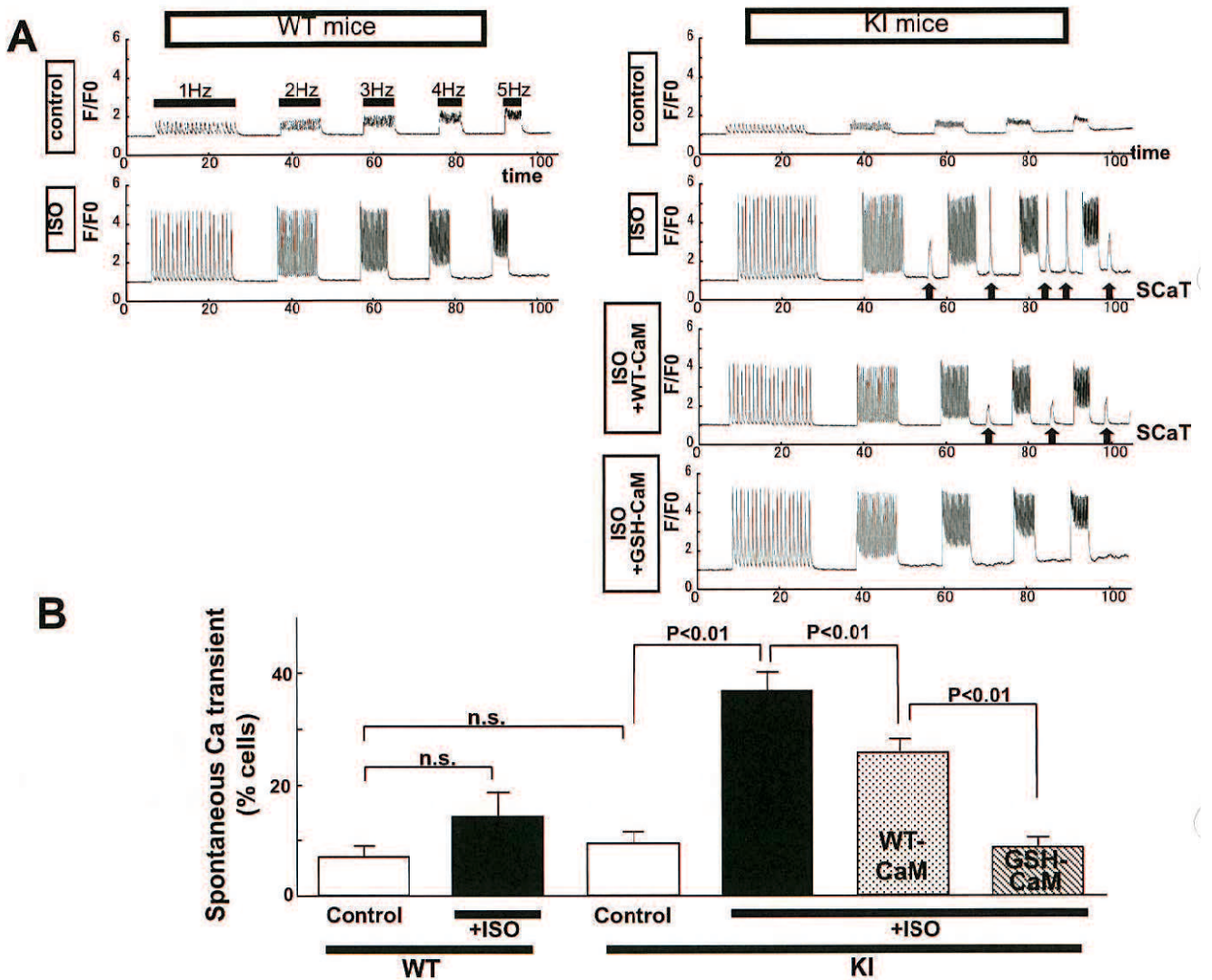


Fig. 3 WTおよびKI細胞において、1, 2, 3, 4, 5 Hzでのペーシングを停止した後に認められる一過性 Ca<sup>2+</sup>濃度変化 (spontaneous Ca<sup>2+</sup> transient : sCaT)。より高頻度のペーシングで Ca<sup>2+</sup> 放出の頻度が多い。(A) 特徴的なペーシング中の Ca<sup>2+</sup> 濃度の変化。一過性 Ca<sup>2+</sup>濃度変化 (spontaneous Ca<sup>2+</sup> transient : sCaT) を図中では黒矢印で示している。(B) sCaT 頻度の要約。ペーシング依存性の sCaT を CaM-GSH は抑制している。データは平均±SE で表示。20-102 細胞が3から4単離より得られた。

#### 4.4 野生型細胞およびノックイン細胞それぞれで遅延後脱分極 (DAD) と激発電位 (TA) での CaM と GSH-CaM の明確な効果の違い

活動電位振幅および静止膜電位は WT 細胞 (n=60) と KI 細胞 (n=49) で有意差は認めなかった (振幅  $116.9 \pm 0.7$  vs  $116.2 \pm 1.2$  mV, n.s. 静止膜電位  $-70.5 \pm 0.3$  vs  $-70.4 \pm 0.1$  mV, n.s.)。Fig. 4 に示すように、WT 細胞ではどのペーシング頻度においても DAD は生じなかった。一方で KI 細胞では 20% (11/55  $p < 0.05$  vs WT) に DAD が、12% (7/55) に TA が観察された。10nmol/L イソプロテレノールの投与により WT は 11% (5/45) の DAD およびたった 1 回の (2%, 1/45) TA が観察された。それに対して KI 細胞では DAD と TA はさらに増加し、それぞれ 60% (24/40,  $p < 0.05$  vs WT) と 38% (15/40,  $p < 0.05$  vs WT) で観察された。CaM-GSH (100nM) の投与により DAD (38%, 13/35) と TA (10%, 4/35) は抑制された (それぞれ  $p < 0.05$  vs ISO)。

