

【筋生理の集い】

CICR (Ca^{2+} 誘発性 Ca^{2+} 遊離) とリアノジン受容体

小 川 靖 男

順天堂大学医学部薬理学教室

(受付 2020 年 3 月 26 日)

CICR(Ca^{2+} INDUCED Ca^{2+} RELEASE) AND RYANODINE RECEPTOR

Yasuo OGAWA

Department of Pharmacology, Juntendo University School of Medicine

A hypothesis that ryanodine binds CICR channels under the open state, keeping them open is widely accepted. In this review, this hypothesis is confirmed by experiments of CICR with skinned skeletal muscle fibers and [^3H]ryanodine binding to SR vesicles and purified ryanodine receptor isoforms(RyR1 and RyR3). Although there is no difference in ryanodine binding activity between the two purified isoforms, RyR1 *in situ*, however, remains depressed with a decreased affinity to ryanodine, where CHAPS sensitive intra- and inter-molecular interactions may be involved. These interactions could play an important roles in the etiology of malignant hyperthermia as well as in Ca^{2+} release on depolarization. (Tokyo Jikeikai Medical Journal 2020;135:53-7)

Key words : CICR, RyR1, RyR3, CHAPS, ryanodine, affinity for ryanodine

東京大学医学部薬理学教室に大学院学生として入室した1965年, 研究テーマについてのディスカッションで, 江橋節郎教授は「骨格筋の収縮—弛緩は Ca^{2+} 濃度変化で調節されることは間違いなし. しかしこれを確定するためには筋弛緩速度が筋小胞体の Ca^{2+} 取り込み速度で説明されなければならない. それには名古屋大学理学部所属の大西勁先生が作られた二波長分光光度計を用いてmurexideを Ca^{2+} 指示薬として Ca^{2+} 取り込み速度を経時的に測定する事だが, この二波長分光光度計の動作が不安定なので改良する必要がある. また, Ca^{2+} 遊離機構の研究も大事である. 多くの研究者は Ca^{2+} 取り込みが止まれば Ca^{2+} 遊離が起これと考えているが, Ca^{2+} 遊離と Ca^{2+} 取り込みとは全く独立な現象である. それはNa-channelとNa-pumpとの関係を見れば明らかであろう」と言われました. 本稿では Ca^{2+} 遊離機構, 特に Ca^{2+} 誘発性 Ca^{2+} 遊離(CICR)に主題を絞ります.

二波長分光光度計の改良に2, 3年苦戦していましたが, なんとか安定してデータが採れるようになった頃, 遠藤先生からこの二波長分光光度計を用いてcaffeine作用時のskinned fiberによる張力発生とmedium中の Ca^{2+} 濃度変化を同時測定したいとの提案があり, 実験をお手伝いいたしました. CICRについてのNature, 228, 34-36, 1970の論文¹⁾に共著者として参加でき, 誇りに思います.

リアノジンは南米トリニダード島に自生するヤナギ科の低木Ryaniaの幹, 根に存在するアルカロイドです. 動物がこの植物を食するとゆっくりと発生し不可逆的に進行する強い筋拘縮を起こす薬理作用で有名ですが, 他方では種々の誘導体が多数存在し, 分離精製が困難であることでもよく知られておりました²⁾. 和光純薬から「純品のリアノジン」との謳い文句で売り出されましたのでHPLCで分析し, 他の市販品とも比較検討いたしました²⁾ (Fig. 1). 確かに和光純薬からのものがシングル

ピークで、純品であることが確かめられました。NENの $[^3\text{H}]$ ryanodineの放射活性のピークも一致いたしました。従って実験にはnonradioactiveなcoldな試薬としては和光純薬のものを、radioactiveな試薬としてはNENのものをを使うのが必須です。純品は水に良く溶けます。不純物が混入しているFig. 1の上段の試薬は水に不溶でした。

