

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

豬骨骼肌 RYANODINE RECEPTOR

單一離子通道特性之研究

Single channel studies of

porcine skeletal muscle ryanodine receptor

計畫編號：NSC 89-2313-B-002-062

執行期限：88年8月1日至89年7月31日

主持人：鍾德憲

國立台灣大學畜產學系

一、中文摘要

緊迫敏感豬的存在對畜產業界造成極大損失。人類也有稱為惡性高熱症的類似疾病，會由特定麻醉劑所引發，究其原因為其骨骼肌中肌漿質網上之鈣離子釋放通道（又稱為 ryanodine receptor, RyR）鈣釋放異常所造成。對 ryanodine receptor 的進一步瞭解，不僅對骨骼肌之興奮—收縮耦合（Excitation-Contraction coupling）機制的瞭解有所增進，而且可藉此找出可能抑制疾病的方法，對畜產業界有所助益。

本計畫目的在以平面雙脂膜實驗系統，探討不同基因型骨骼肌之 ryanodine receptor 在不同物質影響下之單一通道電生理性質。此計畫分兩部份進行：第一部份判定實驗樣本之基因型，並從樣本肌肉中分離出 ryanodine receptor。第二部份則以平面雙脂膜實驗系統，對 ryanodine receptor 進行單一通道實驗，同時探討不同物質對正常及突變通道影響的差異性。

初步結果顯示：惡性高熱症豬 ryanodine receptor 的單一通道電導與正常豬相似，對不同物質（包含 ATP, ryanodine, Mg^{2+} , ruthenium red）的反應也與正常豬類似。但在對鈣離子的依賴

性上則有所差異，細胞質面鈣離子濃度小於 10^{-4} M 時兩者都隨著鈣離子濃度增加而激發活性。當鈣離子濃度繼續增加時，正常豬之 ryanodine receptor 開始呈現被鈣離子抑制的現象，而惡性高熱症豬 ryanodine receptor 則要在鈣離子濃度增至 10^{-3} M 時才開始有被抑制的現象產生。其間詳細的差異性，需待更進一步地探討。

關鍵詞：骨骼肌、興奮—收縮結合、肌漿質網、鈣釋放通道、惡性高熱症、緊迫敏感、單一通道

Abstract

Porcine Stress Syndrome cause huge lost in pigs raising industry. In human, there is a similar disease called Malignant Hyperthermia (MH), which is triggered by anesthetics like halothane. This is caused mainly by abnormal calcium release from calcium release channel (CRC), also been identified as ryanodine receptor (RyR), located on sarcoplasmic reticulum (SR) of skeletal muscle. The understanding of function of RyR can further facilitate the understanding of mechanism of excitation-

contraction coupling (E-C coupling), which is abnormal in MH muscle. We hope that this study can lead us find out ways to control the syndrom and help the industry.

This project is using planer lipid bilayer experimental system to study single channel properties of ryanodine receptor, which including different genetic types, under effect of different substanc. This project will be conducted in two parts. The first part is to identify the genetic type of experimental sample, then extract the ryanodine receptor from skeletal muscle. The second part is to conduct, using planer lipid bilayer system, single channel rcording of ryanodine receptor, and study the difference of normal and MH ryanodine receptor under the effects of different substance.

Initial results show: The single channel conductance of MH ryanodine receptor is similar with that of normal one. The reaction to different substances, including ATP, ryanodine, Mg^{2+} , ruthenium red, both normal and MH are similar. But the dependence of cis Ca^{2+} is different, when concentration of cis Ca^{2+} less than 10^{-4} M both channel are activated in dose dependent manner. When Ca^{2+} continue to increase, the normal ryanodine receptor start to show inhibition effect by Ca^{2+} , whereas MH ryanodine recptor shows similar inhibition effect only when Ca^{2+} concentration increase to above 10^{-3} M. The detail difference and inhibition mechanism need further study.

