

特集

リアノジン受容体

小川 靖 男*

はじめに

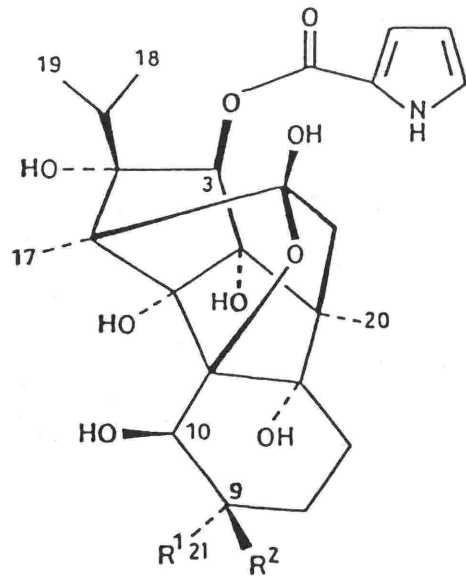
リアノジン受容体 (RyR) は現在では筋小胞体 (SR) の Ca 放出チャネルを構成する蛋白質で、そのモノマーの分子量が565 kDaの大きなタンパク質であり、リアノジン (Ry) を高親和性に結合し、その結果 Ca 放出チャネルは開口したままになると考えられている。

Ry の作用は動物種差、臓器差その外の実験条件により種々であるが、共通している点は脊椎動物骨格筋の筋拘縮 (昆虫類の骨格筋では筋弛緩)、心筋の収縮力低下である¹⁾。受容体を「薬物を結合し、その薬物の作用発現のもととなる諸反応を惹起させる生体成分」と定義通りに解釈すると、脊椎動物の骨格筋で得られる実験結果は前述 RyR の通常概念と合致するが、心筋の場合には後に詳述するように説明困難な点もあり、今後の慎重な検討が望まれる。本論文では Ry の心筋に対する作用と心筋の所謂 RyR について主に考察する。

Ry はイイギリ科 (Flacourtiaceae) の南米ベネズエラ Trinidad 原産の植物 *Ryania speciosa* の根、茎から単離したリトマス中性のアルカロイドであり、図 1 A の(1)の構造式を持つ¹⁾。しかし現在市販の「Ry」は図 1 B に示す如く、多くの不純物が混入している。図示の試料のリアノジン含有率は約16%である。不純物を多く含む粗製ものは水に不溶性である。精製していくと水溶性になる。1980年後半までは Pernick & Co., Merck Sharp and Dohme 社より供給されており、そのものは水溶性であるが、それでも Ry (1)と 9, 21-didehydroRy (2) (図 1 A の(2)) とを 1 : 1 - 1 :

3 の割合で含んでいるものと推定される。表 1 にリアノジン誘導体の生物活性を示す²⁾。(1)と(2)とは薬理作用がほぼ等しいと考えられるが、心筋 SR に対する親和性では(2)の方が(1)の約 3 倍である。以前はリアノジンの供給先及び Lot No. を記載しており、不純品を使っていることを強く意識していたが、最近の論文ではその意識が希薄になっている。AgriSystem の Ry は水に不溶性であることから推定すると、粗製のものと考えられる。著者の知る限りでは、^[3H] ryanodine と和光純薬からの精製リアノジンが99%以上の純度を示す。

