

Ryanodine receptor-bound calmodulin is essential to protect against catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia

(リアノジン受容体へのカルモジュリンの結合はカテコラミン誘発多形性心室頻拍の抑制に必須である)

氏名 中村 吉秀

所属 山口大学大学院医学系研究科
応用医工学系専攻

令和2年6月

目次

1.	要旨	1
2.	研究の背景	2
3.	目的	2
4.	方法	3
5.	結果	8
6.	考察	24
7.	結語	27
8.	謝辞	27
9.	参考文献	28

1. 要旨

リアノジン受容体 (RyR2) は心筋筋小胞体膜上のカルシウム放出チャネルであり、カテコラミン誘発多形性心室頻拍 (CPVT) は RyR2 のさまざまな部位の点変異によっておこることが報告されている。これまで CPVT モデルマウス (R2474S/+) を使用し、RyR2 内の点突然変異がチャネルを感作し、N terminal および central domain 間の連関障害とそれに続くカルモジュリンの解離がチャネルを不安定化し、カルシウムの漏出を起こすことを以前報告してきた。今回我々は RyR2 へのカルモジュリン親和性を高めることで CPVT を遺伝的に抑制できるかの検討を行った。まず、RyR2 のカルモジュリン親和性を高めるアミノ酸置換の検討を行い、V3599K アミノ酸置換が最も親和性が高いことが示された。RyR2 のカルモジュリン結合部位の単一アミノ酸置換のノックインマウス (V3599K/+) を作成し、それを CPVT モデルノックインマウス (R2474S/+) と交配し、ダブルヘテロノックインマウス (R2474S/V3599K) を作成した。CPVT モデルマウスはカテコラミンの腹腔内投与で容易に心室頻拍が誘発されたが R2474S/V3599K ノックインマウスでは完全に抑制されていた。また単離心筋細胞においても CPVT モデルマウスでみられるカルシウムトランジェントやカルシウムスパークはすべて R2474S/V3599K ノックインマウスにおいて抑制されており、カテコラミン刺激による RyR2 からのカルモジュリンの解離も抑制されていた。その機序としては、4 量体である RyR2 のうち、V3599K 変異モノマーへのカルモジュリンの強い結合がドメイン連関障害を抑え、R2474S 変異モノマーからのカルモジュリンの解離も抑えることでチャネルが安定化しカルシウムの漏出が抑制されることを想定している。以上よりリアノジン受容体のカルモジュリン結合親和性を高めることは CPVT の抑制に必須であると考えられる。

2. 研究の背景

心筋型 2 型リアノジン受容体 (RyR2) は筋小胞体膜上の巨大な 4 量体タンパクで、L 型カルシウムチャネルからの少量の Ca^{2+} 流入を引き金に、筋小胞体から大量の Ca^{2+} を放出させる (1, 2)。カテコラミン誘発多形性心室頻拍 (CPVT) は 150 以上の突然変異が報告されているが (3)、それらは N 末端ドメイン、中央ドメイン、C 末端ドメインの 3 か所に集中している (4)。ドメインスイッチ仮説に基づき (5)、我々は点突然変異が N 末端と中央ドメイン間の連関障害を起こし、 Ca^{2+} 漏出を増やすことを CPVT モデル (RYR2^{R2474S/+} ノックイン) マウス (6) や頻拍誘発性心不全のイヌモデル (7-9) で示してきた。このことは N 末端と中央ドメインの連関障害が致死的不整脈の病因に決定的な役割であることを示唆しており、最近我々はドメイン連関障害により RyR2 からカルモジュリン (CaM) が解離することで CPVT (10) や心不全 (11) で Ca^{2+} 漏出が起こることや、RyR2 に対して親和性が高い Gly-Ser-His CaM が CPVT の不整脈基質となる Ca^{2+} スパークや Ca^{2+} トランジェントを抑制し (12)、心不全の収縮不全を改善する (13) ことを示した。これらの知見は CaM の RyR2 への特異的結合が CPVT の病態に決定的な役割を担っているという考えを支持している。さらに RyR2 の CaM 結合部位を遺伝的に変異させ CaM の RyR2 への結合を不可能としたマウスでは著明な心拡大と心肥大で 1 か月以内に死亡する (14) という事柄も RyR2 への CaM の結合が心機能の調節に必須の役割であることを強く示唆している。しかし、病的な RyR2 への CaM 親和性を高めることで疾患の表現型を抑えることができるかは解明されていない。

3. 目的

本研究では病的な RyR2 の CaM 親和性を高めることで自発的な Ca^{2+} 漏出を抑え CPVT を抑制できるかの検討を行った。

4. 方法

4. 1 実験動物

20 から 25 週齢の C57BL/6 マウスを使用した。野生型 C57BL/6 マウスは日本エスエルシー株式会社から、V3599K ノックインマウスはユニテック株式会社で作成した。マウスは各実験にランダムに割り当てられ、各実験で各群の順序はランダムに決定した。各群の遺伝的背景は異なり、この研究には治療薬の検査は含まれないため、割付けのブラインド化はしていない。入手したデータの測定および解析はマウスの遺伝子情報を盲検化した研究者でなされた。この研究は National Academies Press (1996 年改訂) が発行する実験動物の管理と使用に関する指針に準拠して行われた。実験動物の飼育と使用されたプロトコールは山口大学大学院医学系研究科の動物倫理委員会が定めたガイドラインに従った。

4. 2 心エコー

心機能は 7.5 MHz プローブ (Hitachi, UST-5413) 搭載の F37 超音波装置 (Hitachi medical) で分析をした。マウスはまず 4 ~ 5 % イソフルラン吸入で麻酔し 1 ~ 2 % イソフルランで維持をした。

4. 3 体表面心電図

心電図は心電図テレメトリーを使用して計測を行った。送信器 (Data Sciences International) は II 誘導の電極とともに背部皮下に植え込みを行った。テレメトリーはまず安静時のマウスで 24 時間記録された。その後、WT、R2474S/+、V3599K/+、R2474S/V3599K ノックインマウスの 4 群で基準の心電図およびエピネフリン 1mg/kg 腹腔内投与後 30 分間の心電図の記録や、別の 4 群ではトレッドミル運動負荷 (Panlab) の心電図記録を行った。

4. 4 心筋の単離

心筋細胞は従来通りマウスの心臓から単離を行った (6)。ペントバルビタールナトリウム (70mg/kg 腹腔内投与) で麻酔し、挿管後周囲の空気で換気を行った。開胸し心臓を素早

く摘出しコラゲナーゼを含まない緩衝液 (Thermo Fisher Scientific、DMEM、10313) で大動脈から逆行性に定常流で灌流した。50 μM Ca^{2+} 、0.5 mg/ml コラゲナーゼ B (Roche)、0.5 mg/ml コラゲナーゼ D (Roche)、0.02 mg/ml プロテアーゼタイプ XIV (MilliporeSigma, P-5147) を含む 95% O_2 および 5% CO_2 でバブルした培養液 (MilliporeSigma) で逆行性に灌流し、左室心筋を新鮮なコラゲナーゼを含む緩衝液内でハサミで細かく刻みロッド形状の心筋細胞を調製した。培養液を交換し、 Ca^{2+} 濃度を 50 μM 、100 μM 、300 μM 、600 μM と徐々に上げていき最終的に 1mM とした。単離心筋細胞はラミニンで被覆したガラスディッシュに移し、5% CO_2 、95% O_2 、37°C で数時間培養した。

4. 5 心筋の Ca^{2+} トランジェントの測定

従来通りで単離心筋細胞を 20 μM fluo-4 AM (Molecular Probes) と室温で 20 分反応させ、Tyrode 液 (自作、140 mM NaCl、1 mM MgCl_2 、10 mM glucose、6 mM KCl、5 mM HEPES pH7.4、2 mM CaCl_2) で 2 回 wash した (6)。すべての実験は 35°C で行われた。培養細胞刺激装置 (Ion Optix) で刺激された細胞の細胞内 Ca^{2+} 測定は蛍光デジタル顕微鏡 (Keyence、BZ9000) を使用して行った。1, 2, 3, 4 および 5 Hz での刺激停止時の自発的な Ca^{2+} 放出の発生を WT およびノックイン心筋細胞で測定した。

4. 6 Ca^{2+} スパークと Ca^{2+} 含有量の測定

Ca^{2+} スパークの測定は従来通り (6) で Zeiss $\times 40$ 油浸 Plan-Neofluor 対物レンズ (開口数 1.3、励起 488nm、蛍光 $> 505\text{nm}$) 使用の倒立顕微鏡 (Axiovert100, Carl Zeiss) のアルゴンイオンレーザー搭載の共焦点レーザー顕微鏡 (LSM-510, Carl Zeiss) を使用して測定した。心筋細胞は fluo-4 AM (20 μM) を 20 分、24°C でローディングした。ラインスキャンモードを使用し、核以外の部分で単一心筋細胞を長軸方向に繰り返してスキャンした。 Ca^{2+} スパーク計測にあたり Ca^{2+} トランジェントが定常状態になるまで心筋細胞を刺激した。刺激を停止し、その後約 10 秒間の Ca^{2+} スパークを記録した。データは、迅速かつ正確な自動分析プ

ログラムである SparkMaster (<https://sites.google.com/site/sparkmasterhome/>) で解析を行った。解析される変数には一般的な画像パラメーター（検出されたスパークの数、スパークの頻度など）と個々のスパークパラメーター（振幅、FWHM および FDHM）が含まれる。カフェイン（10mM）を急速に灌流し筋小胞体内の Ca^{2+} を放出させ Ca^{2+} 含有量を評価した。

4. 7 RyR2 に結合している内因性 CaM の免疫染色

単離心筋細胞は 4%パラホルムアルデヒド（WAKO、163-20145）で 5 分固定し PBS で 3 回 wash し 0.5% TritonX-100（MilliporeSigma）と 1% BSA（Nacalai Tesque）で 20 分透過処理をした。次に、心筋細胞を 1% BSA および 0.5% TritonX-100 で希釈の抗 CaM 抗体（EP799Y、Abcam）および抗 RyR 抗体（MilliporeSigma、C3-33）と 4°C で一晚反応させた後、Alexa Fluor 488 結合ヤギ抗ウサギ（Thermo Fisher Scientific、A11008）および Alexa Fluor 633 結合ヤギ抗マウス（Thermo Fisher Scientific、A21052）2 次抗体で標識した。