Keywords: Skeletal muscle, excitation-contraction coupling, sarcoplasmic reticulum, calcium release channel, ryanodine receptor, malignant hyperthermia susceptible, single channel

二、緣由與目的

豬惡性高熱症 (malignant hyperthermia, MH) 已被証實圍一種遺傳疾病, 具有此基因突變的豬在緊迫狀況下, 易引起症狀而猝死, 所以又稱為緊迫敏感 (stress susceptible), 其結果導致養豬業重大的經濟損失。惡性高熱症的發生與肌纖維鈣離子釋放之異常有關, 經基因的研究發現 MH 的突變基因與 CRC (ryanodine receptor, RyR) 的突變基因連鎖。這個 RyR 的突變是由單一基因造成 (Fuji et al., 1991)。由分離的 RyR 在人工雙脂膜的實驗發現, MH 的 RyR 對各種激發物如 Ca, Caffeine, ATP, ryanodine 等的反應較正常 RyR 敏感 (Fill et al., 1990)。

骨骼肌的收縮是由肌肉橫細管系統 (transverse tubular system) 薄膜的去極化 (depolarization) 導致鈣離子從肌質網內釋放至肌漿中, 鈣離子與收縮蛋白 Troponin 等之結合即引發肌肉之收縮。從骨骼肌的電壓箝制實驗 (voltage-clamp) 中, 發現薄膜中的電荷移動 (charge movement) (Schneider & Chandler, 1973) 在控制鈣離子釋放上扮演著重要的角色, 因此電荷移動被稱為骨骼肌興奮-收縮結合 (excitation-contraction coupling, E-C coupling) 機制的電壓感應器 (Rios & Pizarro, 1991; Schneider, 1994)。在此結合機

制中扮演重要角色的兩個薄膜蛋白質 (dihydropyridine receptor, DHPR & RyR) 已分別被分離及複製出來 (Tanabe et al., 1987; Takeshima et al., 1989)。由分離並純化的蛋白質進行人工雙膜實驗更證實 RyR 即是肌質網上之鈣釋放通道 (CRC) (Lai et al., 1988)，而 DHPR 則是產生電荷移動的電壓感應器 (Rios & Brum, 1987, Tanabe et al., 1988)。

單一肌纖維實驗近年來發展至可以同時測量電荷移動及鈣離子釋放，結果發覺這兩者有極密切的相關性。從基因研究可知，在 MH 肌肉中沒有第二個突變，所以可判斷 DHPR 電荷移動的變化可能是因為與 RyR 的交互作用而造成。因此，MH 肌肉可成爲一個研究 DHPR 與 RyR 交互作用及 E-C coupling 機制的極佳實驗模式。

單一離子通道的電生理研究，是自 1980 年以來，除了分子技術外，生命科學中極大的突破。此項技術使得科學家們在適當情況下，可以觀察、偵測到單一個蛋白質分子正在活動的狀況，意即離子通道開啓後離子快速通過的情景，可在眼前捕捉得到。因此所有發生於細胞膜上的生理現象，都因為這項技術的成熟而能被人們逐漸瞭解。MH 的基因突變發生於 ryanodine receptor (即鈣離子釋放通道)，其生理作用發生極大影響，但在其分子層面到底發生什麼變化，正常與突變後的通道到底有何差別。欲解開這些謎，則非得由單一離子通道實驗才能達成。至目前爲止，探討 MH 豬骨骼肌生理異常的機制，已有初步結果。比較正常與 MH 豬隻單一肌纖維生理反應，發覺主要差別在於鈣釋放機制，也即是鈣離子釋放通道有所差別。因此持續已進行的骨骼肌研究，

很自然地進一步將重點移至 ryanodine receptor，並將研究範圍從細胞階層推進至分子階層。於是探討 ryanodine receptor 分子作用的單一離子通道實驗即是最佳且唯一的選擇。

