

カテコラミン誘発性多形性心室頻拍関連心臓リアノジン受容体遺伝子変異に関する 3D in silico モデルを用いた変異部位の解析

研究分担者 牧山 武

所 属 京都大学大学院医学研究科循環器内科学

研究要旨

【目的】 カテコラミン誘発性多形性心室頻拍（CPVT）は、運動時の致死性心室性頻拍による突然死を特徴とし、約70%の症例に心臓リアノジン受容体をコードする RYR2 遺伝子の変異が検出される。RyR2 は巨大な蛋白であるため変異チャネルの機能解析が困難であり、病原性が不明な VUS (Variant of Unknown Significance) が多いことが問題となっている。本研究では、検出された RYR2 変異の病原性を検討するために、3D in silico モデルを用いた変異部位との関連を検討した。

【対象と方法】 112 症例にて検出された RYR2 遺伝子 93 変異において、3D in silico モデルを用いた検討を行い、タンパク質内の変異部位の特徴に関して検討した。

【結果】 低温電子顕微鏡法による RyR2 の 3D 構造モデルを用いて変異部位の解析を行い、RyR2 サブユニットやドメイン間のインターフェース、FKBP12.6 結合予測部位、カルシウム結合部位、チャネル孔に近接した変異を多く認め、RyR2 チャネル機能への影響が示唆された。

【結論】 本研究より、RyR2-3D in silico モデルは、CPVT 関連 RYR2 変異の機能異常を予測するのに有用である可能性が示唆された。今後、変異部位と臨床症状のさらなる検討が必要である。

A. 研究目的

心臓リアノジン受容体 (RyR2) は、心筋細胞の興奮時に筋小胞体より Ca^{2+} を放出し筋線維の収縮に関わる重要なイオンチャネル蛋白である。本遺伝子 (RYR2) の変異により、カテコラミン誘発性多形性心室頻拍 (Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia (CPVT)) 等の遺伝性致死性不整脈疾患が引き起こされることが知られているが、RyR2 は、105 エクソン、496 アミノ酸に及ぶ巨大な蛋白であり、また、筋小胞体上に存在するため、遺伝子検査にて変異が検出されても病原性が不明な VUS (Variant of Unknown Significance) が多いことが問題となっている。我々は、遺伝性不整脈疾患にて検出された RYR2 変異の病原性を検討するために、3D in silico モデルを用いて変異部位のチャネル構造における特徴に関して検討した。

B. 研究方法

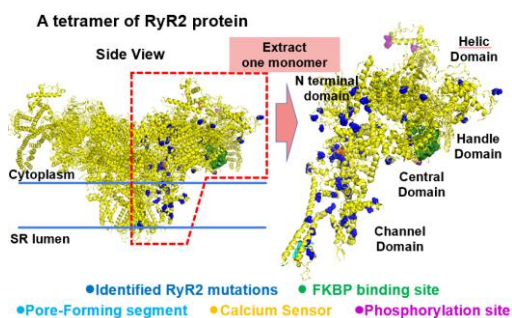
112 症例の遺伝子検査にて検出された RYR2 93 変異において、RyR2 の低温電子顕微鏡法 (Cryo-EM) を用いた 3D 構造モデル (Peng et al. Science 2016) を用いた検討を行った。3D 構造の可視化に関しては、PyMOL (Version 2.1, Schrodinger, LLC) を用いた。
(倫理面への配慮)
遺伝子検査に関しては、書面によるインフォームドコンセントにより行われた。

C. 研究結果

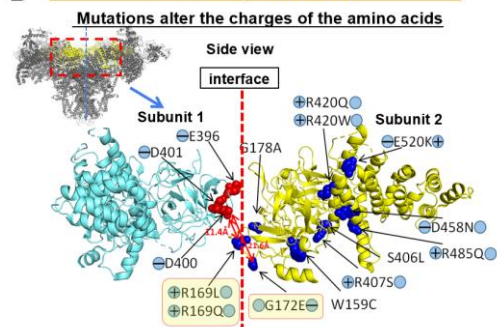
RyR2 は 4 量体にてチャネルを形成しており、Cryo-EM RyR2 3D モデルを用いて、図 A のように 93 変異を plot した。N-terminal part では、9/13 変異において、アミノ酸の電荷の変化が生じており、それによるサブユニット間の不安定性が