Fig. 2はEndoの方法によりカエル骨格筋スキンドファイバーのCICR活性を種々の条件下で測定した呉林らの結果です²⁾。Ca²⁺単独 (Δ) では僅かな活性ですが、5 mM caffeine (\square) が存在するとCa²⁺感受性の増加とともにピーク値も増加します [左側の縦軸目盛り]。一方4 mM AMP存在下 (\circ) ではCa²⁺感受性は変わらないがピーク値は著しく増加いたします [右縦軸, 10倍強度の目盛り]。ADP, AMPPCP (非分解性ATPアナログ) ではもっとも活性ピーク値が増大いたします。Caffeineとアデニンヌクレオチドが共存すると (\bullet) 顕著な増強 (potentiation) が見られます。

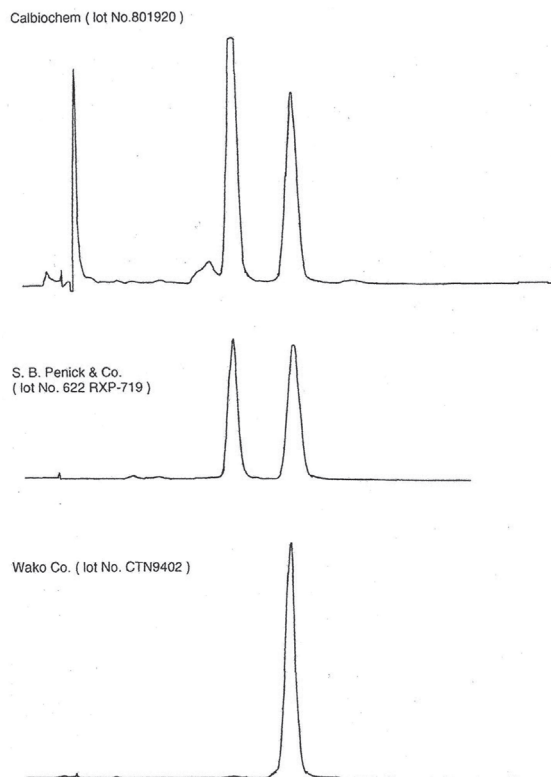


Fig. 1. HPLC analysis of ryanodines from various sources

リアノジンは開状態のCICR channelに結合し、開状態に保つといわれております。そこでカエル骨格筋から調製した筋小胞体画分へのリアノジン結

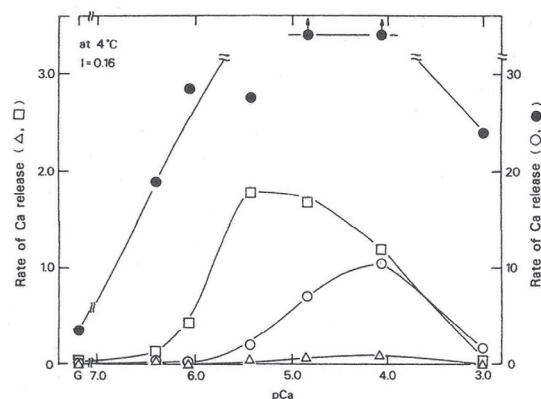


Fig. 2. Ca²⁺ induced Ca²⁺ release in skinned frog iliofibularis muscle fibers.

Δ , Ca²⁺ alone buffered by 10 mM Ca-EGTA; \square , 5 mM caffeine added; \circ , 4 mM AMP added; \bullet , 4 mM AMP + 5 mM caffeine added. Closed circles with arrows mean that the rate of Ca²⁺ release was too fast to be determined. "G" means that 10 mM EGTA was added in the absence of Ca added. Note that the scale in the right-hand ordinate is greater by a factor of 10 in the presence of AMP (\circ , \bullet).