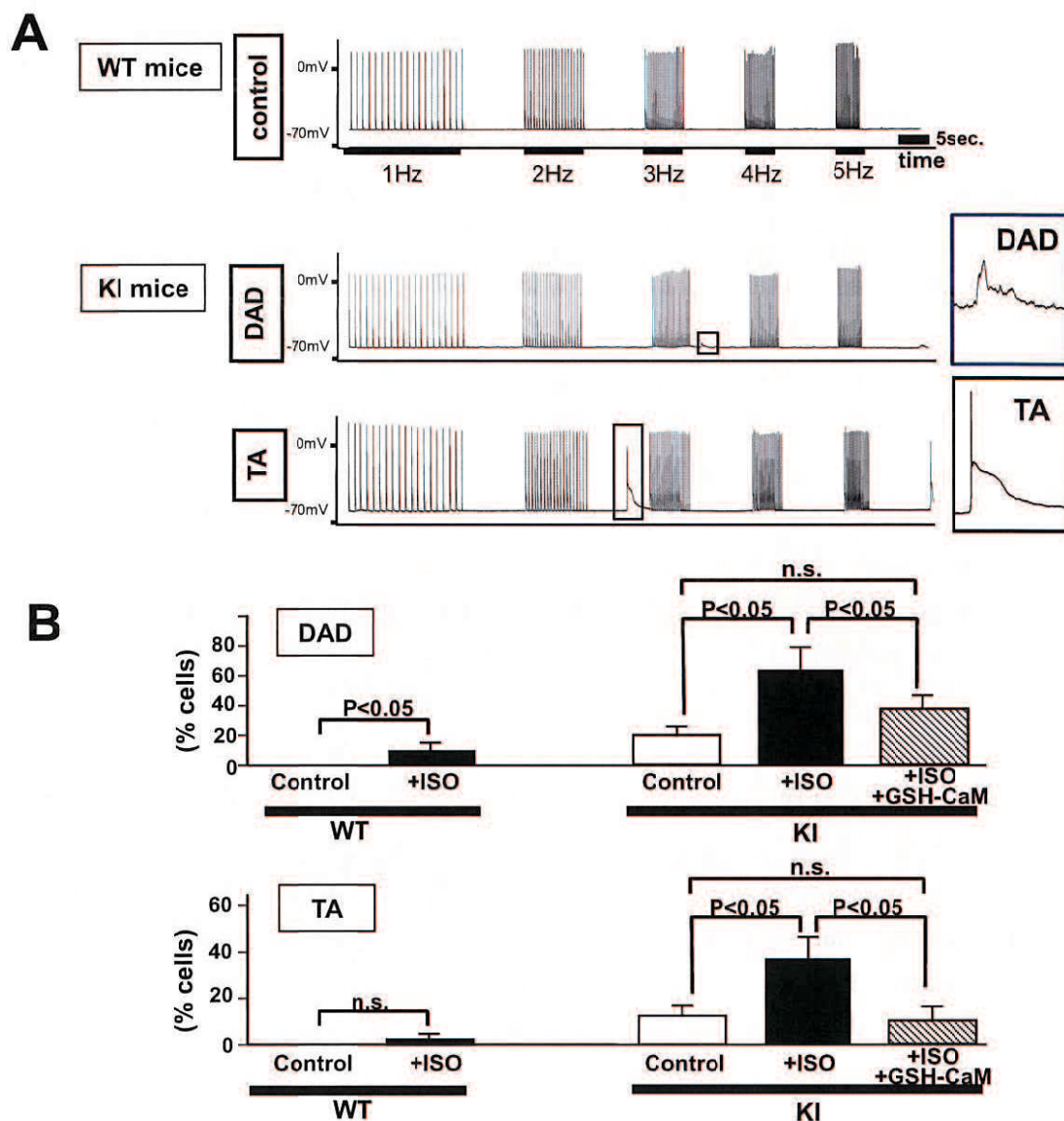


Fig. 4 WT および KI 細胞から得られた活動電位。(A) 各ペーシング頻度でのペーシング中止後に DAD および TA を観察した。DAD および TA は高頻度のペーシング後にみられた。(B) 上段に DAD および下段に TA の頻度をそれぞれ示す。データは平均  $\pm$  SE で表示。10-15 細胞が 4 から 5 単離より得られた。

## 第5章 考察および結論

カテコラミン誘発性多形性心室頻拍 (CPVT) は RyR2 での点突然変異により引き起こされる致死性不整脈を生じうる遺伝性疾患である<sup>22,23</sup>。RyR2 のアミノ酸置換によるいくつかの遺伝子改変マウスが運動やエピネフリンで VT を誘発しうることは、RyR2 での点突然変異が CPVT の明確な原因であることを示している<sup>13, 15, 24, 19</sup>。それにもかかわらず、RyR2 の約 5000 アミノ酸のなかで一つのアミノ酸の変異がなぜ、このように強烈なチャネル特性の変化を生じ致死性不整脈を誘発しうるのかは不明なままである。我々は二つの異なった KI マウスモデル (R2474S, S2246L) を用い、これらの遺伝子変異が domain switch と名付けられている N-terminal region (1-600) と central region (2000-2500) における domain unzipping を生じ、そのことにより受容体は刺激薬に対してより反応性を増し、細胞内カルシウムに対する閾値が低下することを示してきた。また、遺伝子変異によって生じた異常な domain unzipping は RyR2 全体の立体構造の変化に由来しており、RyR2 から CaM の解離を生じ、結果として致死性不整脈を生じる拡張期 Ca<sup>2+</sup>放出を起こすことを報告してきた。

