

Mutation-linked excessively tight interaction  
between the CaM-binding domain and  
c-terminal domain of the cardiac ryanodine receptor  
as a novel cause of catecholaminergic  
polymorphic ventricular tachycardia

(カテコラミン誘発性多形性心室頻拍の新規原因として、心筋型リアノジン受容体におけるカルモジュリン結合ドメインとC末端ドメイン間の連関が過剰に強固となる遺伝子変異が関連している)

氏名 西村 滋彦

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 30 年 1 月

## 目次

第1章	要旨	2
第2章	研究の背景	2
第3章	目的	3
第4章	研究方法	4
4-1	動物モデル	4
4-2	RyR2に対する内因性CaMの結合性についての免疫細胞化学的解析	4
4-3	サボニンによる膜透過処理心筋細胞における蛍光標識したCaMのRyR2への結合親和性の解析	4
4-4	Ca <sup>2+</sup> スパークと筋小胞体(SR)内のCa貯蔵解析	4
4-5	使用したペプチドとペプチド合成	5
4-6	統計解析	5
第5章	結果	6
5-1	N4103K/+KIマウスの形態的・機能的性質について	6
5-2	N4103K/+KIマウスにおける不整脈誘発	8
5-3	KI心筋細胞における電気刺激後の自発性Ca <sup>2+</sup> 放出(SCaTs)	8
5-4	サボニンによる膜透過処理心筋細胞におけるCa <sup>2+</sup> スパークと筋小胞体Ca <sup>2+</sup> 貯蔵	9
5-5	N4103K/+KI心筋細胞におけるRyR2への内因性CaMの結合性	10
5-6	KI心筋細胞におけるRyR2への蛍光標識したCaMの結合性	11
5-7	KIインタクト細胞におけるGSH-CaMの効果	13
5-8	サボニンによる膜透過処理心筋細胞におけるGSH-CaMの効果	14
5-9	CaM存在下/非存在下でのCaMBPに対するドメインペプチド(DP4089)の結合性	15
第6章	考察	16
6-1	N末端ドメイン-セントラルドメインのドメインスイッチとCaMLD-CaMBDペアの間には構造的な関連があるのか?	16
6-2	CaMLDの点突然変異はCaMLD/CaMBDペアに対してどのように影響しているのか?	17
第7章	結語	18
第8章	謝辞	18
第9章	参考文献	19

## 第1章 要旨

背景：リアノジン受容体（RyR2）は重要な遺伝子疾患であるカテコラミン誘発性多形性心室頻拍（CPVT）の原因遺伝子として知られている。ヒトのCPVT関連遺伝子変異の一部は4026-4172の領域で発見されており、この領域はEFハンドモチーフを有しており、カルモジュリン類似ドメイン（CaMLD）と呼ばれている。

目的：N4103K/+ノックイン（KI）マウスを用いて、CPVTがCaMLDの変異によって引き起こされる機序について検討する。

方法と結果：KIマウスではカフェイン+エピネフリン投与により持続性心室頻拍が高頻度に観察された。KIの単離心筋細胞ではベースラインでもRyR2へ結合する内因性CaMは減少していた。Ca<sup>2+</sup>スパーク頻度（CaSpF）は野生型（WT）細胞よりもKI細胞においてより高かった。GSH-CaM（RyR2への親和性が高いCaM）を加えると、CaSpFは有意に減少した。KIインタクト細胞ではイソプロテレノールに反応して自発性Ca<sup>2+</sup>放出（SCaT）が高頻度に観察された。タンパク導入キットを用いてGSH-CaMをKIインタクト細胞内へ導入すると、SCaTは有意に減少した。水晶発振子マイクロバランス測定法を用いた分析は、遺伝子変異させたCaMLDペプチドがCaM結合ドメイン（CaMBD）ペプチドに対して高い結合親和性を示すことを明らかにした。

結語：N4103K点突然変異においては、RyR2へのCaM結合親和性はβアドレナリン刺激の有無に関わらず有意に低下していた。この理由として、CaMBDと変異したCaMLDの間には異常に強い連関が存在するためであることを我々は発見した。このようにCaMBD-CaMLD連関は致死的不整脈における新たな治療標的となりうる。

## 第2章 研究の背景

これまでにカテコラミン誘発性多形性心室頻拍（CPVT）において150以上のRyR2点突然変異が報告されている[1, 2]。RyR2点突然変異は3つの限られた領域、すなわちN末端ドメイン（a.a. 1-600）、セントラルドメイン（a.a. 2000-2500）、C末端チャネル形成領域（a.a. 4100-5000）に集中している[1, 2]。これらの領域はRyR1とRyR2の両方で共通しており、リアノジン受容体におけるチャネル機能の制御に重要な役割を果たしていると考えられる[3, 4]。我々はIkemotoらとの先行研究で、N末端ドメインとセントラルドメインの接触が強固であると、Ca<sup>2+</sup>チャネルが閉じて安定化するが、ドメイン連関障害が生じるとCa<sup>2+</sup>チャネルが開放して不安定になることを示した（ドメインスイッチ仮説[3]）。

我々はさらに、いくつかの心不全モデル[5-7]や CPVT モデル[8]では、安静状態でもドメインスイッチの連関障害が生じることを示した。また、ドメイン連関障害によって RyR2 からカルモジュリン(CaM)が解離することが、Ca<sup>2+</sup>漏出の原因であること明らかにした[9, 10]。機能異常を来した RyR2 への CaM 親和性の低下は、酸化ストレスモデル[11]や圧負荷心肥大モデル[12]による研究で確認されている。これらの知見は、ドメインスイッチの連関障害は CaM が結合している領域で行われるイベントと関連していることを示唆している。

CaM が RyR2 上の CaM 結合ドメイン (CaMBD: a.a. 3581-3610) に結合すると、チャンネル内の調節因子として働く[13, 14]。心筋障害の発症において、RyR2 に結合する CaM が重要な役割を果たしていることも Meissner らによる最近の報告で示されている[15]。彼らは、RyR2 が CaM と結合できないようにしたノックインマウスモデルを作成し、その遺伝子改変マウスが重度の収縮不全を伴う肥大型心筋症を発症し、若齢で死亡することを発見した[15]。CaM 類似ドメイン (CaMLD) は RyR1 の 4064-4210 の領域として Hamilton らが初めて指定した[16]。CaMLD は Ca<sup>2+</sup>と結合可能な2つの EF ハンドモチーフを有しており、Ca<sup>2+</sup>濃度依存性に CaMBD と相互作用する[16]。

Ikemoto らは引き続き、CaMBD-CaMLD 連関の形成が RyR を活性化し、CaM が CaMBD-CaMLD 連関の楔としての役割を果たしているというモデルを提唱した[17]。彼らはさらに、抗 CaMBD 抗体を用いて CaMBD-CaMLD 連関を阻害することで、エンドセリン-1 が引き起こす心筋細胞の肥大が抑制されることを示した[18]。Huang らは同じサブユニット内にある CaMBD の Arg3595 と CaMLD の Lys4269 が相互的な距離にあることを低温電子顕微鏡法および蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) を用いて示しており[19]、この考えをさらに支持している。

RyR2 に 150 以上の CPVT 点突然変異が報告されている中で、我々はその一部が CaMLD 領域に局在していることに注目した。そこで、CaMLD の点突然変異は CaMBD-CaMLD 連関を強固にし、その結果として RyR2 に対する CaM の結合親和性が低下するという仮説を立てた。本研究の目的は、第一に CaMLD に単一アミノ酸点突然変異 (N4103K) が導入されたノックイン (KI) マウスが CPVT モデルとしての役割を果たしうるかを検証すること、そしてこの CaMLD 点突然変異の導入後、CaMBD-CaMLD 間に通常より強固な結合が形成されるのかを確認することである。

### 第3章 目的

CaMLD に点突然変異が導入された N4103K/+ KI マウスが、CPVT モデルとしての役割を果たしうるかを検証する。また、CaMLD 点突然変異により CaMBD-CaMLD 間に通常より強固な連関が形成されうるかも検証する。

