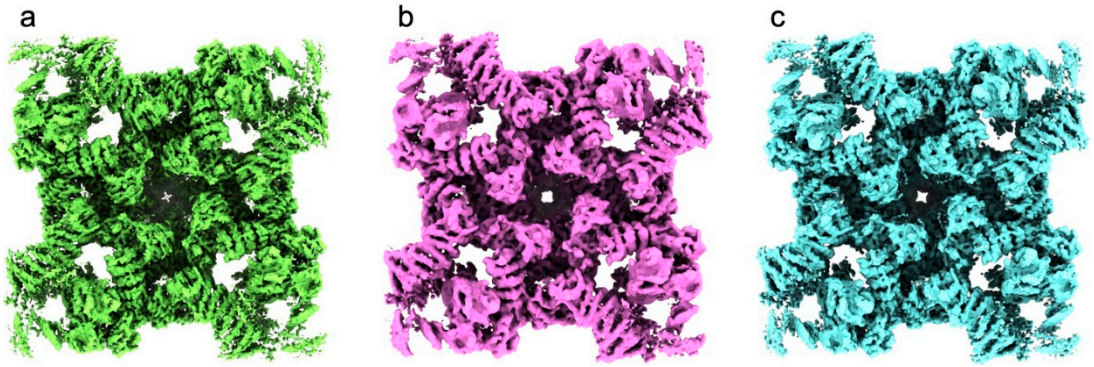
17　リアノジン受容体の疾患発症機構の構造的解明	小川　治夫

【目的】2 型リアノジン受容体（RyR2）は、心筋の筋小胞体に局在する超巨大な小胞体 Ca^{2+}チャネルである（総分子量 2.2 MDa）。活動電位によって細胞外から細胞質へ流入した Ca^{2+}が RyR2 に結合することで RyR2 が開口し、筋小胞体に蓄えられた Ca^{2+}が瞬時に細胞質内へ大量に放出され心筋の収縮が起こる。RyR2 の遺伝子変異は 300 箇所以上報告されており、致死的な不整脈疾患としても知られるカテコラミン誘発多形心室頻脈（CPVT）等の原因としても知られているため、RyR2 は不整脈疾患の標的分子としても注目を集めている。我々は長年 RyR の機能・構造解析に取り組み、2022 年についにクライオ電子顕微鏡法（cryo-EM）による「閉じた状態（Ca^{2+}無し）」と「開いた状態（Ca^{2+}有り）」の構造の高分解能での構造解析に成功した。徹底的な機能解析実験を組み合わせることで、RyR2 の Ca^{2+}結合による開口機構を原子レベルで明らかにすることに世界で初めて成功した。更に Ca^{2+}が結合してもチャネルが開口できない「機能欠失型の変異体」の構造解析も行うことで、変異がチャネル開口に及ぼす機構の解明に大きく前進した。その一方で「機能亢進型の変異体」が機能を亢進する機構については不明点が多く、その高分解能での構造情報が期待されていたので、これを本研究の最終目標とした。

【方法】我々がこれまでに培ってきた HEK293 細胞による大量発現・精製系を用いて機能亢進型変異を持つ RyR2 の試料調製を行った。大量生産は樹立した RyR2 を大量発現する細胞株を 150 mm の細胞培養ディッシュ 60 枚で定常的に培養を行った。細胞を回収しミクロソームを単離後、変異 RyR2 を界面活性剤で可溶化し、RyR2 に特異的に結合する FKBP12.6 を利用したアフィニティークロマトグラフィーにより精製を行った。精製標品は濃縮し、EGTA または $CaCl_2$を加えることでチャネルを閉状態または開状態に固定した。その後液体エタンで急速凍結し、クライオ電顕による movie の撮影を行った。撮影した movie の解析を行い、3 次元再構成を行い、得られた密度マップをもとに原子モデルを構築し、構造精密化を行うことで最終構造を得た。