RyR2 の開口を促進させている可能性が示唆された (図 B)。また、Periphery part では、22/33 変異が、二つの FKBP12.6 結合予測部位に近接しており、FKBP12.6 蛋白の結合に影響を及ぼす可能性が示唆された (図 C)。Channel part では、16/40 変異が、近接するドメインまたはサブユニットの境界に位置し、12 変異はカルシウムセンサー部位、4 変異は、チャネル孔形成部位に位置していた (図 D)。

A Location of 93 RYR2 mutations in 3D in silico model

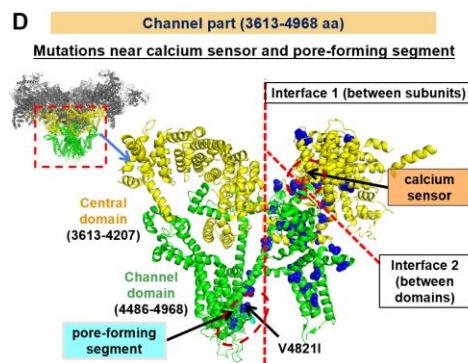
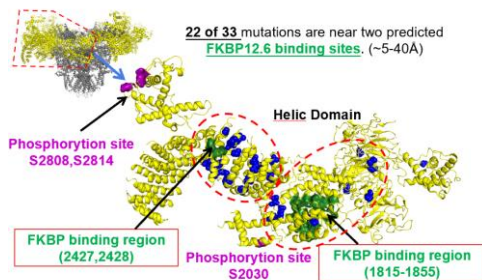


B N-terminal part (1-642 aa)



C Periphery part of the cytoplasmic canopy (643-3528 aa)

Mutations possibly linked with FKBP12.6 binding affinity



D. 考察

本研究より、多くの変異において RyR2 蛋白質における位置の特徴が明らかとなった。

Limitation としては、in silico モデルであり、実験による機能変化の validation が必要であると考える。我々は、ゲノム編集技術を用いた iPS 細胞モデルの作製をすすめており、本 in silico モデルの検討と変異 RyR2 チャネルの wet な機能解析結果を併せることにより、詳細な変異チャネルの機能変化に関する prediction が可能になると考えられた。

E. 結論

3D in silico モデルは、CPVT 関連 RYR2 変異の病原性を予測するのに有用である可能性が示唆された。今後、wet な実験結果も含めた変異部位と臨床症状のさらなる検討が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

[英文]

1. Wu Q, Hayashi H, Hira D, Sonoda K, Ueshima S, Ohno S, Makiyama T, Terada T, Katsura T, Miura K, Horie M. Genetic variants of alcohol-metabolizing enzymes in Brugada syndrome: Insights into syncope after drinking alcohol. *J Arrhythm.* 2019;35(5):752-759. doi: 10.1002/joa3.12227. eCollection 2019 Oct. PMID: 31624517
2. Yoshinaga D, Baba S, Makiyama T, Shibata H, Hirata T, Akagi K, Matsuda K, Kohjitani H, Wuriyanghai Y,