## 第4章 研究方法

### 4-1 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) を遵守して実施した。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を遵守して行った。

本研究では CaMLD の単一点突然変異 (N4103K) である N4103K/+ KI マウスを使用した。

### 4-2 RyR2 に対する内因性 CaM の結合性についての免疫細胞化学的解析

1%ウシ血清アルブミンと 0.5%トリトン X-100 とともに anti-CAM 抗体 (abCaM 社、EP799Y) および anti-RyR 抗体 (Sigma-Aldrich 社、C3-33) を用いて反応させてから、Alexa で標識された二次抗体 (Alexa488-conjugated goat anti-rabbit、Alexa633-conjugated goat anti-mouse) に反応させた心筋細胞をもちいて免疫細胞化学的解析を行った。

### 4-3 サポニンによる膜透過処理心筋細胞における蛍光標識した CaM の RyR2 への結合親和性の解析

心筋細胞膜は 30 秒間、サポニン (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 溶液に浸すことで膜透過処理を行った。その後、細胞内溶液 (0.5 mmol/L EGTA, 10 mmol/L HEPES, 120 mmol/L K-aspartate, 5 mmol/L ATP, 1 mmol/L free  $[\text{Mg}^{2+}]$ , 10 mmol/L reduced glutathione, 30 nmol/L free  $[\text{Ca}^{2+}]$ ) に置き換え、同じ条件下で HiLyte Fluor 647 を用いて蛍光標識した CaM (HiLyte-CaM) をサポニンで膜透過処理を行った心筋細胞へ導入した。

### 4-4 $\text{Ca}^{2+}$ スパークと筋小胞体 (SR) 内の Ca 貯蔵解析

サポニンによる膜透過処理した心筋細胞を使用した  $\text{Ca}^{2+}$ スパークは、レーザー共焦点顕微鏡 (LSM-510, Carl Zeiss) を用いて測定した[8]。膜透過処理を行った後、心筋細胞を 0.02 mM Fluo-4 を含んだ細胞内溶液に置き換えた。データは高速で信頼性の高い、自動スパーク解析ソフトである SparkMaster を用いて解析した[20]。

#### 4-5 使用したペプチドとペプチド合成

我々は今回の実験で以下のドメインペプチドを使用した。

CaMBP: <sup>3582</sup>SKKAVWHKLLSKQRKRAVVACFRMAPLYNL<sup>3610</sup>

DP4089: <sup>4089</sup>PAKDIGFNVAVLLTNLSEHMDTRLQTFLELAE<sup>4120</sup>

DP4089mut (N4104K): <sup>4089</sup>PAKDIGFNVAVLLTKLSEHMDTRLQTFLELAE<sup>4120</sup>

#### 4-6 統計解析

2群間の差の検定には対応のある/ない t 検定を行った。濃度依存性データの群間比較には post-hoc Scheffe 検定を併用した一元配置分散分析で行った。イベント発生率では  $\chi^2$  乗検定によるクロス集計を行った。

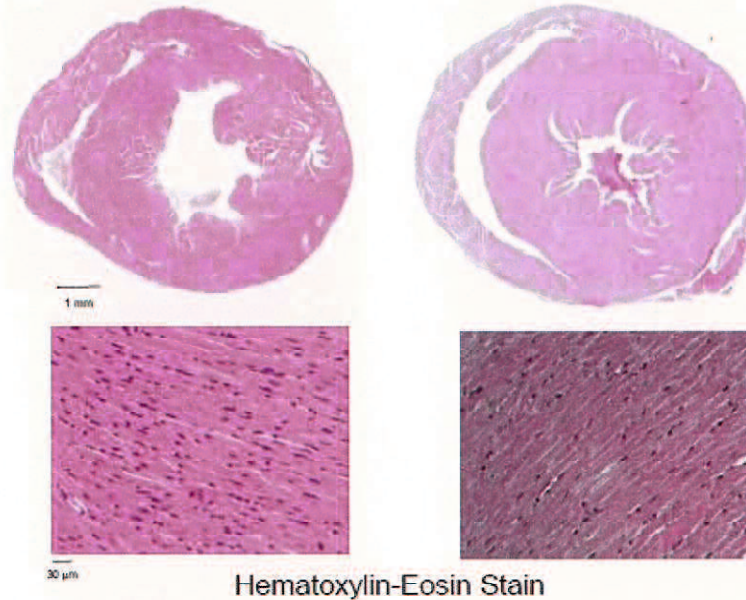
## 第5章 結果

### 5-1 N4103K/+ KI マウスの形態的・機能的性質について

基礎状態において、野生型 (WT) と KI マウスの心臓の間に特記すべき形態上・機能上の違いは認めなかった。組織断面においては WT と KI マウスの間に明らかな差を認めなかった (supplemental figure 1)。心臓超音波検査 (supplemental figure 2) と安静時心電図 (supplemental figure 3) においては WT と KI マウスの間に機能的な差を認めなかった。

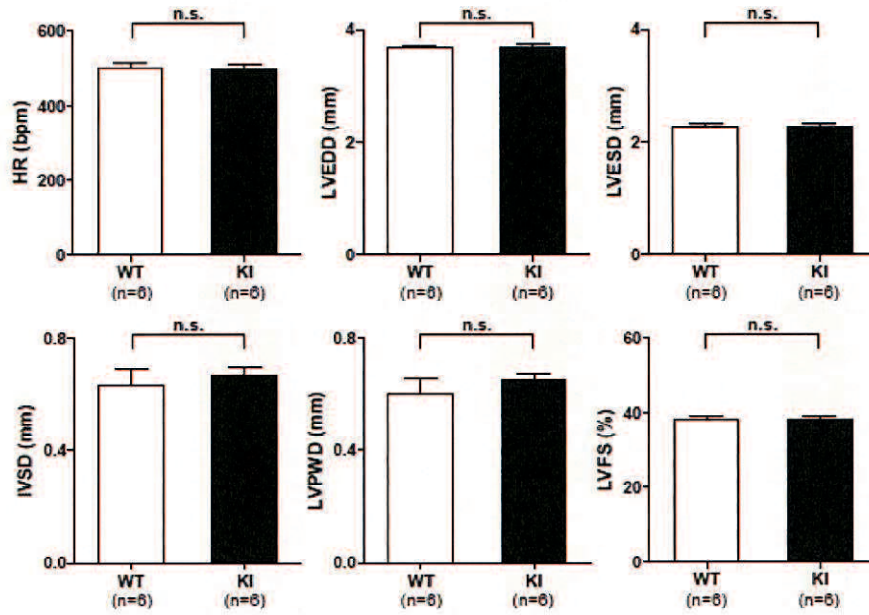
Wild-type (RyR2<sup>+/+</sup>)

Knock-in (RyR2<sup>N4103K/+</sup>)



supplemental figure 1

functional characterization



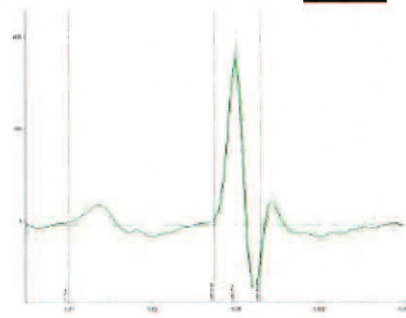
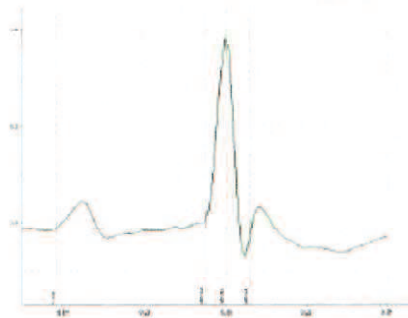
supplemental figure 2

WT (RyR2<sup>+/+</sup>)

KI (RyR2<sup>N4103K/+</sup>)