本計畫打算從判定實驗樣本豬隻之基因型著手，接著將樣本骨骼肌之 ryanodine receptor 分離出來。接下來以所得之 ryanodine receptor 進行單一離子通道實驗，探討其電生理性質，並從不同內源性及外源性調節物質作用下，比較不同基因型 ryanodine receptor 之反應。希望能從分子階層的瞭解而確定其肌纖維鈣釋放之生理調控機制，其結果將可對骨骼肌 DHPR 與 ryanodine receptor 交互作用的機制提供另一層面之證據，這將有助於解開骨骼肌 E-C coupling 之謎。

三、結果與討論

實驗分兩部份進行：第一部份是 ryanodine receptor 的分離，其中包括：利用緊迫敏感基因確定實驗用豬之基因型、將 ryanodine receptor 從肌肉中分離出來。第二部份是 ryanodine receptor 單一離子通道之電生理性質。其中包括：建立平面雙脂膜實驗系統、ryanodine receptor 單一離子通道電生理特性、比較正常豬與惡性高熱症豬 ryanodine receptor 單一離子通道性質之差異。

1. 豬隻基因型之篩檢

此計畫之最終目標是比較正常與緊迫敏感豬 ryanodine receptor 之離子通道性質。樣本的取得必須先確定其基因型，才能正確地解釋實驗結果。此計畫以基因篩檢爲根據判定豬隻的基因型，採取的方

法是使用 Lockley et al. (1996) 描述的突變點拆離式聚合酶連鎖反應 (Mutagenically Separated Polymerase Chain Reaction, MS-PCR) 來檢測豬隻的遺傳型。簡單來說，以 Hal-1843 附近已知的核甘序列，設計三種引子，一為針對正常基因、一為針對突變基因、另一為上述兩引子共用的逆向引子。將此三種引子與從豬隻血液中分離的 DNA 混合，然後進行 PCR 反應。其產物經電泳呈相，若僅有 114 bp 片段者，則為正常型；若僅有 134 bp 片段者，則為突變型；而雜合型則有兩個片段。

在隨機取得豬隻樣本中，五十隻中僅有一隻為雜合型，其餘均為正常型。可見突變型在一般市場中已不易見，所以採購突變型公豬精液為雜合型母豬進行配種，以求得不同基因型之突變後代豬隻，以進行計畫中之實驗。

2. 豬骨骼肌 ryanodine receptor 之分離

參考 Lai et al. (1988) 所用方法，取豬後腿內側骨骼肌，加入含有各種抑制劑的緩衝液後予以均質，經過數次不同程度的離心與過濾，所得的樣本貯存於 -70°C 以為後續分析與實驗用。所得樣本進一步以 $[\text{H}^3]\text{ryanodine}$ 與樣本蛋白質結合，然後在電泳上標定蛋白質位置，以確定所得蛋白質為 ryanodine receptor。

前述方法所得之 pellet 乃是所謂重肌質網 (heavy SR) 所形成的 vesicles。由於重肌質網部分貼近橫係管系統，富含 ryanodine receptor，絕大部分 vesicles 在被均質形成時，其方向都是一致的，即是 vesicle 內部屬肌質網內，而 vesicle 外則是細胞質面 (Miller, 1978)，因此 ryanodine receptor 在 vesicle 上的排列方向也是一致的。

3. 建立平面雙脂膜實驗系統

平面雙脂膜實驗系統是以純化的磷脂模擬細胞膜，然後將分離純化的膜蛋白質融合其中，在可控制的環境下進行膜蛋白的電生理實驗。由於 ryanodine receptor 是屬於內質網上的膜蛋白，在正常生理狀態下，一般微玻璃電極管並無法觸及，所以雙脂膜系統是探討 ryanodine receptor 電生理性質唯一的選擇。