図 1 A



- (1) $R^1 = Me, R^2 = H$
- (2) $R^1, R^2 = =CH_2$
- (3) $R^1 = H, R^2 = Me$

*順天堂大・医・薬理

図1 B

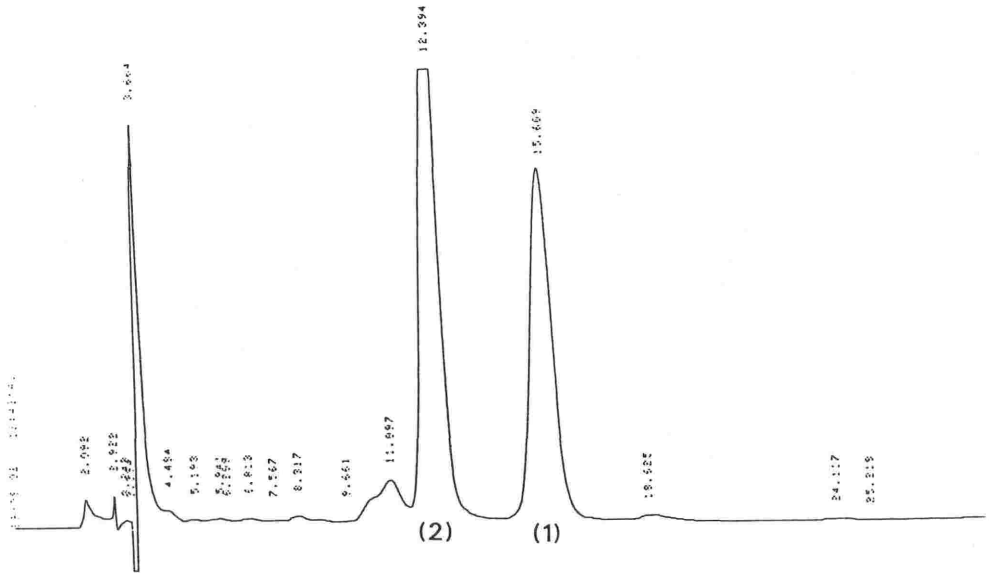


図1 Ryanodine とその誘導体

A. 化学構造式

(1), ryanodine; (2), 9, 21-didehydroryanodine; (3), 9-epiryranodine.

B. Calbiochem Ry (Lot No. 801920) の HPLC 分析結果. ピークの下の番号は A の化学構造式に対応. 分光学的に90%以上の純度というが, ryanodine は16%.

表1 Ryanodine 誘導体の活性比較²⁾

Ryanoids	LD ₅₀ (mg/kg) ^{a)}	[³ H]ryanodine 結合に対する IC ₅₀ (nM)	
		骨格筋 SR	心筋 SR
ryanodine (1) ^{b)}	0.1	27	22
9, 21-didehydroryanodine (2)	0.1	23	7
9-epiryranodine (3)	0.47	76	61
10-ketoryanodine	0.55	73	60
N, O-15-dimethylryanodine	17	384	240
anhydroryanodine	>20	>10,000	>10,000
ryanodol	>20	>10,000	>10,000

a) マウス腹腔内注射

b) 化合物名のあとの数字は図1 A 構造式中の化学構造番号に対応する.

2. 心筋に対するリアノジンの作用

図2に示す如く Ry の心筋に対する作用は一定の頻度の刺激における収縮力減少であり, その有効性 efficacy は動物種により異なる³⁾. ラット > 猫 > 犬 > ウサギの順であり, この序列は SR の関与の程度と一致するといわれている. ウサギ心筋

は Ry による抑制は僅少である. 両棲類の心筋には Ry は無効という報告もあるが⁴⁾, toad 心筋では negative inotropism を示すという報告もある⁵⁾. 我々の実験ではウシガエル心筋には無効であった. Ry の最小有効濃度はラット心筋では0.1 nM であり, 犬, 猫, ウサギ心筋では1-5 nM であった.

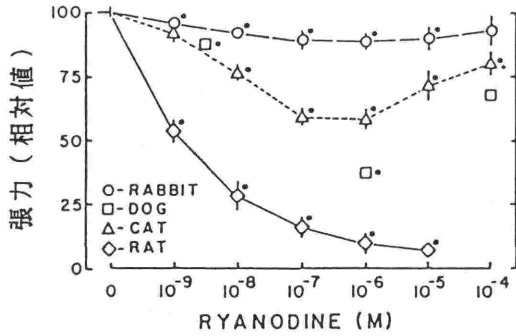


図2 ryanodine の negative inotropism 文献3) を一部変更.

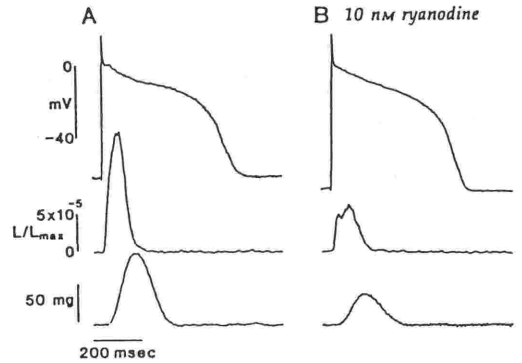


図3 犬プルキンエ線維の活動電位, $[Ca^{2+}]_i$, 収縮力に及ぼす ryanodine の作用 文献6) を一部変更.