サルコメアに関連した Alexa Fluor 633 および Alexa Fluor 488 蛍光の周期的な増加は長軸方向に 25 μm ほど選択されベースラインからの立ち上がりで積算し距離で割り、1 サルコメアあたりの RyR および RyR 結合 CaM の任意の平均値となるように計算した。2 次抗体のみの標識では検出可能な蛍光パターンはみられなかった。

4. 8 サポニン透過処理心筋細胞における外因性 CaM の RyR2 への結合の同定

これまでと同様に Alexa Fluor 633（Molecular Probes）で蛍光標識した外因性 CaM をサポニンで透過処理した WT およびノックイン心筋細胞に導入した（10）。次に、Alexa-CaM 蛍光のデンストメトリー測定により局在化した CaM の分布を同定した。簡潔に説明すると、蛍光標識した心筋細胞を共焦点顕微鏡（LSM-510、Carl Zeiss）（開口数 1.3、励起 633nm、発光 650nm）でレーザースキャンした。サルコメアに関連した Alexa Fluor 633 蛍光のベースラインからの周期的な増強は長軸方向に 25 μm ほど積算され距離で割り 1 サルコメアあたりの値となるように計算した。

4. 9 CaM-SANPAH クロスリンク法による CaMBP の CaM への結合特性と RyR2 への CaM の結合の分析

これまで同様に RyR2 への CaM の結合は光反応性架橋剤 sulfo-SANPAH (Thermo Fisher Scientific) を使用して評価した (10)。まず、暗所でコンジュゲーションバッファー (150mM KCl、20mM MOPS、pH7.2) 内に 50 μ M 組み換え CaM と 100 μ M sulfo-SANPAH を混合して CaM-SANPAH コンジュゲートを作成した。30 分後、十分量のリジンを付加することでコンジュゲーションを停止させた。CaM-SANPAH コンジュゲートはスピンカラム Amicon Ultra (分子量カットオフ 10kDa) を使用して精製した。イヌ SR (CaMBP の CaM への結合特性の分析用) およびマウス心筋ホモジネート (CaM の RyR2 への結合の解析用) は結合バッファー (150mM KCl、10 μ M CaCl₂、20mM MES、pH 6.8) で 1 mg/ml まで希釈され、暗室内でガラスチューブを使用し CaMBP ありなしで 100nM CaM-SANPAH と混合した。10 分間の結合時間の後、UV 照射を行い架橋を作成した。次にサンプルバッファーを架橋をした SR に付加し、抗 CaM 抗体 (Merck、MilliporeSigma) を使用しウエスタンブロッティングを行った。RyR2 に架橋した CaM-SANPAH は 550kDa の高さのバンドで検出された。

各 CaMBP への CaM の結合親和性は SR 上の RyR2 への CaM-SANPAH 結合の阻害として測定された。CaM の CaMBP への結合親和性が RyR2 より高い場合、付加された CaM-SANPAH のほとんどは RyR2 でなく CaMBP に結合する。CaM の立体構造を評価するため、CaMBP への結合時に CaM 内のトリプトファンの蛍光レベルを測定した。

4. 10 QCM による CaMBP と CaM の相互作用の測定

CaM の WT CaMBP または V3599K CaMBP への結合はこれまでと同様 (8)、高感度の質量測定装置である 27 MHz QCM (Initium Inc.) を使用して検出した。QCM Au 電極を CaMBP でコーティングし、150 mM NaCl、20 mM MOPS、0.01 mM Ca²⁺ (pH 7.2) を含む溶液 (500 μ l) に浸した。ペプチド結合量は CaM を含む少量の溶液 (2~5 μ l) の注入時の電極上の質量変化

(サブナノグラムの感度)による周波数変化から決定された。Au 電極への CaM の有意な非特異的結合は検出されなかった。

4. 1 1 組織

10%ホルマリンを使用して 16~22 週齢の WT および一連のノックインマウスの心臓を固定した。2つの左室乳頭筋レベルでの断面が形態分析に選択された。ヘマトキシリンエオジン染色およびマッソントリクローム染色が各断面に対し行われた。

4. 1 2 ウェスタンブロット分析

RyR2 (C3-33, MilliporeSigma)、RyR2 のセリン 2808 リン酸化 (p-Ser2808 RyR2)、SR Ca²⁺-ATPase (SERCA2a, Affinity Bioreagents)、フォスフォランバン (PLB, Santa Cruz Biotechnology Inc.), PLB のセリン 16 リン酸化 (p-Ser16 PLB, Fitzgerald)、PLB のスレオニン 17 リン酸化 (p-Thr17 PLB, Santa Cruz Biotechnology Inc.), グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (MilliporeSigma) に対しウェスタンブロットを行った (3)。

4. 1 3 統計

2つの異なる状況で得られたデータの統計的比較には両側スチューデントの t 検定を使用し、2つ以上のグループの統計的比較には一元配置分散分析とそれに引き続く Tukey 検定を使用した。すべてのデータは平均±SEM として表し、0.05 未満の P 値は統計的に有意であるとみなした。

4. 1 4 試験の承認

すべての実験は山口大学医学系研究科の動物倫理委員会によって承認された。

5. 結果

5. 1 RyR2 の CaM 結合ドメイン (3584~3603 残基) 内の単一アミノ酸置換 (V3599K) は CaM への結合親和性を著しく高める

まず、RyR2 の CaM 結合ドメイン (3584~3603 残基) 内に、その結合親和性を高めることができるアミノ酸置換があるかどうかを確かめた。このために、光感受性架橋剤である sulfo-SANPAH (方法参照) を使用して CaM の RyR2 への結合を確認し、1 アミノ酸残基を除いて CaM 結合ドメインと同じアミノ酸配列 (3584~3603 残基) を含む 20 mer CaM 結合ペプチド (CaMBP) への CaM の結合親和性を評価した (表 1)。25 個のペプチドのうち V3599K 置換が行われたペプチド 24 は、RyR2 への CaM-SANPAH 結合が最も抑制されており、CaM が RyR2 より 24 番 CaMBP により結合親和性が高いことを示している (図 1)。CaMBP への結合による CaM のコンフォメーション変化もトリプトファン蛍光変化を測定することで評価した。補足図 1 で示すように、V3599K CaMBP は CaM を介したトリプトファン蛍光の最大の変化を示した。CaM の結合親和性に対する CaMBP 内の単一アミノ酸置換 (V3599K) の影響は水晶振動子微量天秤法 (QCM) でも確認をおこなった。CaMBP の単一アミノ酸置換 (CaMBP 突然変異 [CaMBPmut]: V3599K) は、CaM の CaMBPmut への結合を著しく高めた。RyR-CaM 結合配列に直接結合し、RyR1 および RyR2 の両方から CaM を置換するスラミン (15~17) は WT CaMBP と CaMBPmut の両方への CaM 結合を阻害した (図 2)。

Name	Amino acid sequence
WT	* <u>AV</u> WHKLLSKQRKRAVACFR ³⁰¹
1	AVWH <u>B</u> LLSKQRKRAVACFR
2	AVWH <u>Y</u> LSKQRKRAVACFR
3	AVWH <u>K</u> ELSKQRKRAVACFR
4	AVWH <u>K</u> WLSKQRKRAVACFR
5	AVWH <u>K</u> LSKQRKRAVACFR
6	AVWH <u>K</u> QLSKQRKRAVACFR
7	AVWHKLLS <u>K</u> RKRAVACFR
8	AVWHKLLS <u>R</u> RKRAVACFR
9	AVWHKLLS <u>K</u> ERKRAVACFR
10	AVWHKLLS <u>R</u> RAVACFR
11	AVWHKLLS <u>K</u> QRKRAVACFR
12	AVWHKLLS <u>K</u> QRKRAVACFR
13	AVWHKLLS <u>K</u> QRKRAVACFR
14	AVWHKLLS <u>K</u> QRKRAVACFR
15	AVWHKLLS <u>K</u> QRKRAVACFR
16	AVWHKLLS <u>K</u> QRKRAVACFR
17	AVWHKLLS <u>K</u> QRKRAVACFR
18	AVWHKLLS <u>K</u> QRKRAVACFR
19	AVWHKLLS <u>K</u> QRKRAVACFR
20	AVWHKLLS <u>K</u> QRKRAVACFR
21	AVWHKLLS <u>K</u> QRKRAVACFR
22	AVWHKLLS <u>K</u> QRKRAVACFR
23	AVWHKLLS <u>K</u> QRKRAVACFR
24	AVWHKLLS <u>K</u> QRKRAVACFR
25	AVWHKLLS <u>K</u> QRKRAVACFR

表1 RyR2 内の CaM 結合ドメイン内の単一アミノ酸置換

下線の文字が置換されたアミノ酸を示す

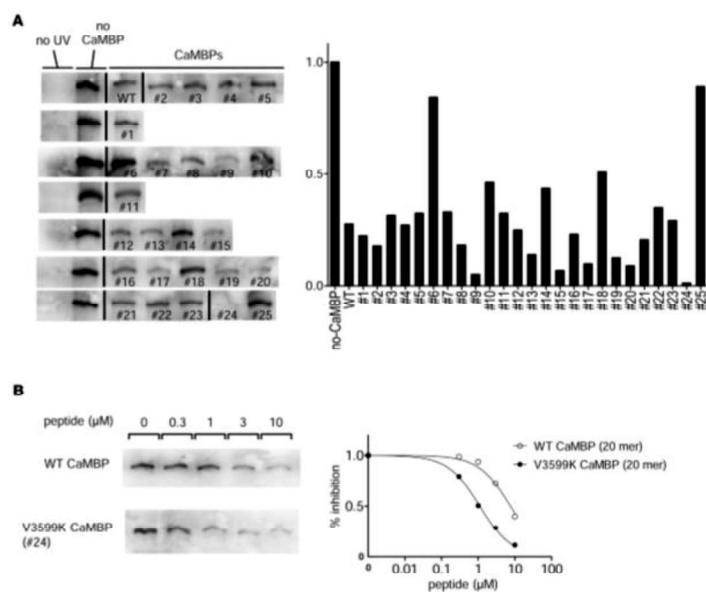
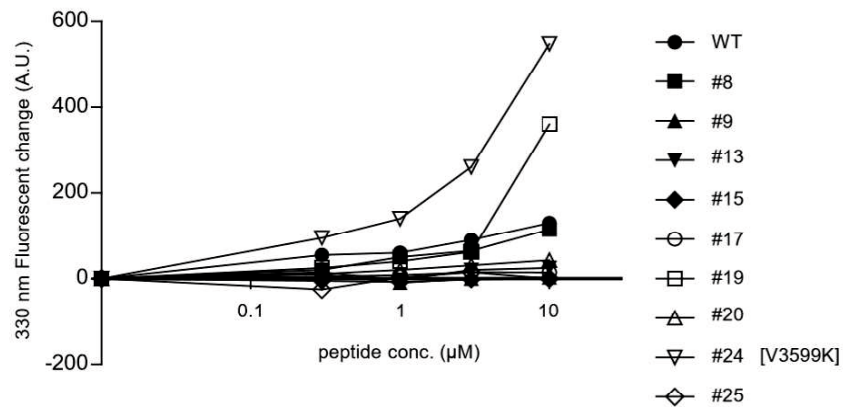