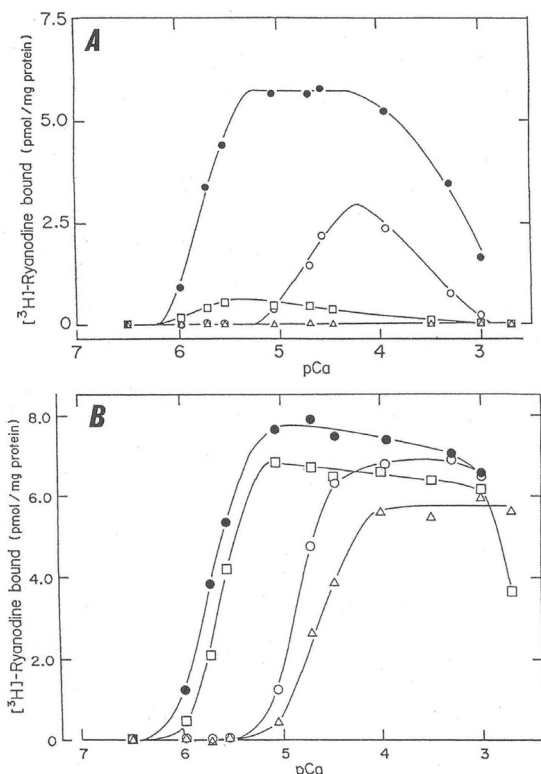


Fig. 3. $[^3\text{H}]$ Ryanodine binding to HFSR from bullfrog skeletal muscle in 0.17 M KCl (A) and 1 M NaCl (B) at 25°C. Symbols correspond to those in Fig. 2.

合をスキンドファイバー実験に対応した0.17 M KCl mediumで測定いたしました (Fig. 3A)²⁾. Ca^{2+} 単独 (Δ) では有意なリアノジン結合は認められませんでした, caffeine (\square), AMPPCP (\circ), 両者共存時の potentiation (\bullet) は良く対応いたします. 一方, 多くの欧米の研究者は1 M KClまたはNaClを含むmediumで測定をしておりますので, 1 M NaCl存在下での結合実験結果をFig. 3Bに示しました²⁾. KClでも同じ結果です. 他の研究者による既報の結果とも一致いたします. 高塩濃度下でのスキンドファイバーによる張力発生の再現性に問題がありますのでFig. 2に対応したCICR活性の正確な結果は得られませんが呉林によると大雑把にはFig. 3Bの結果とは矛盾しないということです. なぜこのような高塩濃度下で実験したのか分かりませんが, Ca^{2+} 単独での効果が明確に見られることがポイントと推定されます. いずれにしても実験条件により結果が大きく変化しますので評価する場合注意が必要です.

Fig. 4にClara Franzini-Armstrongらによるtoadfish (アンコウの類い) の発音器官としての鰾におけるtriadの電子顕微鏡像模式図を示します³⁾. 発音時には収縮弛緩を非常に早く繰り返すそうです. 仄聞によれば潜水艦内では不気味な音に聞こえるということです. 筋小胞体膨大部の細胞質側表面 (parajunctional surface) には無数の Ca^{2+} -ATPase 蛋白が密集しております. 他方T管に接した筋小胞体膜 (junctional surface) には一辺が約30 nmの菱形をした粒子が2列縦隊に並んでおり, これをfootと呼んでおります. これに対するT管膜にはtetradと呼ぶ粒子が一つ置きのfootに対置してお

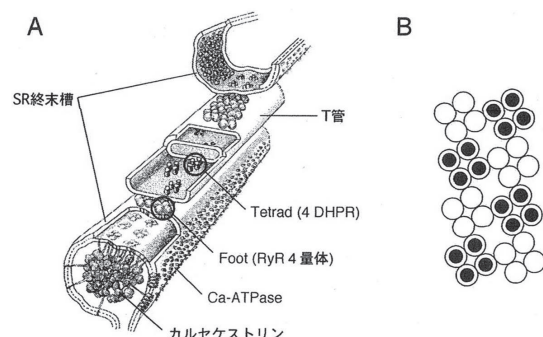


Fig. 4. Schematic diagrams of the electron-microscopic observations of triad from toadfish swim bladder