雙脂膜系統之實驗槽室以塑膠間隔分為兩部分，模擬細胞內外，分別注入近似細胞質 (cis chamber) 與內質網 (trans chamber) 之溶液，然後以鹽橋皆通電極而與記錄線路連通。在塑膠間隔上有一 $200\ \mu\text{m}$ 直徑的小洞，實驗時，將純化的磷脂成分以適當比例混合後，塗在洞口以造成磷脂雙膜。然後將前述分離之含 ryanodine receptor 之 vesicles 注入 cis chamber，將溶液攪拌，待 vesicle 融入磷脂膜。若 ryanodine receptor 嵌入磷脂膜，離子即會通過通道而產生電流，此時即可進行系列實驗。

由於單一離子通道電流非常小 (在 pA 範圍)，所以在線路上必須有放大倍數極大的放大器，才能偵測到訊號。實驗進行時，其他雜訊也會同時被放大而顯現在訊號中，掩蓋住訊號的清晰，因此實驗系統之電訊隔絕是這系統之最大要求。解決方法為：一是採用稱為法拉第籠的金屬網，以隔絕電磁波之干擾；另一為使用防震裝置，隔絕建築物或空氣之振動干擾實驗訊號。這兩者主要裝置可以去除大半雜訊，剩餘雜訊則需要在濾波器及線路安排上下功夫。必須使得訊號雜訊比超過 2 以上，所得的結果才具可信度。

4. ryanodine receptor 之單一通道性質

這實驗所偵測的離子流是以 Cs^+ 代

替 Ca^{2+} (以 250 mM CsCl 在 cis side 和 50 mM CsCl 在 trans side)。這種方式可以 (1) 避免使用大量鈣離子因而降低鈣離子的釋放率；(2) 去除來自肌漿網上鉀離子通道的干擾，因為 Cs^+ 可以阻斷鉀離子通道；(3) 增進訊號對雜訊比，因為對鈣釋放通道的電導 Cs^+ 比 Ca^{2+} 高兩倍。首先，以正常豬隻之 ryanodine receptor 探討其基本電生理性質，在 10 μM cis Ca^{2+} 狀況下，改變電位以偵測其電流。單一離子通道之電流會隨電位變化而呈正相關變化，此結果可用以計算求得單一離子通道之電導，其結果為 385 ± 26 pS ($n = 6$)。接下來，探討 ryanodine receptor 釋放鈣的調節因子：(1) ATP，2 mM 的 ATP 增加鈣釋放通道的開啓機率達 3 倍之多；(2) ryanodine，在 μM 濃度範圍內會減低通道的電導，同時增加通道的平均開啓時間，而在 mM 濃度範圍，則反而有抑制通道開啓的作用；(3) Mg^{2+} ，在 mM 濃度時會阻斷通道的所有活性；(4) ruthenium red，在 μM 濃度範圍內也會抑制通道作用。以上豬隻 ryanodine receptor 之單一離子通道性質均與以發表文獻上兔子、綿羊、青蛙之骨骼肌 ryanodine receptor 性質相似。

5. 正常豬與惡性高熱症豬 ryanodine receptor 性質之比較

在肌纖維的實驗中顯示，惡性高熱症豬骨骼肌鈣釋放性質與正常豬的最大差別，在於對許多內源性刺激因素都顯得較為敏感，但其敏感的原因何在只能由單一離子通道實驗結果才能夠辨別。以基因型為突變型的豬隻 ryanodine receptor 重複前述實驗，結果發現單一離子通道電導較正常豬 ryanodine receptor 稍大， 432 ± 36 pS ($n=5$)。而在 ATP，

ryanodine, Mg^{2+} , ruthenium red 的調控情形，結果都與正常豬之 ryanodine receptor 相同。接著比較兩者對 cis Ca^{2+} 濃度的依賴度，鈣離子濃度從 pCa 7 變化至 pCa 2，然後計算各濃度下通道之開啓機率。結果如下，pCa 從 7 至 4，正常與突變通道隨著鈣離子濃度逐漸被活化。當 pCa 小於 4 時，正常通道開始被 cis Ca^{2+} 所抑制，而突變通道仍保持長時間開啓狀態。當 Ca^{2+} 濃度為 1 mM 時，正常通道已完全關閉，而突變通道則需要 Ca^{2+} 濃度大於 10 mM 時才關閉。