20 ms

20 ms



ECG characteristics

	n	HR (bpm)	QT (ms)	QTc (ms)
WT (RyR2 <sup>+/+</sup> )	5	601±30	24±8	75±25
KI (RyR2 <sup>N4103K/+</sup> )	5	598±43	23±6	71±18
P value (WT vs KI)		NS	NS	NS

supplemental figure 3



## 5-2 N4103K/+ KI マウスにおける不整脈誘発

これまでに多くの CPVT KI マウスにおいて、アドレナリン作動薬とカフェインを混合した注射を用いて不整脈が誘発された[8, 21]。この方法（体重あたり 1mg/kg のエピネフリンと 120mg/kg のカフェインを腹腔内投与）を鎮静状態のマウスに施行し、心電図を記録したところ、N4103K/+ KI マウス (n=7) においては二段脈と持続性 VT の出現を認めたものの、WT マウス (n=5) では認めなかった。本結果より、N4103K/+ KI が臨床的にこの CPVT 点突然変異を持った患者の不整脈原因と考えても矛盾はない。

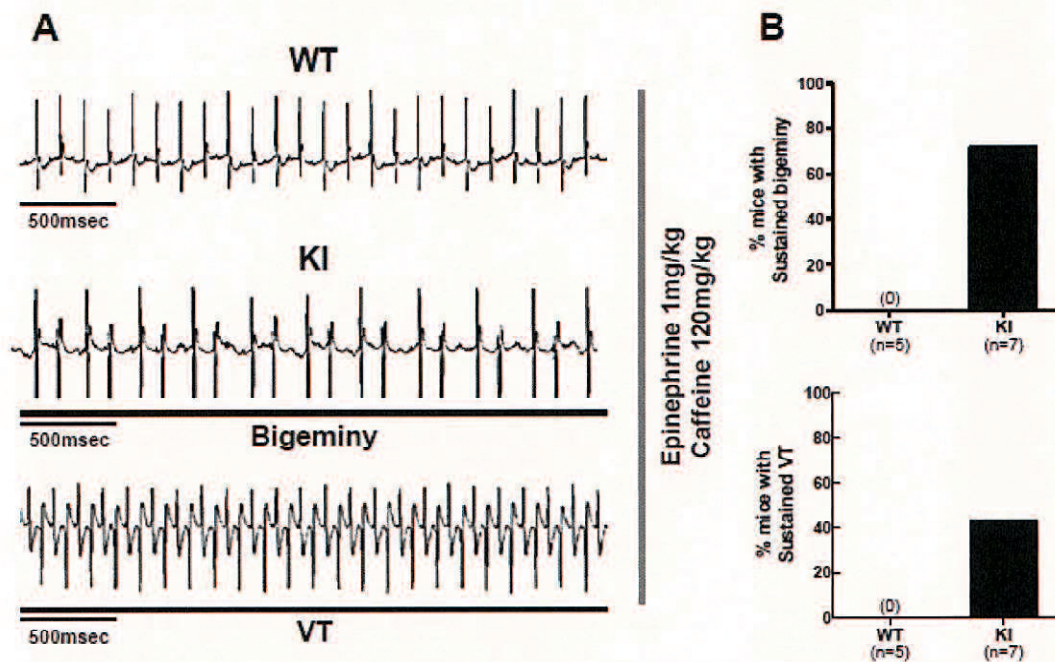


図 1 A: WT と N4103K/+ KI マウスの代表的な心電図記録。B: KI マウスでは、体重あたり 1mg/kg のエピネフリンと 120mg/kg のカフェインの腹腔内投与で、持続性二段脈と持続性心室頻拍 (VT) が高頻度で誘発された (n=7)。WT マウスではエピネフリンとカフェインを投与しても VT は出現しなかった (n=5)。

## 5-3 KI 心筋細胞における電気刺激後の自発性 Ca<sup>2+</sup>放出 (SCaTs)

SCaTs はイソプロテレノール存在下/非存在下で 1,2,3,4,5 Hz の電気刺激を行った後に誘発される。WT 心筋細胞においては、イソプロテレノール (10nM) の有無に関わらず、SCaTs はほとんど認められない (図 2)。イソプロテレノールの非存在下では N4103K/+ KI 心筋細胞は 4Hz 以上の pacing rate では SCaTs の出現を認めるが、イソプロテレノール存在下では 1Hz からでも SCaTs が著明に増加した (図 2)。本結果は、この CPVT 点突然変異における不整脈特性と矛盾しない。

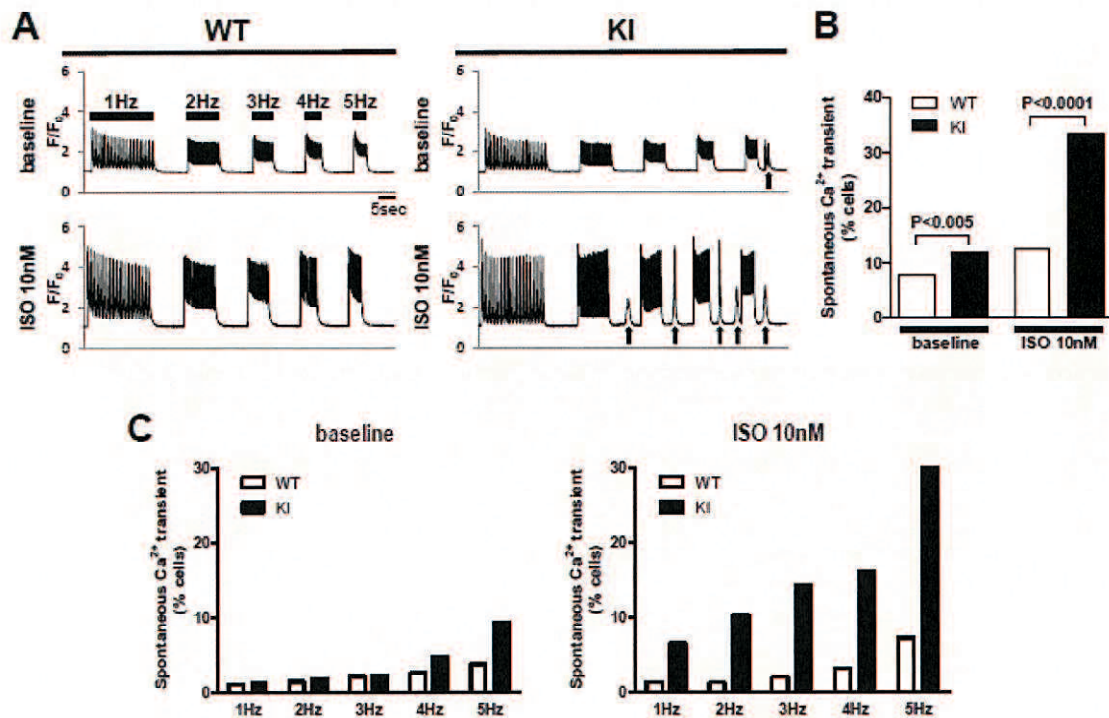


図2 SCaTsはイソプロテレノール(ISO)存在下/非存在下で1,2,3,4,5 Hzの電気刺激を行った後に誘発された。ISO(10nM)存在下では、WT心筋細胞と比べてKI心筋細胞ではSCaTsの出現率が有意に増加した。A: 単離心筋細胞の代表的なCa<sup>2+</sup>放出の図を示す。矢印がSCaTを示している。B,C: SCaT出現率(%)のデータを示す(3-4 heartsから得られた141-463細胞より算出)。