- Umeda K, Yamamoto Y, Conklin BR, Horie M, Takita J, Heike T. Phenotype-Based High-Throughput Classification of Long QT Syndrome Subtypes Using Human Induced Pluripotent Stem Cells. **Stem Cell Reports**. 2019;13(2):394- 404. doi: 10.1016/j.stemcr.2019.06.007. Epub 2019 Aug 1. PMID: 31378668 (査読有)
3. Takayama K, Ohno S, Ding WG, Ashihara T, Fukumoto D, Wada Y, Makiyama T, Kise H, Hoshiai M, Matsuura H, Horie M. A de novo gain-of-function KCND3 mutation in early repolarization syndrome. **Heart Rhythm**. 2019 Jun 4. pii: S1547-5271(19)30543-0. doi: 10.1016/j.hrthm.2019.05.033. [Epub ahead of print] PMID: 31173922 (査読有)
4. Yamada N, Asano Y, Fujita M, Yamazaki S, Inanobe A, Matsuura N, Kobayashi H, Ohno S, Ebana Y, Tsukamoto O, Ishino S, Takuwa A, Kioka H, Yamashita T, Hashimoto N, Zankov DP, Shimizu A, Asakura M, Asanuma H, Kato H, Nishida Y, Miyashita Y, Shinomiya H, Naiki N, Hayashi K, Makiyama T, Ogita H, Miura K, Ueshima H, Komuro I, Yamagishi M, Horie M, Kawakami K, Furukawa T, Koizumi A, Kurachi Y, Sakata Y, Minamino T, Kitakaze M, Takashima S. Mutant KCNJ3 and KCNJ5 Potassium Channels as Novel Molecular Targets in Bradyarrhythmias and Atrial Fibrillation. **Circulation**. 2019 Feb 15. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.118.036761. PMID: 30764634 (査読有)
5. Shimizu W, Makimoto H, Yamagata K, Kamakura T, Wada M, Miyamoto K, Inoue-Yamada Y, Okamura H, Ishibashi K, Noda T, Nagase S, Miyazaki A, Sakaguchi H, Shiraishi I, Makiyama T, Ohno S, Itoh H, Watanabe H, Hayashi K, Yamagishi M, Morita H, Yoshinaga M, Aizawa Y, Kusano K, Miyamoto Y, Kamakura S, Yasuda S, Ogawa H, Tanaka T, Sumitomo N, Hagiwara N, Fukuda K, Ogawa S, Aizawa Y, Makita N, Ohe T, Horie M, Aiba T. Association of Genetic and Clinical Aspects of Congenital Long QT Syndrome With Life-Threatening Arrhythmias in Japanese Patients. **JAMA Cardiol**. 2019 Feb 13. doi: 10.1001/jamacardio.2018.4925. PMID: 30758498 (査読有)
- [和文]**
1. 堀江 稔, Wuriyanghai Yimin, 牧山 武, 【心臓電気生理を理解して不整脈診療に活かす】 識る ヒト iPS 細胞由来心筋細胞の電気生理学, **Heart View**, 2019, 578-585
2. 牧山 武, 失神の診断と治療 心原性、致死性不整脈疾患の鑑別 特に遺伝性不整脈疾患に関して, **てんかん研究**, 2019, 450
3. 山本 雄大, 牧山 武, Calmodulinopathy(カルモジュリン遺伝子関連不整脈疾患) iPS 細胞技術を用いた疾患モデルの作製と遺伝子治療へのアプローチ, **心電図**, 2019, 273-282
- 2. 学会発表**
- [国際学会]**
1. Kashiwa A, Makiyama T, Kohjitani H, Wuriyanghai Y, Yamamoto Y, Gao J, Huang H, Ishikawa T, Ohno S, Toyoda F, Sato S, Horie M, Makita N, Kimura T. Modeling Overlap Syndrome Of Long QT And Brugada Syndrome Associated With CACNA1C-E1115K Which Alters Ion Selectivity With Induced Pluripotent Stem Cells. 40th Heart Rhythm Scientific Sessions 2019.5.8-11(5.9), San Francisco, U.S.A, poster(E)
2. Kohjitani H, Kouda S, Himeno Y, Makiyama T, Kashiwa A, Wuriyanghai Y, Yamamoto Y, Horie M, Kimura T, Noma A, Amano A. Automatic Computational Action Potential Analyzing System Enables Accurate Drug Response Interpretation and Prediction in Human Induced Pluripotent Stem Cell-derived Cardiomyocytes. 40th Heart Rhythm Scientific Sessions 2019.5.8-11(5.10), San Francisco, U.S.A, poster(E)
3. Gao J, Makiyama T, Ohno S, Yamamoto Y, Wuriyanghai Y, Kohjitani H, Kashiwa A, Huang H, Katou K, Horie M, Kimura T. Structural Insights into Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia-associated RyR2 Mutant Channels using a