本研究の主要な知見は以下の通りである。まずはじめに、cAMP により刺激された CPVT 型 RyR2 に対する CaM 親和性の低下は、TA および DAD を生じる。次いで、cAMP で処理された KI 細胞に対して RyR2 に対する CaM 結合性を増加することにより (自然体 CaM よりも RyR に対する親和性が高い CaM-GSH を使用することにより) 異常な Ca<sup>2+</sup> 放出、DAD、TA、が抑制される。上述の概念は、RyR の調整において異なったドメインが協調して全体の立体構造の変化を生じているということを含んでいる。そして、このことは CPVT に関連した遺伝子変異が domain switch の domain unzipping によって CaM 結合部位の異常な構造変化を来していることを示唆している。そのため遺伝子変異は CaM 結合性の低下をきたし、異常な Ca<sup>2+</sup> 放出や致死性不整脈を誘発していると考えられる。Gangopadhyay や Ikemoto<sup>25</sup>の報告によると、CaM 結合部位 (CaMBD) と CaM 相同部位 (CaM-like domain; CaMLD) のドメイン間の連関が Ca<sup>2+</sup> チャネルを活性化し、他方で CaMBD への CaM の結合がドメイン連関に影響しチャネルの過剰な活性化を抑制するとされている。この概念では domain switch 内の CPVT 型遺伝子変異が異常に密接にこれらの二つのドメインを関連させ、上述の立体構造の変化により異常なチャネル活性化をきたしていると考えられる。そして CaM-GSH を使用することによる CaMBD への CaM 結合性の増強は、CaMBD/CaMLD 間の病的な過剰結合を抑制する可能性がある。この視点に立つてみると、我々は CaMBD/CaMLD 連関の特異的抑制薬を用いれば、CPVT の治癒が見込める物質を予測することができるかもしれない。

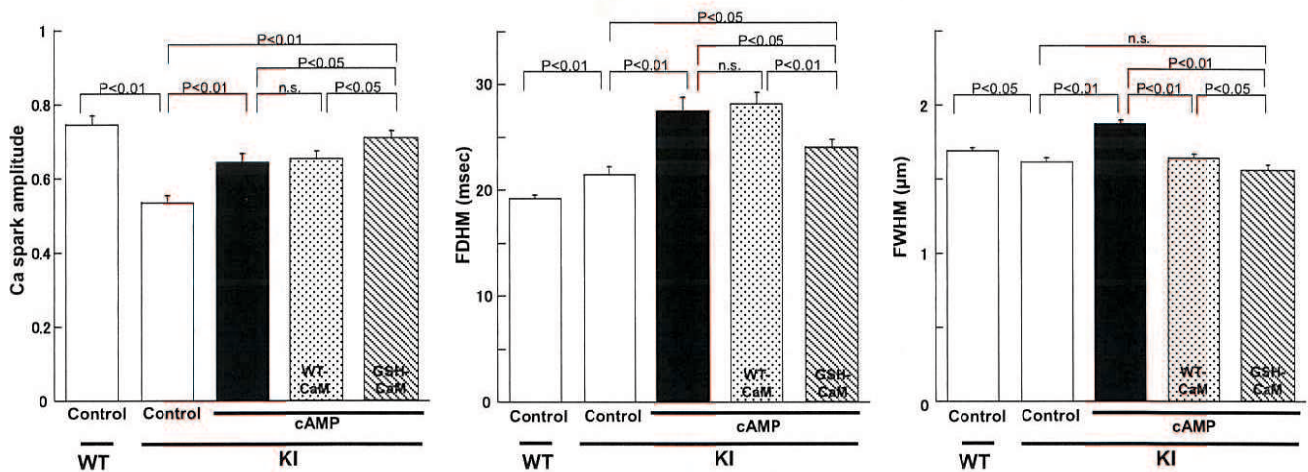
我々は以前に、ペーシング誘発性心不全において Ser2808 の PKA リン酸化<sup>26</sup>および酸化ストレス<sup>27</sup>により domain switch の domain unzipping を生じていること、およびそのことにより異常な Ca<sup>2+</sup>放出を生じ、筋小胞体内の Ca<sup>2+</sup> content 減少による心筋の収縮不全を来すことを報告した。最近、不全心筋においてみられる domain unzipping では CPVT の場合と同様に CaM の解離を生じていること、CaM の再結合により RyR2 の安定性を回復させることを発見した<sup>10, 20</sup>。これらの知見は、domain unzipping で生じる構造変化に関連した CaM の解離は、異常な Ca<sup>2+</sup> 動態で CPVT および心不全の共通の病的機序として中心的役割を果たしていることを示している。この概念は我々の以前の発見でも示唆されている。