#### 5-4 サポニンによる膜透過処理心筋細胞におけるCa<sup>2+</sup>スパークと筋小胞体Ca<sup>2+</sup>貯蔵

自発性Ca<sup>2+</sup>放出が異常なCa<sup>2+</sup>漏出に関連しているかを調べるため、我々はサポニンによる膜透過処理心筋細胞を用いてCa<sup>2+</sup>スパーク頻度(CaSpF)を測定した(図3)。基礎状態ではWTに比べてN4103K/+KIでCaSpFが有意に増加していた(5.4±0.6 vs 12.5±0.8, p<0.0001)。cAMP(1 μM)存在下ではさらにCaSpFが増加した(10.3±0.5 vs 21.5±0.7)。図3Cに示すように、筋小胞体内のCa<sup>2+</sup>貯蔵はN4103K/+KI心筋細胞で有意に減少していた。本結果より、RyR2からの異常なCa<sup>2+</sup>漏出が、KI心筋細胞における自発性Ca<sup>2+</sup>放出の原因であることが示唆された。

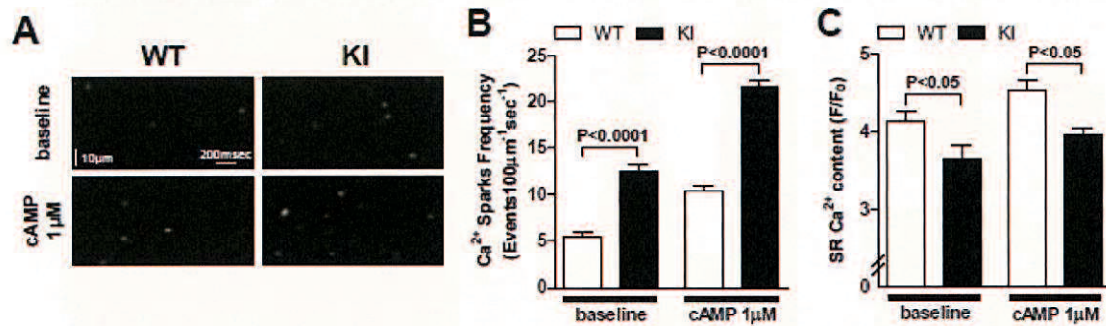


図3 Ca<sup>2+</sup>スパークはサボニンによる膜透過処理心筋細胞を用いて cAMP の存在下/非存在下で観察を行った。cAMP (1 μM) 存在下では、WT 心筋細胞に比較して KI 心筋細胞で有意に CaSpF が増加した。KI 心筋細胞の筋小胞体 Ca<sup>2+</sup>貯蔵は WT 心筋細胞に比べて僅かに減少していた。A: WT と KI 心筋細胞の代表的なラインスキャン図を示す。B: Ca<sup>2+</sup>スパーク頻度 (CaSpF) の結果を示す。C: 筋小胞体 Ca<sup>2+</sup>貯蔵の結果を示す。データは 3-5 hearts から得られた 10-28 細胞から算出し平均値±SE で示した。

#### 5-5 N4103K/+ KI 心筋細胞における RyR2 への内因性 CaM の結合性

免疫蛍光抗体法を用いて RyR2 に結合した内因性 CaM を測定した (図 4)。WT と比較すると、N4103K/+ KI 心筋細胞では RyR2 へ結合する内因性 CaM が有意に減少していた。イソプロテレノール (10 nM) を加えても、RyR2 への CaM 結合に影響しなかった。KI 心筋細胞では、RyR2 へ結合する CaM の減少が、RyR2 から Ca<sup>2+</sup>漏出しやすくなる原因と考えられた。

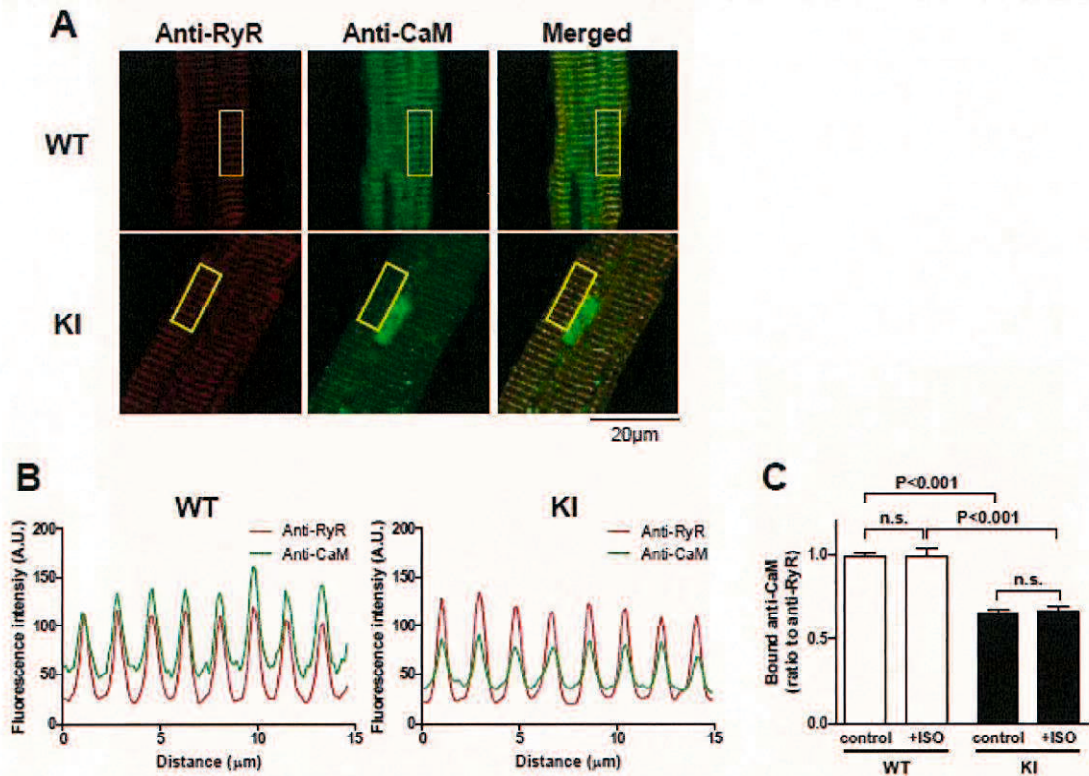


図4 免疫蛍光抗体法を用いて心筋細胞内の RyR2 に結合した内因性 CaM を検出した。RyR2 に結合した内因性 CaM は周期的に増高する蛍光強度として測定される。RyR2 に結合した内因性 CaM は KI 心筋細胞で有意に減少しており、イソプロテレノールは RyR2 に対する CaM の結合率に影響しなかった。A: 代表的な心筋細胞の免疫染色画像を示す。内因性 CaM、RyR2 は各々 anti-CaM 抗体、anti-RyR2 抗体を用いて検出した。上段に WT を、下段に KI を示す。左に RyR2 (赤) を、中央に内因性 CaM (緑) を、右に Merge 像を示す。B: 代表的な蛍光強度の断面曲線 (RyR2: 赤、CaM: 緑) を示す。C: CaM の蛍光強度を RyR2 で除したものを示す。データは 2-3 hearts から得られた 14-24 細胞から算出し平均値  $\pm$  SE で示した。

#### 5-6 KI 心筋細胞における RyR2 への蛍光標識した CaM の結合性

RyR2 に対する蛍光標識した CaM (HiLyte-CaM) の結合親和性について、サポニンによる膜透過処理心筋細胞を用いて実験を行った。心筋細胞へ外因性に HiLyte-CaM を導入してから RyR2 の免疫染色を行い蛍光標識すると、サルコメアに一致するような周期的パターンを認めた。重要なのは、CaM と RyR2 の染色パターンが相互に見事な一致を示したことである。WT と比較して、N4103K/+ KI 心筋細胞では RyR2 への HiLyte-CaM の結合親和性が有意に低下していた (図 5A, 5B)。RyR2 への HiLyte-CaM の結合親和性は cAMP (1  $\mu$ M) を加えても変化しなかった。これは、基礎状態であっても強固な CaMBD-CaMLD 連関が RyR2 への CaM 結合を妨げていることを示唆している。しかしながら、N4103K/+ KI-RyR2 へ濃度依存性に結合する GSH-CaM (図 5C, D) は、WT-RyR2 へ結合する WT-CaM と同じような結