【結果】膜貫通ヘリックス S4 上部に位置する F4749A と Ca^{2+}の結合に関与する CTD に位置する F4888A と変異箇所の異なる 2 種類の機能亢進変異体の発現・精製に成功した。濃縮した精製標品をクライオ電顕で観察し、F4749A 変異体については EGTA 存在下で 5,085 枚、Ca^{2+}存在下で 4,680 枚を、F4888A では EGTA 存在下で 5,238 枚、Ca^{2+}存在下で 2,007 枚の movie の撮影を行った。解析プログラム CryoSPARC を用いて、分解能が 3〜4 Åとアミノ酸側鎖を十分解像可能な分解能での 3 次元密度マップを再構築することに成功した。得られた密度マップをもとに原子モデルを構築し、構造精密化を行った。

クライオ電顕で解析された RyR2 機能亢進変異体の密度マップ



17. リアノジン受容体の疾患発症機構の構造的解明

小川　治夫

京都大学 大学院薬学研究科 構造生物薬学分野

Key words：リアノジン，リアノジン受容体，イオンチャネル，膜タンパク質，クライオ電子顕微鏡

緒　言

2 型リアノジン受容体（RyR2）は、心筋の筋小胞体に局在する超巨大な小胞体 Ca^{2+}チャネルである（総分子量 2.2 MDa）。活動電位によって細胞外から細胞質へ流入した Ca^{2+}が RyR2 に結合することで RyR2 が開口し、筋小胞体に蓄えられた Ca^{2+}が瞬時に細胞質内へ大量に放出され心筋の収縮が起こる。RyR2 の遺伝子変異は 300 箇所以上報告されており、致死的な不整脈疾患としても知られるカテコラミン誘発多形心室頻脈（CPVT）等の原因としても知られているため、RyR2 は不整脈疾患の標的分子としても注目を集めている。だが、「Ca^{2+}のような小さな分子が、一体どのように 6 万倍も大きな超巨大分子 RyR2 を制御しイオンを通す穴を開くか？」や、「疾患変異がチャネル構造へ与える影響」という点についてはこれまで謎のままであった。そのため、RyR2 を原因とする不整脈疾患の効果的な診断や、治療のための創薬への展開は困難を極めていた。我々は長年 RyR の機能・構造解析に取り組み［1〜4］、2022 年についにクライオ電子顕微鏡法（cryo-EM）による「閉じた状態（Ca^{2+}無し）」と「開いた状態（Ca^{2+}有り）」の構造の高分解能での構造解析に成功した（図 1）。徹底的な機能解析実験を組み合わせることで、RyR2 の Ca^{2+}結合による開口機構を原子レベルで明らかにすることに世界で初めて成功した［5］。更に Ca^{2+}が結合してもチャネルが開口できない「機能欠失型の変異体」の構造解析も行うことで、変異がチャネル開口に及ぼす機構の解明に大きく前進した。その一方で「機能亢進型の変異体」が機能を亢進する機構については不明点が多く、その高分解能での構造情報が期待されていた。そこで本研究では機能亢進型の変異体である F4749A と F4888A について cryo-EM での解析を行った。

方　法

1. RyR2 の大量発現・精製

タンパク質の立体構造解析には大量の精製タンパク質が必要となる。RyR2 の精製標品は豚の心臓から抽出・精製することで得ることは可能であるが、この手法では原理的には任意の精製変異体を得ることは不可能である。そこで、本研究では我々がこれまでに培ってきた HEK293 細胞による大量発現・精製系を用いた。マウス RyR2（野生型または変異体）を安定発現する細胞株を構築し、これを用いることで大量発現を行った。変異箇所の異なる 2 種類を選んだ。Ca^{2+}チャネルの過剰発現は即細胞死に繋がるため、テトラサイクリンで発現誘導が可能な Flp-In T-REx HEK293 細胞（Thermo Fisher）を用いた。細胞株の樹立は製造元のマニュアルに従った。得られた細胞株から幾つかのクローンを選別し、更にウェスタンブロッティングで高発現株を選んだ。大量生産は確立した細胞株を 150 mm の細胞培養ディッシュ 60 枚で定常的に培養を行った。培養開始から 70〜80%コンフルエントになった時点で、2 μg/mL のドキシサイクリン（SIGMA）で発現を誘導し、48 時間後に細胞の回収を行った。発現した RyR2 は回収細胞のミクロソームに局在するので、その後、Inesi らの記載［6］に従ってミクロソームの調製を行った。