図1 CaM 結合親和性を高める RyR2 の CaM 結合ドメイン(3584-3603)内の単一アミノ酸置換の同定。(A)CaM-SANPAH クロスリンク法による1アミノ酸残基を除いてCaM結合ドメインと同一のアミノ酸配列のCaM結合ペプチドの結合親和性の評価。25のペプチドの内、24番のV3599K置換がRyR2へのCaM-SANPAH結合を最も抑制し、CaMが24番CaMBPに最も結合親和性が高いことを示している。Y軸はCaMBPなしとの濃度の比を表す。(B)RyR2へのCaM-SANPAH結合に対するWT CaMBPまたはV3599K CaMBPの濃度依存性阻害作用。WT CaMBPと比較してV3599K CaMBPは強い阻害を示し、WT CaMBPよりもCaMへのV3599K CaMBPの高い結合親和性を示している。



補足図1 CaMBP への CaM 結合に対する CaM 媒介性トリプトファン蛍光変化の濃度依存性。V3599K-CaMBP は CaM を介したトリプトファンの蛍光が最も変化した。

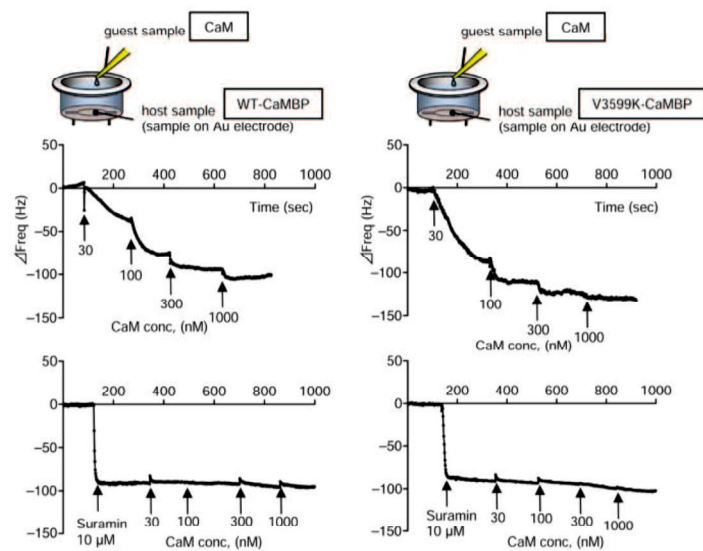


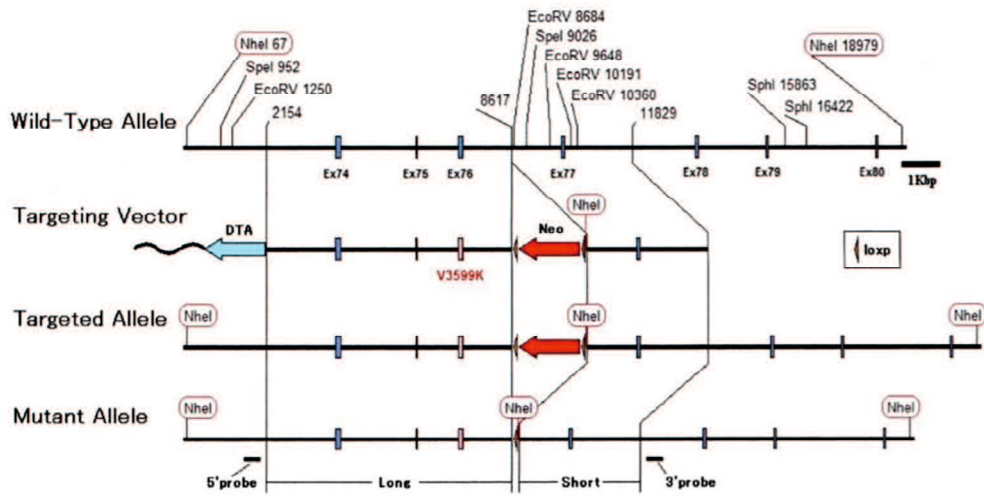
図2 QCM による WT CaMBP(左)および V3599K CaMBP(右)への CaM の結合親和性評価。

各 CaMBP は最初に宿主サンプルとしてセンサーチップの表面に固定化され、方法に記載されているように CaM を濃度依存的に累積的に付加し、各 CaMBP に対する CaM の結合親和性を評価した。

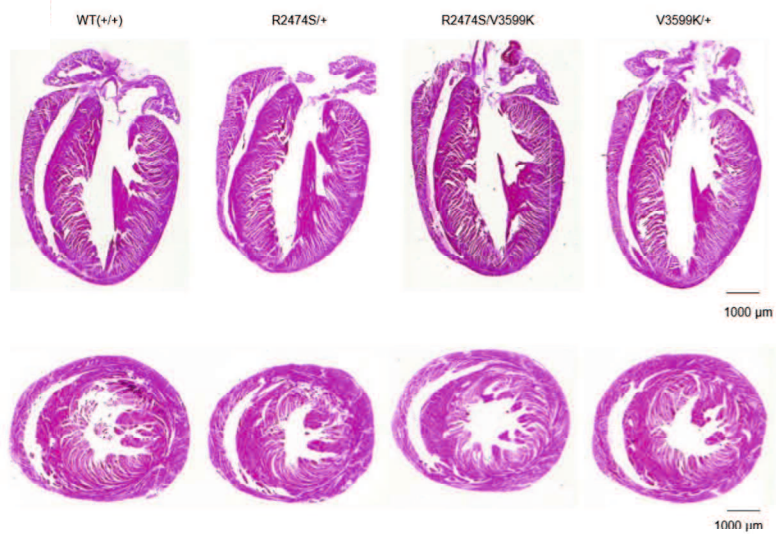
5. 2 R2474S/V3599K ノックインマウスではカテコラミンや運動負荷による心室頻拍は抑制された

RyR2 への CaM の結合親和性を RyR2 内の CaM 結合ドメインの単一アミノ酸変異 (V3599K) により著しく高めたヘテロ接合 V3599K/+ノックインマウスモデルを生成した(補足図 2)。次に、V3599K/+ノックインマウスと R2474S/+ノックインマウスを交配してヘテロ接合 R2474S/V3599K ノックインマウスモデルを取得した。WT(+/+), R2474S/+ノックイン、V3599K/+ノックインおよび R2474S/V3599K ノックインマウスの間で心臓の構造的または機能的特徴に目立った違いはみられなかった(構造的特徴:補足図 3、心エコー:補足図 4、タンパク質発現およびリン酸化:補足図 5)。

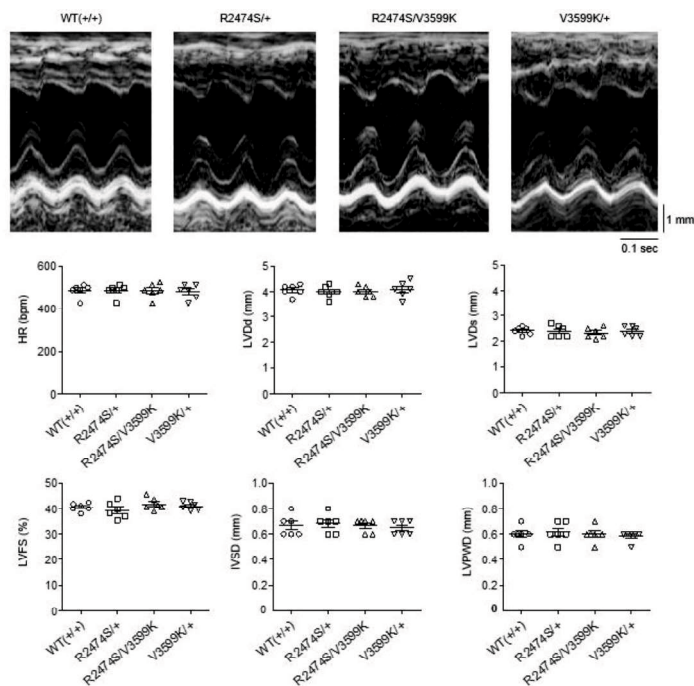
我々は以前、CPVT の病因において、カテコラミンを介した RyR2 セリン 2808 (Ser2808) のリン酸化により、N 末端と中央ドメイン間でドメイン連関障害が生じ、RyR2 から CaM が解離し Ca^{2+} 漏出が起こり、遅延後脱分極 (DaD) から最終的に致死的な不整脈が誘導されることを実証してきた (6, 10)。本研究では R2474S/V3599K ノックインマウスにおいて 24 時間心電図モニタリングを使用し不整脈が観察されるかどうかを調べ、心室性不整脈に対するエピネフリンや運動負荷の影響を調べた。心室頻拍 (VT) はすべての R2474S/+ノックインマウスでエピネフリンまたは運動負荷によって容易に誘発されたが R2474S/V3599K ノックインマウスでは WT や V3599K ノックインマウス同様誘発はされなかった (図 3 A および B)。24 時間心電図モニタリングで、R2474S/+ノックインマウスではわずかなストレス下でも VT と心室 2 段脈の両方が頻回に観察されたが、R2474S/V3599K ノックインマウスでは観察されなかった (図 3 C および D)。