合性を示している。

図4や図5で示されたこれらの知見は、導入部で述べた CaMBD-CaMLD 間の活性化連関モデルをうまく説明しうる。すなわち、CaMBD-CaMLD 連関がこの点突然変異によって異常に強固となると、CaM の結合親和性は明らかに低下するのである。

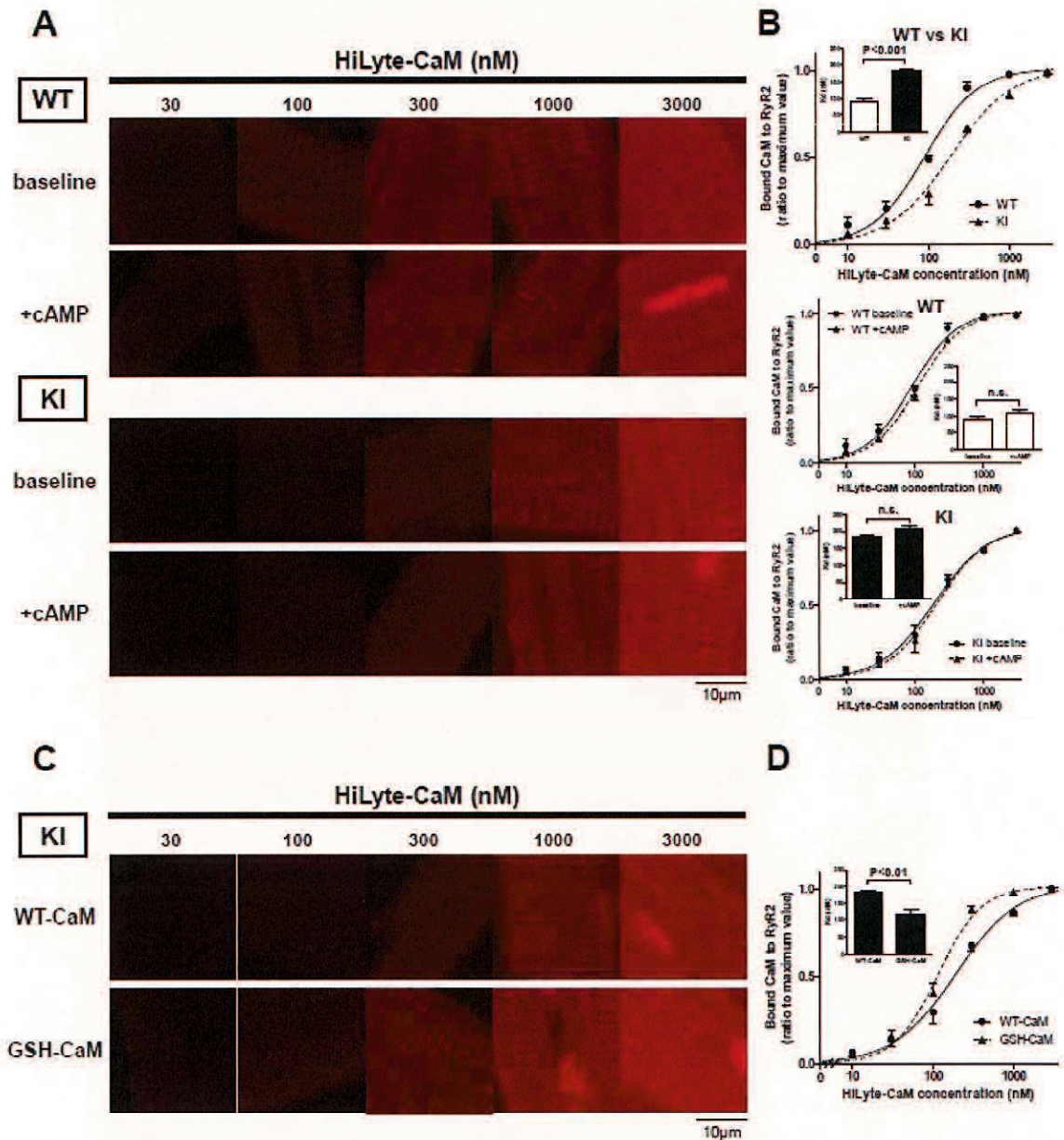


図5 HiLyte で蛍光標識した CaM (HiLyte-CaM) をサポニンによる膜透過処理心筋細胞へ導入した。RyR2 に結合した HiLyte-CaM は周期的な増高する蛍光強度として測定される。KI 心筋細胞では WT より CaM の結合親和性が低下していた。WT・KI ともに cAMP は結合親和性へ影響しなかった。

A: WT・KI 心筋細胞へ HiLyte-CaM を導入した代表的な画像を示す。それぞれ cAMP 存在下/非存在下で観察している。

B: 結合親和性曲線を示す。HiLyte-CaM の蛍光強度を測定し、その最大値で除したデータから Hill の式を用いて結合親

和性曲線を作成した。3-4 hearts から得られた 11-24 細胞より結合親和性曲線を作成し、平均値±SD で示した。Kd 値の比較は棒グラフで示した。基礎状態において KI 心筋細胞の Kd 値は WT よりも有意に高かった。cAMP を使用しても WT・KI とともに Kd 値への影響はなかった。C: KI 心筋細胞に対して HiLyte-CaM と HiLyte-GSH-CaM を導入した代表的な画像を示す。D: 3-4 hearts から得られた 11-35 細胞より結合親和性曲線を作成し、平均値±SD で示した。

### 5-7 KI インタクト細胞における GSH-CaM の効果

図 6 に示すように、KI 心筋細胞の自発性  $Ca^{2+}$  放出は GSH-CaM を導入することで抑制されるが、WT-CaM では抑制されない。一方で domain zipper であるダントロレンは有効な抗不整脈作用を示さなかった。本結果より、GSH-CaM を用いて CaM の結合性を還元することで、強固な CaMBD-CaMLD 連関は是正されるが、ダントロレンによるドメイン安定作用では是正できないことが示唆された。

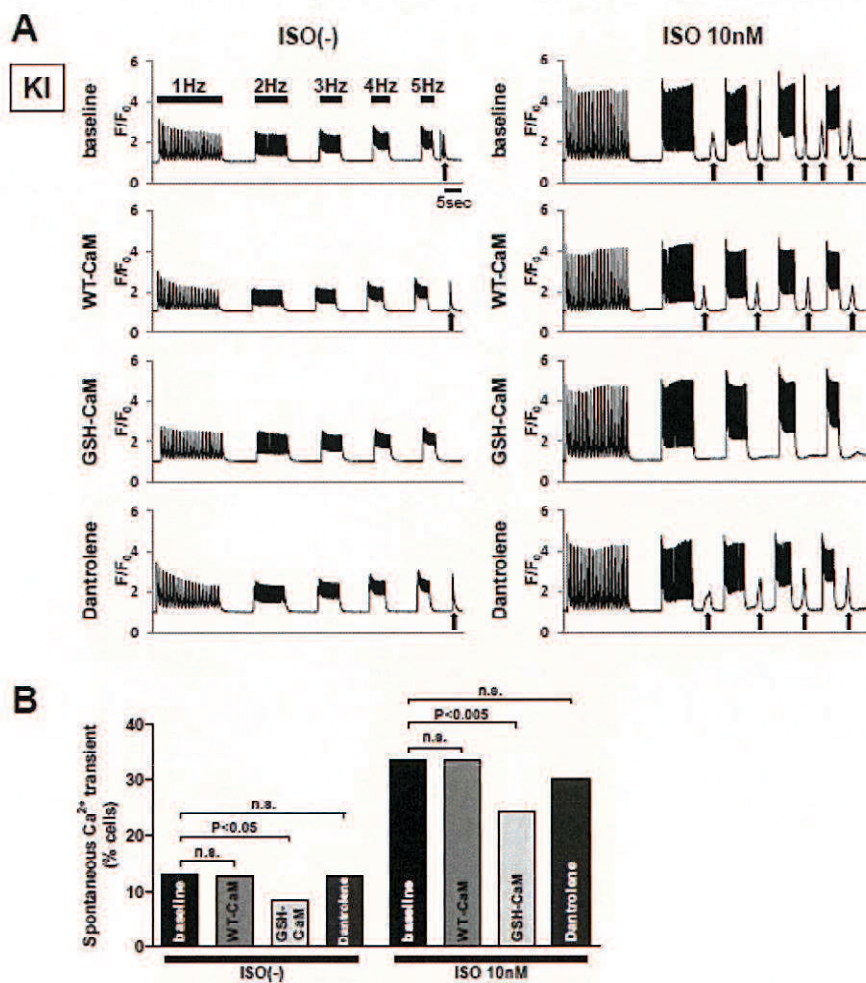


図 6 KI 心筋細胞において WT-CaM、GSH-CaM、ダントロレンが SCaT へ与える効果についてイソプロテレノール存在下/非存在下で検証した。GSH-CaM を加えると、SCaT の出現率は有意に低下したが、WT-CaM やダントロレンは効果が