RyR2 を高発現したミクロソーム RyR2 からの RyR2 の可溶化・精製は、RyR2 を特異的に結合する FKBP-FKBP12.6 を用いたアフィニティークロマトグラフィー［7］により行った。まず界面活性剤 CHAPS を用いて RyR2 をミクロソームから抽出後、超遠心を行うことで可溶化された RyR2 を得た。FKBP12.6 に SBP タグが融合した SBP-FKBP12.6 融合タンパク質を予め大腸菌で発現・精製し、これを RyR2 と結合させた。その後、この RyR2_SBP-FKBP12.6 複合

体を StrepTrap HP カラムに結合させ、界面活性剤を Tween-20 へ置換後に D-デスチオビオチンで溶出させることで精製を行った。

2. cryo-EM 試料調製とデータ収集

RyR2 精製標品を最終的に～5 mg/mL に濃縮した。EGTA（最終濃度 1 mM）または $CaCl_2$（最終濃度 100 μM）を濃縮タンパク質サンプルに添加し、チャネルを閉状態または開状態に固定した。濃縮した精製標品を電顕の試料支持のためのグリッドに添加し余分な水分を除去後、液体エタンで急速凍結した。凍結試料は東京大学医学部に設置の加速電圧 300 kV の Titan Krios G3i cryo-EM を用いて movie の撮影を行った。F4749A 変異体については倍率 105,000 倍、撮影の際の総電子線量は 60 $e^-/Å^2$で、F4888A 変異体については倍率 81,000 倍、撮影の際の総電子線量は 48 $e^-/Å^2$で撮影を行った（表 1）。

3. データの解析とモデル構築・構造精密化

全ての解析は解析ソフト CryoSPARC によって行った。まず撮影した各 movie を内装プログラムである Patch Motion Correction で撮影の際のブレの補正を行い、各 movie のコントラスト伝達関数（CTF）から得られるデフォーカス値を内装プログラムである Patch CTF で推定し、分解能の基準が一定以上の movie を選別後、以前決定した野生型の構造をテンプレートとして movie から RyR2 粒子の自動ピッキングによる抽出と切り出しを行った。切り出した粒子は「2 次元平均化とそれに基づくクラス分け」と「良質な 2 次元平均像の選別」という一連の操作を繰り返すことで良質な粒子を選び出した。3 次元密度マップの再構成を行い、精密化、デフォーカス値の精密化、3 次元クラス分けを繰り返すことで、最終的な 3 次元密度マップの再構成を行った。得られた 3 次元密度マップへのモデリングはモデリングソフト COOT を用いて行った。得られたモデルの構造精密化は構造精密化のプログラム Refmac/Servalcat もしくは PHENIX を用いて行った。

結果および考察

1. RyR2 機能亢進型変異体の cryo-EM による解析

機能亢進変異体として、S4 上部に位置する F4749A と CTD に位置する F4888A と変異箇所の異なる 2 種類を選択した。タンパク質の立体構造解析には大量の精製タンパク質が必要となる。そこで、HEK293 を用いた独自発現・精製系を用いることで、これら 2 種類の変異体の大量発現・精製に成功した。濃縮した精製標品をクライオ電顕で観察し、F4794A 変異体については倍率 105,000 倍、F4888A については倍率 81,000 倍で撮影した（表 1）。

表 1. 解析に関するデータのまとめ

変異体	状態	倍率	dose ($e^-/Å^2$)	movie数	2D class分け後 particles数	3D class分け 別れた構造	3D class分け後 particles数
F4749A	EGTA	81,000	60	5,085	59,480	閉構造	35,669
						開構造	22,909
F4749A	Ca^{2+}	81,000	60	4,680	77,451	開構造	73,852
F4888A	EGTA	105,000	48	5,238	94,627	閉構造	66,141
						開構造	25,669
F4888A	Ca^{2+}	105,000	48	2,007	37,951	開構造	29,991