ります. footとtetradとの関係はFig. 4Bに示します³⁾. 沼研のマウスを用いた分子生物学的研究によりfootは Ca^{2+} 遊離チャネルーリアノジン受容体RyR四量体であり⁴⁾, tetradは膜電位センサーであるジヒドロピリジン受容体 (DHPR) であることが同定されました⁵⁾. 更にTakeshimaらによりRyRモノマーのcDNA配列が決定され, 5,000強のアミノ酸残基からなる巨大分子であることが分かりました⁴⁾. 翻って我々のウシガエル骨格筋筋小胞体標品のSDS-PAGEを見ると Ca^{2+} -ATPase蛋白より大きな分子が二ないし三本認められます. どれがRyRかを確定いたしたく巨大分子の大家である丸山工作先生に相談したところ村山を推薦されました. 村山は2種類のアイソフォームがあることを確定し, 分子量の大きい方から α -RyR, β -RyRと命名しました⁶⁾. 小山田が沼研での国内留学を終えて遠藤研に戻っておりましたので遠藤先生に相談して小山田を中心として両アイソフォームのcDNA配列を決定いたしました. 初めは β -RyRは心筋型 (RyR2) と予想しておりましたが, 結論は α -RyR, β -RyRはそれぞれRyR1, RyR3と相同性が最も高い⁷⁾. これまでの既報の比較生物学的知見とも総合して骨格筋に発現するRyRアイソフォームは, 原則として哺乳類骨格筋ではRyR1のみ, 鳥類以下の脊椎動物骨格筋ではRyR1, RyR3の2種類, しかし早く収縮一弛緩する筋ではRyR1一種類であります⁸⁾⁹⁾. Clara Franzini-Armstrongによりますと2種類のアイソフォームを発現する筋では筋小胞体膨大部細胞質側parajunctional surfaceにfeetに似た構造物が Ca^{2+} -ATPaseの海の中に島状に散見されとのことです (私信).

Fig. 5Aに示す通りウシガエル骨格筋筋小胞体標品よりCHAPS (3-[(3-chloroamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate) 存在下に単離した α -RyR, β -RyRの Ca^{2+} 依存性リアノジン結合は全く同一であります. 一方, 筋小胞体標品に [^3H] ryanodineを結合させ, 約1,000倍量のcold ryanodineを加えて反応を停止させてからon iceに置くと, 結合した放射性活性は遊離しません. CHAPSを加え可溶化し, 特異的抗 β -RyR抗体を用いて免疫沈降により両者を分離すると α -RyR

の方が β -RyRに比べ著しく結合活性が低いことが分かりました (Fig. 5B)¹⁰。両者のピーク値を合わせると Ca^{2+} 濃度依存性は合致いたします (Fig. 5B挿入図)。リガンドの濃度を変え Scatchard plotすると最大結合部位数はほぼ同じですが親和性が低いことが分かりました¹⁰。哺乳類骨格筋では例外的に横隔膜に2種類のアイソフォームが発現していることが知られておりますので、牛の横隔膜より筋小胞体画分を調製し、Fig. 5Bと同様

に免疫沈降法により RyR1, RyR3 へのリアノジン結合活性を分別測定いたしました (Fig. 6A)¹¹。ピーク値を合わせますと RyR1 の方が若干 Ca^{2+} 感受性が高いようですが、顕著な差はありません。Scatchard plot いたしますと RyR1 の方が親和性は低いですが、最大結合部位数は RyR3 より 20 倍以上大きい (Fig. 6B)。RyR1, RyR3 各結合部位あたりのリアノジン結合比活性を比べるとやはり哺乳類でも RyR1 の方が RyR3 より低い (Fig. 6C)¹¹。