0.1 – 1 μ M で効果が最大であった³⁾. これに対し骨格筋では 1 – 10 μ M で最大効果が得られ¹⁾, 筋の不可逆的拘縮を起す. ラット心筋では Ry 濃度が増すに従い negative inotropism も著明になり 10 μ M で収縮はほんのわずかになる. ラット以外の動物心筋では Ry の濃度に 2 相性であり, 1 μ M で効果が最大になり, それ以上の高濃度では negative inotropism の程度は濃度依存性に減少する.

この Ry の作用機作を明らかにするため, 心筋細胞 (犬 Purkinje 線維) にエクオリンを注入し, 活動電位, 細胞内 Ca^{2+} 濃度 $[Ca^{2+}]_i$ 変化, 張力を同時に測定した (図3)⁶⁾. 図3に示すように 10nM Ry により, 活動電位のプラトー持続時間はむしろ延長気味であるにも拘らず, エクオリン蛍光強度, 即ち $[Ca^{2+}]_i$ の上昇, 張力とも低下している. 1 μ M Ry で20分処理すると $[Ca^{2+}]_i$ 上昇, 張力発生とも殆ど検出できない. 活動電位には顕著な変化なく, また Ca チャネルを介する Ca-influx も, Na-Ca 交換反応も 1 – 10 μ M Ry で有意な影響を受けていないことを確認している. Ca-influx はむしろ増加していることが膜電位固定実験で報告されている. このような時に 10mM カフェインを作用させると $[Ca^{2+}]_i$ の上昇, 張力発生が見られるので SR の Ca が枯渇したためでもない. また skinned fiber の実験で収縮系の Ca^{2+} 感受性が Ry によって有意には変化していないことも確認されている. 従って心筋では膜電位変化により Ca が SR から放出される機構が Ry により不活性化されると考えられる. Fabiato⁷⁾ は skinned fiber にすると生筋での効果と同一の効果を得るためには約1000倍高濃度の Ry が必要にな

ると報告している. 後述する所謂 RyR に対する Ry の作用をもととする説明としては骨格筋では SR から放出された Ca^{2+} は細胞内に留まり, $[Ca^{2+}]_i$ を高め筋拘縮を起こすが, 心筋では Na-Ca 交換等により細胞外に排出されるので, 収縮を起すに充分な $[Ca^{2+}]_i$ に達せず, SR の Ca は枯渇するので, 収縮力低下を起すと説明されている^{8,9)}. しかし, 前述したように SR 中の Ca は枯渇していない. いずれにしても negative inotropism の作用機序の詳細については今後の研究にまたねばならない.

3. リアノジン受容体

³H] リアノジンが骨格筋 SR の開口した Ca 放出チャネルに高親和性に結合し^{2,10)}, 結合すると Ca^{2+} 依存性 Ca 放出チャネルを開口したままに固定することが明らかにされ, その蛋白質が単離され, SDS-PAGE 移動度から評価した分子量は 360 – 450kDa と推定された^{9,11,12)}. その電子顕微鏡像は一辺が約 210 Å の四辺形ないし quatrefoil をなし四量体により形成されることが明らかになった¹²⁾. このものは形態的には T-SR 間に存在し, 膜電位の脱分極によって惹起される Ca 放出即ち生理的 Ca 放出に深い関わりのあると考えられている foot 構造に酷似している. Ca^{2+} 誘発性 Ca 放出と生理的 Ca 放出とはアデニンヌクレオチドやプロカインなどのモジュレーターによる効果が異なることから機能的には別個のものと考えられるが¹³⁾, その実体は少なくとも哺乳類では RyR という同一の蛋白質であることが明らかにされた.

ウサギ骨格筋の RyR の cDNA クローンの塩基配列が Takeshima ら¹⁴⁾により始めて明らかにされて以来、種々の RyR の cDNA クローンが採られてきているが、現在3つに大別される(表2)¹⁴⁻¹⁸⁾。即ち白筋および赤筋の骨格筋にみられる骨格筋型、心筋にみられる心筋型、脳の線状体、視床、海馬など特定の部位にみられる脳型である。少なくとも骨格筋型と心筋型はその染色体が異なることが明らかにされている。心筋型の RNA は

脳全般に検出され、特に小脳に多い。小脳にはしかし脳型 RNA プローブに反応を示す RNA は存在しない。これに対し平滑筋には脳型 RAN プローブに陽性の RNA が検出されるが、mRNA が脳のものとは必ずしも同一ではない可能性がある。同一動物の骨格筋型、心筋型、脳型の cDNA クローンから推定される RyR のアミノ酸配列の概要について表3にまとめてある。脳から RyR 蛋白質を単離したという報告が最近2, 3なされて