(1) CPVT および心不全において共通して、ダントロレンは domain switch を unzip 状態から zip 状態に改善することにより異常な Ca<sup>2+</sup> 放出を抑制すること<sup>28,29</sup>、(2)ダントロレンは不全心筋において CaM

の解離を抑制することに有効であること<sup>20)</sup>、およびこれらは R2474S CPVT 型 KI 心筋においても同様である<sup>13,29)</sup>。

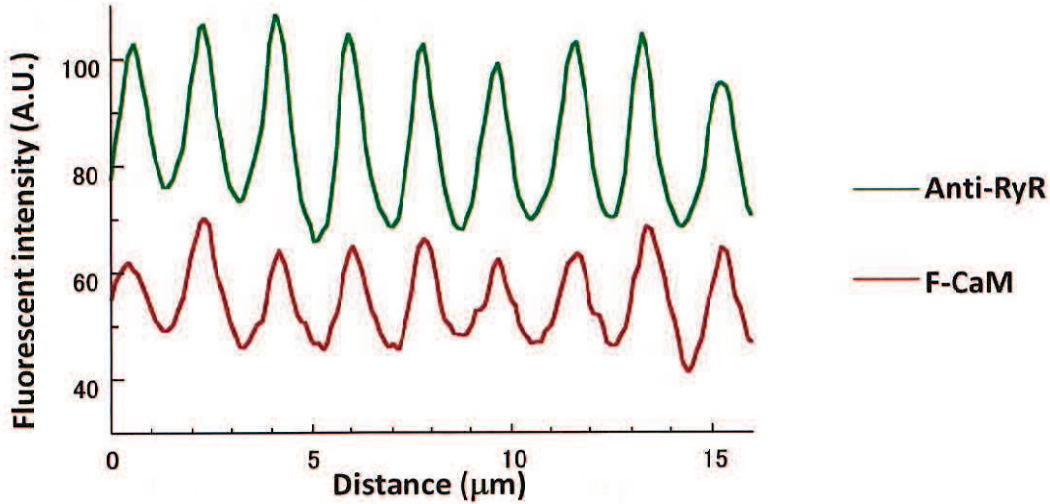
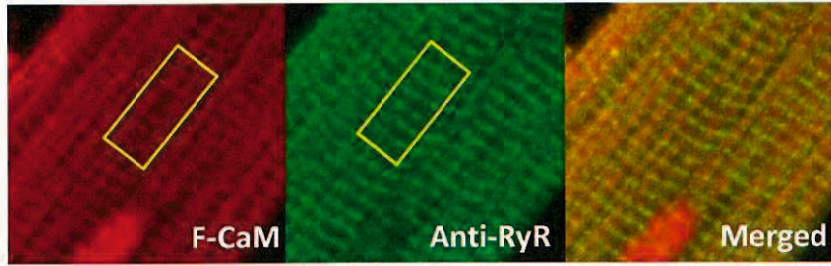
結語として、我々の結果は、CPVT 型の RyR2 における CaM 結合性の低下は PKA リン酸化により誘発されることを示唆するものである。このことは CPVT 心筋細胞において不整脈誘発性の主要な原因である。今回の結果から、自然体 CaM よりもさらに RyR に強固に結合することができる化学的に修飾された CaM を用いることで、CPVT 型遺伝子変異で生じる RyR チャンネル機能の異常は改善できる可能性があることが証明された。上記の知見に基づいて、RyR での CaM 結合部位に特異的かつより高親和性な物質が CPVT 関連の不整脈に対して治療的物質となると考えている。

### Supplementary figure



Supplementary Fig. 1.