Cryo-EM の構造解析における各パラメータ

それぞれの movie の撮影枚数は、F4749A 変異体の EGTA 存在下で 5,085 枚、Ca^{2+}存在下で 4,680 枚を、F4888A の EGTA 存在下で 5,238 枚、Ca^{2+}存在下で 2,007 枚であった（表 1）。F4888A の EGTA 存在下の画像を典型例として示す（図 1a）。

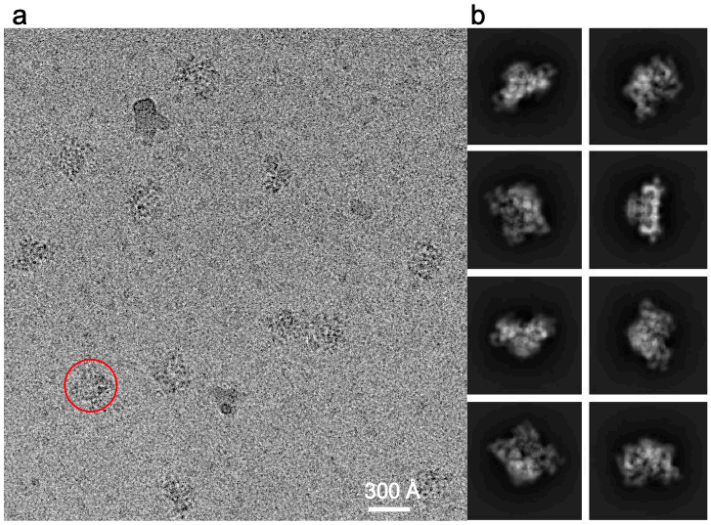


図 1. Cryo-EM による構造解析の典型例

a） F4888A の EGTA 存在化での電顕写真。1 辺 300Å程度の RyR2 分子がさまざまな方向を向いていることが分かる。赤丸で囲んだ部分は典型的な分子例。スケールバー：300Å。

b） 2 次元クラス分けの一例。さまざまな方向への明瞭な投影像が得られていることから、3 次元再構成が可能であると判断できる。

それぞれの movie は解析プログラム CryoSPARC で解析を行った。典型例として F4888A の EGTA 存在下での 2 次元クラス分けを示した（図 1b）。次に 2 次元クラス分け像から良質なクラスを選別した。F4749A の EGTA 存在下では 59,480 個の切り出された画像（particle）を、Ca^{2+}存在下では 77,451 個の particle を得た。また、F4888A の EGTA 存在下では 94,627 個の particle を、Ca^{2+}存在下では 37,951 個の particle を得た（表 1）。その後、これらの particle を用いることで、それぞれの 3 次元密度マップの再構成を行い、精密化を行った。それぞれ分解能が 3〜4Åとアミノ酸側鎖を十分解像可能な分解能での 3 次元密度マップを再構築することに成功した（図 2）。