表2 Ryanodine Receptor cDNA の種類と Ryanodine Receptor の分布

種類	分布
「骨格筋型」	1. 骨格筋 (白筋及び赤筋) 哺乳類では1種類 鳥類以下の脊椎動物では2種. slow tonic fiber では検出できず. 2. 小脳 Purkinje cell
「心筋型」	1. 心筋 哺乳類では1種 鳥類でも1種 カエルでは検出されず 2. 脳 脳全般に、特に小脳
「脳型」	1. 脳 線状体、視床、海馬など特定の部位 2. 平滑筋 mRNA は脳のものとは必ずしも同一とは限らない

表3 ウサギ Ryanodine Receptor の比較

	骨格筋 (Sk)	心筋 (C)	脳 (B)
アミノ酸残基数	5032 ^{a)} 5037	4969, 4968, 4976 ^{b)}	4872
分子量	564-565 kDa	565 kDa	552 kDa
アミノ酸配列 相同性		66% (Sk/C)	67% (Sk/B) 70% (C/B)
三者間の相違はアミノ配列全長にわたって存在する			
顕著な相違	1302-1408 4249-4626	1315-1408 4210-4562	1301から約100残基欠損 4100-4400
C端側推定 膜貫通部分		相同性は極めて高し	

a) Zorzato ら¹⁵⁾のは Takeshima ら¹⁴⁾の3481-3485 (AGDAQ) が欠損・更に2015がE→Dになっている。
 b) 3716-3723 (VTGSQRSK) が挿入されているものがある。Hakamata ら¹⁸⁾の論文ではこの部分が欠失しているもので議論している。さらに Nakai ら¹⁷⁾のは Otsu ら¹⁶⁾の74 (L→S), 1806 (G→A), 1885 (V→M), 2267 (V→欠損), 3501 (A→Q), 4496 (L→F) に相違が見られる。

いるが、脳型なのか、心筋型なのかは明らかでない。因みに同一組織に2つの isoform があることは鳥類以下の脊椎動物の骨格筋で明らかにされたが¹⁹⁾、その生物学的意義については今後の研究にまたねばならない。Murayama & Ogawa²⁰⁾はウシガエル骨格筋より2つの isoform を単離し、その特性の差異について報告している。

単離した RyR を用いての研究は主としてウサギ骨格筋と犬心筋由来のものである。その結果を表4にまとめてある^{2,8,9,21~23)}。両者はむしろ非常によく似ているというべきであろう。差があるとしても定量的なものも多く、臓器差なのか動物差なのか検討を要する。

リアノジン結合について説明を加えると骨格筋 RyR 結合部位は1種類で、その k_d は数 nM オーダーというのが妥当である。 k_d は温度、反応溶液の osmolality, Ca^{2+} 濃度、ATP やカフェインなどのモジュレーターの有無により異なる。反応

溶液の osmolality (多くは KCl か NaCl 濃度だが、蔗糖でも代替できるので) の影響が顕著であるのは意外であった。0.15 M KCl (NaCl) では Ca^{2+} 濃度だけでは Ca^{2+} 依存性リアノジン結合は検出されず、ATP やカフェインなどの修飾因子が必要で、これらの存在により k_d 値は約20倍変わらうが、1 M KCl (NaCl) 存在下では Ca^{2+} のみで Ca^{2+} 依存性リアノジン結合がみられ、促進性修飾因子による k_d の変化も高々3倍以内であり、 k_d 値はいずれの場合にも nM オーダーである²³⁾。近年骨格筋でも Ry 結合部位が2種類あるとの報告がある²⁴⁾。これはリン脂質膜二重層に埋込んだチャンネル活性に及ぼす Ry の作用が低濃度 (実際に使われているのは数-数十 μ M) Ry ではチャンネルは開口したまま固定する (但しコンダクタンスは低い) が、高濃度 (報告によっては10 μ M もあるが、多くは50 μ M 以上) ではチャンネルが閉鎖するという2種の作用があることに対応した