Ca<sup>2+</sup> spark は自動スパーク解析ソフトである SparkMaster により解析した。個別のスパークパラメータ（振幅 amplitude、50%スパーク持続時間 FDHM: full duration at half maximum、50%スパーク幅 FWHM: full width at half maximum）についての要約である。KI 細胞では WT 細胞に比べ、有意に振幅の減少、FDHM の増加、FWHM の低下を認めた。KI 細胞において cAMP を加えたときの変化に対して、GSH-CaM を投与すると有意にそれぞれのパラメータをより WT 細胞に近づける変化を認めた。



Supplementary Fig. 2

HiLyte Fluor 647 (AnaSpec Inc., CA)により蛍光標識された CaM (F-CaM) を外因性に細胞内に導入した。F-CaM の導入された心筋細胞に対して抗 RyR モノクローナル抗体(C-terminal Ab4963, Sigma)、Alexa488 結合抗マウスヤギ二次抗体を用いて免疫染色した。共焦点レーザー顕微鏡 (LSM-510, Carl Zeiss)により励起 488nm・バンドパスフィルター505-530nm による緑色チャンネル (RyR 抗体)、励起 633nm・ロングパスフィルター650nm による赤色チャンネル (F-CaM) を表示すると、それぞれの蛍光は一致した部位に認められ、蛍光強度の周期的な変化も同一に観察された。

### 謝辞

本研究を行うために、多大なご指導・ご支援を頂いた山口大学大学院医学系研究科器官病態内科学 矢野雅文教授、山本健准教授、および、同講座スタッフの皆様へ心から感謝申し上げます。

## 参考文献

1. G.G. Rodney, B.Y. Williams, G.M. Strasburg, K. Beckingham, S.L. Hamilton, Regulation of RYR1 activity by  $\text{Ca}^{2+}$  and calmodulin, *Biochemistry* 39 (2000) 7807–7812.
2. N. Yamaguchi, L. Xu, D.A. Pasek, K.E. Evans, G. Meissner, Molecular basis of calmodulin binding to cardiac muscle  $\text{Ca}^{2+}$  release channel (ryanodine receptor), *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 23480–23486.
3. M. Samso', T. Wagenknecht, Apocalmodulin and  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulin bind to neighboring locations on the ryanodine receptor, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 1349–1353.
4. T. Oda, Y. Yang, F.R. Nitu, B. Svensson, X. Lu, B.R. Fruen, R.L. Cornea, D.M. Bers, In cardiomyocytes, binding of unzipping peptide activates ryanodine receptor 2 and reciprocally inhibits calmodulin binding, *Circ. Res.* 112 (2013) 487–497.
5. X. Huang, Y. Liu, R. Wang, X. Zhong, Y. Liu, A. Koop, S.R. Chen, T. Wagenknecht, Z. Liu, Two potential calmodulin-binding sequences in the ryanodine receptor contribute to a mobile, intra-subunit calmodulin-binding domain, *J. Cell Sci.* 126 (2013) 4527–4535.
6. N. Ikemoto, T. Yamamoto, Postulated role of inter-domain interaction within the ryanodine receptor in  $\text{Ca}^{2+}$  channel regulation, *Trends Cardiovasc. Med.* 10 (2000) 310–316.
7. N. Ikemoto, T. Yamamoto, Regulation of calcium release by interdomain interaction within ryanodine receptors, *Front Biosci.* 7 (2002) d671–d683.
8. T. Yamamoto, M. Yano, X. Xu, H. Uchinoumi, H. Tateishi, M. Mochizuki, T. Oda, S. Kobayashi, N. Ikemoto, M. Matsuzaki, Identification of target domains of the cardiac ryanodine receptor to correct channel disorder in failing hearts, *Circulation* 117 (2008) 762–772.
9. X. Xu, M. Yano, H. Uchinoumi, A. Hino, T. Suetomi, M. Ono, H. Tateishi, T. Oda, S. Okuda, M. Doi, S. Kobayashi, T. Yamamoto, Y. Ikeda, N. Ikemoto, M. Matsuzaki, Defective calmodulin binding to the cardiac ryanodine receptor plays a key role in CPVT-associated channel dysfunction, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 394 (2010) 660–666.
10. A. Hino, M. Yano, T. Kato, M. Fukuda, T. Suetomi, M. Ono, W. Murakami, T. Susa, S. Okuda, M. Doi, S. Kobayashi, T. Yamamoto, N. Koseki, H. Kyushiki, N. Ikemoto, M. Matsuzaki, Enhanced binding of calmodulin to the ryanodine receptor corrects contractile dysfunction in failing hearts, *Cardiovasc. Res.* 96 (2012) 433–443.