なかった。

A: 代表的な電気刺激下での細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  放出の図を示す。WT-CaM と GSH-CaM はタンパク導入キットである BioPORTER®を用いて導入した。矢印が SCaT を示す。GSH-CaM は SCaT を抑制したが、WT-CaM とダントロレンは抑制しなかった。B: SCaT 出現率 (%) のデータを示す (3-4 hearts から得られた 71-463 細胞より算出)。

### 5-8 サボニンによる膜透過処理心筋細胞における GSH-CaM の効果

図 7 に示すように、N4103K/+ KI 心筋細胞に GSH-CaM を加えると、CaSpF は減少したが、WT-CaM では CaSpF は増加したままであった。GSH-CaM を加えた後に筋小胞体  $\text{Ca}^{2+}$  貯蔵は有意に増加した。ここでも domain zipper であるダントロレンは有効でなかった。本結果からも、強固な CaMBD-CaMLD 連関はダントロレンでは是正されないことが示唆された。

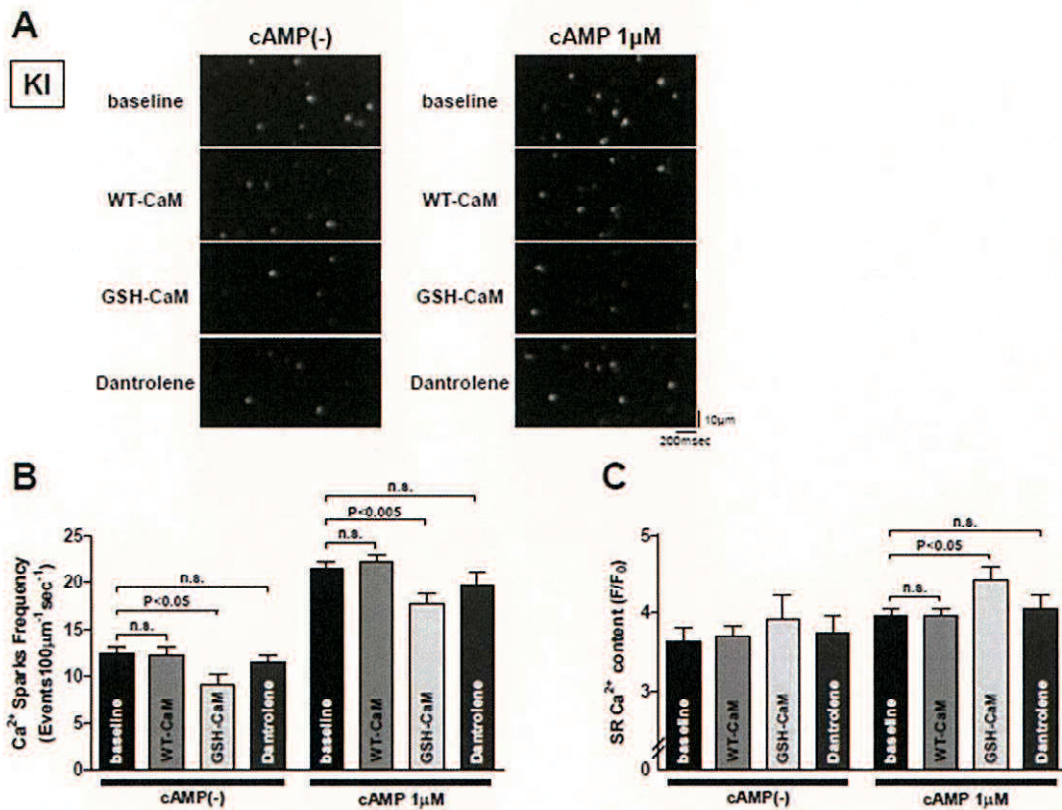


図 7 GSH-CaM は cAMP (1 μM) の存在下/非存在下で CaSpF を抑制したが、WT-CaM とダントロレン (1 μM) は抑制しなかった。KI 心筋細胞において減少した  $\text{Ca}^{2+}$  貯蔵を GSH-CaM のみが増加させた。A: KI 心筋細胞の代表的なラインスキャン図 (baseline, WT-CaM, GSH-CaM, ダントロレン) を示す。B:  $\text{Ca}^{2+}$  スパーク頻度 (CaSpF) の結果を示す。データは 3-5 hearts から得られた 8-28 細胞から算出し平均値 ± SE で示した。C: 筋小胞体  $\text{Ca}^{2+}$  貯蔵の結果を示す。データは 3-5 hearts から得られた 3-8 細胞から算出し平均値 ± SE で示した。

### 5-9 CaM 存在下/非存在下での CaMBP に対するドメインペプチド (DP4089) の結合性

水晶発振子マイクロバランス測定法 (QCM) は、水晶振動子における共振周波数の変化を測定することで、分子間の結合と解離を無標識かつリアルタイムに測定できる装置である。CaM が CaMBP へ結合する性質を利用することで、CaMLD 内の単一アミノ酸点突然変異 (N4103K) が与える影響について QCM を用いて評価した (図 8A)。このために、まずは CaM 結合ペプチド (CaMBP) を金電極上に固定させ、図 8B のように CaM を加えると、濃度依存性に電極の周波数が減少した。これは CaM の CaMBP への特異的な結合を示している。CaM を加えた後で EGTA を加えると、電極の周波数は元のレベルに戻った。図 8B が示すように、DP4089 (3  $\mu\text{M}$ ) と DP4089mut (3  $\mu\text{M}$ ) は両方とも同じように CaMBP へ結合した。CaM (300 nM) を加えてから DP4089 (3  $\mu\text{M}$ ) を加えても、電極の周波数にほとんど変化はなかったが、DP4089mut (3  $\mu\text{M}$ ) を加えると、電極の周波数が有意に増加した。EGTA (5 mM) は電極の周波数を完全には元のレベルに戻さなかったが、これは CaMBP への結合において、DP4089mut が CaM (300 nM) と競合したことを示唆している。