補足図2 ヘテロ接合 V3599K KI マウスの作製。V3599K/+ KI マウスの生成に使用されたターゲットベクターのゲノム構造の模式図。

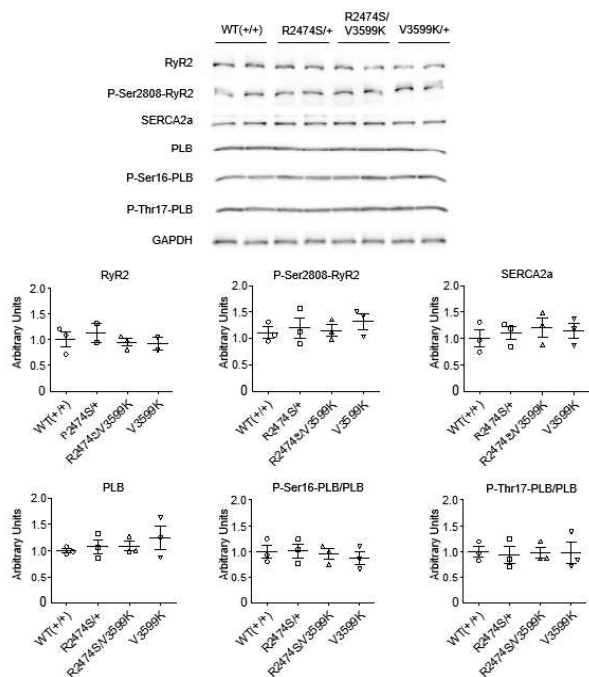


補足図3 WT(+/+), R2474S/+ KI、V3599K/+ KI および R2474S/V3599K KI マウスの構造的および機能的特性。マウス心臓の長軸断面と短軸断面の代表的な画像。心臓組織の断面にマウス間で著明な違いはなかった。スケールバー:1000 μ m。



補足図 4

心エコー検査の代表的な画像とまとめデータ。心エコー検査上、マウス間の機能的な差は明らかでなかった。



補足図 5

Ca²⁺調節 SR タンパク質の発現

(上) さまざまな Ca²⁺調節タンパク質のウェスタンブロット。RyR2:心筋型リアノジン受容体。P-Ser2808-RyR2:RyR2 Ser2808 のリン酸化。SERCA2a:SR Ca²⁺-ATPase。PLB:ホスフォランパン。P-Ser16-PLB:PLB の Ser16 リン酸化。P-Thr17-PLB:PLB の Thr17 リン酸化。GAPDH:グリセルアルデヒド 3-リン酸脱水素酵素。(下) ウェスタンブロットのまとめデータ。データは 3 心臓の平均 ± SEM を表示。

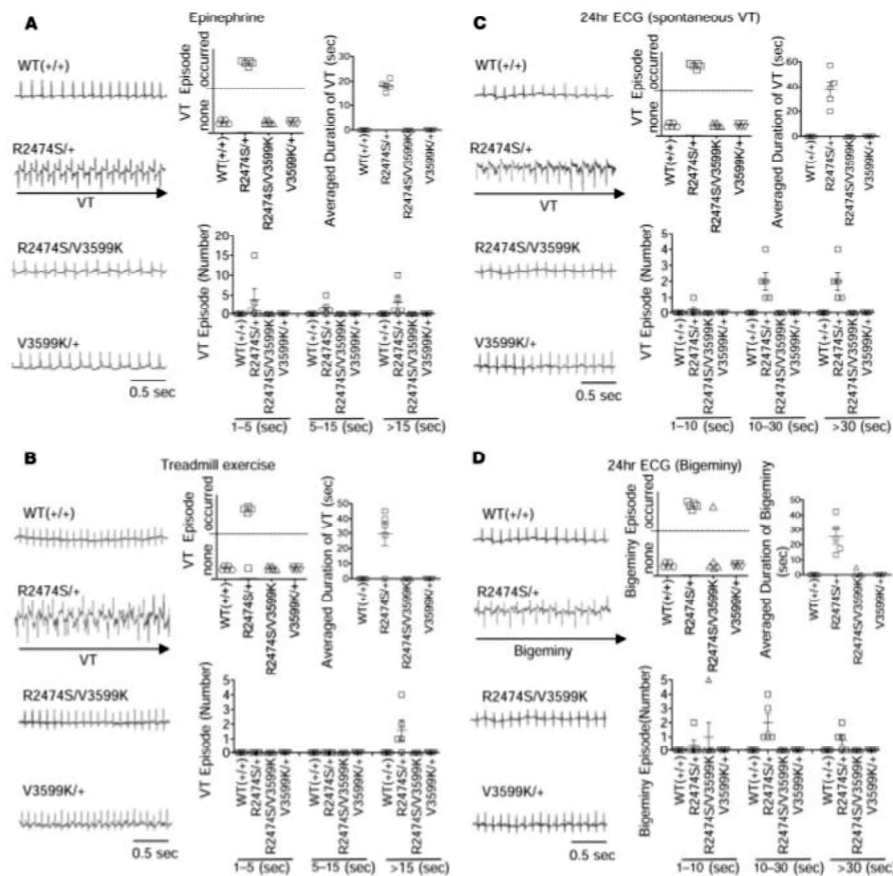


図 3 V3599K 突然変異による心室性不整脈の抑制。(A)エピネフリン投与後および(B)トレッドミルの代表的な心電図(左)とまとめデータ(右)。(C)持続性 VT および(D)2 段脈の 24 時間心電図(左)とまとめデータ(右)。WT(n=5)、R2474S/+KI(n=5)、V3599K/+KI(n=5)、R2474S/V3599K KI(n=5)。

5. 3 R2474S/V3599K ノックインマウスでは自発的 Ca^{2+} トランジェントと Ca^{2+} スパークの両方が抑制された。

WT マウスと V3599K/+ ノックインマウスにおいて、ベースラインの細胞短縮 (図 4) および Ca^{2+} トランジェント (図 5A) に統計学的な有意差はなかった。ISO 負荷すると細胞短縮または Ca^{2+} トランジェントがピークから 80% 低下するまでの時間が R2474S/+ ノックインマウス心筋細胞で延長し、RyR2 不活化の延長や自発的な Ca^{2+} 漏出イベントが示唆された。一方、R2474S/V3599K ノックインマウス心筋細胞では細胞短縮または Ca^{2+} トランジェントのピーク

から 80%低下までの時間が改善していた (図 4 および図 5)。ISO 存在下で SR Ca^{2+} 含有量は WT および V3599K/+ノックインマウスで増加したが、R2474S/+ノックインマウスでは、おそらく Ca^{2+} 漏出が原因で増加の程度が減少した (図 5B)。一方、R2474S/+ノックインマウスでみられた SR Ca^{2+} 含有量の減少は R2474S/V3599K ノックインマウスでは観察されなかった (図 5B)。ISO の存在下で、R2474S/V3599K ノックインマウスと比較し R2474S/+ノックインマウスでは Ca^{2+} スパーク頻度が増加していた (図 6A)。WT 心筋細胞と比較し R2474S/+ノックインマウス心筋細胞では最大振幅と半値全幅 (FWHM) の両方が低下したのに対し、半値全時 (FDHM) は R2474S/+ノックインマウス心筋細胞で増加しており、RyR2 の不活化の遅延が示唆された。FDHM の増加は R2474S/V3599K ノックインマウス心筋細胞では減少していた (図 6B および表 2)。ISO 存在下で R2474S/+ノックインマウスでは自発的な Ca^{2+} トランジェント (SCaT) が増加したが、R2474S/V3599K ノックインマウスではほとんど観察されなかった (図 7)。これらの結果は CaM と RyR2 の相互作用の障害とその後の Ca^{2+} 漏出が、CPVT につながる不整脈誘発性基質となるだけでなく、弛緩障害 (PKA リン酸化時) を引き起こすことを明確に示している。

さらに、CaM とは無関係なチャンネルゲーティングに対する V3599K 変異の影響を調べるため、内因性 CaM を置換することが示されている (15-17) スラミン (10 μM) による前処理後の Ca^{2+} スパークをサポニン透過性処理後心筋細胞で測定した。まず、スラミン処理なしで Ca^{2+} スパークへの外因性 CaM (100nM) の影響を調べた。Internal solution に外因性 CaM (100nM) を加えた場合、cAMP 非存在下ではすべてのグループで Ca^{2+} スパーク頻度に有意差はなかった (図 8A および B)。しかし、cAMP (1 μM) の存在下では R2474S/+心筋細胞で Ca^{2+} スパークは著しく増加したが、他のグループの心筋細胞では増加しなかった (図 8A および B)。対して、スラミン処理後 (および外因性 CaM なし) の CaM なし条件で、cAMP 非存在下のベースラインでは、おそらく RyR2 からの漏出による SR 内 Ca^{2+} の減少により、 Ca^{2+} スパー

クは一時的にのみ観察され急速にみられなくなった。しかし、cAMP の存在下では、SR 内 Ca^{2+} 含有量に大きな差なく Ca^{2+} スパーク頻度はすべてのグループで同程度に著しく増加した (図 8B)。これらの結果は、CPVT 関連変異 (R2474S) によっておこる異常な Ca^{2+} 放出に対する V3599K 変異の救済効果が CaM 依存性であることを明確に示している。

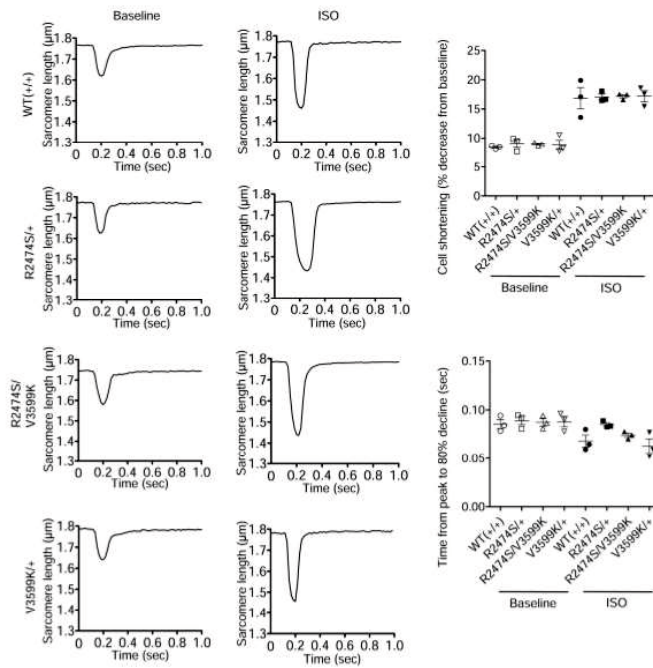


図 4 心筋細胞の細胞短縮。ISO(10nM)ありとなし(ベースライン)での 1Hz ペーシング時のサルコメア長の代表的記録とまとめデータ(右)。個々のマウスのデータは平均±SEM をプロット。3 心臓から得た n=27-44 細胞。