11. N. Yamaguchi, N. Takahashi, L. Xu, O. Smithies, G. Meissner, Early cardiac hypertrophy in mice with impaired calmodulin regulation of cardiac muscle Ca release channel, *J. Clin. Invest.* 117 (2007) 1344–1353.
12. L.W. Xiong, R.A. Newman, G.G. Rodney, O. Thomas, J.Z. Zhang, A. Persechini, M.A. Shea, S.L. Hamilton, Lobe-dependent regulation of ryanodine receptor type 1 by calmodulin, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 40862–40870.
13. H. Uchinoumi, M. Yano, T. Suetomi, M. Ono, X. Xu, H. Tateishi, T. Oda, S. Okuda, M. Doi, S. Kobayashi, T. Yamamoto, Y. Ikeda, T. Ohkusa, N. Ikemoto, M. Matsuzaki, Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia is caused by mutation-linked defective conformational regulation of the ryanodine receptor, *Circ. Res.* 106 (2010) 1413–1424.
14. Y.Y. Zhou, S.Q. Wang, W.Z. Zhu, A. Chruscinski, B.K. Kobilka, B. Ziman, S. Wang, E.G. Lakatta, H. Cheng, R.P. Xiao, Culture and adenoviral infection of adult mouse cardiac myocytes: methods for cellular genetic physiology, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 279 (2000) H429–H436.
15. T. Suetomi, M. Yano, H. Uchinoumi, M. Fukuda, A. Hino, M. Ono, X. Xu, H. Tateishi, S. Okuda, M. Doi, S. Kobayashi, Y. Ikeda, T. Yamamoto, N. Ikemoto, M. Matsuzaki, Mutation-linked defective interdomain interactions within ryanodine receptor cause aberrant Ca<sup>2+</sup> release leading to catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia, *Circulation* 124 (2011) 682–694.
16. H. Tateishi, M. Yano, M. Mochizuki, T. Suetomi, M. Ono, X. Xu, H. Uchinoumi, S. Okuda, T. Oda, S. Kobayashi, T. Yamamoto, Y. Ikeda, T. Ohkusa, N. Ikemoto, M. Matsuzaki, Defective domain–domain interactions within the ryanodine receptor as a critical cause of diastolic Ca<sup>2+</sup> leak in failing hearts, *Cardiovasc. Res.* 81 (2009) 536–545.
17. E. Picht, A.V. Zima, L.A. Blatter, D.M. Bers, SparkMaster: automated calciumspark analysis with ImageJ, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 293 (2007) C1073–C1081.
18. N. Liu, Y. Ruan, M. Denegri, T. Bachetti, Y. Li, B. Colombi, C. Napolitano, W.A. Coetzee, S.G. Priori, Calmodulin kinase II inhibition prevents arrhythmias in RyR2(R4496C<sup>+/-</sup>) mice with catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia, *J. Mol. Cell Cardiol.* 50 (2011) 214–222.
19. N. Liu, B. Colombi, M. Memmi, S. Zissimopoulos, N. Rizzi, S. Negri, M. Imbriani, C. Napolitano, F.A. Lai, S.G. Priori, Arrhythmogenesis in catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia: insights from a RyR2 R4496C knock-in mouse model, *Circ. Res.* 99 (2006) 292–298.