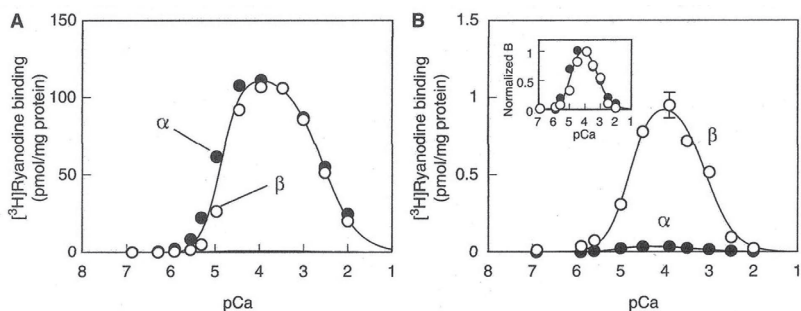


Fig. 5. Ca^{2+} dependent $[\text{H}]\text{ryanodine}$ binding to purified α -RyR and β -RyR (A) and HFSR *in situ* (B) Low results for α -RyR *in situ* were due to a low affinity of α -RyR. There was little difference in the maximum binding sites. For details, refer to Ref.¹⁰

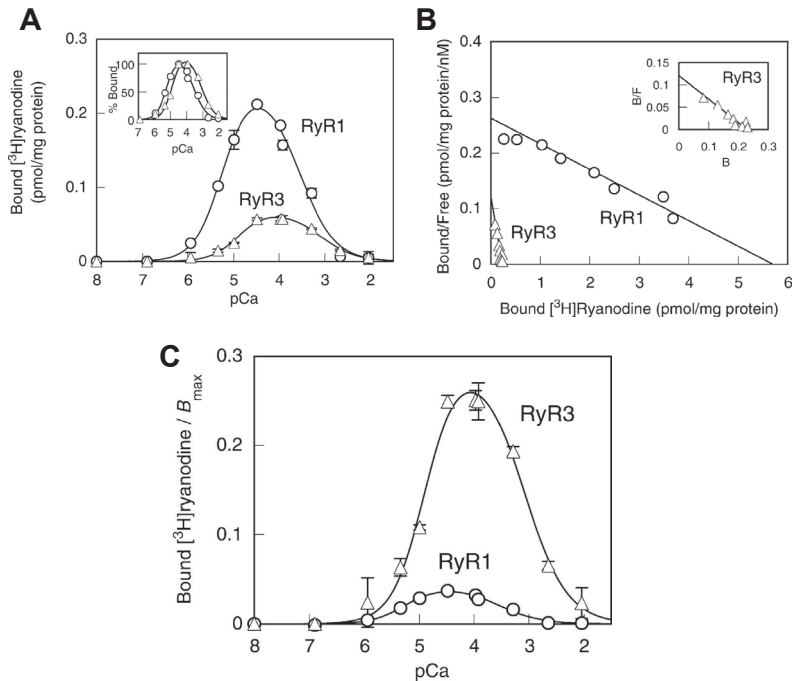


Fig. 6. Ca^{2+} dependent $[\text{H}]\text{ryanodine}$ binding to RyR1 and RyR3 of HFSR *in situ* from bovine diaphragm. A) Gross amounts to RyR1 and RyR3. B) Scatchard plots for RyR1 and RyR3. The number of the maximum binding sites (B_{max}) for RyR1 is about 20 times greater than that of RyR3, whereas the affinity of RyR1 for ryanodine is lower by a factor of 10 or more than that of RyR3. C) The binding per the unit amounts of RyR1 and RyR3, respectively. For details, refer to Ref.¹¹.

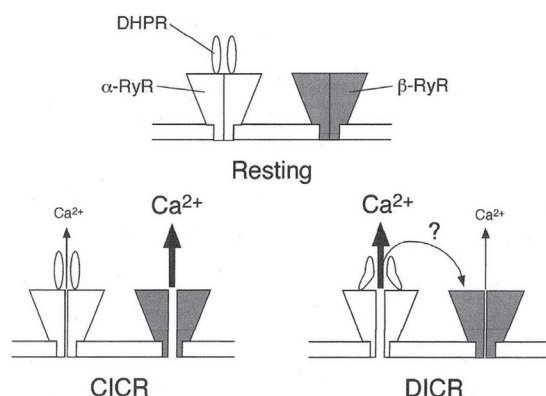


Fig. 7. Schematic drawing of Ca channels on different modes of Ca^{2+} release in the skeletal muscle.