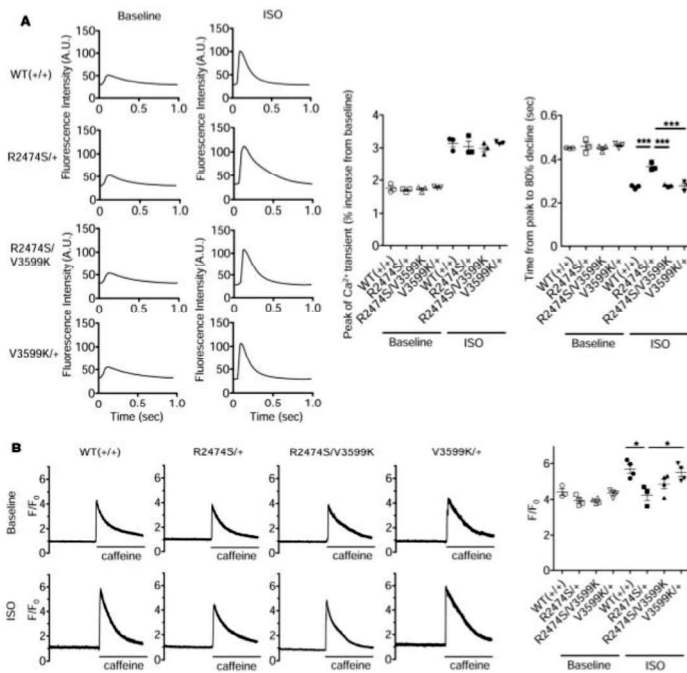


図 5 心筋細胞内 Ca²⁺トランジェントと SR Ca²⁺含有量。(A)ISO ありとなし(ベースライン)で 1 Hz ペーシングの fluo-4AM 蛍光の代表的記録とまとめデータ(右)。3 心臓から 28-44 細胞。(B)SR Ca²⁺貯蔵量であるカフェイン投与後の fluo-4AM 蛍光の代表的記録とまとめデータ(右)。3-4 心臓から 10-19 細胞。カフェインで誘発された Ca²⁺トランジェントは最初 2Hz で刺激された後、灌流液から 20 mM カフェインを含む溶液に 5-6 秒で素早く入れ替えることで測定した。個々のマウスのデータは平均±SEM をプロット。*p<0.05、***P<0.001(一元配置分散分析と Tukey 多重比較検定)

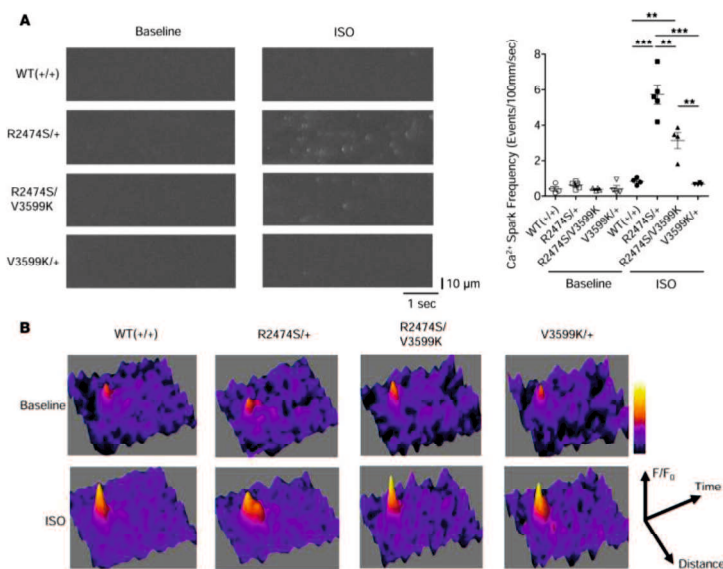


図 6 心筋細胞の Ca²⁺スパーク
(A)Ca²⁺スパークの代表的記録。ISO ありなしでの WT および KI 心筋細胞の fluo-4AM 蛍光のラインスキャンの記録(左)とまとめデータ(右) 個々のマウスのデータは平均±SEM をプロット。
*p<0.01、***P<0.001(一元配置分散分析と Tukey 多重比較検定)。3-4 心臓から N=21-35 細胞。(B)Ca²⁺スパークの 3次元イメージ。

ISO (10 nM)		Peak (F/F ₀)	FWHM (μm)	FDHM (ms)	No. of sparks
(-)	WT (+/+) (n = 3)	1.20 ± 0.02	1.53 ± 0.15	36.44 ± 4.85	38
(-)	R2474S/+ (n = 3)	1.19 ± 0.01	1.53 ± 0.10	36.17 ± 4.36	32
(-)	R2474S/V3599K (n = 3)	1.17 ± 0.01	1.43 ± 0.11	40.21 ± 6.65	31
(-)	V3599K/+ (n = 3)	1.18 ± 0.01	1.67 ± 0.15	34.02 ± 3.22	35
(+)	WT (+/+) (n = 3)	1.27 ± 0.02	1.81 ± 0.09	36.46 ± 2.89	65
(+)	R2474S/+ (n = 3)	1.25 ± 0.01	2.33 ± 0.06 ^A	81.14 ± 3.49 ^A	352
(+)	R2474S/V3599K (n = 3)	1.26 ± 0.01	2.21 ± 0.06 ^B	53.93 ± 2.84 ^C	211
(+)	V3599K/+ (n = 3)	1.24 ± 0.02	1.89 ± 0.13 ^B	33.24 ± 2.65 ^D	52

^AP < 0.01 vs. WT (+/+) with ISO. ^BP < 0.05 vs. WT (+/+) with ISO. ^CP < 0.01 vs. R2474S/+ with ISO. ^DP < 0.05 vs. R2474S/+ with ISO. n, the number of hearts; FWHM, full width at half maximum; FDHM, full duration at half maximum.

表 2 心筋細胞の Ca²⁺スパークへのアイソプロテレノールの効果

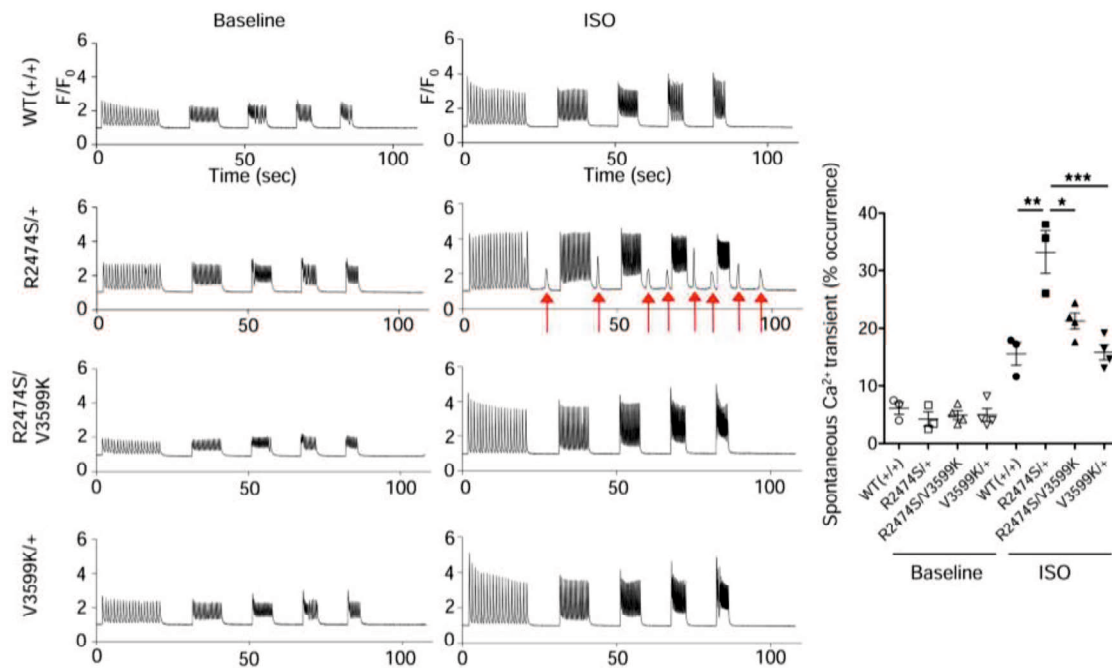


図 7 正常心筋細胞の SCaTs。SCaTs の代表的トレース(左)と 3-4 心臓からの 874-1693 正常単離心筋細胞の SCaTs の出現率のまとめデータ。矢印が SCaT を示す。SCaT は 10nMISO ありなしで 1、2、3、4、5 Hz ペーシング刺激の停止後に誘発された。SCaT は ISO(10nM)の存在下で R2474S/+KI 細胞の方が WT や V3599K/+KI 細胞よりはるかに多かった。しかし、SCaT は R2474S/V3599K KI 細胞で著明に減少していた。個々のマウスのデータは平均±SEM をプロット。*p<0.05、**p<0.01、***P<0.001(一元配置分散分析と Tukey 多重比較検定)

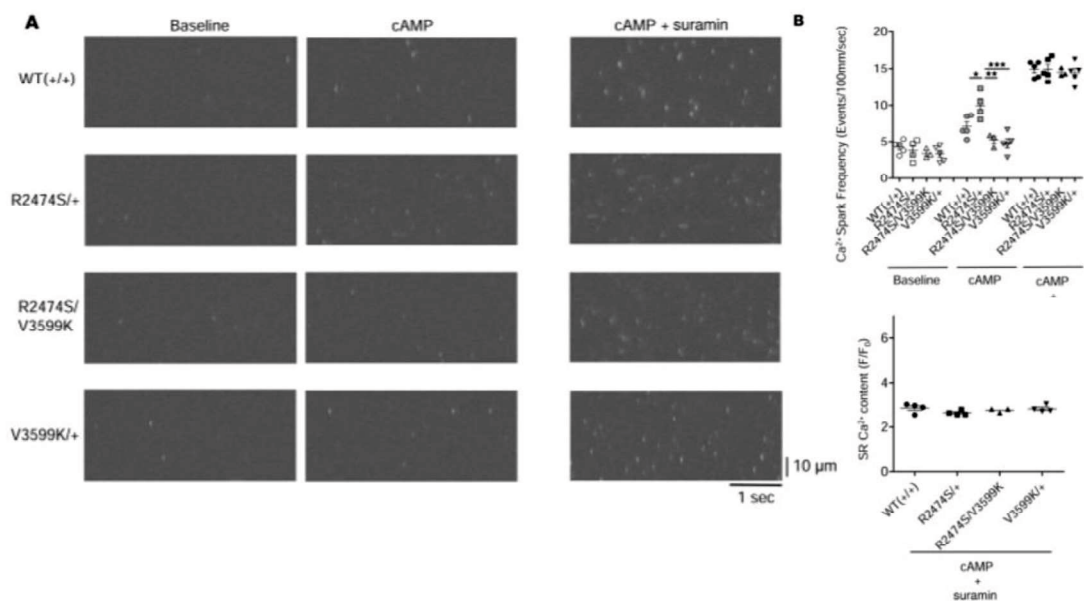


図 8 サポニン透過処理心筋細胞の Ca²⁺スパーク (A) fluo-4 AM 蛍光のラインスキャン記録(左)cAMP(1 μM)ありなしで外因性 CaM(100nM)の存在下 (右)cAMP(1 μM)とスラミン(10 μM)。(B)Ca²⁺スパーク頻度と SR Ca²⁺貯蔵量のまとめデータ。SR Ca²⁺貯蔵量測定には、20mM カフェイン付加による Ca²⁺トランジェントを測定した。個々のマウスのデータは平均±SEM をプロット。*p<0.05、**p<0.01、***P<0.001(一元配置分散分析と Tukey 多重比較検定)。3-5 心臓から 27-42 細胞。