表4 Ryanodine 受容体の特性比較

	骨格筋 ^{a)}	<	心筋 ^{a)}
SDS-PAGE 上の Rf	Rf		Rf
活性体	四量体 (30 S)		四量体 (30 S)
リアノジン結合部位	1 種類		1 種類, 2 種類
k_d	nM-10nM オーダー		nM-数+ nM オーダー [サブ μ M- μ M オーダー]
B_{max}	1 モル/四量体		1 モル/四量体 [数モル/四量体]
チャンネル活性			
in 500 mM Ca^{2+}	100 pS		70 pS
in 500 mM Na^+	600 pS		550 pS
ryanodine の作用	μ M オーダー-30 μ M で低コンダクタンスの開口固定 10-数百 μ M でチャンネル閉鎖		
リガンドによる修飾			
μ M Ca による活性化	yes		yes
mM Ca による抑制	yes (0.15 M KCl or NaCl) No (1 M NaCl)		No
mM ATP による活性化	yes		yes (less sensitive)
caffeine による活性化	yes Ca に対するみかけの 親和性を増す		
mM Mg^{2+} , μ M ruthenium red による抑制	yes		yes (less sensitive)

a) 骨格筋のデータは主としてウサギまたはカエルの骨格筋由来のものであるのに対し、心筋のデータは犬心室筋由来のもの

ものである。Ry 結合実験では $[^3\text{H}]$ Ry だけで全濃度 (0.1nM- μM オーダー) をカバーすることは困難であり, $[^3\text{H}]$ Ry に非放射性 Ry を加えて行っている。しかし加える Ry が純粋である場合は稀れで, 多くは図1に掲げたような不純品である。事実, 純品だけでは1種類の結合部位であるものが, 不純品を加えるとみかけ上2種類となった。また Ry を加えた場合, 比放射活性が低くなり, 相対的に実験の精確度が低下するので, 実験がむずかしくなる。

心筋の Ry 結合部位は始め2種類といわれており, それが心筋の特徴と考えられていたが, 近年1種類という報告もある²¹⁾。心筋の RyR は不安定らしく, 形態的に quatrefoil を保っているものが骨格筋のものに比し少なく, 崩れたものが多いということを考え併せると, 結合部位が2種類という結論は変性途中のもの混入によるためという可能性が大きい。

RyR は一つの蛋白質で Ca^{2+} 誘発性 Ca 放出と生理的 Ca 放出の2つの機能をもつと考えられているが, 精製した RyR を用いたチャネル活性は前者のみがみられているに過ぎない。生理的 Ca 放出に対応するチャネル活性がみられないのは実験方法が悪いためなのか検討を要する。

RyR のアミノ酸配列が明らかにされ, どの部位がどの性質に関係するものか予測されているが, 沼らと MacLennan らとは意見が異なる。膜貫通部分にしても沼ら C 端側1/10の部分にある4つのセグメントと主張しているのに対し¹⁴⁾, MacLennan らはこの外に8つのセグメントの可能性を主張している¹⁵⁾。また修飾因子に関係する部分にしても沼らは3614-4457が重要と考えているのに対し, MacLennan らは2619-3016が重要と考えている。

これに関連して Ca^{2+} 誘発性 Ca 放出が先天的に起こりやすいために生ずるブタの悪性高体温症候群の RyR は615の Arg (R) が Cys (C) に変異したためであることが明らかにされた。ヒトではこれに対応した変異 (但し614) のほかに248の Gly (G) \rightarrow Arg (R) に変異した例やそのほかの可能性も報告されている²⁵⁾。