CICR, Ca^{2+} dependent Ca^{2+} release; DICR, depolarization induced Ca^{2+} release

Fig. 5, 6をまとめますとRyR1のCICR比活性は*in situ*に於いてはCHAPS sensitiveな分子間, 分子内相互作用によりかなり低く抑えられている (Fig. 7)¹²⁾. CICRはpositive feedbackであり, positive feedbackは暴走して生命体にとっては危険であることが多い. 目的論的に考えるとCHAPS sensitiveな分子間, 分子内相互作用によりRyR1のCICR比活性を低く抑えていることが重要であると考えられる. この事は悪性高体温症の病因論を考察する際の重要な鍵となる. また, 心室筋におけるRyR2について検討しなければならない.

稿を終えるにあたり「筋生理の集い」令和元年を主催され, 発表の機会をお与えくださいました東京慈恵会医科大学分子生理学講座 竹森 重教授および教室員の皆様, またCICR発見50周年記念ミニシンポジウムを企画された順天堂大学薬理学教室 村山 尚 博士に感謝いたします.

文 献

- 1) Endo M, Tanaka M, Ogawa Y. Calcium induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of skinned skeletal muscle fibres. *Nature* 1970; 228: 34-36
- 2) Ogawa Y. Roles of ryanodine receptors. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 1994; 29: 229-274
- 3) Block BA, Imagawa T, Campbell KP, Franzini-Armstrong C. Structural evidence for direct interaction between the molecular components of the transverse tubule/sarcoplasmic reticulum junction in skeletal muscles. *J. Cell*

Biol. 1988; 107: 2587-2600

- 4) Takeshima H, Nishimura S, Matsumoto T, Ishida H, Kangawa K, Minamino N et al. Primary structure and expression from complementary DNA of skeletal muscle ryanodine receptor. *Nature* 1989; 339: 439-445
- 5) Tanabe T, Beam KG, Powell JA, Numa S. Restoration of excitation-contraction coupling and slow calcium current in dysgenic muscle by dihydropyridine receptor complementary DNA. *Nature* 1988; 336: 134-139
- 6) Murayama T, Ogawa Y. Purification and characterization of two ryanodine-binding protein isoforms from sarcoplasmic reticulum of bullfrog skeletal muscle. *J. Biochem.* 1992; 112: 514-522
- 7) Oyamada H, Murayama T, Takagi T, Iino H, Iwabe N, Miyata T, et al. Primary structure and distribution of ryanodine binding protein isoforms of the bullfrog skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 1994; 269: 17206-17214.
- 8) Ogawa Y, Kurebayashi N, Murayama T. Ryanodine receptor isoforms in excitation-contraction coupling. *Adv. Biophys.* 1999; 36: 27-64
- 9) Ogawa Y, Murayama T, Kurebayashi, N. Comparison of properties of Ca^{2+} channels between rabbit and frog skeletal muscles. *Mol. Cell. Biochem.* 1999; 190: 191-201
- 10) Murayama T, Ogawa Y. Selectively suppressed Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release activity of α -ryanodine receptor (α -RyR) in frog skeletal muscle sarcoplasmic reticulum: potential distinct modes in Ca^{2+} release between α - and β -RyR. *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 2953-2960
- 11) Murayama T, Ogawa Y. RyR1 exhibits lower gain of CICR activity than RyR3 in the SR: evidence for selective stabilization of RyR1 channel. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2004; 287: C36-C45
- 12) Murayama T, Ogawa Y. Roles of two ryanodine receptor isoforms coexisting in skeletal muscle. *Trends Cardiovasc. Med* 2002; 12: 305-311