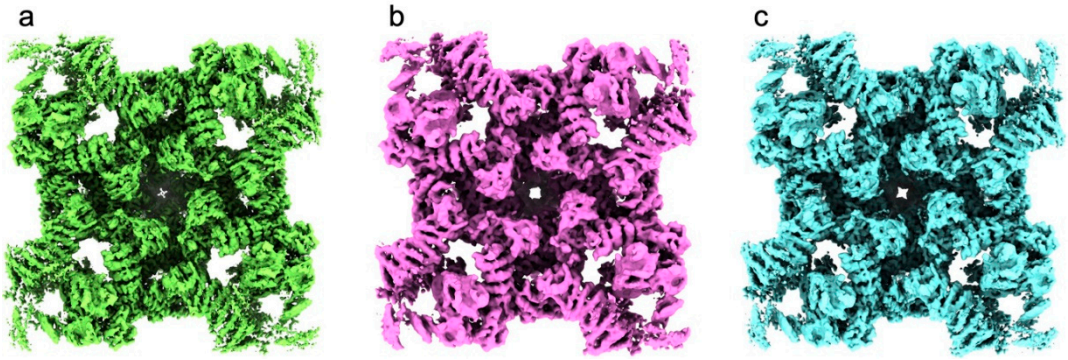


図 2. 3 次元再構成された密度マップ（F4888A）

a） EGTA 存在化での閉構造。中央の pore は閉じている。

b） EGTA 存在化にもかかわらず得られた開構造。中央の pore が開いている。

c） Ca^{2+}存在化での開構造。中央の pore が開いている。

2. 3次元クラス分けから得られた結果

興味深いことに、F4749A においても F4888A においても EGTA 状態では、3D クラス分けを行うことで、2 つのクラスに分けることができ、Ca^{2+}結合型の構造も得られた（表 1、図 2）。このような結果は野生型の EGTA 存在下の解析では見ることができなかったことである。本研究で用いた機能亢進型変異体はどちらも Ca^{2+}感受性が増大する[5]。そのために、EGTA 存在下にもかかわらず試料中にわずかに残った Ca^{2+}が RyR2 に結合し易くなっていたのかもしれない。

3. 今後

現在、構築した密度マップを基に全ての変異体の原子モデルを構築し、構造精密化を進めている段階である。得られた原子モデルを、既に構造が決定されている野生型の閉状態、開状態の原子モデル［5］と比較することにより、RyR2 において機能亢進が生じる機構を明らかにしたいと考えている。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、順天堂大学医学部薬理学研究室の村山尚先生と呉林なごみ先生である。

文　献

1） Ogawa H, Kurebayashi N, Yamazawa T, Murayama T. Regulatory mechanisms of ryanodine receptor/Ca^{2+} release channel revealed by recent advancements in structural studies. J Muscle Res Cell Motil. 2021 Jun;42(2):291-304. doi: 10.1007/s10974-020-09575-6. Epub 2020 Feb 10.PMID: 32040690

2） Yamazawa T, Ogawa, H, Murayama T, Yamaguchi M, Oyamada H, Suzuki J, Kurebayashi N, Kanemaru K, Oguchi K, Sakurai T, Iino M. Insights into channel modulation mechanism of RYR1 mutants using Ca^{2+} imaging and molecular dynamics. J Gen Physiol. 2020 Jan 6;152(1):e201812235. doi: 10.1085/jgp.201812235. PMID: 31841587

3） Murayama T, Ogawa H, Kurebayashi N, Ohno S, Horie M, Sakurai T. A tryptophan residue in the caffeine-binding site of the ryanodine receptor regulates Ca^{2+} sensitivity. Commun Biol. 2018 Jul 23:1:98. doi: 10.1038/s42003-018-0103-x. eCollection 2018. PMID: 30271978

4） Murayama T, Kurebayashi N, Ishigami-Yuasa M, Mori S, Suzuki Y, Akima R, Ogawa H, Suzuki J, Kanemaru K, Oyamada H, Kiuchi Y, Iino M, Kagechika H, Sakurai T. Efficient High-Throughput Screening by Endoplasmic Reticulum Ca^{2+} Measurement to Identify Inhibitors of Ryanodine Receptor Ca^{2+}-Release Channels. Mol Pharmacol. 2018 Jul;94(1):722-730. doi: 10.1124/mol.117.111468. Epub 2018 Apr 19. PMID: 29674523

5） Kobayashi T, Tsutsumi A, Kurebayashi N, Saito K, Kodama M, Sakurai T, Kikkawa M, Murayama T, Ogawa H. Molecular basis for gating of cardiac ryanodine receptor explains the mechanisms for gain- and loss-of function mutations. Nat Commun. 2022 May 20;13(1):2821. doi: 10.1038/s41467-022-30429-x.PMID: 35595836

6） Eletr S., Inesi G. Phospholipid orientation in sarcoplasmic membranes: spin-label ESR and proton MNR studies. Biochim Biophys Acta. 1972 Sep 1;282(1):174-9. doi: 10.1016/0005-2736(72)90321-5. PMID: 4341786

7） Cabra V, Murayama T, Samsó M. Ultrastructural analysis of self-associated RyR2s. Biophys J. 2016 Jun 21;110(12):2651-2662. doi: 10.1016/j.bpj.2016.05.013. PMID: 27332123