5. 4 RyR2 への CaM 結合は R2474S/V3599K マウスで保たれていた

静止時の心筋細胞は総 CaM の約 1%のみが遊離し (18)、結合した CaM は Z line 上に高度に集中し、その CaM の 90%以上は RyR2 に結合している (17)。さらに、最近アンジオテンション II やフェニレフリンが Z line 上の CaM を G タンパク質共役受容体キナーゼ 5 と共に核内移行させ、ダントロレン (RyR2 安定化薬) が CaM の核内移行を妨げることを発見した。これらの所見に基づき、Z line 上の CaM と核内の CaM を調べ RyR2 への CaM の結合が ISO 存在下でも V3599K 変異によって維持されるかどうかを評価した。以前の報告で (10)、内因性 CaM は Z line 上の RyR2 とよく共局在していた (図 9)。ISO 負荷で Ser2808 リン酸化レベルは全群で同様に上昇していたが (補足図 6)、Z line 上の CaM は ISO 負荷後の R2474S ノック

クイン心筋細胞でのみ核内 CaM の増加と並行して減少し、R2474S/V3599K ノックイン心筋細胞では保たれていた (図 9)。これらのデータは、カテコラミン刺激による R2474S 関連チャネル障害時に RyR2 への CaM 結合が V3599K 変異の存在で保たれることを強く示唆している。

さらに、WT とノックインマウスの間で RyR2 に結合する CaM の動態に違いがあるかを調べるため、Alexa Fluor488 (Alexa-CaM) で蛍光標識した CaM をサポニン透過処理した WT および R2474S/+ノックインマウス心筋細胞に導入することで細胞内分画への CaM 結合を評価した。この方法により、外因的に導入された Alexa-CaM と RyR2 の免疫染色の蛍光シグナルがサルコメアに関連した周期的パターンを示し、CaM と RyR2 の両者の蛍光パターンが互いによく一致することを以前に確認を行った (参考文献 9 の図 2)。Yaug らの方法 (17) に従って、まずスラミン (10 μ M) で細胞を前処理し内因性 CaM を完全に排除し、Z line に沿った Alexa CaM (100 nM) 結合の時間経過を観察し、曲線の最大特異的結合 (Bmax) と τ を決定した (図 10)。R2474S/+心筋細胞でのみ cAMP 存在下で Alexa CaM 結合の Bmax が低下し τ には有意な変化はみられなかった。一方、cAMP の存在に関係なく、WT、R2474S/V3599K および V3599K/+心筋細胞の間に Bmax と τ に有意差はみられなかった。これらのデータは、RyR2 への CaM 結合親和性が R2474S 変異により低下し、V3599K 変異が低下した CaM 結合親和性を救済できるという概念を一貫してサポートしている。

外因性 CaM の RyR2 への直接結合も UV 架橋剤を CaM に結合させることで評価を行った。cAMP を介した Ser2808 リン酸化により、Ser2808 リン酸化レベルはすべての群で同様に上昇していた (補足図 7) が、RyR2 への CaM の結合親和性は R2474S/+ノックイン心臓で著しく低下し、R2474S/V3599K ノックイン心臓で回復した (図 11A)。RyR2 への CaM 結合の化学量論を半定量的に評価するため、スラミンを再度使用し、RyR2 から CaM を薬理的に解離させた (15-17)。まず、スラミンの濃度が RyR2 の 4 つのサブユニットすべてから CaM を完全に解離するのに十分であることを確認した。図 11B に示すようにスラミン (10 μ M) は WT

心臓の RyR2 への外因性 CaM の結合をほぼ完全に阻害した。次にノックインの心臓におけるスラミンの抑制効果を観察した。スラミンはリン酸化や突然変異に関係なくすべてのノックインマウスで RyR2 への外因性 CaM をほぼ完全に阻害した (図 11B および補足図 8)。

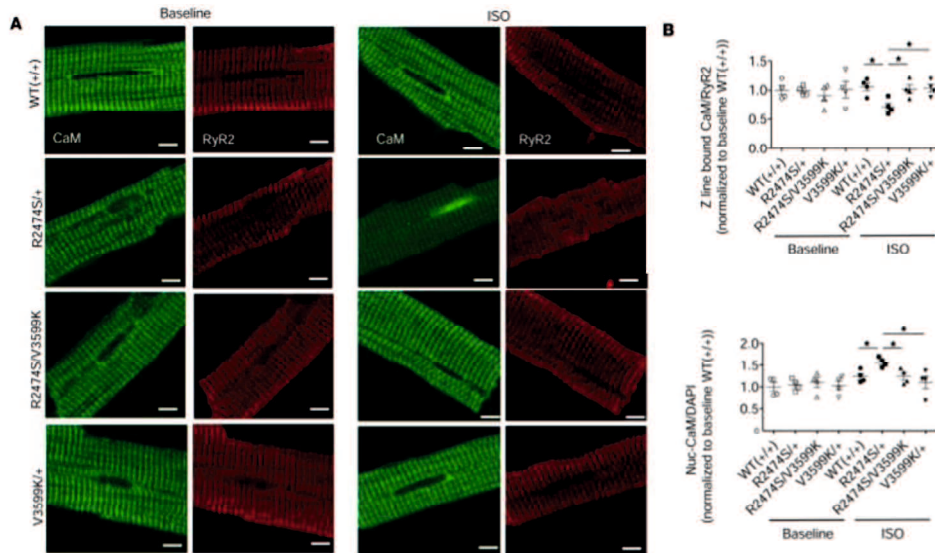
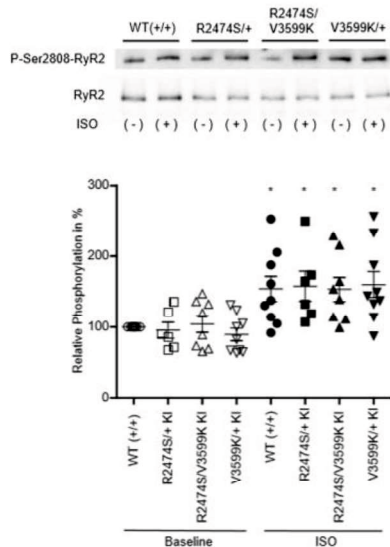


図 9 正常 WT および KI 心筋細胞における内因性 CaM の局在と結合特性 (A)WT 心筋細胞の RyR2 と共局在した内因性 CaM の代表像(左)ISO なし(右)ISO(10nM); CaM の免疫染色(緑); RyR2 の免疫染色(赤)。スケール:10 μ m。(B)Z ライン結合 CaM と核内 CaM のまとめ。Z ライン結合 CaM の免疫染色シグナルは RyR のシグナルで割り、WT のベースラインの平均を 1 とした比で表した。核内 CaM の免疫染色シグナルは DAPI のシグナルで割られ、WT のベースラインの平均を 1 とした比で表した。データは 4 心臓から得た 37-50 細胞の平均 \pm SEM で表された。* $p < 0.05$ (一元配置分散分析と Tukey 多重比較検定)。



補足図 6

Ser2808-RyR2(P-Ser2808-RyR2)のリン酸化レベルのアイソプロテレノール(ISO)の効果。ISO(10nM)存在下で KI および WT 心筋細胞は溶解バッファー内で反応させ遠心した。続いてクルードホモジネートを含む上清分画をリン酸化実験に使用した。ISO の存在にかかわらず WT と KI の心臓間には p-Ser2808-RyR2 レベルに大きな差はみられなかった。データは 4 心臓から得た平均 \pm SEM を表した。* $p < 0.05$ 対ベースライン (スチューデントの t 検定)

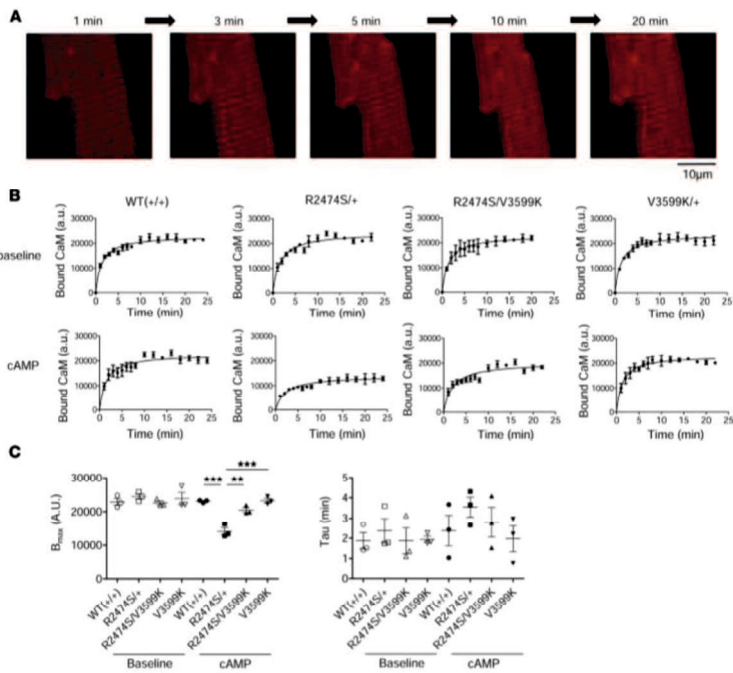
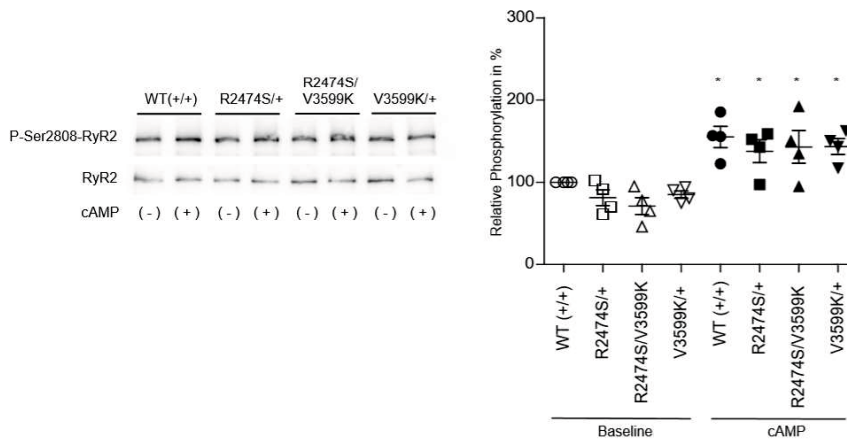