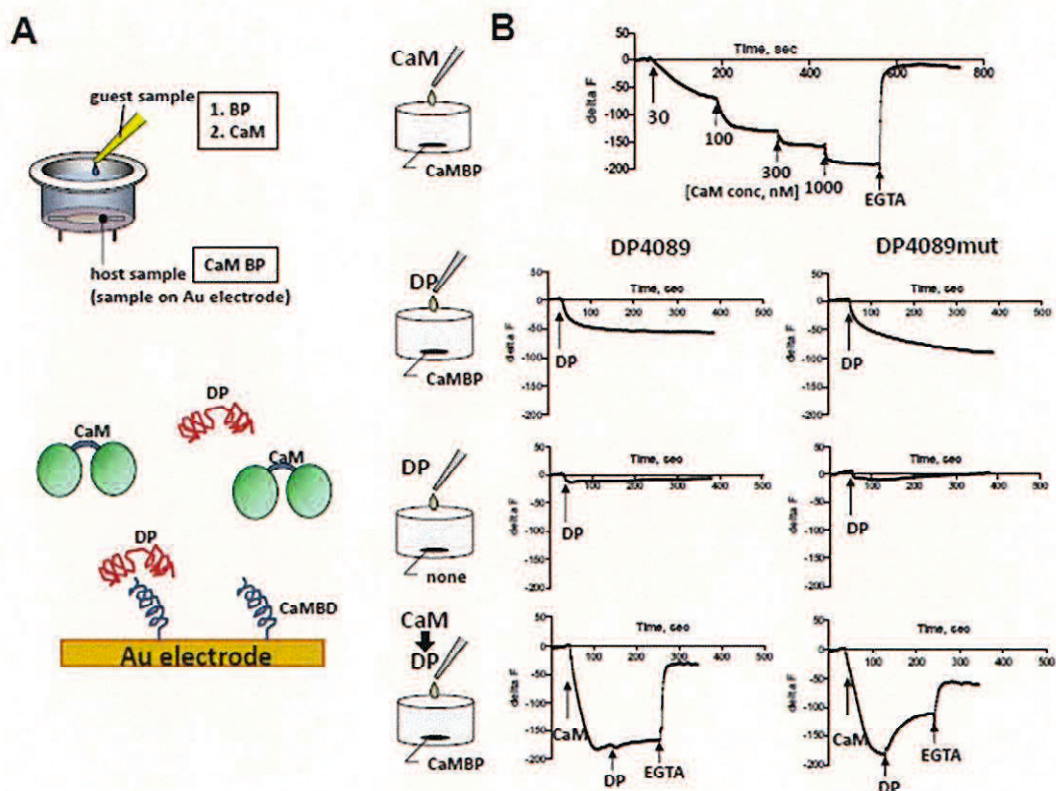


図8 A: 方法で記載されているようにCaMBPはセンサーチップの表面上で固定化した。CaM、DP4089、DP4089mutのCaMBPへの結合性を観察した。B: 興味深いことに、DP4089mut (3  $\mu\text{M}$ ) はCaMBPからCaMを解離させたが、DP4089 (3  $\mu\text{M}$ ) は影響しなかった。さらにDP4089mutの場合、EGTAを加えてもQCM周波数は元のレベルに戻らなかった。これはDP4089mutがCaMBPと結合することでCaMを解離させたことを示唆している。図はCaMBPに対するCaM・DP4089・



DP4089mut結合の経時的变化を表したものである。この実験は150 mM NaCl, 20mM MOPS (pH 7.2), 10  $\mu$ M CaCl<sub>2</sub>を含んだ溶液で実施した。それぞれCaMBPへの結合を観察した後に、最終的にEGTA (3 mM) を加え、CaMBPからCa-CaMの解離を観察した。

## 第6章 考察

CPVT患者でみられるCaMLD内の単一アミノ酸点突然変異(N4103K)は、CaMLD-CaMBD間の異常に強固な連関の原因となり、CaMBDへのCaMの結合親和性が低下し、その結果としてCa<sup>2+</sup>漏出が生じ、致死性不整脈を引き起こすことが今回の研究で主に明らかになった。さらに、GSH-CaMでRyRに対するCaMの結合性を高めることで、前述のチャンネル開閉障害を抑制した。もう一つ興味深いことに、このモデルにおいて、ダントロレンは有効な抗不整脈作用を有さないことも分かった。

この章では2つの重要な疑問：1) RyR2チャンネルのon-off制御を担っている2組のドメインペア(すなわち、N末端ドメインとセントラルドメインのペア(いわゆるドメインスイッチ)とCaMLD/CaMBDのペア)は構造的に関連があるのか？ 2) CaMLDにおける4089点突然変異はCaMLD/CaMBDペアにどのように影響しているのか？ について焦点を当てる。

### 6-1 N末端ドメイン-セントラルドメインのドメインスイッチとCaMLD-CaMBDペアの間には構造的な関連があるのか？

カテコラミン誘発性多形性心室頻拍(CPVT)はRyR2の単一点突然変異による遺伝性の致死的な不整脈である[22, 23]。R2474SやS2246Lといった異なる2タイプのKIマウスモデルを用いて、我々はこれらの突然変異がN末端領域：1-600とセントラル領域：2000-2500の間のドメイン連関障害(すなわち、ドメインスイッチにおけるドメイン連関障害)を引き起こし、結果としてアゴニストに対するチャンネルの感受性が高まり、Ca<sup>2+</sup>の活性化閾値が低下することを報告した[8, 24]。イヌ心不全モデルを用いた我々の先行研究では、ドメインスイッチの連関障害はRyR2に対するCaM結合親和性の著明な低下が原因であることを明らかにした[9]。最近では、ドメインスイッチの連関障害によりCaMBDに対するCaMの結合が減少し、それに伴いCaMLD-CaMBD連関が増強されることが明らかになっている[10]。すなわち、ドメインスイッチの連関障害とCaMLD-CaMBDペアの連関増強における協調作用はRyR2を活性化し、この協調作用が過度となると、RyR2の異常活性化を引き起こすものと考えられる。前述の考察の裏付けとして、我々はこれまでに、悪性高熱に対する特效薬であるダントロレンがRyR1[25]とRyR2[26]のN末端ドメインに結合して、ドメインスイッチの連関障害を改善することで、RyR2に対するWT-CaMの結合性を正常レベルまで戻し、

心不全[9, 10]や CPVT モデル[27]における RyR2 機能を正常化することを報告している。

## 6-2 CaMLD の点突然変異は CaMLD/CaMBD ペアに対してどのように影響しているのか？

これまでの我々の研究において R2474S KI マウスモデルでは、 $\beta$  刺激を行うことで初めて RyR2 に対する CaM の結合親和性が明らかに低下した[27, 28]。しかしながら、N4103K/+ KI マウスモデルのように CaMLD に点突然変異が起きた場合、 $\beta$  刺激なしで、またダントロレン（ドメインスイッチを介した活性化の抑制剤）の存在下で、CaM の結合親和性は明らかに低下していた。これは、CaMLD 内の N4103K 点突然変異は CaMLD/CaMBD 連関を正常よりも増強し、CaMBD への結合性が増強した CaMLD との競合により、CaM の CaMBD への結合性が減弱することを示唆している。実際に、我々が示した QCM データでは、DP4089mut (N4103K 点突然変異を含む) のみが CaMBD に結合する CaM を阻害していた。N4103K/+ KI マウスにおいて GSH-CaM (WT-CaM より CaMBD に対して高い結合親和性が示された CaM 類似体) が異常なチャネル活性化を改善するという事実は、GSH-CaM が分子的楔として働き、強固な CaMLD/CaMBD 連関に対して (CaM よりも強く) 競合的に結合し、チャネル安定性を正常化することを示唆している。さらに、ダントロレンはこのモデルに対して全く有効性を持たなかった。RyR2 内でシグナル伝達経路の下流に位置する CaMLD/CaMBD 連関の過剰な増強は、ドメインスイッチの安定化では改善しない可能性がある。

N4103K/+ KI マウスは基礎状態であっても RyR2 に対する CaM の結合親和性が低下しているため、RyR2 は leaky であるにも関わらず、安静状態での収縮不全を認めなかった。これは、KI 心筋細胞における筋小胞体  $\text{Ca}^{2+}$  貯蔵の減少量 (WT の約 85%) が、不全心筋細胞 (正常心の約 56%) よりもかなり少ないことから、部分的に説明できるかもしれない。

本研究の限界として以下のことが挙げられる。電気生理学的記録がないため、正確な不整脈発症メカニズムを評価することができない。本研究では一つの点突然変異 (N4103K) でしか検討していないため、このメカニズムが CaMLD の他の点突然変異にも共有できるかは言及できない。