RyR の分子生物学的研究はこれからが本番である。

文 献

- 1) Jenden, D. J. and Fairhurst, A. S.: The pharmacology of ryanodine, *Pharmacol. Rev.* **21** : 1-25,
- 2) Pessah, I. N., Waterhouse, A. L. and Casida, J. E.: The calcium-ryanodine receptor complex of skeletal and cardiac muscle., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **128** : 449-456, 1985.
- 3) Sutko, J. L. and Willerson, J. T.: Ryanodine alteration of the contractile state of rat ventricular myocardium : Comparison With dog, cat, and rabbit ventricular tissues., *Circ. Res.* **46** : 332-343, 1980.
- 4) Chapman, R.: Excitation-contraction coupling in cardiac muscle., *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **35** : 1-52, 1979.
- 5) Nayler, W. G.: Effect of ryanodine on cardiac muscle., *Amer. J. Physiol.* **204** : 975-978, 1963.
- 6) Marban, E. and Wier, W. G.: Ryanodine as a tool to determine the contributions of calcium entry and calcium release to the calcium transient and contraction of cardiac Purkinje fibers., *Circ. Res.* **56** : 133-138, 1985.
- 7) Fabiato, A.: Effects of ryanodine in skinned cardiac cells, *Fed. Proc.* **44** : 2970-2976, 1985.
- 8) Inui, M., Saito, A. and Fleischer, S.: Isolation of the ryanodine receptor from cardiac sarcoplasmic reticulum and identity with the feet structures, *J. Biol. Chem.* **262** : 15637-15642, 1987.
- 9) Anderson, K., Lai, F. A., Liu, Q.-Y., et al.: Structural and functional characterization of the purified cardiac ryanodine receptor- Ca^{2+} release channel complex., *J. Biol. Chem.* **264** : 1329-1335, 1989.
- 10) Fleischer, S., Ogunbunmi, E. M., Dion, M. C., et al.: Localization of Ca^{2+} release channels with ryanodine in junctional terminal cisternae of sarcoplasmic reticulum of fast skeletal muscle, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **82** : 7256-7259, 1985.
- 11) Imagawa, T., Smith, J. S., Coronado, R., et al.: Purified ryanodine receptor from skeletal muscles sarcoplasmic reticulum is the Ca^{2+} -permeable pore of the calcium release channel, *J. Biol. Chem.* **262** : 16636-16643, 1987.
- 12) Lai, F. A., Erickson, H. P., Rousseau, E., et al.: Purification and reconstitution of the calcium release channel from skeletal muscle, *Nature* **331** : 315-319, 1988.
- 13) Endo, M.: Calcium release from the sarcoplasmic reticulum., *Physiological Review* **57** : 71-108, 1977.
- 14) Takeshima, H., Nishimura, S., Matsumoto, T., et al.: Primary structure and expression from complementary DNA of skeletal muscle ryanodine receptor, *Nature* **339** : 439-445, 1989.
- 15) Zorzato, F., Fujii, J., Otsu, K., et al.: Molecular cloning of cDNA encoding human and rabbit forms of the Ca^{2+} release channel (ryanodine receptor) of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum., *J. Biol. Chem.* **265** : 2244-2256, 1990.
- 16) Otsu, K., Willard, H. F., Khanna, V. K., et al.: Molecular cloning of cDNA encoding the Ca^{2+} release channel (ryanodine receptor) of rabbit cardiac muscle sarcoplasmic reticulum., *J. Biol. Chem.* **265** : 13472-13483, 1990.
- 17) Nakai, J., Imagawa, T., Hakamata, Y., et al.: Primary structure and functional expression from cDNA of the

- cardiac ryanodine receptor calcium release channel., FEBS Letters **271** : 169-177, 1990.
- 18) Hakamata, Y., Nakai, J., Takeshima, H., et al.: Primary structure and distribution of a novel ryanodine receptor / calcium release channel from rabbit brain, FEBS Letters **312** : 229-235, 1992.
 - 19) Airey, J. A., Beck, C. F., Murakami, K., et al.: Identification and localization of two triad junctional foot protein isoforms in mature avian fast twitch skeletal muscle., J. Biol. Chem. **265** : 14187-14194, 1990.
 - 20) Murayama, T. and Ogawa, Y.: Purification and characterization of 2 ryanodine-binding protein isoforms from sarcoplasmic reticulum of bullfrog skeletal muscle, J. Biochem. **112** : 514-522, 1992.
 - 21) Imagawa, T., Takasago, T. and Shigekawa, M.: Cardiac ryanodine receptor is absent in type I slow skeletal muscle fibers : Immunochemical and ryanodine binding studies., J. Biochem. **106** : 342-348, 1989.
 - 22) Ogawa, Y. and Harafuji, H.: Effect of temperature on [³H] ryanodine binding to sarcoplasmic reticulum from bullfrog skeletal muscle., J. Biochem. **107** : 887-893, 1990.
 - 23) Ogawa, Y. and Harafuji, H.: Osmolarity-dependent characteristics of [³H] ryanodine binding to sarcoplasmic reticulum., J. Biochem. **107** : 894-898, 1990.
 - 24) Lai, F. A., Misra, M., Xu, L., et al.: The ryanodine receptor-Ca²⁺ release channel complex of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. Evidence for a cooperatively coupled, negatively charged homotetramer., J. Biol. Chem. **264** : 16776-16785, 1989.
 - 25) MacLennan, D. H. and Phillips, M. S.: Malignant hyperthermia., Science **256** : 789-794, 1992.