四、成果自評

研究內容與原計畫的相符程度約為百分之七十。原計畫預定成果包括豬隻基因型之篩檢、ryanodine receptor 之分離、平面雙脂膜實驗系統之建立及正常與 MH 豬之 ryanodine receptor 單一離子通道之實驗結果比較。

執行計畫一年下來，豬隻基因型之篩檢，已能充分掌握。所需豬隻之不同基因型樣本都以自行配種的方法取得。

豬骨骼肌 ryanodine receptor 之分離，按文獻上所提供之方法，所得之 vesicles 在以下的實驗中，都有相當的穩定性。平面雙脂膜系統的建立，在實驗槽室攪拌裝置上，及電流訊號的雜訊去除上，都遇到頗大的困難，雖然預定的實驗仍可順利進行，但是在訊號上仍須改進。

ryanodine receptor 的單一離子通道的電生理性質及受調節物質調控的情形，與文獻上的結果相類似。在比較正常與 MH 豬 ryanodine receptor 對鈣離子濃度的依賴性時，發現 MH 豬 ryanodine receptor 對高濃度鈣離子的抑制性較正常者差近十倍，此結果似乎可以解釋肌纖

維實驗中，在突變豬肌纖維中鈣離子對鈣釋放的抑制效果較正常豬差的結果。

五、參考文獻

1. Fill, M., R. Coronado, J. R. Mickelson, J. Vilven, J. Ma, B. A. Jacobson, and C. F. Louis. 1990. Abnormal ryanodine receptor channels in malignant hyperthermia. *Biophysical Journal*. 50:471-475.
2. Fuji, J., K. Otsu, F. Zorzato, S. de Leon, V. K. Khanna, J. E. Weiler, P. J. O'Brien, and D. H. MacLennan. 1991. Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. *Science*. 253:448-451.
3. Lai, F. A., H. P. Erickson, E. Rousseau, Q.-Y. Liu, and G. Meissner. 1988. Purification and reconstitution of the calcium release channel from skeletal muscle. *Nature*. 331:315-319.
4. Lockley, A. K., J. S. Bruce, S. J. Franklin and R. G. Bardsley. 1996. Use of mutagenically separated PCR for the detection of the mutation associated with porcine stress syndrome. *Meat Science*. 43(2): 93-97.
5. Miller, C. 1978. Voltage-gated cation conductance channel from fragmented sarcoplasmic reticulum : steady-state electrical properties. *Journal Membrane Biology*. 40:1-23.
6. Rios, E., and G. Brum. 1987. Involvement of dihydropyridine receptors in excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *Nature*. 325:717-720.
7. Rios, E. and G. Pizarro. 1991. Voltage sensor of excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *Physiological Reviews*. 71:849-908.
8. Schneider, M. F. 1994. Control of calcium release in functioning skeletal muscle fibers. *Annual of Reviews of Physiology*. 56:463-484.
9. Schneider, M. F., and W. K. Chandler. 1973. Voltage-dependent charge movement in skeletal muscle:a possible step in excitation-contraction coupling. *Nature*. 242:244-246.
10. Tanabe, T., K. G. Beam, J. A. Powell, and S. Numa. 1988. Restoration of excitation-contraction coupling and slow calcium current in dysgenic muscle by dihydropyridine receptor complementary DNA. *Nature*. 336:134-139.
11. Tanabe, T., H. Takeshima, A. Mikami, V. Flockerzi, H. Takahashi, K. Kangawa, M. Kojima, H. Matsuo, T. Hirose, and S. Numa. 1987. Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle. *Nature*. 328:313-318.
12. Takeshima, H., S. Nishimura, T. Matsumoto, H. Ishida, K. Kangawa, N. Minamino, H. Matsuo, M. Ueda, M. Hanaoka, T. Hirose, and S. Numa. 1989. Primary structure and expression from complementary DNA of skeletal muscle ryanodine receptor. *Nature*. 339:439-445.