

【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 2.2MDa)。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、致命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 年について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 枚で定期的に培養を行った。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 3~4Å 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。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