- Three-dimensional In Silico Model. European Society of Cardiology Congress 2019 (ESC2019), 2019.8.31-9.4(9.3), Paris, France, moderated poster(E)
4. Yamamoto Y, Makiyama T, Wuriyanghai Y, Kohjitani H, Hirose S, Gao J, Kashiwa A, Hai H, Aizawa T, Imamura T, Ishikawa T, Ohno S, Chonabayashi K, Motomura H, Yoshida Y, Horie M, Makita N, Kimura T. KCNQ1 Channel Dysfunction in human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes carrying a CALM2-N98S mutation associated with long QT syndrome. American Heart Association Scientific Sessions 2019 (AHA2019), 2019.11.16-18(11.18), Philadelphia, USA, poster(E)
 5. Wuriyanghai Y, Makiyama T, Yamamoto Y, Kohjitani H, Hirose S, Gao J, Kashiwa A, Huang H, Aizawa T, Imamura T, Ohno S, Horie M, Kimura T. Morphological and electrophysiological characterization of homozygous lamin A/C knockout human induced-pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. American Heart Association Scientific Sessions 2019 (AHA2019), 2019.11.16-18(11.17), Philadelphia, USA, poster(E)
 6. Yamamoto Y, Makiyama T, Wuriyanghai Y, Kohjitani H, Hirose S, Gao J, Kashiwa A, Hai H, Aizawa T, Imamura T, Ishikawa T, Ohno S, Chonabayashi K, Motomura H, Yoshida Y, Horie M, Makita N, Kimura T. Response of KCNQ1 to Adrenergic Stimulation was Impaired in Human Induced Pluripotent Stem Cell-derived Cardiomyocytes Carrying a CALM2-N98S Mutation Associated with Long QT Syndrome. 12th Asia Pacific Heart Rhythm Society Scientific Session (APHR2019), 2019.11.24-27, Bangkok, Thailand, poster(E)
 7. Kohjitani H, Kouda S, Himeno Y, Makiyama T, Kashiwa A, Wuriyanghai Y, Yamamoto Y, Horie M, Kimura T, Noma A, Amano A. Algorithmic Auto-Recreation System of hiPSC-CMs Simulation and Prediction of Drug Testing. 12th Asia Pacific Heart Rhythm Society Scientific Session (APHR2019), 2019.11.24-27, Bangkok, Thailand, poster(E)
 8. Aizawa T, Makiyama T, Huang H, Imamura T, Gao J, Wuriyanghai Y, Yamamoto Y, Kohjitani H, Hirose S, Kashiwa A, Kohjitani H, Ohno S, Horie M. Patients characteristics of idiopathic ventricular fibrillation carrying SCN5A mutations without Brugada or long QT syndrome. 12th Asia Pacific Heart Rhythm Society Scientific Session (APHR2019), 2019.11.24-27, Bangkok, Thailand, poster(E)
- [国内学会]
1. Kohjitani H, Kouda S, Himeno Y, Makiyama T, Huang H, Gao J, Kashiwa A, Wuriyanghai Y, Yoshinaga D, Kimura T, Amano A. Algorithmic Auto-Recreation System of hiPSC-CMs Simulation and Prediction of Drug Testing. 第 83 回日本循環器学会学術集会 2019.3.29-31(3.31), 横浜, poster(J)
 2. Kashiwa A, Makiyama T, Ohno S, Aoki H, Kohjitani H, Wuriyanghai Y, Yamamoto Y, Gao J, Hai H, Horie M, Kimura T. Overlapping Sick Sinus Syndrome Associated with SCN5A Mutations in Patients with Brugada Syndrome. 第 83 回日本循環器学会学術集会 2019.3.29-31(3.31), 横浜, Best poster session (E)
 3. Gao J, Makiyama T, Ohno S, Yamamoto Y, Wuriyanghai Y, Kohjitani H, Kashiwa A, Horie M, Kimura T. Three-Dimensional Structural Analysis of Mutant Ryanodine Receptor Type 2 Channels Associated with Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia. 第 83 回日本循環器学会学術集会 2019.3.29-31(3.31), 横浜, poster(E)
 4. Kashiwa A, Makiyama T, Kohjitani H, Wuriyanghai Y, Yamamoto Y, Gao J, Huang H, Ishikawa T, Ohno S, Toyoda F, Sato S, Horie M, Makita N, Kimura T. Modeling Overlapping Phenotypes of Long-QT and Brugada Syndrome with CACNA1C-E1115K that Alters Ion Selectivity of the Cardiac L-Type Calcium Channel Using Induced Pluripotent Stem Cells. 第 66 回日本不整脈心電学会学術大会 2019.7.24-27 (7.25), 横浜, Oral (E), Young Investigator Award (YIA) Competition 1st prize
 5. Kohjitani H, Kouda S, Himeno Y, Makiyama T, Huang H, Gao J, Kashiwa A, Wuriyanghai Y, Yoshinaga D, Kimura T, Amano A. Algorithmic Auto-Recreation