図 10 心筋細胞の Z ラインへの外因性 CaM の結合動態。(A) スラミン ($5 \mu\text{M}$) で前処理し洗い流した後、CaM と反応させ Alexa Fluor 488 (Alexa-CaM; 100nM) で蛍光標識したサボニン透過処理心筋細胞の共焦点画像。各画像は CaM との反応後の時間経過を表す。(B) cAMP ($1 \mu\text{M}$) 有無での心筋細胞の Z ラインに沿った Alexa-CaM 結合の時間経過。(C) B_{max} と τ の要約データ。個々のマウスのデータは平均 \pm SEM をプロット。** $p < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ (一元配置分散分析と Tukey 多重比較検定)。3 心臓から 4-6 細胞。



補足図 7 Ser2808-RyR2 (P-Ser2808-RyR2) のリン酸化レベルに対する cAMP の影響。cAMP ($1 \mu\text{M}$) とオカダ酸 ($1 \mu\text{M}$) の存在下で KI および WT 心臓ホモジネートを 0.15M NaCl 、 50mM MOPS 、 $0.1\% \text{CHAPS}$ を含むサンプル溶液中で $\text{pH} 6.8$ 、 22°C で 30 分間インキュベートし、続いて抗 P-Ser2808-RyR2 抗体でウエスタンブロットを行った。cAMP の存在に関係なく、WT と一連の KI 心臓の間の P-Ser2808-RyR2 のレベルに有意差はみられなかった。データは 4 心臓の平均 \pm SEM で表示した。

* < 0.05 vs ベースライン (スチューデントの t 検定)

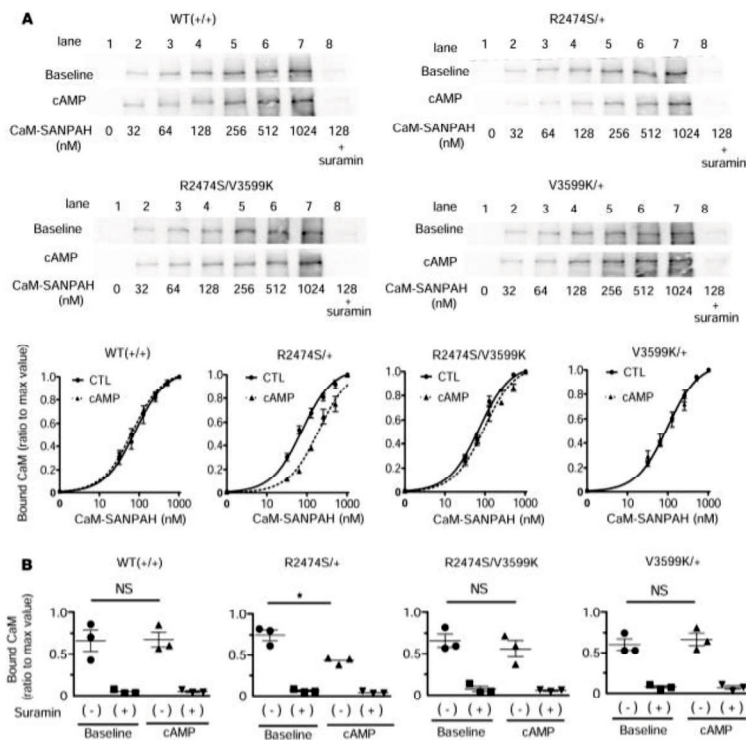
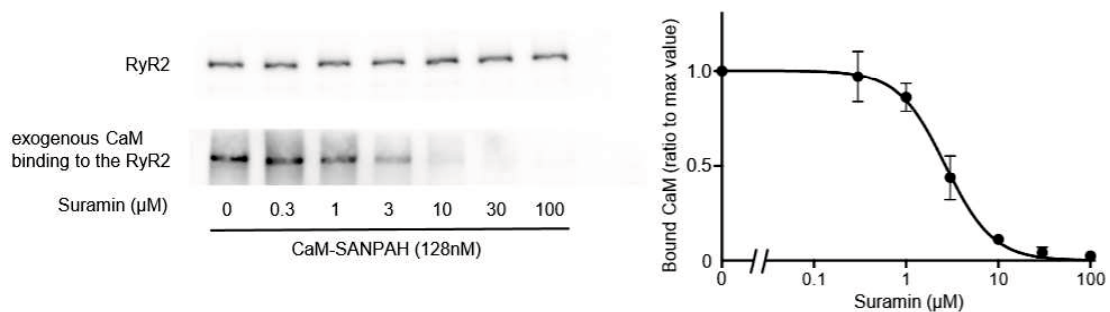


図 11 心臓ホモジネートの RyR2 への CaM 結合。(A) (上) RyR2 結合 CaM-SANPAH (光反応性架橋剤) の代表的なイムノプロット。WT および KI 心臓ホモジネートはまず結合バッファー (150mM KCl, 10 μ M CaCl₂, 20mM MES, pH 6.8) で希釈し、次にさまざまな濃度の CaM-SANPAH (32-1024 nM) と cAMP (1 μ M) およびオカダ酸 (1 μ M) ありなしで反応させた。RyR2 への CaM 結合は抗 CaM 抗体を用いたイムノプロットによって決定された。(下) CaM-SANPAH の濃度の関数としての RyR2 への CaM 結合の要約データ。CaM 結合は CaM の最大結合 (1024 nM) に対する比率で表された。データは 3 心臓の平均 \pm SEM で表された。(B) RyR2 への CaM 結合に対する cAMP (1 μ M) とスラミン (10 μ M) の効果。CaM-SANPAH の濃度は 128nM に固定された。データは 3 心臓の平均 \pm SEM で表された。* p < 0.05 ; NS, 有意差なし (スチューデントの t 検定)



補足図 8 WT 心臓の RyR2 への外因性 CaM 結合に対するスラミンの抑制効果。データは 3 心臓の平均 \pm SEM で示す。

6. 考察

これまでで、RyR2 の CaM 結合ドメイン内の単一アミノ酸置換で RyR2 への CaM 結合親和性が著しく強化され、SR からの Ca²⁺漏出が抑制され、CPVT を抑制することを実証した。

Liu らは最近、N 末端の Ca²⁺解離速度の低下と RyR2 不応性の延長を示す変異 CaM (GSH-M37Q) の遺伝子導入により異常な拡張期 Ca²⁺放出が減少しカルセクエストリン関連 CPVT モデルで不整脈が軽減したと報告した (20)。これらの発見は CPVT の病因において RyR2 調節に CaM が重要な役割であることを支持している。しかし、CaM は細胞内の他の多くのタンパク質と相互作用しさまざまな細胞機能を制御または作用するため、CaM と RyR2 の直接的な結合が本当に CPVT の病因において Ca²⁺動態を修飾するかどうかは明らかにされていない。このことに関して、本研究は CaM の結合親和性を高めるために CaM 自体でなく、RyR2 (V3599K) 内の CaM 結合部位にのみ単一アミノ酸置換が行われた点が重要である。したがって、オフターゲット効果を考慮することなく、CaM の RyR2 への結合が CPVT の表現型の抑制に不可欠であることを明確に示すことが可能である。

心不全および CPVT のような致死性不整脈における RyR2 機能障害を説明する主要な仮説の 1 つに N 末端 (N:1-600) と中央 (C:2000-2500) ドメインの連関障害 (4、5) でチャンネルが不安定化することがある。つまり、静止状態では RyR2 の N 末端と中央ドメインが相互作用して RyR チャンネルゲーティングに影響する調節スイッチとして機能する。「ドメインジッピング」と呼ばれる密なドメイン間相互作用はチャンネルを閉じた状態で安定させる。これらのドメイン間相互作用は RyR2 の N 末端または中央ドメインいずれの突然変異でも障害される可能性がある。この考えを支持して、3次元低温電子顕微鏡を使用してドメイン 5 内の N 末端領域がドメイン 6 内の中央領域と近接していることが報告され (21)、N 末端と中央の変異領域の相互作用はサブユニット間 (サブユニット内でなく) 相互作用であり (22)、Ser2808 の PKA リン酸化部位の 3次元位置はドメイン-ドメイン境界の近くに位置しており

(23)、これは PKA による Ser2808 のリン酸化が RyR2 の N 末端と中央領域のドメイン間相互作用、つまりチャネルのゲーティング特性に影響しうることを示唆している。実際、我々は PKA による Ser2808 のリン酸化は、CPVT モデル R2474S/+ノックインマウスでのみドメインアンジッピングと異常な Ca²⁺放出を生じることを以前報告している (6)。さらに最近、ドメインアンジッピングがアロステリック効果で RyR2 に結合した CaM の親和性を低下させ、それにより CPVT および心不全の根底にある共通の病態機序として異常な拡張期 Ca²⁺放出が引き起こされることを示した (10-13、24-26)。

上記の RyR2 に関連した CPVT の病態メカニズムに関する構造的背景に基づき、我々は R2474S 変異を含まないサブユニットに適応された単一アミノ酸置換 (V3599K) により CaM が R2474S 変異サブユニットから解離しない理由を説明する仮説モデルを提唱した (図 12)。WT または R2474S/V3599K ノックインマウスと R2474S/+ノックインマウスの心臓 (cAMP を含む) の CaM 結合度合いの差は、WT 心臓のスラミンの有無における差の約半分であったため (図 11B)、R2474S/+ノックインマウスの心臓では、R2474S 変異サブユニットで生じたドメイン間相互作用の障害、すなわちドメインアンジッピングが CaM の R2474S 変異サブユニットへの結合親和性をアロステリックに低下させ、その後 RyR2 から約半分の CaM を解離させることが示唆される。一方、R2474S/V3599K ノックインマウスの心臓では CaM の V3599K 変異サブユニットへの強力な結合により、サブユニット間の相互作用の障害が最小限に抑えられ、R2474S 変異サブユニットへの CaM 結合親和性の低下とそれに続く RyR2 からの CaM の解離を抑制する。この仮説モデルは、蛍光共鳴エネルギー移動法により得られたドメインスイッチと CaM 結合領域は異なるがアロステリックに (オルソステリックでなく) 相互作用するというこれまでの知見により支持されている (26)。