## 第7章 結語

本研究では N4103K/+ KI マウスモデルを使用した。RyR2 内のいわゆるカルモジュリン類似ドメイン (CaMLD) に点突然変異を有する CPVT タイプの一つである。この点突然変異は CaMLD/CaMBD 連関の過剰な増強の原因となり、その結果として CaM の解離を引き起こし、異常な  $\text{Ca}^{2+}$  漏出を生じることで、最終的には致死性不整脈に至る。すなわち、RyR2 に対して特異的に結合する内因性 CaM は RyR2 に対する天然の分子安定剤としての役割を果たしていると言える。RyR2 に対する CaM の結合親和性を高めることが、心不全や致死的不整脈に対して新たな治療戦略となるかもしれない。

## 第8章 謝辞

本研究を行うために多大なご指導・ご支援をいただ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、山口大学大学院医学系研究科保健学系学域病態検査学 山本健教授、および、器官病態内科学講座スタッフの皆様、岡本陽子様へ心から感謝申し上げます。また、本研究へのアドバイスと吟味をいただいた Noriaki Ikemoto 博士に感謝申し上げます。

## 第9章 参考文献

1. Priori SG, Chen SR. Inherited dysfunction of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> handling and arrhythmogenesis. *Circulation Research*. 2011;108:871-883
2. Venetucci L, Denegri M, Napolitano C, Priori SG. Inherited calcium channelopathies in the pathophysiology of arrhythmias. *Nat Rev Cardiol*. 2012;9:561-575.
3. Ikemoto N, Yamamoto T. Regulation of calcium release by interdomain interaction within ryanodine receptors. *Front Biosci*. 2002;7:d671-d683.
4. Yano M, Yamamoto T, Ikeda Y, Matsuzaki M. Mechanisms of Disease:ryanodine receptor defects in heart failure and fatal arrhythmia. *Nat ClinPract Cardiovasc Med*. 2006;3:43–52.
5. Oda T, Yano M, Yamamoto T, Tokuhisa T, Okuda S, Doi M, Ohkusa T, Ikeda Y, Kobayashi S, Ikemoto N, Matsuzaki M. Defective regulation of interdomain interactions within the ryanodine receptor plays a key role in the pathogenesis of heart failure. *Circulation*. 2005;111:3400-3410.
6. Tateishi H, Yano M, Mochizuki M et al. Defective domain-domain interactions within the ryanodine receptor as a critical cause of diastolic Ca<sup>2+</sup> leak in failing hearts. *Cardiovasc Res*. 2009; 81:536-545.
7. Yamamoto T, Yano M, Xu X, Uchinoumi H, Tateishi H, Mochizuki M, Oda T, Kobayashi S, Ikemoto N, Matsuzaki M. Identification of target domains of the cardiac ryanodine receptor to correct channel disorder in failing hearts. *Circulation*. 2008;117:762-772.
8. Uchinoumi H, Yano M, Suetomi T, et al. Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia is caused by mutation-linked defective conformational regulation of the ryanodine receptor. *Circulation Research*. 2010;106:1413-1424.
9. Ono M, Yano M, Hino A, et al. Dissociation of calmodulin from cardiac ryanodine receptor causes aberrant Ca<sup>2+</sup> release in heart failure. *Cardiovasc Res*. 2010;87:609–617.
10. Hino A, Yano M, Kato T, et al. Enhanced binding of calmodulin to the ryanodine receptor corrects contractile dysfunction in failing hearts. *Cardiovasc Res*. 2012;96:433-443.

11. Oda T, Yang Y, Uchinoumi H, Thomas DD, Chen-Izu Y, Kato T, Yamamoto T, Yano M, Cornea RL, Bers DM. Oxidation of ryanodine receptor (RyR) and calmodulin enhance Ca release and pathologically alter, RyR structure and calmodulin affinity. *J Mol Cell Cardiol.* 2015;85:240-248.
12. Uchinoumi H, Yang Y, Oda T, Li N, Alsina KM, Puglisi JL, Chen-Izu Y, Cornea RL, Wehrens XHT, Bers DM. CaMKII-dependent phosphorylation of RyR2 promotes targetable pathological RyR2 conformational shift. *J Mol Cell Cardiol.* 2016;98:62-72.
13. Yamaguchi N, Xu L, Pasek DA, Evans KE, Meissner G. Molecular basis of calmodulin binding to cardiac muscle Ca<sup>2+</sup> release channel (ryanodine receptor). *J Biol Chem.* 2003;278:23480-23486.
14. Rodney GG, Williams BY, Strasburg GM, Beckingham K, Hamilton SL. Regulation of RYR1 activity by Ca<sup>2+</sup> and calmodulin. *Biochemistry.* 2000; 39:7807-7812.
15. Yamaguchi N, Takahashi N, Xu L, Smithies O, Meissner G. Early cardiac hypertrophy in mice with impaired calmodulin regulation of cardiac muscle Ca release channel. *J Clin Invest.* 2007;117:1344-1353.
16. Xiong L, Zhang JZ, He R, Hamilton SL. A Ca<sup>2+</sup>-binding domain in RyR1 that interacts with the calmodulin binding site and modulates channel activity. *Biophys J.* 2006;90:173-182.
17. Gangopadhyay JP, Ikemoto N. Interaction of the Lys3614-Asn3643 calmodulin-binding domain with the Cys4114-Asn4142 region of the type 1 ryanodine receptor is involved in the mechanism of Ca<sup>2+</sup>/agonist-induced channel activation *Biochem J.* 2008;411:415-423
18. Gangopadhyay JP, Ikemoto N. Aberrant interaction of calmodulin with the ryanodine receptor develops hypertrophy in the neonatal cardiomyocyte *Biochem J.* 2011;438:379-387
19. Huang X, Liu Y, Wang R, Zhong X, Liu Y, Koop A, Chen SR, Wagenknecht T, Liu Z. Two potential calmodulin-binding sequences in the ryanodine receptor contribute to a mobile, intra-subunit calmodulin-binding domain. *J Cell Sci.* 2013;126:4527-4535
20. Picht E., Zima A.V., Blatter L.A., Bers D.M., SparkMaster: automated calciumspark analysis with ImageJ, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2007;293:C1073–C1081.

21. Liu N, Denegri M, Ruan Y, Avelino-Cruz JE, Perissi A, Negri S, Napolitano C, Coetzee WA, Boyden PA, Priori SG. Short communication: flecainide exerts an antiarrhythmic effect in a mouse model of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia by increasing the threshold for triggered activity. *Circ Res.* 2011;109:291-295.
22. Priori SG, Napolitano C, Tiso N, Memmi M, Vignati G, Bloise R, Sorrentino V, Danieli GA. Mutations in the cardiac ryanodine receptor gene (hRyR2) underlie catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circulation.* 2001;103:196-200.
23. Laitinen PJ, Brown KM, Piippo K, et al. Kontula K. Mutations of the cardiac ryanodine receptor (RyR2) gene in familial polymorphic ventricular tachycardia. *Circulation.* 2001;103:485-490.
24. Suetomi T, Yano M, Uchinoumi H, et al. Mutation-linked defective interdomain interactions within ryanodine receptor cause aberrant Ca<sup>2+</sup> release leading to catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circulation.* 2011;124:682-694.
25. Paul-Pletzer K, Yamamoto T, Bhat MB, Ma JJ, Ikemoto N, Jimenez LS, Morimoto H, Williams PG, Parness J. Identification of a dantrolene-binding sequence on the skeletal muscle ryanodine receptor. *J Biol Chem.* 2002;277:34918-34923
26. Kobayashi S, Yano M, Suetomi T, et al. 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.* 2009;53:1993-2005
27. Xu X, Yano M, Uchinoumi H, et al. Defective calmodulin binding to the cardiac ryanodine receptor plays a key role in CPVT-associated channel dysfunction. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;394:660-666.
28. Fukuda M, Yamamoto T, Nishimura S, et al. Enhanced binding of calmodulin to RyR2 corrects arrhythmogenic channel disorder in CPVT-associated myocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014;448:1-7