20. M. Ono, M. Yano, A. Hino, T. Suetomi, X. Xu, T. Susa, et al., Dissociation of calmodulin from cardiac ryanodine receptor causes aberrant Ca<sup>2+</sup> release in heart failure, *Cardiovasc. Res.* 87 (2010) 609–617.
21. C.P. Moore, G. Rodney, J.Z. Zhang, L. Santacruz-Toloza, G. Strasburg, S.L. Hamilton, Apocalmodulin and Ca<sup>2+</sup> calmodulin bind to the same region on the skeletal muscle Ca<sup>2+</sup> release channel, *Biochemistry* 38 (1999) 8532–8537.
22. N.L. Thomas, C. Maxwell, S. Mukherjee, A.J. Williams, Ryanodine receptor mutations in arrhythmia: the continuing mystery of channel dysfunction, *FEBS Lett.* 584 (2010) 2153–2160.
23. S.G. Priori, S.R. Chen, Inherited dysfunction of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> handling and arrhythmogenesis, *Circ. Res.* 108 (2011) 871–883.
24. P.J. Kannankeril, B.M. Mitchell, S.A. Goonasekera, M.G. Chelu, W. Zhang, S. Sood, D.L. Kearney, C.I. Danila, M. De Biasi, X.H. Wehrens, R.G. Pautler, D.M. Roden, G.E. Taffet, R.T. Dirksen, M.E. Anderson, S.L. Hamilton, Mice with the R176Q cardiac ryanodine receptor mutation exhibit catecholamine-induced ventricular tachycardia and cardiomyopathy, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103 (2006) 12179–12184.
25. J.P1 Gangopadhyay, N. Ikemoto, Interaction of the Lys(3614)-Asn(3643) calmodulin-binding domain with the Cys(4114)-Asn(4142) region of the type 1 ryanodine receptor is involved in the mechanism of Ca<sup>2+</sup>/agonist-induced channel activation, *Biochem. J.* 411 (2008) 415–423.
26. T. Oda, M. Yano, T. Yamamoto, T. Tokuhisa, S. Okuda, M. Doi, T. Ohkusa, Y. Ikeda, S. Kobayashi, N. Ikemoto, M. Matsuzaki, Defective regulation of interdomain interactions within the ryanodine receptor plays a key role in the pathogenesis of heart failure, *Circulation* 111 (2005) 3400–3410.
27. M. Yano, S. Okuda, T. Oda, T. Tokuhisa, H. Tateishi, M. Mochizuki, T. Noma, M. Doi, S. Kobayashi, T. Yamamoto, Y. Ikeda, T. Ohkusa, N. Ikemoto, M. Matsuzaki, Correction of defective interdomain interaction within ryanodine receptor by antioxidant is a new therapeutic strategy against heart failure, *Circulation* 112 (2005) 3633–3643.



28. S. Kobayashi, M. Yano, T. Suetomi, M. Ono, H. Tateishi, M. Mochizuki, X. Xu, H. Uchinoumi, S. Okuda, T. Yamamoto, N. Koseki, H. Kyushiki, N. Ikemoto, M. Matsuzaki, Dantrolene, a therapeutic agent for malignant hyperthermia, markedly improves the function of failing cardiomyocytes by stabilizing interdomain interactions within the ryanodine receptor, *J. Am. Coll. Cardiol.* 53 (2009) 1993–2005.

29. S. Kobayashi, M. Yano, H. Uchinoumi, T. Suetomi, T. Susa, M. Ono, X. Xu, H. Tateishi, T. Oda, S. Okuda, M. Doi, T. Yamamoto, M. Matsuzaki, Dantrolene, a therapeutic agent for malignant hyperthermia, inhibits catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia in a RyR2(R2474S/+) knock-in mouse model, *Circ. J.* 74 (2010) 2579–2584.