RyR2 の N 末端ドメイン (アミノ酸残基 600-610) に直接結合するダントロレンは、カテコラミン負荷 R2474S/+ノックインおよび心不全でドメインアンジッピング状態を回復し RyR2 へ

の CaM の再結合を誘導することで Ca²⁺リーク、DaD そして致死性不整脈を抑制する (6、9、11、27)。我々は CPVT 型ノックインマウスモデルを使用して、CPVT 患者で観察された CaM-like domain (CaMLD) 内の単一アミノ酸変異 (N4103K) が CaMLD と CaM 結合ドメイン (CaMBD) 間の強力な相互作用を引き起こし、CaMBD に対する CaM の親和性が低下し Ca²⁺漏出と致死的不整脈を引き起こすことを以前示した (28)。このノックインマウスモデルでは、ダントロレンは Ca²⁺漏出を抑制しなかったが、CaM の RyR への親和性増加 (GSH-CaM) は抑制した (28)。この概念は、欠陥のある N 末端と中央ドメインの相互作用 (アンジッピング) または欠陥のある CaMLD と CaMBD の相互作用によって RyR から CaM が解離することが Ca²⁺漏出につながる一般的な異常経路であり、異常な Ca²⁺漏出に対するダントロレンの治療効果は CaM 依存性であるという考えを支持している。この考えを支持して、Oo らは最近シングルチャンネル記録において、ダントロレンは生理的 CaM (100nM) を加えた後にのみ RyR1 および RyR2 の抑制を引き起こすが、CaM の非存在下では起こらなかったことが示された (29)。

本研究には限界がある。自然交配により RyR2 の同じサブユニットに二重変異 (R2474S と V3599K) を作成することは不可能であった。したがって、同じサブユニット内の二重変異が実際にチャンネルの安定性を回復するかを明らかにするにはさらなる研究が必要である。

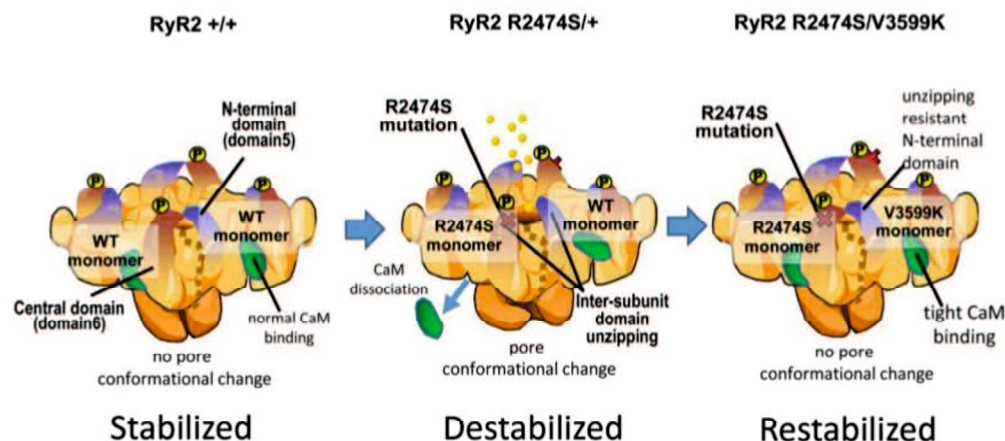


図 12 RyR2 の V3599K 置換がチャンネルを安定化させ、Ca²⁺漏出から保護するメカニズムの概略図。 R2474S 変異サブユニットでのドメインアンジッピングは、グローバルなサブユニット間相互作用を起こし、R2474S 変異サブユニットへの CaM 結合親和性をアロステリックに低下させ、RyR2 に結合した CaM の約半分が解離するが、R2474S/V3599K KI 心臓では、V3599K 変異サブユニットの安定性により、想定されるグローバルサブユニット間相互作用とそれに続くドメインアンジッピングが最小限に抑えられ、残りの R2474S 変異サブユニットに対する CaM の結合親和性の低下とそれに続く RyR2 からの CaM の解離が抑制される。

7. 結語

RyR2 の CaM 結合親和性の強化は CPVT 関連不整脈の抑制に不可欠である。したがって、CaM は RyR2 チャンネル機能の内因性の安定化剤として作用する可能性があり、CaM の RyR2 への親和性増加は心不全や致死性不整脈の強力な治療標的となりうる。

8. 謝辞

本研究の遂行および論文作成に際し、ご指導、ご鞭撻を賜りました山口大学大学院医学系研究科 器官病態内科学 矢野雅文教授に感謝申し上げます。また、指導教官として終始ご指導いただいた山口大学大学院医学系研究科 保健学系学域 病態検査学 山本健教授に深謝の意を表します。本研究では多くの先生方や実験助手の方々にデータ収集にご協力いただきました。ここに改めて感謝いたします。

9. 参考文献

1. Yano M, Yamamoto T, Kobayashi S, Matsuzaki M. Role of ryanodine receptor as a Ca²⁺(+) regulatory center in normal and failing hearts. *J Cardiol*. 2009;53(1):1-7.
2. Bers DM. Macromolecular complexes regulating cardiac ryanodine receptor function. *J Mol Cell Cardiol*. 2004;37(2):417-429.
3. Priori SG, Chen SR. Inherited dysfunction of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ handling and arrhythmogenesis. *Circ Res*. 2011;108(7):871-883.
4. Yano M, Yamamoto T, Ikeda Y, Matsuzaki M. Mechanisms of Disease: ryanodine receptor defects in heart failure and fatal arrhythmia. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2006;3(1):43-52.
5. Ikemoto N, Yamamoto T. Regulation of calcium release by interdomain interaction within ryanodine receptors. *Front Biosci*. 2002;7:d671-d683.
6. Uchinoumi H, et al. Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia is caused by mutation-linked defective conformational regulation of the ryanodine receptor. *Circ Res*. 2010;106(8):1413-1424.
7. Oda T, et al. Defective regulation of interdomain interactions within the ryanodine receptor plays a key role in the pathogenesis of heart failure. *Circulation*. 2005;111(25):3400-3410.
8. Yamamoto T, et al. Identification of target domains of the cardiac ryanodine receptor to correct channel disorder in failing hearts. *Circulation*. 2008;117(6):762-772.
9. Kobayashi S, 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(21):1993-2005.
10. Xu X, 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(3):660-666.
 11. Ono M, et al. Dissociation of calmodulin from cardiac ryanodine receptor causes aberrant Ca(2+) release in heart failure. *Cardiovasc Res.* 2010;87(4):609-617.
 12. Fukuda M, et al. Enhanced binding of calmodulin to RyR2 corrects arrhythmogenic channel disorder in CPVT-associated myocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014;448(1):1-7.
 13. Hino A, et al. Enhanced binding of calmodulin to the ryanodine receptor corrects contractile dysfunction in failing hearts. *Cardiovasc Res.* 2012;96(3):433-443.
 14. 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(5):1344-1353.
 15. Papineni RV, O'Connell KM, Zhang H, Dirksen RT, Hamilton SL. Suramin interacts with the calmodulin binding site on the ryanodine receptor, RYR1. *J Biol Chem.* 2002;277(51):49167-49174.
 16. Hill AP, Kingston O, Sitsapesan R. Functional regulation of the cardiac ryanodine receptor by suramin and calmodulin involves multiple binding sites. *Mol Pharmacol.* 2004;65(5):1258-1268
 17. Yang Y, et al. Cardiac myocyte Z-line calmodulin is mainly RyR2-bound, and

- reduction is arrhythmogenic and occurs in heart failure. *Circ Res.* 2014;114(2):295-306.
18. Wu X, Bers DM. Free and bound intracellular calmodulin measurements in cardiac myocytes. *Cell Calcium.* 2007;41(4):353-364.
 19. Oda T, et al. Nuclear translocation of calmodulin in pathological cardiac hypertrophy originates from ryanodine receptor bound calmodulin. *J Mol Cell Cardiol.* 2018;125:87-97.
 20. Liu B, et al. Gene transfer of engineered calmodulin alleviates ventricular arrhythmias in a calsequestrin-associated mouse model of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *J Am Heart Assoc.* 2018;7(10):e008155.
 21. Wang R, et al. Localization of an NH₂-terminal disease-causing mutation hot spot to the “clamp” region in the three-dimensional structure of the cardiac ryanodine receptor. *J Biol Chem.* 2007;282(24):17785-17793.
 22. Liu Z, et al. Dynamic, inter-subunit interactions between the N-terminal and central mutation regions of cardiac ryanodine receptor. *J Cell Sci.* 2010;123(pt 10):1775-1784.
 23. Meng X, et al. Three-dimensional localization of serine 2808, a phosphorylation site in cardiac ryanodine receptor. *J Biol Chem.* 2007;282(35):25929-25939.
 24. Uchinomi H, et al. CaMKII-dependent phosphorylation of RyR2 promotes targetable pathological RyR2 conformational shift. *J Mol Cell Cardiol.* 2016;98:62-72.
 25. Oda T, et al. 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.

26. Oda T, et al. In cardiomyocytes, binding of unzipping peptide activates ryanodine receptor 2 and reciprocally inhibits calmodulin binding. *Circ Res.* 2013;112(3):487-497.
27. Kobayashi S, et al. Dantrolene, a therapeutic agent for malignant hyperthermia, inhibits catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia in a RyR2(R2474S/+) knock-in mouse model. *Circ J.* 2010;74(12):2579-2584.
28. Nishimura S, et al. Mutation-linked, excessively tight interaction between the calmodulin binding domain and the C-terminal domain of the cardiac ryanodine receptor as a novel cause of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Heart Rhythm.* 2018;15(6):905-914.
29. Oo YW, et al. Essential role of calmodulin in RyR inhibition by dantrolene. *Mol Pharmacol.* 2015;88(1):57-63.

この学位論文は

Nakamura Y, Yamamoto T, Kobayashi S, et al. Ryanodine receptor-bound calmodulin is essential to protect against catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *JCI Insight.* 2019; 4(11): e126112. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.126112> に原著論文として発表したものからデータを引用して作成した。