System of hiPSC-CMs Simulation and Prediction of Drug Testing. 第66回日本不整脈心電学会学術大会 2019.7.24-27 (7.26), 横浜, Oral(J)

6. Yamamoto Y, Makiyama T(代発表), Wuriyanghai Y, Kohjitani H, Hirose S, Gao J, Kashiwa A, Hai H, Ishikawa T, Ohno S, Chonabayashi K, Suda K, Yoshida Y, Horie M, Makita N, Kimura T, Single Cell Electrophysiological Analysis of iPS Cell-derived Cardiomyocytes Generated from Long-QT Syndrome Patients Carrying a CALM2 Mutation Using a Membrane Potential Imaging System. 第66回日本不整脈心電学会学術大会 2019.7.24-27 (7.25), 横浜, Oral(E)
7. Gao J, Makiyama T, Ohno S, Yamamoto Y, Wuriyanghai Y, Kohjitani H, Kashiwa A, Huang H, Katou K, Horie M, Kimura T. Structural Insights into Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia-associated RyR2 Mutant Channels using a Three-dimensional in Silico Model. 第66回日本不整脈心電学会学術大会 2019.7.24-27 (7.25), 横浜, Oral(E)
8. Yoshinaga D, Baba S, Makiyama T, Shibata H, Hirata T, Akagi K, Matsuda K, Kohjitani H, Wuriyanghai Y, Umeda K, Yamamoto Y, Bruce R. Conklin, Horie M, Takita J, Heike T. Phenotype-based High-throughput Classification of Long-QT Syndrome Subtypes Using Human Induced Pluripotent Stem Cells. 第66回日本不整脈心電学会学術大会 2019.7.24-27 (7.26), 横浜, Oral(E)
9. Wuriyanghai Y, Makiyama T, Sasaki K, Kamakura T, Yamamoto Y, Hayano M, Harita T, Nishiuchi S, Chen J, Kohjitani H, Hirose S, Yokoi F, Gao J, Chonabayashi K, Watanabe K, Ohno S, Yoshida Y, Kimura T, Horie M. Complex aberrant splicing in the induce pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes from a patient with long-QT syndrome carrying KCNQ1-A344Aspl mutation. 第66回日本不整脈心電学会学術大会 2019.7.24-27 (7.26), 横浜, Oral(J) 第24回日本不整脈心電学会学術奨励賞選考会
10. Makiyama T. Challenges of iPS cell-Based Disease Modeling and Therapeutic Approaches to Inherited

Arrhythmias 第3回日本循環器学会基礎研究フォーラム(BCVR2019), 2019.9.6-8 (9.6), 東京, Oral(E), シンポジウム・不整脈の分子基盤, invited

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし